

AUS DEM MEDIZINISCHEN ZENTRUM FÜR HUMANGENETIK
GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR: PROF. DR. RER. NAT. K. H. GRZESCHIK
DES FACHBEREICHS MEDIZIN DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG
IN ZUSAMMENARBEIT MIT DEM UNIVERSITÄTSKLINIKUM GIEßEN UND MARBURG GMBH,
STANDORT MARBURG

Studie zur Häufigkeit und Art von Chromosomenanomalien
unter frühen Spontanaborten ohne in vitro Wachstum

-

Retrospektive Untersuchung
mittels Comparativer Genomhybridisierung (CGH)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Marion Pircher, geborene Bruns
aus Kevelaer

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 19. April 2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: PD Dr. rer. nat. B. Fritz

Correferent: Prof. Dr. rer. nat. M. Eilers

1. Einleitung	1-30	
1.1	Definition des Aborts	1
1.2	Verlaufsformen der Fehlgeburt	1
1.3	Allgemeine Abortursachen und Häufigkeit von Spontanaborten	2
1.4	Genetische Ursachen für Fehlgeburten	6
1.4.1	Chromosomale Aberrationen in Abhängigkeit des Gestationsalters	7
1.4.2	Art der Chromosomenaberration unter Spontanaborten	8
1.4.3	Aneuploidierate in den verschiedenen Schwangerschaftsstadien	10
1.4.4	Mechanismen und Ursachen der Aneuploidie in Spontanaborten	15
1.4.5	Einfluß des mütterlichen Alters auf die Entstehung von Trisomien	16
1.4.6	Parentale Herkunft von autosomalen Trisomien unter Spontanaborten	18
1.4.7	Wiederholungsrisiko für Spontanaborte in Abhängigkeit vom chromosomalen Befund	20
1.4.8	Chromosomale Befunde bei habituellen Aborten	21
1.5	Comparative Genomhybridisierung (CGH)	24
1.5.1	Sensitivität und Validität der CGH	27
1.6	Ziele der vorliegenden Arbeit	29
2. Material und Methoden	31-58	
2.1	Material	31
2.1.1	Chemikalien	31
2.1.2	Lösungen, Puffer und Medien	32
2.1.2.1	Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur	32
2.1.2.2	Lösungen für die DNA-Extraktion und -Fällung	33
2.1.2.3	Reagenzien für die Nick-Translation	34

2.1.2.4	Reagenzien für die Comparative Genom- hybridisierung (CGH) und FISH-Analysen mit Zentromerspezifischen Sonden	34
2.1.2.5	PCR-Zusätze und Primer	35
2.1.2.6	Lösungen für Gelelektrophoresen	36
2.1.2.7	Reagenzien zur Silberfärbung	36
2.1.3	Geräte und Zubehör	37
2.1.4	Untersuchungsmaterial	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	Untersuchung der Plazentae und Embryos	39
2.2.1.1	Makroskopische Begutachtung der Plazentae, Fixation und Paraffineinbettung	39
2.2.1.2	Histologische Färbungen	39
2.2.1.3	Histologische Beurteilung der Plazentae	40
2.2.1.4	Makroskopische Beurteilung der Embryos	40
2.2.2	Lymphozytenkultur	40
2.2.3	Chromosomenpräparation	41
2.2.4	DNA-Isolierung	41
2.2.4.1	DNA-Isolierung aus Blut	41
2.2.4.2	DNA-Isolierung aus Abortgewebe	43
2.2.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	43
2.2.6	Nick-Translation	44
2.2.6.1	Vorbereitung der Nukleotide	44
2.2.6.2	Markierung der genomischen DNA	44
2.2.6.3	Herstellung der Hybridisierungsmischung	45
2.2.7	Comparative Genomhybridisierung	46
2.2.7.1	Vorbereitung der Chromsomenpräparate	46
2.2.7.2	Fluoreszenz-Detektion und Waschung	47
2.2.7.3	Auswertung der CGH mittels digitaler Bildanalyse	48
2.2.8	Fluoreszenz- in situ-Hybridisierung (FISH)	49
2.2.8.1	Vorbereitung der Sonden und Hybridisierung	50
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion	51

2.2.9.1	Primer und PCR-Standardbedingungen	52
2.2.10	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	53
2.2.10.1	Agarosegelelektrophorese	54
2.2.10.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	55
2.2.10.3	Silberfärbung	56
3.	Ergebnisse	59-91
3.1	Ergebnisse der CGH	59
3.2	Parentale Herkunft der Chromosomenaberrationen	73
3.3	Zottenhistologie der Spontanaborte	76
3.4	Fetalpathologische Untersuchungen	78
3.5	Vergleich der Ergebnisse mit denen der Kontrollgruppen	84
3.5.1	Gestationsalter zum Zeitpunkt des Aborts	86
3.5.2	Maternales Alter	87
3.5.3	Aberrationsrate und Aberrationstyp	88
3.5.3.1	Gonosomenkonstellation bei triploiden Abort-Karyotypen	89
3.5.4	Sex-Ratio	90
3.5.5	Zottenhistologie	90
4.	Diskussion	92-112
4.1	CGH	92
4.1.1	Effizienz der CGH im Vergleich zur Effizienz der Aussage nach Zellkultur	92
4.1.2	Wertigkeit der CGH im Rahmen der Aufdeckung chromosomaler Imbalancen bei Frühaborten	96
4.1.3	Plazentamorphologie, Korrelation mit dem chromosomalen Befund der CGH-Analyse und mit der parentalen Herkunft der Chromosomenaberrationen	100
4.1.4	Sex-Ratio	104

4.1.5	Limitationen der CGH	106
4.1.6	Zukünftige Entwicklungen	111
5. Zusammenfassung		113-115
Anhang		A1-A21
	Literaturverzeichnis	A1
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	A16
	Danksagung	A18

1. Einleitung

1.1 Definition des Aborts

Eine Schwangerschaft, welche vor Erreichen der Lebensfähigkeit des Kindes zum Ende kommt, wird als Fehlgeburt bezeichnet.

Die WHO-Definition von 1977 dazu lautet: „The expulsion or extraction from its mother of an embryo or fetus weighing 500 g or less“ (WHO 1977). Diese Gewichtsdefinition entspricht in etwa der 20. – 22. Woche und war als absolute Grenze zur Lebensfähigkeit angesehen worden. Durch die Fortschritte in der Intensivbehandlung von Frühgeborenen gibt es zur Zeit bereits einzelne extreme Frühgeborene, die mit einem Geburtsgewicht von 350 g oder einem Gestationsalter von 23 Schwangerschaftswochen überlebt haben.

Hinsichtlich der Abortursache und eventueller prophylaktischer Maßnahmen gibt es noch eine Unterscheidung in Früh- und Spätaborte. Die Grenze zwischen Früh- und Spätaborten liegt im Bereich der 16. SSW. Innerhalb der Gruppe der Frühaborte werden in neuerer Zeit noch Frühestaborte unterschieden, welche nur biochemisch nachweisbar sind (Hinney, 2001).

1.2 Verlaufsformen der Fehlgeburt

Die Klinik der Fehlgeburt ist klassischerweise durch das Auftreten von Blutungen und, oder Unterleibsschmerzen, bei fortgeschrittenem Gestationsalter auch durch den Abgang von Fruchtwasser oder Geweben charakterisiert.

Als Verlaufsformen der Fehlgeburt sind zu unterscheiden:

- **Abortus imminens:** Die drohende Fehlgeburt bei intakter Gravidität. Bei sonografisch nachgewiesenen Vitalitätszeichen wird meist mit Bettruhe, gegebenenfalls mit Gestagenen, von der 10. - 12. Woche an tokolytisch behandelt. Bei unzureichendem Zervixverschuß kann eine Cerclage (operative Zervixumschlingung) notwendig werden.

- **Abortus incipiens:** Der beginnende Abort ist durch das Fehlen von Vitalitätsmerkmalen vom Abortus imminens abzugrenzen. Da hier keine Aussicht auf Erhalt der Schwangerschaft besteht, wird der Uterus operativ entleert. Der Abortkürettage wird dann abhängig vom Schwangerschaftsalter eine Behandlung durch intrazervikale Prostaglandingabe vorgeschaltet.
- **Verhaltener Abort (missed abortion):** Hier ist es zum Absterben der Frucht und Retention derselben im Uterus gekommen, ohne daß (zunächst) Symptome der Fehlgeburt auftreten. Auch hier ist umgehend mit der Abortkürettage zu beginnen.
- **Abortus incompletus:** Unvollständig ausgestoßene Anteile des Schwangerschaftsproduktes können Anlaß zu starken Blutungen sein; die Behandlung besteht wiederum in der sofortigen Kürettage.
- **Abortus completus:** Auch bei anzunehmender kompletter Ausstoßung der Frucht ist die Nachkürettage angezeigt.
- **Abortus febrilis:** Ist es durch Keimaszension zur Infektion des Abortgewebes gekommen, so wird der Uterus druckempfindlich, es finden sich laborchemische Infektionszeichen (Leukozytose, CRP-Anstieg), die rektale Temperatur ist erhöht. Die Abortkürettage ist unter intravenöser Antibiotikagabe vorzunehmen (nach Martius 1996).

1.3 Allgemeine Abortursachen und Häufigkeit von Spontanaborten

Die menschliche Reproduktion ist erstaunlich ineffektiv: Mindestens 70% der Konzeptionen, so vermutet man, enden letal, die meisten unbemerkt in den ersten vier Wochen nach der Befruchtung.

Roberts and Lowe postulierten bereits 1975 eine Verlustrate von 78%. Miller et al. (1980), Edmonds et al. (1982) und Wilcox et al. (1988) fanden in kleinen prospektiven Studien durch Bestimmung des β -hCGs bei Frauen in der Lutealphase, dass 31-(43)-62% der Schwangerschaften vorzeitig endeten. 22-(33)-57% der nachgewiesenen Konzeptionen gingen in der Postimplantationsphase klinisch unerkannt zugrunde. Da allerdings bei diesen Untersuchungen der β -hCG-Test erst ab dem 28. Tag p. m. zuverlässig positiv war, konnten Aborte in den ersten 14 Tagen p. c. nicht erfasst werden. Da auf

diese Weise die Präimplantationsphase nicht beurteilt werden konnte, liegt die Verlustrate vermutlich noch höher. Neueste Beobachtungen aus Studien mit assistierenden Reproduktionsverfahren deuten auf eine Implantationsrate von unter 20% hin (Munné et al. 2003). Es ist jedoch anzunehmen, dass die Implantationsrate nach extrakorporaler Befruchtung niedriger liegt, als bei spontan eingetretener Schwangerschaft.

Unter klinisch beobachteten Fehlgeburten gibt es übereinstimmend eine Konzentration auf das erste Schwangerschaftsdrittel. Mehr als die Hälfte der Spontanaborte werden in den ersten 8 Wochen diagnostiziert, etwa 80% der spontanen Aborte finden in den ersten 12 Wochen der Schwangerschaft statt (Fantel und Shepard 1980, Hinney 2001).

Es gibt zahlreiche Abortursachen (s. Tab. 1.1a und b); im Einzelfall kann es unmöglich sein, das Entstehen zweifelsfrei zu klären.

Tab. 1.1a Abortursachen (Martius et al. 1994)

Maternale Abortursachen

Genitale Anomalien:

- Baustörungen (uterine Doppelbildung, intrauterine Synechien)
- Uterustumoren (Myome)
- Zervixinsuffizienz (Trauma, Bindegewebsschwäche)
- Endometriuminsuffizienz (endokrine Störung, Schäden nach Abrasionen)
- Infektionen (Zervizitis, Endometritis)
- Hypermotilität (Fieber, psychovegetative Störung)

Extragenitale Anomlien:

- Endokrine Störung (Diabetes mellitus, Hyperthyreose, Tetanie)
 - Infektionen (infektiöse bzw. toxische Fruchtschäden, fieberbedingte Hypermotilität des Uterus)
 - Anämie
 - Trauma
 - Konsumierende Erkrankungen
-

Tab. 1.1b Abortursachen (Martius et al. 1994)

Fetoplazentare Abortursachen:

- Chromosomenaberrationen
- Trophoblastanomalien (Hypo- oder Hyperplasien, Gefäßmangel)
- Nidationsanomalien (Plazenta praevia)
- Funktionelle Trophoblaststörung (endokrine Insuffizienz)
- Gestörte Immuntoleranz
- Gesteigerte Thromophilie (Lupusantikoagulanz)

Spermatogener Abort:

- Genetische Defekte
- Spermaanomalien (numerische Anomalien, Teratospermie, Enzymstörung)
- Chromosomenanomalien

Iatrogene und artifizielle Aborte:

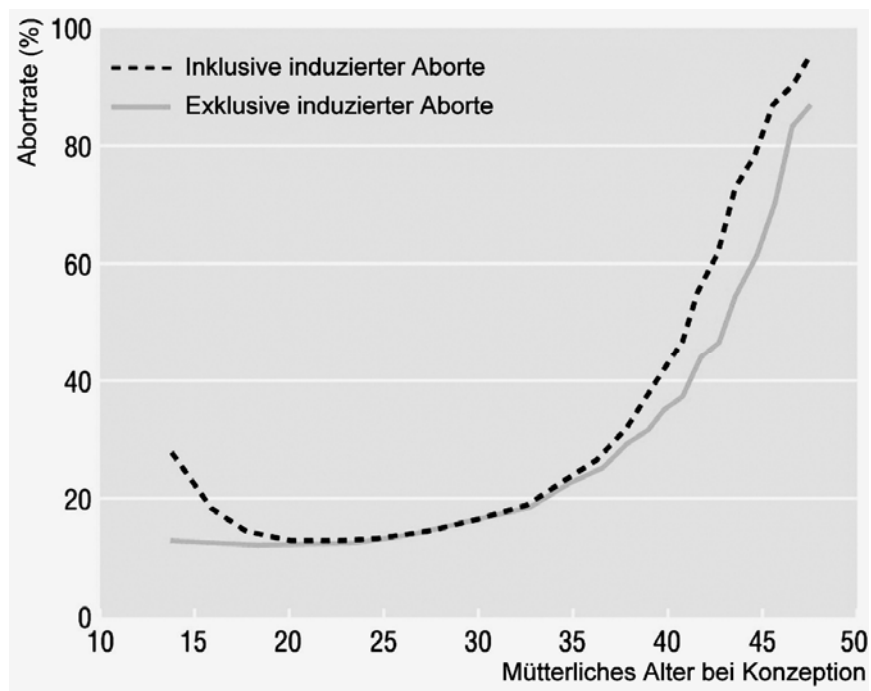
- Ionisierende Strahlen
 - Kurzwellen
 - Medikamente
 - Impfungen
 - Abruptio
-

Es gibt jedoch einige Faktoren, deren Auswirkungen auf die Entstehung und die Häufigkeit von Spontanaborten durch Studien gut belegt sind:

Eine positive Korrelation zwischen der Spontanaborte und **mütterlichem Alter** ist schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt (Boué et al. 1969, Kline and Stein 1987), wobei die zugrundeliegende Ursache bisher ungeklärt blieb. In einer prospektiven Studie untersuchten Nybo Andersen und Mitarbeiter (2000) die Abhängigkeit der Spontanaborte vom mütterlichen Alter über einen Zeitraum von 14 Jahren. Sie konnten eindeutig zeigen, dass das maternale Alter ein unabhängiger und starker Risikofaktor für das Auftreten einer Fehlgeburt ist. Nybo Andersen et al. (2000) ermittelten ein durchschnittliches Abortrisiko von 10,9%. Frauen zwischen 20 und 24 Jahren hatten ein etwas niedrigeres Risiko als der Durchschnitt mit 8,9%. Das Abortrisiko nimmt dann kontinuierlich zu, und steigt für Frauen ab 35 Jahren exponentiell an: Frauen zwischen 35 und 39 Jahren hatten eine Aborte von knapp 20%. Bei 40-jährigen Frauen hatte sich die Aborte verdoppelt (41%), bei über 45-jährigen

Frauen stieg die Abortinzidenz auf 75% der beobachteten Schwangerschaften, (Abb. 1.1).

Abb. 1.1 Wahrscheinlichkeit eines Spontanaborts in Abhängigkeit vom mütterlichem Alter zum Zeitpunkt der Konzeption (nach Nybo Andersen, 2000).



Die gestrichelte Linie entspricht den unkorrigierten Werten, die durchgezogene Linie den Werten nach Berücksichtigung geplanter Abruptiones.

Die Wahrscheinlichkeit eines Aborts steigt auch mit der Anzahl vorausgegangener Fehlgeburten an. In diesem Zusammenhang spricht man bei drei oder mehr Spontanaborten in Folge von **habituellen Aborten**. Bei einer angenommenen Abortwahrscheinlichkeit von 15% ist das rechnerische Risiko für das zufällige Auftreten von zwei aufeinanderfolgenden Aborten $0,15^2 = 2,25\%$, für drei Aborte in Folge $0,15^3 = 0,34\%$. Die tatsächlich beobachtete Rate ist jedoch wesentlich höher (Tab. 1.2) 1-3% aller Frauen mit Kinderwunsch leiden unter habituellen Aborten (Wieacker, 2002). Die Ergebnisse einer Auswertung von 10 Studien zur Abhängigkeit der Abortrate von der Zahl

vorausgegangener Aborte wurden von Stirrat (1990) zusammengestellt (Tab.1.2).

Tabelle 1.2 Wahrscheinlichkeit eines Aborts in Abhängigkeit von der Zahl vorausgegangener Fehlgeburten (Auswertung von 10 Studien n. Stirrat, 1990)

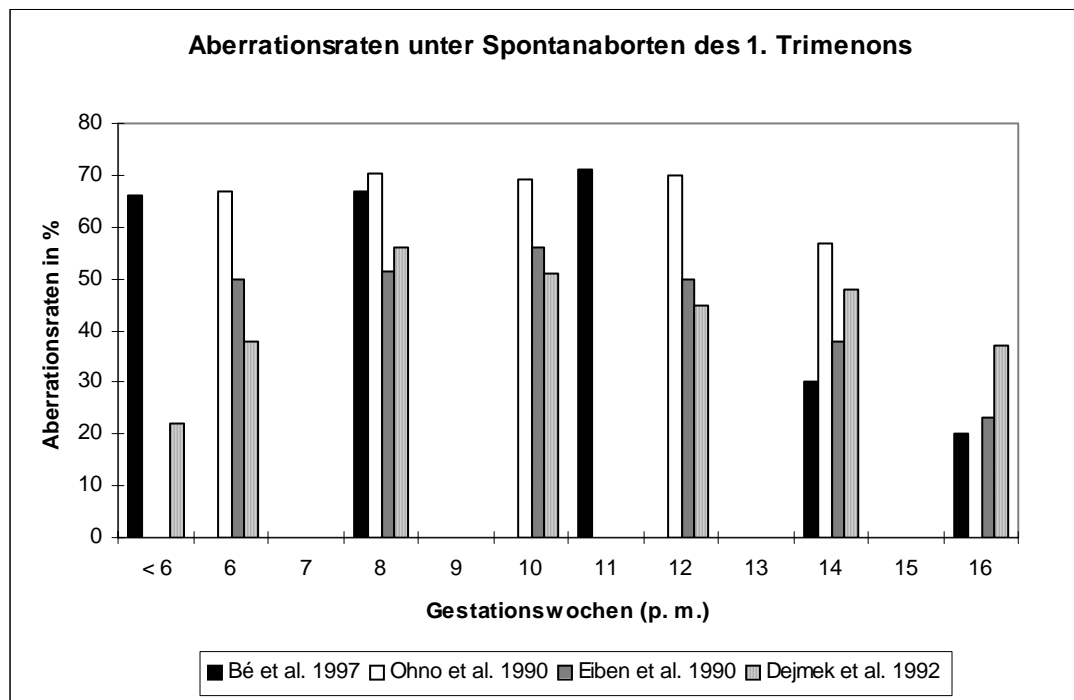
Aborte	Wahrscheinlichkeit eines Aborts in Prozent		
	Retrospektive Studien (n = 4)	Kohortenstudien (n = 2)	Prospektive Studien (n = 4)
0	12,8 (11,0-15,2)	10,7 (10,4; 10,9)	
1	21,3 (16,8-26,2)	20,0 (18,0; 22,1)	13,5 (13,2-13,8)
2	29,0 (19,2-35,3)	27,4	24,4 (17,4-31,3)
≥ 3	31,1 (26,2-37,0)	-	33,1 (24,9-45,7)

Nach diesen Daten liegt die Wahrscheinlichkeit eines positiven Schwangerschaftsverlaufs trotz dreier vorausgegangener Fehlgeburten noch über 65%.

1.4 Genetische Ursachen für Fehlgeburten

Chromosomenaberrationen stellen eine Hauptursache für Spontanaborte dar. Sie werden in 60% aller Spontanaborte des ersten Schwangerschaftsdrittels nachgewiesen (Abb 1.2).

Abb. 1.2 Aberrationsraten unter frühen Spontanaborten



Die hohe Rate an chromosomalen Imbalancen in Spontanaborten wird als natürliche Selektion verstanden (Gardo 1993): Nach Wells und Delhanty (2000) beträgt die Rate an Chromosomenaberrationen bei Präimplantationsembryonen ca. 45%, sofern diese normal entwickelt erscheinen. Ausgehend von einer durchschnittlichen Aneuploidierate von 0,6% bei Neugeborenen kann man davon ausgehen, dass über 98% aller aneuploiden Embryonen bzw. Feten intrauterin absterben (Wieacker, 2002).

1.4.1 Chromosomale Aberrationen in Abhängigkeit des Gestationsalters

Die Wahrscheinlichkeit eines chromosomal bedingten Aborts ist dabei um so höher, je früher der Abort eintritt. Im weiteren Schwangerschaftsverlauf nehmen sowohl die Abortrate als auch die Häufigkeit der Aborte mit chromosomalen Veränderungen ab (Abb. 1.2, Tab. 1.5)

1.4.2 Art der Chromosomenaberration unter Spontanaborten

Die gepoolten Daten von mehr als 20 000 Spontanaborten ergaben, dass autosomale Trisomien mit ca. 58% aller Chromosomenaberrationen die häufigsten Chromosomenanomalien darstellen, gefolgt von Monosomie X-Karyotypen und Triploidien mit jeweils 15%. Tetraploidien machen 4,8% und strukturelle Aberrationen 5,1% aller pathologischen Karyotypen aus (s. Tab. 1.3a und b).

Tab. 1.3a Aberrationsraten und Chromosomenanomalien unter Spontanaborten, Studienübersicht

Autoren	Aberrationsrate gesamt	Autosom. Trisomien	X0	Tri-ploidien	Tetra-ploidien	Strukt. Anomalie	Andere
Boué et al. 1975	61,5%	53,7%	15,2%	19,9%	6,2%	3,8%	1,2%
Creasy et al. 1975	30,5%	52,6%	24,0%	13,2%	4,2%	3,5%	2,4%
Lauritsen 1976	54,9%	46,4%	28,6%	10,0%	8,6%	2,9%	3,6%
Takahara et al. 1977	47,0%	59,6%	12,8%	20,2%	2,1%	4,3%	1,1%
Hassold et al. 1980	46,3%	49,2%	24,2%	15,1%	7,1%	4,3%	0,7%
Kajji et al. 1980	53,9%	60,6%	18,2%	12,0%	3,3%	5,1%	1,2%
Warburton et al. 1980	32,3%	47,8%	15,4%	15,7%	4,5%	2,9%	12,5%
Meulenbroek et al. 1982	61,7%	54,0%	24,0%	12,0%	2,0%	-	8,0%
Andrews et al. 1984	18,8%	48,3%	27,6%	10,3%	3,4%	3,4%	6,9%
Geisler et al. 1987	39,2%	60,0%	20,0%	13,8%	-	6,2%	-
Gueneri et al. 1987	76,7%	69,0%	9,0%	9,0%	2,1%	8,3%	6,9%
Eiben et al. 1990	50,7%	60,3%	10,5%	12,1%	4,2%	4,7%	8,1%
Ohno et al. 1991	69,4%	64%	7%	-	-	6%	14%
Dejmek et al. 1992	46,0%	47,4%	18,3%	17,8%	8,0%	4,5%	4,0%
Garbó et al. 1992	51,3%	53,9%	15,7%	16,5%	7,0%	5,2%	1,7%
Strom et al. 1992	83,2%	77,2%	11,3%	6,3%	3,8%	1,3%	-
Cowchock et al. 1993	45,2%	63,2%	18,4%	10,5%	-	7,9%	-

Tab. 1.3b Aberrationsraten und Chromosomenanomalien unter Spontanaborten, Studienübersicht

Autoren	Aberrationsrate gesamt	Autosom. Trisomien	X0	Tri-ploidien	Tetra-ploidien	Strukt. Anomalie	Andere
Kalousek et al. 1993	62,8%	54,1%	13,1%	20,6%	3,1%	9,1%	-
Neuber et al. 1993	53,5%	49,7%	15,8%	18,4%	7,3%	4,7%	-
Ford et al. 1996	46,5%	51,9%	12,6%	14,5%	5,2%	8,9%	7,0%
Be et al. 1997	63,7%	61,6%	10,6%	16,0%	4,4%	4,9%	2,6%
Brajenovic-Milic et al. 1998	37,8%	42,2%	4,4%	28,9%	6,7%	4,4%	13,3%
Sánchez et al. 1999	62,4%	62,3%	7,5%	26,4%	1,9%	1,9%	-
Interne Daten 1999	71,0%	58,8%	15,3%	9,3%	4,8%	11,5%	0,4%
Nagaishi et al. 2004	56,5%	61,2%	12,2%	13,8%	2,6%	6,6%	3,6%
Menasha et al. 2005	57,2%	71,7%	9,9%	11,2%	2,4%	4,2%	0,6%
gemittelte Daten	50,9%	54,0%	15,4%	15,7%	5,0%	5,6%	2,7%

Aneuploidien stellen also die größte Gruppe der Chromosomenaberrationen dar, die als ursächlich für eine frühe Fehlgeburt gelten können. Aneuploidien sind numerische Chromosomenaberrationen. Sie sind durch das Fehlen (Monosomie) oder das Vorliegen eines überzähligen Chromosoms (Trisomie) charakterisiert. Monosomien der Autosomen werden unter Aborten nur sehr selten gefunden. Daten aus Präimplantationsstudien zeigen jedoch, dass in Oozyten Trisomien und Monosomien in gleichem Verhältnis entstehen. Der Verlust an genetischem Material scheint so gravierend zu sein, dass die Frucht schon sehr früh abstirbt und wohl auch nicht implantiert wird.

Unter frühen Spontanaborten ist die Trisomie 16 mit Abstand die häufigste (28-30%), sie wird unter Lebendgeborenen jedoch nicht gefunden. Es folgen mit ca. 20% und 8% die Trisomien 22, 21 sowie 15. Mit ca. 5% sind Trisomie 13 und 18 etwa gleich häufig. Mittlerweile sind Trisomien aller Chromosomen beschrieben worden, inklusive zwei Fälle der Trisomie 1 (Sanford Hanna et al. 1997, Dunn et al. 2001).

Gonosomale Trisomien werden bei Aborten nur selten beobachtet. Aufgrund der Lyon-Hypothese wirken Hyperploidien des X-Chromosoms weniger schädigend als die der Autosomen. Polysomien des Y-Chromosoms bedingen durch die weitgehende genetische Leere des Chromosoms ebenfalls nur geringe Normabweichungen (nach Horn et al. 1990).

40% der frühen Fehlgeburten lassen sich zur Zeit nicht auf eine Chromosomenanomalie zurückführen. Andere endogene oder exogene Faktoren wie Infektionen, Alkohol- oder Nikotinabusus, Exposition zu Narkotikagasen oder Röntgenstrahlen sind zum Teil nur in Ansätzen erforscht und können nur einen kleinen Anteil der Frühaborte hinreichend erklären (Müntefering 1988, Simpson et al. 1985).

1.4.3 Aneuploidierate in den verschiedenen Schwangerschaftsstadien

Chromosomenaberrationen in **Oozyten** sind durch die IVF-Technik (in vitro Fertilisation) erforschbar geworden. In diesem Zusammenhang mussten Abstriche in der Qualität auswertbarer Metaphasen gemacht werden. Nur bei 50 Prozent der zur Verfügung stehenden Oozyten war eine zytogenetische Beurteilung überhaupt möglich. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist auch zu berücksichtigen, dass die Eizellen überwiegend von älteren Frauen stammten und nach Hyperstimulationsbehandlung gewonnen wurden. Außerdem sind nur die nicht befruchteten Eizellen Grundlage dieser Studien geworden. Wahrscheinlich liegt die Aberrationsrate aber höher als die beschriebene von ca. 25%, da Eizellen in der zweiten meiotischen Teilung arretiert sind und somit nur Fehler der 1. meiotischen Teilung erfasst werden können.

Nach Durchsicht der Daten über mehr als 3000 Oozyten wird die mittlere Aneuploidierate zusammenfassend mit 22,8% angegeben, kalkuliert aus der zweifachen Rate der hyperhaploiden Eizellen (nach Van Blerkom 1996). In nur 1,6% wurden strukturelle Aberrationen festgestellt.

Es zeigt sich, daß Aneuploidien alle Chromosomengruppen betreffen, allerdings in unterschiedlicher Häufigkeit. Signifikant höhere Aneuploidieraten zeigen

Chromosomen der Gruppen A, C, D und G, mit deutlichem Überwiegen der Chromosomen der G-Gruppe (21,22), (Pellestor 1991). Das deutliche Überwiegen der Trisomie 16 unter den bei Spontanaborten beschriebenen Trisomien scheint nicht schon auf Keimzellebene vorzuliegen, sondern erst durch spätere Selektion zu entstehen.

Die Kenntnisse über die Entstehungsmechanismen und ätiologischen Faktoren, die die Fehlverteilung der Chromosomen in Meiose I bzw. der Schwesterchromatiden in Meiose II beeinflussen sind vergleichsweise gering. Die ungewöhnlich hohe Zahl an Zygoten mit chromosomalen Inbalancen lässt darauf schließen, dass die Meiose in Oozyten ein sehr fehleranfälliger Prozeß ist.

Spermien sind der Untersuchung wesentlich einfacher zugänglich und in ausreichender Menge analysierbar. Erste Ergebnisse stammen aus Studien, die sich der „hamster“-Technik (Befruchtung von Hamster-Oozyten durch humane Spermien, nach Rudak et al. 1978) bedient haben. Es konnte eine Aneuploidierate von 1-2% ermittelt werden (Jacobs 1992). Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) konnte später eine große Anzahl von Spermien direkt untersucht werden. Auch durch die FISH-Technik wird eine Aneuploidierate von ca. 2% postuliert, sie ist somit deutlich niedriger als die in 1. Oozyten. Spriggs und Mitarbeiter (1996) untersuchten mindestens 50000 Spermien pro Chromosom und fanden, in Übereinstimmung mit den Untersuchungen mittels „hamster“-Technik, daß alle untersuchten Chromosomen „anfällig“ für Nondisjunction sind; eine signifikant erhöhte Disomierate wurde jedoch für die Geschlechtschromosomen und für das Chromosom 21 beschrieben. Pellestor et al. (1996) werteten mindestens 10000 Spermien pro Chromosom in PRINS-(primed in situ)-Technik aus und ermittelten eine höhere, jedoch annähernd gleiche Aneuploidierate unter allen Autosomen (s. Tab. 1.4).

Tab. 1.4 Disomiehäufigkeit für verschiedene Chromosomen in Spermien

Studien	Disomieraten in Prozent													
	1	2	4	5	8	9	12	13	15	16	18	20	21	X/Y
Pellestor et al. 1996		0,33		0,31		0,27	0,28				0,33			
Pellestor et al. 1996					0,31	0,28		0,28		0,26			0,32	
Spriggs et al. 1996	0,09	0,08	0,11			0,14	0,16		0,11	0,11	0,11	0,12	0,29	0,43

Eine direkte Korrelation der Keimzellaneuploidien mit der beobachteten Häufigkeit chromosomaler Aberrationen unter Spontanaborten ist daher nicht gegeben. Der Beitrag zur Aneuploidie-Rate der Konzeptionen scheint also bei Mann und Frau höchst unterschiedlich zu sein.

Die Verhältnisse in der frühen Schwangerschaft haben Untersuchungen an **Präimplantationsembryonen** im Rahmen von IVF-(in-vitro-Fertilisation)-Programmen versucht zu klären. Insgesamt ist eine Aneuploidierate von ca. 20% ermittelt worden (Angell et al. 1986, Jamieson et al. 1994). Wie erwartet sind überwiegend Trisomien, insbesondere der Chromosomen 16 und der akrozetrischen, gefunden worden. Allerdings waren die Metaphasen bezüglich Quantität und Qualität nur eingeschränkt beurteilbar. Diesen Nachteil hat die Anwendung von Multi-Colour-FISH an Interphasenuklei umgehen können (Griffin et al. 1991, 1992, Munné et al. 1994). Aus methodischen Gründen sind allerdings dadurch zur Zeit nur Erkenntnisse über die Chromosomen 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X und Y verfügbar. Munné und Mitarbeiter (1995) ermittelten in 188 sich normal entwickelnden Embryonen im 5-12-Zellstadium eine Aneuploidierate von 23,8% allein für die Chromosomen 13, 18, 21, X und Y, in einer weiteren Studie (1998) eine Anomalierate von 58% bzw. eine Aneuploidiehäufigkeit von 22,6% der 247 untersuchten Blastomeren für die Chromosomen 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X und Y. Die genetischen Imbalancen werden insgesamt am häufigsten durch Mosaik, gefolgt von Ploidie-Haploidie Mutationen und Aneuploidien verursacht, wobei in dieser frühen Entwicklungsstufe Monosomien und Trisomien noch annähernd in gleichem Verhältnis anzutreffen sind. In etwa 10% liegen völlig aberrante („chaotic“)

Karyotypen mit einer Vielzahl von Chromosomenkonstitutionen vor (Delhanty 1997, 2000, Delhanty und Harper 2000). Untersuchungen an Präimplantationsembryonen sind aufgrund der künstlichen Bedingungen nur unter Vorbehalt zu werten. Zum einen hat das hohe maternale Alter einen wahrscheinlichen Einfluß auf die Aneuploidierate der Oozyten, die zudem nach Überstimulationbehandlung der Ovarien gewonnen wurden. Nicht wenige der untersuchten Embryos waren von schlechterer Qualität und aus diesem Grund vom Transfer in den Uterus ausgeschlossen worden. Nach Munné et al. (1995) weisen 60% der wachstumsarretierten Embryonen und etwa 45% der normal entwickelten Embryonen chromosomale Anomalien auf.

In das zweite Trimenon fallen nur ca. 10% der Aborte. Exogene Faktoren wie mütterliche Infektionen nehmen in diesem Zeitraum erheblichen Einfluß auf die Fetalentwicklung. Laborinterne Daten von 140 karyotypisierten Aborten der 13. – 24. SSW ergaben in etwa 1/3 der Fälle auffällige Karyotypen (Tab. 1.5). In diesem Zeitfenster überwiegen eindeutig die Aneuploidien; Polyploidien sind kaum noch zu finden.

Tab. 1.5 Laborinterne Daten zur Häufigkeit der verschiedenen Chromosomenaberrationen bei Früh- und Spätaborten, 1994-2001 (Angaben in %)

	n	Pathologisch	45,X	Trisomie	Triploidie	Tetraploidie	Strukturelle Anomalie	Sonstige	Mosaik
Frühaborte									
< 12. SSW	379	71,0	15,3	58,8	9,3	4,8	11,5	0,4	11,6
13.–16. SSW	72	14,7	26,7	46,7	13,3	-	13,3	-	13,3
Spätaborte									
17.-24. SSW	58	24,1	26,8	35,4	14,3	-	21,4	-	14,3
> 25. SSW	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamt	519	60,3	16,9	56,4	9,9	4,1	12,1	0,6	10,2

Die Untersuchung von Gaillard und Mitarbeiter (1993) konnte jedoch zeigen, dass eine Korrelation der Inzidenz chromosomaler Störungen mit der Dauer der Fruchttretention besteht. Mazerierte Feten wiesen in ca. 17% einen pathologischen Karyotyp auf, gut erhaltene dagegen nur in 4%.

Relativ wenig Informationen liegen über die chromosomalen Konstitutionen von Totgeburten vor. Der Anteil von Chromosomenaberrationen liegt bei ca. 6% und ist damit eine Größenordnung niedriger als bei den Spontanaborten (Tab. 1.6). Das Spektrum an Chromosomenaberrationen ist ähnlich dem unter Lebendgeborenen. Es ist aber anzunehmen, dass innerhalb dieses Kollektivs die Frequenz chromosomaler Aberrationen unterschätzt wird, da in nur maximal 70% eine Chromosomenanalyse erfolgreich durchgeführt werden kann (Ellis und Bain, 1984, Angell 1984).

Tab. 1.6 Häufigkeit der verschiedenen Chromosomenaberrationen bei Spontanaborten, Totgeburten und Neugeborenen (nach Jacobs 1990, Angaben in %)

Population	45,X	Trisomie	Triploidie	Tetraploidie	Strukturelle Anomalie	Sonstige	Summe abnormal
Spontanaborte	8,6	26,8	7,3	2,5	2,0	0,7	47,9
Totgeburten	0,25	3,8	0,6	-	0,4	0,6	5,65
Neugeborene	<0,01	0,30	-	-	0,25	0,02	0,57
Klinisch diagnostizierte SS	1,30	4,31	1,1	0,38	0,76	0,15	8,0
Überlebenswahrscheinlichkeit bis zur Geburt (%)	0,3	5,8	0	0	27	11,5	6

Unter Lebendgeburten, einer leicht zugänglichen Population, wird die Aneuploidierate mit ca. 0,6% angegeben (Tab. 1.6, Jacobs 1990).

Die Trisomie 21 ist dabei die häufigste Aberration, die in ca. 1 auf 700 Neugeborenen gefunden wird. Seltener sind die Trisomien 13 und 18 mit einer

Häufigkeit von 1:5000 bzw. 1:3000 und einem schweren Krankheitsbild, welches dazu führt, daß Kinder mit Patau- bzw. Edwards-Syndrom meist innerhalb des ersten Lebensjahres versterben. Aneuploidien der Heterosomen rufen milde Krankheitsbilder hervor; Trisomien der Geschlechtschromosomen (XXX, XXY, XYY) finden sich zusammengenommen in 1 auf 650 Geburten; das Turner-Syndrom (Monosomie X) hat eine Inzidenz von 1 auf 2500 weibliche Neugeborene.

Zusammenfassend kann man sagen, dass unter den Spontanaborten die Häufigkeit chromosomaler Imbalancen etwa 100-fach, unter den Totgeburten ca. 10-fach so hoch ist wie unter Lebendgeburten (Hassold et al. 1996). Wie aus Tab. 1.6 hervorgeht, ist jedoch das Muster der Chromosomenaberrationen in den verschiedenen Schwangerschaftsstadien unterschiedlich.

1.4.4 Mechanismen und Ursachen der Aneuploidie in Spontanaborten

Die Kenntnisse über die Entstehungsmechanismen und ätiologischen Faktoren, die die Fehlverteilung der Chromosomen in Meiose I bzw. der Schwesterchromatiden in Meiose II beeinflussen sind vergleichsweise gering. Die allgemein etablierte Vorstellung ging davon aus, dass im Diktyotänstadium arretrierte primäre Oozyten jahrzehntelang potentiell schädlichen Einflüssen ausgesetzt sind. Es sind zahlreiche zytoplasmatische Faktoren untersucht worden (pH-Wert, Sauerstoff- und ATP-Gehalt), welche sich in der alternden Oozyte verändern, und die die Effektivität zellulärer Reparaturmechanismen beeinträchtigen sollen (Van Blerkom, 1996).

Eine neuere Hypothese besagt jedoch, dass aberrante Oozyten bereits embryonal angelegt sind und erst im späteren Alter gehäuft ovuliert werden (Akande et al. 2002).

Andere Autoren vermuten eine altersbedingte Degradation von Kohäsionsproteinen im Zentromerbereich der Chromosomen, die diese destabilisiert und zu einer unregelmäßigen Segregation der Chromosomen bzw. Chromatiden führen kann (Wolstenholme und Angell 2000, 2001). Die Fehlverteilung der Chromosomen soll Folge der instabilen Spindelformation

sein und schließlich abhängig von der Größe und Form der Chromosomen bzw. von der Anzahl und Lage der Chiasmata. Die Unterscheidung in Meiose I bzw. Meiose II – Fehler scheint somit inkorrekt. Nach Ansicht der Autoren könnte dieser Kohäsionsverlust auch verantwortlich sein für paternale Chromosomenfehlverteilungen.

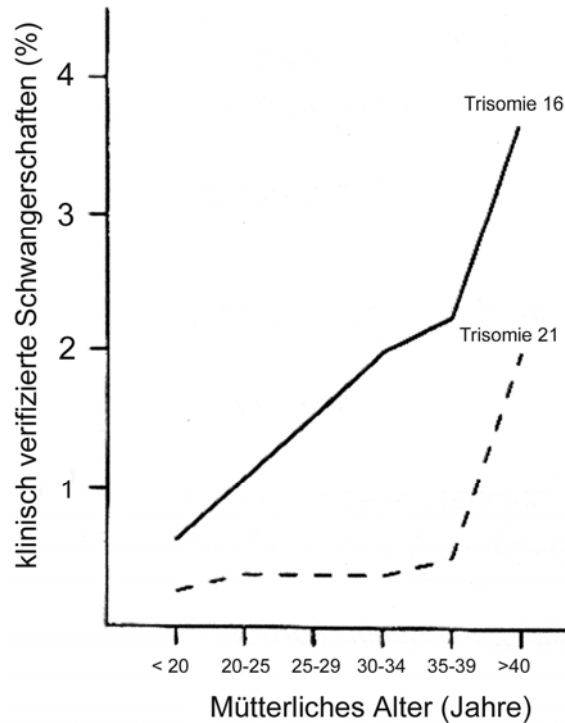
Mittlerweile sind vorwiegend aus Untersuchungen an Hefen eine Vielzahl von Genen identifiziert, die für oben postulierte Kohäsionsproteine kodieren (Übersicht in Nasmyth 2001). Van Heemst und Heyting (2000) beschreiben einen sogenannten Cohesin-Proteinkomplex, bestehend aus vier Komponenten (Mcd1/Scc1, Scc3, Smc1 und Smc3), der in Hefen für eine korrekte Chromosomensegregation notwendig ist. Unklar ist jedoch, in wie weit diese Ergebnisse auf höhere Eukaryonten und den Menschen übertragbar sind.

1.4.5 Einfluß des mütterlichen Alters auf die Entstehung von Trisomien

Insbesondere ab dem 35. Lebensjahr erhöht sich für die Frau das Risiko für eine trisome Konzeption. Der Effekt des mütterlichen Alters auf die spätletale Trisomie 21 ist lange bekannt und scheint auch für die Mehrzahl der anderen autosomalen Trisomien zu gelten (Griffin 1996). Für die frühletale Trisomie 16 steigt das Risiko eher linear mit dem Alter der Mutter an, während es bei den anderen Trisomien vergleichbar ist mit dem der Trisomie 21, (siehe exponentieller Kurvenverlauf in Abb. 1.3). Die Inzidenz der Trisomie 16 scheint also in völliger Abhängigkeit vom maternalen Alter zuzunehmen, während bei der Trisomie 21 noch andere Faktoren beteiligt sein müssten (Hassold et al. 1995).

Eine positive Korrelation des mütterlichen Alters mit der Häufigkeit von trisomen Aborten findet sich praktisch in jeder Studie, die eine Karyotypisierung von Spontanaborten zum Inhalt hatte (s. Tab 1.7 Studienübersicht).

Abb. 1.3 Einfluss des mütterlichen Alters auf die Entstehung einer Trisomie 16 und Trisomie 21 (nach Griffin 1996)



Tab. 1.7 Maternales Alter (in Lebensjahren) in Korrelation zur Chromosomenaberration unter Spontanaborten, Studienübersicht

Autoren der Studie	Karyogramme	
	Unauffällig	Trisomie
Boué 1975	27,5	31,3
Creasy 1975	26,4	30,0
Lauritsen 1976	27,1	28,7
Takahara 1977	28,7	29,3
Hassold 1980	27,0	29,8
Kajii 1980	28,9	31,9
Geisler 1987	29,1	31,7
Eiben 1990	28,8	33,5
Ohno 1991	29,3	32,4
Dejmek 1992	26,4	27,7
Strom 1992	36,0	38,4
Ford 1996	28,8	31,9
Bé 1997	31,3	35,5

Andere Chromosomenanomalien zeigen hingegen eine negative Korrelation mit dem mütterlichen Alter. Spontanaborte mit Monosomie-X-Karyotypen bzw. Polyploidien fanden sich häufiger bei jüngeren Frauen (Neuber et al. 1993, Eiben et al. 1990).

1.4.6 Parentale Herkunft von autosomalen Trisomien unter Spontanaborten

Daß die autosomalen Trisomien überwiegend auf Segregationsfehler in der maternalen Gametogenese beruhen, konnte schon vor mehr als 20 Jahren durch vergleichende Analysen mit den elterlichen Chromosomen belegt werden. Die meisten Informationen über die elterliche Herkunft überzähliger Chromosomen hat man aus Familienuntersuchungen mit Lebendgeborenen mit den häufig auftretenden Trisomien 13, 18 und 21.

Mit der Etablierung der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) Ende der 80er Jahre konnte der Herkunftsnachweis aberranter Chromosomen vereinfacht und präzisiert werden: Diese molekulargenetische Technik analysiert Chromosomen mittels polymorpher DNA-Marker. Je nach Länge der Repeatssequenz werden sie als Minisatellit (typische Repeatlänge 15-50 Basen) oder Mikrosatellit (STR=Short Tandem Repeats, typische Länge des einzelnen repetitiven Motivs 2-5 Basen) bezeichnet. Die Allele unterscheiden sich durch die Anzahl der Wiederholungen der einzelnen Motive. Voraussetzung für eine parentale Zuordnung von Chromosomenstörungen ist eine Heterozygotie der zu untersuchenden Loci. Auf diese Weise kann man auch die Verteilung von crossing-over Ereignissen erfassen, und so Rückschlüsse auf den Zeitpunkt anstellen, wo sich eine Nondisjunction ereignet hat (Meiose I oder II, bzw. Mitose-Zeilteilungen).

Über den elterlichen Ursprung der verschiedenen Aneuploidien in Spontanaborten ist bisher relativ wenig bekannt, da die Fallzahlen in den einzelnen Studien sehr gering sind (Tab. 1.8). Zusammenfassend kann man aber sagen, dass maternale Nondisjunction bei den meisten autosomalen Trisomien, die in Spontanaborten gefunden werden, verantwortlich ist. Es

ergeben sich somit keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Ergebnissen bei Lebendgeborenen und Spontanaborten.

Darüber, ob die parentale Herkunft des überzähligen Chromosoms eine Auswirkung auf das Abortgeschehen oder die Wahrscheinlichkeit eines erneuten Aborts hat, lässt sich zur Zeit nur spekulieren. Aus kleinen Studien von Zaragoza und Mitarbeitern (1998) ließ sich die vorsichtige Tendenz ableiten, dass Aborte mit Trisomien paternaler Herkunft frühzeitiger zum Ende der Schwangerschaft führen könnten.

Tab. 1.8 Parentale Herkunft der Non-disjunction von Aneuploidien in Aborten und Lebendgeburten (Nur informative Fälle nach molekulargenetischer Analyse).

Anomalie	Fallzahl	Spontanaborte		Fallzahl	Lebendgeburten	
		maternal	Paternal		maternal	paternal
Trisomie 2	12 ⁸	75%	25%			
Trisomie 7	9 ⁸	77,8%	22,2%			
Trisomie 13	6 ¹	66,7%	33,3%			
	10 ²	80%	20%	5 ²	80%	20%
Trisomie 14	11 ²	81,8%	18,2%			
Trisomie 15	20 ⁸	85%	15%			
Trisomie 16	16 ³	100%				
Trisomie 18	8 ⁴	87,5%	12,5%	10 ⁴	90%	10%
				20 ⁵	95%	5%
Trisomie 21	6 ⁶	100%		193 ⁷	95,3%	4,7%
				77 ⁶	93,5%	6,5%
Trisomie 22	22 ⁸	95,4%	4,5%			

¹Hassold et al. 1987, ²Zaragoza et al. 1994, ³Hassold et al. 1991, ⁴Fisher et al. 1993, ⁵Kupke et al. 1989, ⁶Shermann et al. 1991, ⁷Antonarakis et al. 1991, ⁸Zaragoza et al. 1998

1.4.7 Wiederholungsrisiko für Spontanaborte in Abhängigkeit vom chromosomalen Befund

Ob das Risiko für eine Chromosomenaberration in der Folgeschwangerschaft nach einem chromosomal auffälligen Abort erhöht ist, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Einige Untersucher vermuten ein erhöhtes Wiederholungsrisiko (Alberman et al. 1975, Mikkelsen und Stene 1981). Andere Studien ergaben kein wesentlich erhöhtes Risiko für eine erneute Chromosomenaberration (Morton et al. 1987, Warburton et al. 1987). Die deutliche Altersabhängigkeit der Trisomien und das hohe a priori Risiko für eine Chromosomenanomalie im Abort erschweren eine Beantwortung der Frage nach dem individuellen Wiederholungsrisiko. In der Literatur findet sich für Trisomien, die mit einer Entwicklung bis zur Geburt vereinbar sind, ein erhöhtes Wiederholungsrisiko in einer nachfolgenden Schwangerschaft: Das Wiederholungsrisiko für ein Down Syndrom beispielsweise wird mit über 1% angegeben, wenn bereits ein Kind mit einer freien Trisomie 21 geboren wurde (Mikkelsen u. Steene, 1981). Dem erhöhten Wiederholungsrisiko soll zumindest in einigen Familien ein sogenanntes Gonadenmosaik zugrunde liegen, welches mit der üblichen Chromosomenanalyse nicht nachweisbar ist (Sachs et al. 1990). Als ein weiterer Faktor wird eine genetische Prädisposition für eine Nondisjunction diskutiert. Munné und Mitarbeiter (2004) arbeiteten in einer Studie über Präimplantationsembryonen eine Gruppe von Frauen jünger als 35 Jahre heraus, die ein vermutlich genetisch bedingtes, erhöhtes Risiko für eine erneute aneuploide Konzeptionen hatte. Auch Paare mit wiederholten Aborten und jüngere Mütter von Kindern mit Down-Syndrom können eine erhöhte Nondisjunction-Frequenz aufweisen (Hecht et al. 1984, Juberg et al. 1985, Ford et al. 1984). Dieses Phänomen könnte durch eine Dysregulation Meiose-spezifischer Gene hervorgerufen sein, welche die Zellzyklus-Kontrolle steuern. Amiel et al. (2000) beschreiben in diesem Zusammenhang eine mögliche Relation zwischen Verlust der Replikationskontrolle, Dysfunktion des Zentromers und einer Prädisposition zur Nondisjunction (s. Kap. 1.4.4).

Da das Risiko für eine erneute trisome Konzeption unabhängig vom betroffenen Chromosom erhöht zu sein scheint, wird daher nach einem Abort mit

nachgewiesener Trisomie bzw. einer Geburt eines Kindes mit Trisomie 13, 18 oder 21 eine Pränataldiagnostik in Folgeschwangerschaften angeboten.

Eine strukturelle Chromosomenaberration im Abortmaterial kann sowohl de novo entstanden als auch in unbalancierter Form vererbt worden sein. In jedem Fall ist eine Chromosomenanalyse bei den Eltern angeraten, um diese Unterscheidung treffen zu können.

1.4.8 Chromosomale Befunde bei habituellen Aborten

Im Vergleich zu den Daten aus sporadischen Aborten, wird die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen bei habituellen Aborten meist als etwas erniedrigt angegeben (Heyat et al. 1991, Tab. 1.9). Der Anteil der untersuchten Abortmaterialien mit aberranten Chromosomensätzen scheint außerdem abzunehmen, je mehr Aborte in Folge aufgetreten waren. Jedoch finden sich im Vergleich zu sporadischen Fehlgeburten häufiger strukturelle Aberrationen, v. a. Translokationen.

Tab. 1.9 Häufigkeit und Anteil der Chromosomenanomalien in Aborten bei Frauen mit 1. (n = 153) bzw. 2. und 3. Abort (n = 148)
(nach Heyat et al. 1991)

	1. Abort	2. und 3. Abort
Chromosomenaberrationen gesamt	58%	47,3%
Anteil an Aberrationen in %		
Trisomie	56,2%	67,1%
Polyploidie	28,1%	14,3%
Monosomie-X	11,2%	10,0%
Strukturelle Aberration	4,5%	8,6%

Die Häufigkeit, mit der Chromosomenaberrationen bei einem Elternteil diagnostiziert werden, hängt aber entscheidend von den Selektionskriterien ab. Gadow et al. (1991) teilte die untersuchten Paare in drei Gruppen ein. In der ersten Gruppe fasste er Paare mit zwei oder mehr Aborten mit unauffälliger

Familienanamnese zusammen. Es fand sich in 2,8% eine balancierte Translokation bei einem Elternteil. Die zweite Gruppe setzte sich aus Paaren zusammen, die darüber hinaus noch eine Totgeburt oder ein Kind mit Fehlbildungen hatten. Bei diesen Paaren betrug der Prozentsatz 5,4% für eine balancierte Translokation. In der dritten Gruppe waren ebenfalls Paare mit einer oder mehreren Fehlgeburten, die aber zusätzlich ein Geschwister hatten, welches selbst ein fehlgebildetes Kind oder wiederkehrende Aborte hatte. In dieser Gruppe erhöhte sich die Rate an balancierten Translokationen auf 10% bei einem der Partner. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer sorgfältigen Anamnese mit Stammbaumanalyse und genetischen Beratung betroffener Paare. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass bei der zytogenetischen Diagnose eines euploiden Abortes kleinere (strukturelle) Chromosomenveränderungen unentdeckt geblieben sein können, da das Bandenniveau der Chromosomen aus Abortmaterial meist geringer ist als bei der Chromosomenanalyse aus Lymphozyten. Bei wiederholten Aborten mit unauffälligem Karyotyp sollte deshalb auch eine Chromosomenanalyse der Eltern durchgeführt werden.

In mehreren Studien wurden die für wiederholte Aborte als ursächlich angesehenen Befunde ermittelt. In der Arbeit von Li (1998) sind die Ergebnisse von drei Studien zusammengestellt (Tab. 1.10). Es wird empfohlen, bei euploiden Aborten gezielt nach dort genannten Ursachen zu suchen.

Tab. 1.10 Ursachen habitueller Aborte. Vergleich der Daten (in %) dreier Studien (nach Hinney, 2001)

	Clifford (1994) (n = 500)	Stephenson (1996) (n = 197)	Li (1998) (n = 160)
Path. Elterlicher Karyotyp	3,6	3,5	2,5
Antiphospholipid-AK	14,0	17,0	13,0
Corpus-luteum-Insuffizienz	keine Angabe	17,0	28,0
Hoher LH-Spiegel	57,0	keine Angabe	9,7
Hypothyreose	keine Angabe	3,0	0,6
Uterusanomalien	1,8	14,0	9,0
Zervixinsuffizienz	keine Angabe	2,0	3,8
Ungeklärt	keine Angabe	43,0	45,0

Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass im Falle von Aborten mit unauffälligem Karyotyp ein nicht-chromosomaler Grund existieren müsste, der auch einen Großteil weiterer Schwangerschaften negativ beeinflusst. Bei habituellen Aborten scheint es sich in vielen Fällen um ein eigenständiges, aber keineswegs einheitliches Krankheitsbild zu handeln.

Zur Frage, ob bei Frauen mit habituellen Aborten eine vorausgegangene Lebendgeburt die Abortwahrscheinlichkeit günstig beeinflusst, gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Aus den Daten von Alberman (1988) lässt sich eine deutlich bessere Wahrscheinlichkeit für einen positiven Schwangerschaftsverlauf ableiten, während Clifford et al. (1997) keinen Unterschied gegenüber primär abortierenden Frauen feststellten.

In gut 40% der Fälle wird die Abortursache ungeklärt bleiben. Clifford und Mitarbeiter (1997) haben Frauen mit ungeklärter habitueller Abortneigung in einer prospektiven Studie untersucht. Oben genannte Ursachen waren zuvor ausgeschlossen worden. Die Paare wurden in einer entsprechend ausgerichteten Klinik mit geschultem Personal engmaschig betreut. Es kam in der folgenden Schwangerschaft zu einer ermutigenden Geburtenrate von 74%, im Vergleich zu 49% für Frauen ohne derartige Anbindung. Für diese Betreuung hat sich der Begriff „tender loving care“ durchgesetzt.

Frauen mit habituellen Aborten leiden vielfach unter massiven Schuldgefühlen. Eine erneute Schwangerschaft wird angstvoll erlebt. Aus diesem Grund sollte eine psychotherapeutische Beratung angeboten werden. Nach Eintritt einer Schwangerschaft sollte die Patientin aus oben genannten Gründen besonders intensiv betreut werden.

1.5 Comparative Genomhybridisierung (CGH)

Wie bereits ausgeführt, sind ca. 50-60% der spontanen Frühaborte auf Chromosomenstörungen zurückzuführen (Tab. 1.3). Zusätzlich haben 25-30% der Spätaborte und ca. 6% der Totgeburten pathologische Chromosomensätze (Tab. 1.5, 1.6). Diese Angaben beruhen auf der zytogenetischen Analyse von Abortmaterial. Die Grundvoraussetzung für die Darstellung von Chromosomen ist jedoch der Zugang zu proliferierenden Zellen. In Abhängigkeit vom Gestationsalter und auch von der Art des Abortes gelingt es in mindestens 10-15% der Fälle nicht, eine ausreichende Anzahl an Metaphasen zu erhalten (Tab. 4.1). Chromosomale Veränderungen bleiben in diesen Kollektiven somit unentdeckt.

Die vergleichende genomische Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH) ist eine neue molekularzytogenetische Methode zum Nachweis genetischer Veränderungen bei Spontanaborten. Sie ermöglicht eine umfassende Analyse von unbalancierten Chromosomenaberrationen in einem Genom.

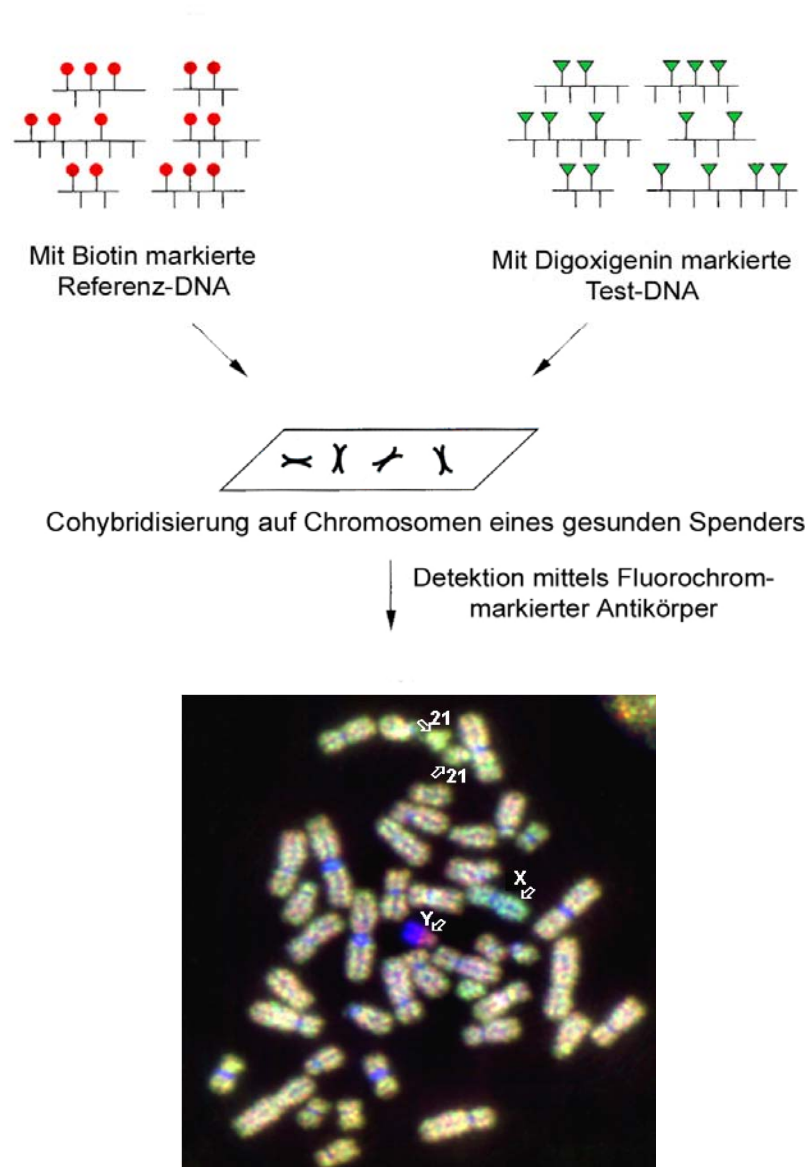
Entwickelt wurde die CGH unabhängig von zwei Arbeitsgruppen zur Erfassung komplexer Chromosomenarrangements in der Tumorgenetik (Kallioniemi et al. 1992, du Manoir et al. 1993). Sie basiert auf einem molekularen Verfahren, d. h. sie ist unabhängig von der mitotischen Aktivität des zu untersuchenden Materials und umgeht damit die technischen Probleme der Zellkultur (Kontamination, selektives Wachstum, Kulturartefakte, Kulturversagen). Gleichzeitig nutzt die CGH die Vorteile der Zytogenetik, nämlich die Möglichkeit zur Darstellung des gesamten Chromosomensatzes in einem Überblick. Sie macht eine Beurteilung von unbalancierten genomischen Veränderungen auf chromosomaler Ebene möglich.

Die Methodik basiert auf einer interstitiellen Markierung von DNA eines gesunden Spenders und der zu analysierenden DNA mit verschiedenfarbigen Fluorochromen und der kompetitiven Hybridisierung auf Metaphasen eines gesunden Spenders. Die CGH ist somit ein „reverses Chromosome-Painting-Verfahren“.

Die Test-DNA kann beispielsweise mit grün fluoreszierendem Anti-Digoxogenin, die Referenz-DNA mit rot fluoreszierendem Avidin sichtbar gemacht werden. Teile des Testgenoms, die in höherer oder niedriger Kopienanzahl als im balancierten Karyotyp der Kontroll-DNA vorkommen, führen im entsprechenden Chromosom(enabschnitt) zu einer stärkeren oder schwächeren Fluoreszenzintensität.

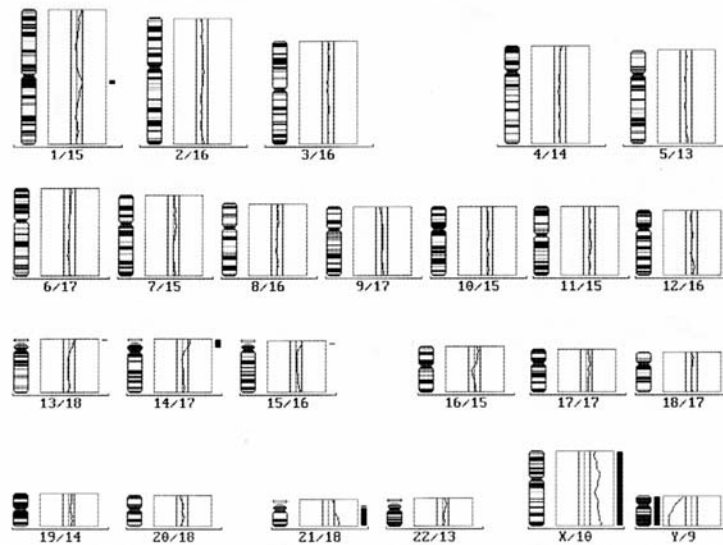
Eine akkurate Auswertung ist aber auf eine sensitive Kamera und eine computergestützte Bildanalyse angewiesen (Speicher et al. 1993, Lottspeich und Zobras 1998): Die Fluoreszenzen werden separat für Test- und Kontroll-DNA entlang jedes Chromosoms mit bildanalytischen Verfahren quantitativ erfasst und zu einem Fluoreszenzratioprofil verrechnet. Bei gleichen Werten für beide Fluorochrome ergibt sich eine Ratio von 1,0. Abweichende Fluoreszenzverhältnisse zeigen Gewinne oder Verluste des genomischen Materials an, und es kommt zu einem Abweichen des Fluoreszenzratioprofils von der Mittellinie. Ein einfacher Zugewinn, entsprechend einer Trisomie, äußert sich in einer Fluoreszenzratio von 3:2 und ein einfacher Verlust (Monosomie) in der Fluoreszenzratio von 1:2. Mehrfache Zugewinne oder Verluste ergeben entsprechend höhere Werte. Die Ausprägung der Fluoreszenzunterschiede hängt dabei von der Größe des veränderten Chromosomenabschnitts, sowie von dem Anteil der veränderten Zellen in der Probe ab, aus der die Test-DNA gewonnen wurde. Ausgeprägte genomische Imbalancen bewirken Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten, die im Mikroskop mit bloßem Auge erkennbar sind, wie am Beispiel einer Trisomie 21 gezeigt (Abb. 1.4). Kleinere Verschiebungen der Fluoreszenzaktivität dagegen können nur mit Hilfe einer rechnergestützten digitalen Bildanalyse der Farbzusammensetzung aufgedeckt werden.

Abb. 1.4 Das Prinzip der Comparativen Genomhybridisierung (CGH)
(nach Lottspeich und Zorbas, 1998)



CGH-Analyse von DNA aus einem weiblichen Spontanabort der 12. SSW (MR-95) mit Trisomie 21. Dargestellt ist eine Metaphase nach Hybridisierung. Die Chromosomen 21 fallen durch eine intensive Grün-Fluoreszenz auf. Da sowohl Metaphase-Chromosomen als auch die Referenz-DNA von einem männlichen Spender stammen, kommen X- bzw. Y-Chromosom mit intensiver Grün- bzw. Rot-Fluoreszenz zur Darstellung.

Abb. 1.5 CGH-Profil eines weiblichen Aborts mit Trisomie 21



Die Fluoreszenzintensität der Fluorochrome FITC und TR wurden getrennt in p- und q-Arm über die Länge der einzelnen Chromosomen erfaßt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Zur Ermittlung von Über- bzw. Unterrepräsentationen wurde der Schwellenwert auf die 3fache Standardabweichung festgesetzt. Mindestens 10 Chromosomen eines jeden Typs wurden für die CGH analysiert. Die genaue Anzahl ist rechts neben der Chromosomenbezeichnung gelistet. Die Ergebnisse wurden für jedes Chromosom getrennt in Bezug auf das jeweilige Chromosomenideogramm grafisch dargestellt. Regionen mit chromosomalen Imbalancen wurden mittels Balken verdeutlicht, dabei wurde rot für Unter- und grün für Überrepräsentation gewählt.

1.5.1 Sensitivität und Validität der CGH

Ein großer Vorteil der CGH liegt darin, daß sie die Untersuchung kompletter Genome in nur einem Versuchsansatz ohne Anlegen einer Zellkultur auf verschiedene genetische Veränderungen hin ermöglicht (Störkel et al. 1996). Diese Methode umgeht somit Probleme, die bei der Zellkultivierung und anschließenden Auswertung entstehen können. Als problematisch bei der zytogenetischen Untersuchung von abortiven Chorionzotten gelten in erster

Linie eine mögliche Kontamination der Ausgangsgewebe, eine Kontamination der Kultur mit mütterlichen Zellen sowie Mosaikbefunde.

Im Gegensatz zu anderen modernen molekular(zyto)genetischen Methoden wie die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) oder die PCR-Analytik, welche nur gezielt zur Untersuchung von Teilen des Genoms sinnvoll eingesetzt werden können, eignet sich die CGH hervorragend als Screeningverfahren, da sie das Gesamtgenom erfasst.

Als nachteilig ist zu werten, daß die CGH ausschließlich chromosomale Netto-Gewinne oder -Verluste, und daher keine balancierten Chromosomenaberrationen wie z. B. Translokationen oder Inversionen erfaßt, weil diese keine Verschiebung des Fluoreszenzratioprofils bewirken (Kallioniemi et al. 1994).

Etabliert wurde die CGH als Screeningverfahren in der Tumorzytogenetik zur Detektion genetischer Imbalancen. Da gerade die genetischen Imbalancen in der Tumorgenetik eine große Rolle spielen, hat diese Methode schnell großen Einfluß auf die genetische Analyse von Tumoren gewonnen. Die CGH wird zur Klassifikation und Malignitätsbeurteilung insbesondere von soliden Tumoren eingesetzt (Störkel et al. 1996, Forozan et al. 1997). In Zukunft könnte die CGH Frühdiagnostik von Tumoren ermöglichen (Hemminki et al. 1997) und Bedeutung für Prognoseabschätzung und Therapieplanung anhand molekulargenetischer Risikofaktoren erlangen (Visakorpi et al. 1995, Störkel et al. 1996).

Von besonderem Interesse ist, dass die CGH auch an langjährig archiviertem Material durchgeführt werden kann, wobei auch sehr kleine Gewebeproben ausreichend sind. Im Bedarfsfall kann die DNA universell amplifiziert werden, so dass letztlich für eine Analyse die DNA einiger Zellen ausreichend ist, um Imbalancen gesichert zu erfassen (Speicher 1993, Aviram-Goldring et al. 2000, Fritz et al. 2000). Neueste Studien zeigen, dass mittels CGH Aneuploidien auch auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden können (Voullaire et al. 2000, Wells et al. 2002).

In jüngster Zeit findet die CGH Anwendung bei Fragestellungen in der Reproduktions-, Prä- und Perinatalmedizin. Aneuploidien unter Feten und Neonaten konnten zweifelsfrei nachgewiesen werden (Yu et al. 1997,

Christiaens et al. 2000, Benzacken et al. 1998, Erdel et al. 1997). Somit ermöglicht die CGH-Analyse die ätiologische Einordnung von Fehlbildungen, wenn eine herkömmliche zytogenetische Analyse durch Autolyse oder Fixierung des Materials erfolglos war. Im Rahmen der Pränatal- und Abortdiagnostik kann die CGH an Amnionzellen und Chorionzotten ergänzend zur Zytogenetik oder stellvertretend bei Kulturversagen zur Detektion der häufigen numerischen Aberrationen eingesetzt werden (Wang et al. 1995, Daniely et al. 1998, 1999, Lomax et al. 2000). Auch zur retrospektiven Charakterisierung unbalancierter struktureller Chromosomenanomalien im Rahmen der Fetalpathologie hat sich die CGH als geeignet herausgestellt (Daniely et al 1998). Sie konnte Beitrag leisten, de novo Aberrationen, familiäre sowie kryptische Translokationen aufzuklären (Levy et al. 1997, Aviram-Goldring et al. 2000, Fritz et al. 2000). Für die betroffenen Familien sind die Ergebnisse von großer Bedeutung, da sie Grundlage zur Abschätzung des Wiederholungsrisikos sind.

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Spontanaborten des 1. Schwangerschaftsdrittels liegen in 50-60% Chromosomenanomalien zugrunde. Die höchsten Aberrationsraten werden in Studien mit hohen Erfolgsquoten in der Zellkultur gefunden (s. Tab.1.3a, b; Tab. 4.1). Dennoch bleiben bisher mindestens 10% des Abortkollektivs zytogenetisch nicht erfasst.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, von dieser zytogenetisch bisher nicht zugänglichen Gruppe früher Spontanaborte den chromosomalen Status mittels Comparativer Genomhybridisierung (CGH) retrospektiv zu erheben. Die Karyotypisierung von Spontanabortmaterial ist eine wesentliche Voraussetzung für die Aufklärung der Abortursache und stellt die Basis für eine genetische Beratung betroffener Paare dar. Es ergeben sich daraus Indikationsstellung für weiterführende Diagnostik, und sie hat daher auch prognostische Bedeutung für nachfolgende Schwangerschaften.

Wir stellen die Hypothese auf, dass in dem Abortkollektiv, welches in vitro kein Zellwachstum aufwies (Kulturversager) und sich somit einer zytogenetischen Charakterisierung entzog, eine hohe Frequenz chromosomaler Aberrationen

aufzufinden ist. Wir nehmen an, dass insbesondere bei sehr frühen Aborten mit Regressionszeichen schwere chromosomale Imbalancen aufzudecken sind, die sich in Art und Verteilungsmuster von Aborten, die mittels konventioneller Zytogenetik charakterisierbar waren, unterscheiden.

Hierzu sollen in dieser Studie 60 Spontanaborte des ersten Trimenons, welche aus unabhängigen Stichproben aus Mainz und Marburg stammen, mittels CGH auf chromosomale Imbalancen untersucht werden. Als Ausgangsmaterial dient genomische DNA, welche aus nativ eingefrorenen Abortgeweben isoliert wurde.

Folgenden Fragestellungen soll nachgegangen werden:

- Welche Chromosomenaberrationsrate lässt sich ermitteln? Welche Chromosomen sind vorwiegend betroffen und bedingen die Frühletalität der Fruchtanlage? Ergeben sich Unterschiede zu Aborten, die unter Kulturbedingungen gewachsen sind?
- Korreliert das histologische Zottenbild der Plazenta mit dem chromosomalen Status?
- Korreliert der chromosomale Status mit dem fetalpathologischen Befund?
- Hat die parentale Herkunft der Chromosomenstörung Einfluß auf den Schweregrad der Wachstums- und Differenzierungsstörung der Plazentazotten? Diesbezüglich sind bisher noch keine Untersuchungen durchgeführt worden.

Die Ergebnisse der CGH-Studie sollen mit Daten aus einer Kontrollgruppe verglichen werden. Zur Kontrollgruppe wurden 4693 Spontanaborte des 1. Trimenons zusammengefaßt, die im gleichen Zeitraum (1993-1999) in dem hiesigen Labor für Zytogenetik sowie in Kooperation mit dem Labor für Zytogenetik der Abteilung für Kinderpathologie der Universitätsklinik Mainz erfolgreich untersucht worden waren. Die Korrelation der CGH-Ergebnisse mit anamnestischen und histologischen Angaben soll klären, ob ein Zusammenhang zwischen Kulturversagen und ermittelten Chromosomenaberrationen, Manifestationszeitpunkt der Aborte, maternalem Alter oder Schweregrad der plazentaren Funktionsstörungen anzunehmen ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid 30 % in Rotiphorese Gel A	Roth, Karlsruhe
Agarose	GIBCO BRL, USA
Albumin Bovine (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Anti-Digoxigenin-Fluorescein-Fab-Fragment	Boehringer, Mannheim
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Bisacrylamidlösung 2 %	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel B	Roth, Karlsruhe
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA, DNase Free (für PCR)	Pharmacia Biotech
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma, Deisenhofen
Dextransulfat	Pharmacia, Heidelberg
Dimethylsulfoxid 99,7 % (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
EDTA-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Serva, Heidelberg
Fluorescein Avidin	Vector, Kanada
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid deion.	Riedel de Haen, Seelze
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Human COT-1 DNA (1mg/ml)	GIBCO BRL, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Marabu Fixogum Rubber Cement	Erich Feucht GmbH, Tamm
Natriumcarbonat	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Pronase E (aus <i>Streptomyces Griseus</i>)	Sigma, Deisenhofen
Salpetersäure	Merck, Darmstadt
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Streptavidin-TEXAS-RED	Boehringer, Mannheim
Tetramethylethylene-diamine (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, Kanada
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

Alle weiteren handelsüblichen Chemikalien (pro analysi) wurden von Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Sofern nicht gesondert angegeben, wurden alle Lösungen, Puffer und Nährmedien mit entmineralisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder sterilfiltriert. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

2.1.2.1 Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur

Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung:	GIBCO BRL, USA
Penicillin/Streptomycin (10 000 units/ml)	
Amphotericin (25 µg/ml)	
Fetales Kälberserum	GIBCO BRL, USA
Mc Coy`s 5A-Medium	GIBCO BRL, USA
Natriumbicarbonat 7,5 %	GIBCO BRL, USA

Colcemid-Lösung (10µg/ml)	Boehringer Mannheim
Phytohaemagglutinin (PHA)	Welcome Diagnostics, England
Trypsin-EDTA-Lösung (1x) (Trypsin 0,5%, EDTA 0,2 %)	Biochrom, Berlin

Hypotone Lösungen: 75 mM Kaliumchlorid-Lösung
1 % Natriumcitrat/75 mM Kaliumchlorid (1:1, vol:vol)

PBS-Puffer: 8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat, 1,15 g Dinatriumhydrogenphosphat ad 1000 ml Aqua bidest., pH 7,2

Fixativ-Lösung: Ethanol/Eisessig (3:1, vol:vol)

2.1.2.2 Lösungen für die DNA-Extraktion und -Fällung

Red cell lysis buffer: (RCLB) 1,21 g Tris, 1,01 g MgCl, 0,58 g NaCl ad 1000 ml A. bidest

TE-Puffer: 1,21 g Tris, 0,372 g Na -EDTA ad 1000 ml A. bidest

Zellkern-Lysis Puffer: (SE-Puffer) 75 mM NaCl, 1 mM Na -EDTA ad 1000 ml A. bidest

10%ige SDS-Lösung: 10 g Sodiumdodecylsulfat ad 100 ml A. bidest., wegen Toxizität der Substanz sind Mundschutz und Handschuhe zu tragen, Lösung sterilfiltrieren

5M NaCl-Lösung: 292,2 g NaCl ad 1000 ml A. bidest

Pronase: 100 mg Pronase (von Streptomyces griseus) ad 10 ml A. bidest; Aliquots à 1 ml einfrieren

Ethanol 70% und 100%

Mastermix: Formamid 50%, Dextransulfat 10%, 2 x SSC

2.1.2.3 Reagenzien für die Nick-Translation

Biotin-16-UTP: 1 mM	Boehringer Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP: 1 mM	Boehringer Mannheim
Nick Translation Kit:	Abbott Laboratories, IL, USA
Nick Translation Enzyme	
10 X Nick Translation Buffer	
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, (0,3 mM)	
Nuclease-free Water	

2.1.2.4 Reagenzien für die Comparative Genom Hybridisierung und FISH-Analysen mit zentromerspezifischen Sonden

20 x SSC:	350,4 g NaCl + 176,4 g Natriumcitrat ad 2000 ml Aqua bidest., pH 7,0
4 x SSC:	20 ml 20 x SSC + 80 ml Aqua bidest.
2 x SSC:	100 ml 20 x SSC + 900 ml Aqua bidest.
1 x SSC:	50 ml 20 x SSC + 950 ml Aqua bidest.
0,1 x SSC:	5 ml 20 x SSC + 995 ml Aqua bidest.
4 x SSC/Triton:	200 ml 20 x SSC + 800 ml Aqua bidest. + 1 ml Triton X-100
2 x SSC/Triton:	100 ml 20 x SSC + 900 ml Aqua bidest. + 1 ml Triton X-100
2 x SSC/Tween	100 ml 20 x SSC + 900 ml Aqua bidest. + 1,8 ml Tween 20
4 x SSC/3 % BSA: (Blockungslösung)	20 ml 4 x SSC + 0,6 g bovines Serumalbumin, aliquotieren à 1 ml und lagern bei – 20 °C
4 x SSC/Tween/ 3% BSA	20 ml 4 x SSC + 0,2 ml Tween 20 + 0,6 g BSA

4 x SSC/1 % BSA: Inkubationspuffer für Antikörper	20 ml 4 x SSC + 0,2 g bovines Serumalbumin, aliquotieren à 1 ml und lagern bei – 20 °C
Mastermix:	11 ml Formamid deion. + 2 g Dextransulfat + 1 ml 20 x SSC, vortexen und lösen bei 70°C, pH 7,0 ad 14 ml mit Aqua dest. auffüllen
Formamid :	Deionisiert mit Ionenaustaucher Dowex, pH 7,0, sterilfiltriert, aliquotiert und bei 4°C gelagert
Anti-Avidin, Biotin konjugiert:	Stocklösung 1 mg/ml, Gebrauchslösung 1:200 verdünnt mit 4 x SSC/Tween 20/1 % BSA (vol:vol:vol), Endkonzentration 5 µg/ml
Anti-Digoxigenin- Rhodamin-Fab- Fragment:	Stocklösung 200 µg Lyophilisat/ml A. bidest., Gebrauchslösung 1:10 verdünnt mit 4 x SSC/Tween 20/1 % BSA (vol:vol:vol), Endkonzentration 20 µg/ml
DAPI:	70 ml 4 x SSC/Tween 20 + 84 µl DAPI Stocklösung (200 µg/ml)

2.1.2.5 PCR-Zusätze und Primer

Enzym: AmpliTaq DNA-Polymerase	PerkinElmer, USA
dNTP-Stammlösung:	Amersham Pharmacia Biotech,
DNA Polymerisation Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Wien, Österreich
10 x PCR-Puffer	PerkinElmer, USA
Primer: Map pairs Weber Screening Set Version 6a	Research Genetics, USA

2.1.2.6 Lösungen für Gelelektrophoresen

Natives Polyacrylamidgel (PAA-Gel), 8 %:

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

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

1 x TBE-Puffer: 45,7 ml (55,02 g Borsäure, 107,8 g Tris(-base), 7,44 g EDTA
ad 1000 ml Aqua bidest, pH 8,0)

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

Tetraethylendiamin (TEMED): 50 µl

2%iges Agarosegel

2 g Agarose auf 100 ml 1xTBE Puffer, 5 µl Ethidiumbromid (1%)

Gelladepuffer

0,25 % Xylencyanol, 0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin

Längenstandard Marker VIII:

35 µl Marker VIII (0,25 µg/ml), 35 µl 10 x TBE, 180 µl H₂O, 100 µl
Bromphenolblau (20 mg/ml)

Längenstandard Marker 100 bp:

5 µl Marker 100 bp (1 µg/ml, GIBCO BRL), 25 µl 10 x TBE-Puffer, 220 µl
H₂O, 50 µl Bromphenolblau (20 mg/ml)

2.1.2.7 Reagenzien zur Silberfärbung

Essigsäure 10%

Färbelösung: 2%ige Silbernitratlösung
(800 mg ad 400 ml Aqua dest.)

Entwicklungslösung: 3%ige Natriumcarbonatlösung, 1/800 vol 37%iges
Formaldehyd

Stopp-Lösung:	10%ige Essigsäure
Gelfixierlösung:	10 ml Glycerin (2%) + 280 ml Ethanol 100 % ad 1000 ml H ₂ O

2.1.3 Geräte und Zubehör

Autoklav	Gössner, Hamburg
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus, Hanau
Gelelektrophoresekammer	
horizontal	Gibco BRL, USA
vertikal	Gibco BRL, USA
Gelelektrophoreseschlitten	AGS, Heidelberg
Gelfärbegerät (Hofer Automated Gel Stainer)	Pharmacia Biotech, USA
Gelkämme	
Agarosegelkämme (1 mm und 2 mm)	AGS, Heidelberg
PAA-Gelkämme (0,2 mm und 0,8 mm)	Gibco BRL, USA
Gewebeeinbettautomat, Citadel 2000	Fa. Shandon, Frankfurt
Magnetrührer Ikamag RO	Ika-Werk, Staufen
Mikrowelle Typ M742	Philips, Schweden
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer UV-160	Shimadzu, Japan
Pipetten	
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Multipette	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Pipettenspitzen (Biosphere Quality Tips)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	
Falcon tubes (50 ml)	Falcon, USA
Micro-Test-Tubes (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Kulturröhrchen (12 ml)	Falcon, USA

Schüttelwasserbad (GFL 1083)	GFL, Münster
Spannungsgeber	Biometra, USA
Steril-Werkbank Lamin Air (Typ HB 2448)	Heraeus, Hanau
Thermocycler (OmniGene Thermal Cycler)	HYBAID limited, UK
Tischzentrifugen	
Mikrozentrifuge (Biofuge 13)	Heraeus Instruments, Hanau
Biofuge 28 RS	Heraeus Instruments, Hanau
Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Waagen	
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Wärmeplatte	Heraeus, Hanau
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad (RM 6)	Lauda, Lauda-Königshofen

2.1.4 Untersuchungsmaterial

Im Rahmen einer Studie zur Abklärung der Inzidenz uniparentaler Disomien unter frühen Spontanaborten wurden in der Abteilung für Klinische Genetik in Marburg und in der Abteilung für Kinderpathologie in Mainz Gewebe plazentaren und falls vorhanden embryonalen Ursprungs asserviert. Für die meisten Fälle aus Marburg konnte außerdem 10 ml EDTA-Blut der Eltern kryokonserviert werden.

Für diese Arbeit wurden 32 frühe Spontanaborte aus Mainz und 28 aus Marburg ausgewählt, bei denen keine zytogenetische Diagnose erhoben werden konnte, da die Zellen unter in vitro Bedingungen nicht proliferierten. Bei diesen insgesamt 60 Aborten handelt es sich um Spontanaborte des 1. Trimenons aus den Jahren 1993-1998. Die Erhebung anamnestischer Daten und die Ermittlung des Gestationsalters durch Ultraschall erfolgte in den kooperierenden Abteilungen für Gynäkologie und Geburtshilfe in Mainz und Marburg.

Für die Comparative Genomhybridisierung wurde DNA aus den asservierten Abortgeweben gewonnen, sowie DNA einer männlichen Kontrollperson als Referenz-DNA. Die Zielchromosomen zur Hybridisierung stammten ebenfalls von einem männlichen, klinisch und zytogenetisch unauffälligen Probanden.

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchung der Plazentae und Embryos

2.2.1.1 Makroskopische Begutachtung der Plazentae, Fixation und Paraffineinbettung

Nach Eingang des Abortmaterials wurde dieses auf Vollständigkeit, Art und Struktur der Gewebebestandteile hin untersucht und Proben für die zytogenetische und histologische Untersuchung entnommen. Von jedem Fall wurden zusätzlich jeweils 50-200 mg Chorionzottenmaterial entnommen und bei -80 °C nativ tiefgefroren, um die spätere DNA-Extraktion zu ermöglichen. Anschließend wurde das restliche Material für mindestens 12 Stunden in 4%igem Formalin fixiert. Für die histologische Begutachtung wurden dann bis zu fünf Proben pro Fall entnommen und in Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung der Paraffinblöckchen wurden Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt und auf entfettete Objektträger aufgezogen.

2.2.1.2 Histologische Färbungen

Routinemäßig kamen zwei Färbungen zur Anwendung:

- Die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung, die Zellkerne und Kalk blau, Zytoplasma und Kollagenfasern rot anfärbt.
- Die van Gieson-Färbung, bei der sich Zellkerne schwarz, Bindegewebsfasern rot, Muskulatur und Zytoplasma gelb anfärben.

2.2.1.3 Histologische Beurteilung der Plazentae

Die morphologischen Veränderungen der Chorionzotten wurden der CGH-Analyse zeitlich vorgeschaltet und somit in Unkenntnis der durch die CGH erzielten Diagnose beschrieben. Die Einordnung der Zottenalterationen erfolgte entweder als primäre Unterwertigkeit der Gewebe (PGU) mit schwerwiegenden Veränderungen wie Chorionzottenhydrops, atypische Kontur und Größe der Zotten, Zottenstromafibrose, Trophoblastinklusionen sowie mangelhafte Vaskularisation. Unspezifische und regressive Plazentaveränderungen mit Zottenfibrose, Trophoblastatrophie, -eosinophilie und Gefäßkollaps wurden der PGU-Gruppe gegenübergestellt.

2.2.1.4 Makroskopische Beurteilung der Embryos

In den Fällen mit vorliegenden Embryos bzw. -fragmenten wurden diese in Formalin konserviert, und soweit möglich unter einem Invertoskop seziiert, um organische Veränderungen zu erfassen.

2.2.2 Lymphozytenkultur

Zur Lymphozytenkultivierung wurde heparinisiertes Blut verwendet. Die Kultivierung der Lymphozyten erfolgte in 10 ml Mc Coy's Medium, supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum, 100 µl Antibiotikum-Antimykotikum-Lösung zur Vermeidung von Kontamination durch Bakterien oder Pilze, 120 µl Bikarbonatlösung 7,5 % zur Pufferung im physiologischen Bereich und 200 µl PHA (Phytohaemagglutinin) zur Wachstumsstimulierung. Nach Kultivierung bei 37 °C über 72 Stunden wurden durch Zugabe von 0,1 ml Colcemid-Lösung (10 µg/ml) die Zellteilungen unterbrochen und die Kultur für weitere 2 Stunden fortgesetzt.

2.2.3 Chromosomenpräparation

Nach Umfüllen der Zellsuspension in 10 ml Zentrifugenröhrchen, Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 Minuten und Verwerfen des Überstandes wurde 6 ml 0,075 M Kaliumchlorid (37 °C) als hypotone Lösung hinzugegeben. Die Behandlung mit einer hypotonen Lösung dient der besseren Spreitung und somit der Darstellbarkeit der Chromosomen. Durch osmotische Flüssigkeitsaufnahme in die Zellen wird eine Zellschwellung herbeigeführt. Auf diese Weise werden die Erythrozyten zerstört und konnten nach 20 minütiger Inkubation bei 37 °C durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 Minuten und Abpipettieren des Überstandes entfernt werden. Anschließend wurde 6,0 ml eisgekühlte Fixierlösung (Ethanol/Eisessig 1:3; v:v) hinzugegeben, vorsichtig durchmischt und erneut bei 1000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde insgesamt viermal durchgeführt. Schließlich wurden zum verbliebenen Zellpellet 0,5 ml Eisessig zugegeben und vorsichtig resuspendiert, um eine vollständige Fixierung der Zellen zu erhalten.

Die Zellsuspension wurde dann auf entfettete, kaltfeuchte Objektträger aufgetropft und mittels eines Phasenkontrastmikroskops (Fa. Zeiss) hinsichtlich Dichte und Spreitung der Chromosomen beurteilt. Die Objektträger wurden anschließend für 24 h bei Raumtemperatur gelagert und dann der weiteren Bearbeitung zwecks FISH und CGH zugeführt (s. Kap. 2.2.7; 2.2.8).

2.2.4 DNA-Isolierung

Die in dieser Arbeit verwendete DNA stammt zum einen aus Abortgeweben (Chorionzotten, Eihaut), zum anderen aus peripherem Blut.

2.2.4.1 DNA-Isolierung aus Blut

Genomische DNA lässt sich aus Leukozyten menschlichen Blutes gewinnen. Dazu entfernt man die kernlosen Erythrozyten und lysiert schließlich die Leukozyten. Die freiwerdenden Proteine werden enzymatisch abgebaut und

ausgesalzen. Zuletzt wird die DNA durch Ethanolgabe ausgefällt und isoliert (nach Miller et al. 1988).

Das tiefgefrorene EDTA-Blut wurde zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und in Falconröhrchen überführt. Mit 4 °C kaltem RCLB (Red Cell Lysis Buffer) auf ca. 40 ml Volumen aufgefüllt und unter intermittierendem Schwenken für 15 Minuten auf Eis gelagert, erfolgte die selektive Lyse der Erythrozyten. Durch anschließende Zentrifugation bei 4 °C, 3000 rpm für 10 Minuten wurden die Erythrozyten-Trümmer mit dem Überstand verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde mit 15 ml RCLB wiederholt; dabei war darauf zu achten, daß das Pellet durch Schütteln vollständig resuspendiert war. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 5 ml SE-Puffer, 50 µl Pronase und 500 µl SDS 10 % gelöst und bei 37 °C über Nacht im Schüttelwasserbad belassen. Auf diese Weise erfolgte die Proteolyse der Zellmembranen und die Freisetzung der DNA aus den Zellkernen. Gleichzeitig wurden auch die Nukleasen irreversibel inaktiviert und so die DNA vor Verdauung durch DNAsen geschützt. Um eine möglichst vollständige Lyse der Leukozyten zu erzielen, wurden dem Ansatz nochmals 5 ml SE-Puffer zugesetzt und für weitere 5 Minuten bei 55 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2,5 ml 5 M NaCl-Lösung und sofortigem Mischen wurden die proteinogenen Zelltrümmer ausgefällt. Sie ließen sich durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (15 Minuten, 3000 rpm) von der DNA abtrennen. Die DNA aus dem Überstand wurde durch Zugabe von 30 ml eiskaltem 96-%igem Ethanol gefällt. Die Menge des zugesetzten Ethanols richtet sich nach dem Volumen der DNA-Lösung und sollte das 2,5-3fache betragen. Das mitgefällte Salz wurde durch anschließendes Waschen in 70-%igem Ethanol größtenteils entfernt. Je nach geschätzter Menge DNA wurde die DNA in 300-600 µl TE-Puffer gelöst. Aus 10 ml EDTA-Blut ließen sich im Mittel zwischen 400 und 600 µg hochmolekulare DNA gewinnen. Die DNA-Konzentration wurde durch photometrische Messungen ermittelt (Kapitel 2.2.4.).

2.2.4.2 DNA-Isolierung aus Abortgewebe

Analog zur DNA-Gewinnung aus Leukozyten wurde zur DNA-Isolierung aus Abortgewebe die Aussalzmethode (nach Miller et al. 1988) angewendet. Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Proben wurden unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser pulverisiert, um einen möglichst optimalen Zellaufschluß zu gewährleisten. Durch Zugabe von wenigen ml PBS-Puffer wurde das Gemisch in ein Falcon-Tube überführt und bei 3000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Pro Röhrchen wurden nun 2 ml Lysispuffer (SE-Puffer), 200 μl SDS und 3 μl Pronase hinzugefügt und wie in Kapitel 2.2.4.1. fortgeföhren: Zelllyse bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht, Aussalzen der Proteine mit 5 M NaCl-Lösung, Fällung der sich im Überstand befindenen DNA mittels Ethanol, Lösung der DNA in TE-Puffer, photometrische Ermittlung der DNA-Konzentration, siehe Kapitel 2.2.5.

2.2.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm Wellenlänge. Für die photometrische Messung wurden Quarzküvetten (mit 1 cm Schichtdicke) benutzt, weil diese UV-Licht nicht absorbieren. Unter diesen Voraussetzungen hat eine Lösung mit einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA einen Absorptionswert von 1 (sogenannte Optische Dichte, OD, Maniatis et al. 1989). Proben der DNA-Isolate wurden nun im Verhältnis von 1:50 mit Aqua dest. verdünnt und gegen einen Probenleerwert (H_2O) gemessen.

Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei 280 nm. Durch Bildung des Quotienten aus OD_{260} zu OD_{280} läßt sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Eine reine DNA-Lösung besitzt den $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Wert von 1,8. Werte größer 2 weisen auf Kontamination durch RNA hin, Werte kleiner 1,7 lassen auf Verunreinigung durch Proteine schließen. Die Werte der aus Blut extrahierten DNA lagen zwischen 1,6-1,9, die der DNA aus Abortgewebe zwischen 1,5-1,8.

2.2.6 Nick-Translation

Die Nick-Translation dient zur enzymatischen Markierung von DNA mittels chemisch veränderten Nukleotiden. Nukleotide können nicht radioaktiv mit Molekülen wie Digoxigenin oder Biotin modifiziert werden, wie zum Beispiel als Biotin-16-dUTP und Digoxigenin-11-dUTP. Bei der Nick-Translation werden pankreatische DNase I und die *E. coli* DNA-Polymerase eingesetzt. Die DNase katalysiert zunächst die Bildung von Einzelstrangbrüchen (*nicks*). Auf diese Weise entstehen freie 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Dabei wird die DNA in Fragmente von 500-1500 bp 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 angefügt werden. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide im Reaktionsgemisch angeboten. Gleichzeitig baut die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität desselben Enzyms auf der anderen Seite des Bruchs weitere Nukleotide ab. Dadurch wird die Bruchstelle langsam im 5'-3'-Richtung verschoben (*nick translation*). Für eine effektive Markierung der DNA ist ein ausgewogenes Verhältnis der Reaktion von DNase und Polymerase notwendig.

2.2.6.1 Vorbereitung der Nukleotide

Mischung unmarkierter Nukleotide herstellen, z. B.:

8 µl dATP, 8 µl dGTP, 8 µl dCTP (0,3 mM) mischen, reicht für 2 Ansätze.

1:10 Verdünnung von Digoxigenin-11-dUTP (1mM) mit Aqua dest. (0,1mM)

1:3 Verdünnung von dTTP (0,3mM) mit Aqua dest. (0,1mM)

2.2.6.2 Markierung der genomischen DNA

Im Reaktionsgemisch für die Nicktranslation befand sich die zu markierende DNA (Test-DNA bzw. Referenz-DNA), Puffergemisch, Wasser, Nukleotide, Biotin- bzw. Digoxigenin-markierte Nukleotide und das Enzymgemisch. In der

Tabelle 2.1 ist der Reaktionsansatz dargestellt. In die Nicktranslation wurden schließlich 10 µl des Reaktionsansatzes eingesetzt.

Tab. 2.1 Nicktranslation: Reaktionsansätze

	Reaktionsansatz zur Markierung der Test-DNA	Reaktionsansatz zur Markierung der Referenz-DNA
dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP)	10 µl	10 µl
Nicktranslationspuffer	5 µl	5µl
dTTP	7 µl	7µl
Digoxigenin-11-dUTP	3µl	-
Biotin-16-dUTP	-	1 µl
1 µg DNA	X µl Test-DNA	X µl Referenz-DNA
Aqua bidest.	X µl ad 40 µl	X µl ad 40 µl

1 µg der Test- bzw. Referenz-DNA wurden unter Zugabe der mitgelieferten Enzymmischung für 2 Stunden bei 15 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70 °C für 10 Minuten gestoppt.

2.2.6.3 Herstellung der Hybridisierungsmischung

Ca. 400 ng markierte Referenz- und Test-DNA wurden in gleichen Verhältnissen gemischt und mit 25 µl COT-1-DNA (1mg/ml, Fa. Invitrogen) versetzt. Restliche Referenz- bzw. Test-DNA wurde bei -20°C asserviert. Die DNA wurde durch Zugabe von 6,5 µl 4 N LiCl mit eisgekühltem 100% EtOH (200µl) bei -80 °C präzipitiert. Nach Auswaschung des LiCl's mit eisgekühltem 70% EtOH wurde das Pellet in 7,5 µl Formamid 100% aufgenommen und bei 37 °C über Nacht gelöst. Anschließend wurden 7,5 µl Mastermix (4 x SSC + 20% Dextransulfat) zur Hybridisierungsmischung dazugegeben. Diese Mischung wurde dann bei 75 °C im Wasserbad für 10 Minuten denaturiert und zur Reduktion der Hybridisierung unspezifischer repetitiver Sequenzen bei 37 °C für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert.

2.2.7 Comparative Genom Hybridisierung

2.2.7.1 Vorbereitung der Chromosomenpräparate

Die Vorbereitung der Chromosomen erfolgte anhand der Protokolle von Fritz und Mitarbeitern (1998). Die einzelnen Schritte sind der Tab. 2.2 zu entnehmen. Die Inkubationen fanden in Küvetten statt.

Tab. 2.2 Vorbereitung der Chromosomenpräparate – Arbeitsschritte

Lösung	Zeit (Minuten)	Temperatur	Funktion
Alkoholreihe (100%, 70%, 50%, 30%)	je 2	RT	Rehydrierung
0,1 x SSC	1	RT	Rehydrierung
2 x SSC	10	RT	Rehydrierung
2 x SSC	30	70 (-80) °C	Verbesserung der Chromosomenstruktur
2 x SSC	ca. 30	RT	Abkühlen der OT in der Küvette auf ca. 30 °C
0,1 x SSC	1	RT	Äquilibrieren
0,07 N NaOH	1	RT	Denaturierung der Chromosomen-DNA
0,1 x SSC	1	4 °C	Stoppen und Waschen
2 x SSC	1	4 °C	Waschen
Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 100%)	1	RT	Dehydrierung
Objektträger	10	RT	Lufttrocknen der OT

Nach dem Lufttrocknen der Chromosomenpräparate wurde die Hybridisierungsmischung aufgetragen, der Objektträger mit einem 22 x 22 mm großem Deckglas luftblasenfrei bedeckt und mit Fixogum an den Rändern des Deckglases versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte für bei 37 °C in einer feuchten Kammer für drei Tage.

2.2.7.2 Fluoreszenz-Detektion und Waschung

Nach Entfernen des Fixogums wurden die Deckgläser in 2 x SSC abgeschwemmt und die ungebundene DNA durch stringente Waschungen mit SSC-Puffer entfernt.

Die Biotin-markierte Referenz-DNA wurde durch die Bindung von Fluorochrom-markiertem Streptavidin (Texas Red) nachgewiesen. Zur Detektion der Digoxigenin-markierten Test-DNA wurden Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper eingesetzt. Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde der Objektträger zuvor mit Rinderserumalbumin (BSA, 3%) inkubiert. 50 µl Antikörperlösung wurde kurz zentrifugiert, auf den Objektträger aufgetragen und für eine Stunde in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden anschließend durch Waschschriffe entfernt und die Chromosomen mit DAPI gegengefärbt. Bei allen Arbeitsschritten mit Fluorochromen sollte ein direkter Lichteinfall vermieden werden. Schließlich wurden die Präparate in ein oxidationshemmendes Medium (Antifade, Vectashield) eingebettet, um ein schnelles Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern. Die einzelnen Arbeitsschritte sind Tabelle 2.3 zu entnehmen.

Tab. 2.3 Waschung der hybridisierten Objektträger und Fluoreszenz-Detektion – Arbeitsschritte

Lösung	Zeit (Minuten)	Temperatur	Funktion
2 x SSC	ca. 5	RT	Entfernen der Deckgläser
1 x SSC	5	75 °C	Waschung zur Entfernung ungebundener Sonden-DNA
2 x SSC/0,1%Triton	5	RT	Waschung
Blockungslösung 200 µl 4 x SSC/ 3% BSA	15	RT	Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen
4 x SSC / 0,1% Triton	kurz eintauchen	RT	Waschung
Antikörper- Inkubationslösung	60	37 °C	Detektion der markierten Sonden-DNA
4 x SSC/0,1% Triton	2 x 5	45 °C	Entfernung nicht gebundener Antikörper
DAPI	2	RT	Gegenfärbung der Chromosomen
Aqua dest.	kurz eintauchen	RT	Abspülen
		37°C	Lufttrocknen der OT
Vectashield		RT	Eindecken mit 24 x 60 mm Deckgläsern

2.2.7.3 Auswertung der CGH mittels digitaler Bildanalyse

Die Auswertung erfolgte mit einem Zeiss-Epifluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen), ausgestattet mit der Filterkombination Nr. 1 nach Prof. Dan Pinkel (AHF Analysetechnik, Tübingen), einer CCD-(charge-coupled-device)-Kamera (Fa. IMAC) und digitaler Bildanalyse (ISIS digital image analysis system, MetaSystems, Altusheim, Germany und Cytovision CGH program, Applied Imaging Cooperations). Geeignete Metaphasen wurden unter dem Mikroskop aufgesucht. Die mittels DAPI gefärbten Metaphasechromosomen sowie die Fluoreszenzen der mit Texas Red und FITC markierten Referenz- bzw. Test-DNA wurden mit den entsprechenden Filtern und mittels einer mit hochempfindlichem Photochip ausgestatteten Kamera als Grauwerte separiert. So lagen von jeder Metaphase drei monochrome Bilder vor. Das DAPI-Bild diente der Chromosomenidentifizierung, das FITC-Bild

repräsentierte die Test-DNA und das Texas-Red-Bild stellte die Referenz-DNA dar. Die Invertierung des DAPI-Fluoreszenzmusters ermöglichte eine semiautomatische Karyotypisierung. Rot-zu-grün Fluoreszenzprofile wurden getrennt in kurzen (p-) und langen (q-) Arm für jedes Chromosom ermittelt und als Histogramm angegeben. Anschließend erfolgte eine Normalisierung der Profile für jeden Chromosomentyp einer Metaphase. Nach Bearbeitung von 10-15 Metaphasen wurden deren Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet und wiederum als Profil über die Länge des jeweiligen Chromosoms dargestellt. Zur Ermittlung von Über- und Unterrepräsentationen wurde der Schwellenwert auf die dreifache Standardabweichung festgesetzt, einem Konfidenzintervall von etwa 95% entsprechend. War das Verhältnis von Referenz-zu-Test-DNA (rot-zu-grün Fluoreszenzprofil) ausgeglichen, so errechnete sich eine Ratio von 1.0. Ein Verlust an genetischem Material auf Seiten der Test-DNA zeigte eine Ratio kleiner 0,80, ein Zugewinn an DNA eine Ratio größer 1,20 an (du Manoir et al., 1995). Mit diesen Grenzwerten sind auch Mosaik bis zu 50% erfassbar. Chromosomale Imbalancen in der Test-DNA wurden mittels Balken verdeutlicht. Dabei wurden gemäß internationaler Übereinkunft rot für Unter- und grün für Überrepräsentation gewählt (s. a. Abb. 1.4, 1.5). Aberrante Befunde wurden nach dem internationalen System für die Nomenklatur zytogenetischer Befunde beschrieben (ISCN 1995).

2.2.8 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist eine zytogenetische Technik, mit der Nukleinsäuren in Präparaten von Geweben, einzelnen Zellen, Zellkernen oder Metaphasechromosomen visualisiert werden können. Das Prinzip ist eine Hybridisierung einzelsträngiger Nukleinsäuren mit einem Genom, wie von Gall und Pardue schon 1969 beschrieben. Es hat sich die nicht-radioaktive *in-situ*-Hybridisierung durchgesetzt, d. h. die DNA-Sonden sind über sogenannte Reportergruppen markiert, welche entweder selbst fluoreszieren oder mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper detektiert werden.

In den Fällen, in denen die CGH ein balanciertes Fluoreszenzprofil ergeben hatte, wurde eine FISH-Analyse zum Ausschluß bzw. Nachweis einer Ploidie-Bestimmung eingesetzt. Da für GC-reiche Regionen wie 1p32 pter, 16p, Chromosomen 19 und 22 CGH-Ergebnisse nur unter Vorbehalt zu werten sind, wurden außerdem Nachuntersuchungen mittels FISH durchgeführt, wenn Abweichungen im Fluoreszenzprofil für diese Chromosomen(abschnitte) in der CGH aufgedeckt wurden, um numerische Veränderungen sicher zu erfassen. Interphase-FISH-Untersuchungen erfolgten mit zentromerspezifischen Sonden an Ausstrichpräparaten von Plazentazotten. Tabelle 2.4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Sonden und die jeweilige Fragestellung.

Tab. 2.4 FISH mit zentromerspezifischen Sonden

(Alle Sonden waren Digoxigenin-markiert, Firma Qbiogen, Heidelberg)

Sonden	Fragestellung	Fall-Nummer
D7Z1	Trisomie-7-Mosaik Ploidie-Bestimmung	MZ-637 MZ-1438
D9Z1	Ploidie-Bestimmung	MZ-531, MZ-1566, MZ-1593, MZ-2903
D15Z	Ploidie-Bestimmung	MZ-570, MZ-1832
D16Z1	Trisomie 16	MZ-1832, MZ-2025
D18Z1	Ploidie-Bestimmung Trisomie 18 Mosaik, Triploidie	MZ-531, MZ-1566, MZ-1593, MZ-2011, MZ-2903, MZ-4077 MZ-2557
DXZ1	Klinefelter-Syndrom Triploidie Turner-Syndrom	MZ-526 MZ-1438, MZ-2025 MZ-3572
DYZ3	Klinefelter-Syndrom Triploidie	MZ-526 MZ-1438, MZ-2025

2.2.8.1 Vorbereitung der Sonden und Hybridisierung

Ein Hybridisierungsansatz bestand aus 8 µl Mastermix, 1 µl Herrings-Sperm-DNA und 1 µl zentromerspezifischer DNA-Sonde. Die Sonden wurden durch Hitze denaturiert (5 Minuten bei 70-80 °C), anschließend kurz anzentrifugiert und auf Eis gestellt. Die Chromosomen wurden entsprechend Kapitel 2.2.7.1 vorbereitet. Die Sonden wurden auf die denaturierten Chromosomen

aufgetragen, mit einem 22 x 22 mm großen Deckglas luftblasenfrei abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte wie unter Kap. 2.2.7.1 beschrieben über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37 °C.

Die Detektion der indirekt markierten Sonden erfolgte in gleicher Weise wie in Kapitel 2.2.7.2 beschrieben. Pro Hybridisierung wurden anschließend mindestens 50 Zellkerne mittels Zeiss-Epifluoreszenzmikroskop mit entsprechender Filterkombination analysiert.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist im Jahre 1983 von Kary B. Mullis entwickelt worden. Mit der PCR ist es möglich geworden, winzige Mengen DNA selektiv zu amplifizieren und so messbar zu machen. Theoretisch ist sie in der Lage, aus einem einzigen Nukleinsäureabschnitt innerhalb von wenigen Stunden bis zu 10^{12} Kopien herzustellen. Voraussetzung dafür sind ein DNA-Doppelstrang, eine thermoresistente DNA-Polymerase, eine ausreichende Menge an Nukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und sogenannte Primer; das sind zwei gegenläufige, synthetische DNA-Fragmente aus ca. 20 Nukleotiden. Zunächst wird die DNA durch Temperaturerhöhung auf 94-96°C denaturiert, d. h. in Einzelstränge getrennt. Nach Abkühlung auf 55-65°C können sich die Primer an die DNA binden. Dieser Vorgang wird als *Annealing* bezeichnet. Dazu bindet ein Primer am sense-Strang, der andere am Gegenstrang, dem antisense-Strang. Die Primer können nun bei 72 °C von der Polymerase in 5`-3`-Richtung verlängert werden. Nach Wiederholung des Zyklus sind nun DNA-Abschnitte entstanden, deren Länge exakt dem Abstand zwischen den Primern entspricht und die im nächsten Zyklus wiederum als Matrize dienen können. Der Zyklus Denaturierung-Annealing-Extension wird insgesamt 25-35 mal wiederholt und so eine exponentielle Amplifikation des erwünschten DNA-Abschnitts erreicht. Mullis erkannte außerdem, daß eine temperaturstabile DNA-Polymerase, wie sie in thermophilen Bakterien (*Thermus aquaticus*) vorkommt, es möglich macht, die Reaktion ohne Unterbrechung ablaufen zu lassen.

2.2.9.1 Primer und PCR-Standardbedingungen

Die Überprüfung der CGH-Ergebnisse erfolgte mit den von Jim Weber (Mansfield) zusammengestellten Markersets (Fa. Research Genetics). Die eingesetzten Primer begrenzen hochpolymorphe Loci in der Größe von 100-350 bp, die sehr häufig im menschlichen Genom vorkommen und die als Mikrosatelliten bezeichnet werden. Die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten ist von Allel zu Allel unterschiedlich, so daß man davon ausgehen kann, durch die PCR ein allelspezifisches PCR-Produkt zu erhalten. Mikrosatelliten eignen sich hervorragend als genetische Marker unter der Voraussetzung, daß die Lage auf dem Chromosom, der Abstand in cM zum nächsten Markerpunkt und seine Heterozygotität in der Bevölkerung bekannt sind.

Sämtliche Reaktionsansätze sind nach folgendem Schema (Tab. 2.5) pipettiert worden, wobei die Taq-Polymerase zur Vermeidung eines frühzeitigen Starts der PCR zuletzt hinzugefügt wurde. Um die Aktivität des Enzyms zu erhalten, wurde die Taq-Polymerase nicht wie die anderen PCR-Zusätze aufgetaut, sondern konsequent bei -20 °C gelagert.

Tab. 2.5 Reaktionsansatz für PCR mit Mikrosatelliten

10 x Puffer	2,5 µl
dNTPs (20 mM)	0,25 µl
Primer vorwärts (20 µM)	0,5 µl
Primer rückwärts (20 µM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (0,25 U)	0,5 µl
DNA (50 ng/µl)	1,0 µl
H ₂ O variabel	ad 25 µl

Die Reaktionsansätze wurden in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel amplifiziert. 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. Danach wurde sie wieder schrittweise gesenkt, um eine möglichst hohe Ausbeute an spezifischen PCR-Produkten zu erhalten. Die abschließende Elongation über fünf Minuten sollte eine vollständige Polymerisation der DNA-Fragmente sicherstellen (Tab 2.6).

Tab. 2.6 Standardzyklen-Bedingungen für eine PCR mit Mikrosatelliten (touch down`Protokoll)

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

Zur Überprüfung des PCR-Erfolgs wurden die PCR-Produkte anschließend auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.10) und mit Ethidiumbromid gefärbt. Das PCR-Produkt stellt sich dann als scharfe Bande in der zu erwartenden Größe dar. Zusätzliche Banden sind ein Hinweis auf unspezifische Primer-Anlagerung oder ungleiche Primermengen. Die Agarosegele dienen gleichzeitig zur Abschätzung der einzusetzenden Menge an PCR-Produkten in der sich anschließenden Polyacrylamidgelelektrophorese. Für weitere Analysen wurden die PCR-Produkte bei -20 °C gelagert.

2.2.10 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind bei neutralem pH-Wert stets negativ geladen. Verantwortlich dafür sind die negativ geladenen Phosphatgruppen, so daß DNA-Moleküle im elektrischen Feld zur Anode wandern. Zur Elektrophorese der Nukleinsäuren eignen sich als Trägermaterialien Agarose und Polyacrylamid.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren ist dabei abhängig von der Ladung, der Molekülgröße, der Molekülstruktur, der Porengröße des Gels und der angelegten Spannung. Die DNA wird zusammen mit Gelladepuffer aufgetragen, der die Dichte in den DNA-Proben erhöht und so das Absinken der DNA-Lösung in die Geltaschen erleichtern soll. Der Gelladepuffer enthält zusätzlich Bromphenolblau und Xylencyanol als Farbstoffe, die zusammen mit der DNA zur Anode wandern und so die Abschätzung des Gellaufs erleichtern. Bromphenolblau wandert im Agarosegel ungefähr wie ein DNA-Fragment mit 300 bp (Sambrook et al. 1989). Ein weiteres Hilfsmittel sind die Längenstandards (Marker), gebräuchlich ist z. B. ein 100 bp-Marker, der DNA-Fragmente enthält, die sich jeweils um 100 bp unterscheiden. Auf diese Weise kann die Größenbestimmung der DNA-Fragmente im Vergleich zum Längenstandard erfolgen. Dazu werden vergleichbare Mengen von Marker und DNA im gleichen Puffer gelöst und auf dasselbe Gel aufgetragen.

2.2.10.1 Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden zum Nachweis und zur Quantifizierung in 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt, die mit Ethidiumbromid versehen waren. Bei der Agarose handelt es sich um ein Polymer, das aus Galaktoseeinheiten besteht. Die Agarosekonzentration wird abhängig von der erwarteten DNA-Fragmentgröße eingestellt (Sambrook et al 1989). Hierzu wurde Agarose in 1x TBE-(Tris-Borat)Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung mit Ethidiumbromid, einem DNA-interkalierendem Farbstoff, versetzt (5 µl auf 100 ml Agarosegel). Anschließend wurde das Gel in einen waagerechten Gelschlitten gegossen und die Ladetaschen durch einen Kamm (1 mm) ausgespart. Nach vollständiger Auspolymerisation wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TBE-Laufpuffer bedeckt. Nach Entfernen des Kammes wurden die DNA-Proben, versetzt mit einem Drittel Volumen Gelladepuffer, und der Längenstandard (Marker VIII, Fa. Boehringer-Mannheim) in die Taschen pipettiert. Nach Beendigung der Elektrophorese konnte die aufgetrennte DNA

als Bande auf einem UV-Transluminator bei 312 nm Wellenlänge sichtbar gemacht werden.

Tab. 2.7 Agarosegelelektrophorese

Agarosekonzentration	2 %
Gelgröße	14 cm x 11 cm
Gelvolumen	100 ml
Gelpuffer	1 x TBE
Gelladepuffer	Xylencyanol, Bromphenolblau, Glycerin
Probenvolumen	6 µl (4 µl PCR-Produkt und 2 µl Gelladepuffer)
Längenstandard Marker VIII	6 µl
Spannung	ca. 200 V
Laufzeit	ca. 30 min

2.2.10.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamidgele besitzen im Vergleich zu Agarosegelen ein höheres Auftrennungsvermögen. Sie werden analog zu den Agarosegelen mit Tris-Borat-Puffer angesetzt und können nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid oder Silbernitrat gefärbt werden. Ein Gel setzt sich aus insgesamt vier Komponenten zusammen: 30% Acrylamidlösung, Bisacrylamidlösung, 1 x TBE-Puffer, 10% Ammoniumpersulfat und TEMED (vgl. Kap. 2.2.10.1).

Zur Herstellung und beim Gießen des Gels sollten wegen der Giftigkeit des Gemisches Handschuhe und Schutzbrille getragen werden. Zunächst wurden zwei Glasscheiben und zwei 0,8 mm dicke Spacer mit Wasser, anschließend mit Ethanol 70% gereinigt und entfettet. Die Glasplatten wurden aufeinander gelegt, getrennt durch die beiden Spacer an den Längsseiten, und der untere Rand sorgfältig mit Klebeband abgedichtet. Klammern an den Längsseiten dichteten die Glasplatten zusätzlich ab. Schließlich konnte die Gellösung zwischen die leicht schräg gehaltenen Glasplatten luftblasenfrei eingegossen

und ein Kamm (0,8 mm) mit 20 Taschen am oberen Ende eingeschoben werden. Zur vollständigen Auspolymerisation erfolgte die horizontale Lagerung des Gels für mindestens eine halbe Stunde. Danach wurden Klammern und Klebeband entfernt, die Glasplatten von außen nochmals mit Wasser gereinigt und in die vertikale Gelkammer eingespannt. Die obere und untere Kammer wurden mit ca. 200 ml 1xTBE aufgefüllt, der Kamm entfernt und die Taschen mittels einer dünnen Glaspipette durchgespült und so von Gelresten, die den Probenlauf stören könnten, gereinigt. Es empfiehlt sich ein Vorlauf von etwa 20 Minuten bei 35 Watt, damit das Gel eine Temperatur von 50 °C angenommen hat. In der Zwischenzeit wurden die PCR-Produkte vorbereitet. Dazu wurde die zuvor in der Agarosegelelektrophorese abgeschätzt Menge des PCR-Produkts mit Aqua dest. auf 5 µl aufgefüllt. Zu diesem Probenansatz wurden 2 µl Ladepuffer, bestehend aus 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol und 30% Glycerin, hinzugegeben. Das Pipettieren in die Geltaschen erfolgte stets in der Reihenfolge Vater-Abort-Mutter und wurde durch Auftrag des 100 bp Längenstandards in die äußeren Geltaschen vervollständigt. Zur besseren Auftrennung der Proben wurde zunächst 10 Watt für 10 Minuten, und dann die Leistung auf 35 Watt für die restliche Laufzeit eingestellt. Die Abschätzung des Probenlauf wurde durch die beigemischten Farbstoffe erleichtert; Xylencyanol wandert ungefähr wie ein 100 bp-Fragment. Erfahrungsgemäß wird für die Auftrennung von PCR-Produkten mit einer Größe zwischen 120-170 bp eine Laufzeit von zwei Stunden, bei größeren Fragmenten von 200-350 bp eine Laufzeit von etwa drei Stunden erwartet. Bei zu kurz gewählter Laufzeit ist die Auftrennung der Allele oft unzureichend, bei zu langer Laufstrecke resultieren unscharfe Banden.

2.2.10.3 Silberfärbung

Ein Vorteil der Silberfärbung liegt in der hohen Sensitivität (bis zu 0,03 ng/mm² Nukleinsäuren können noch dargestellt werden) und darin, daß keine mutagenen oder radioaktiven Substanzen eingesetzt werden müssen. Nukleinsäuren verändern das Redoxpotential und katalysieren dadurch die

Reduktion von Silbernitrat zu Silber, welches sich dann an den Nukleinsäuren ablagert. Silberfärbungen können nur mit Polyacrylamidgelen durchgeführt werden, da Agarosegele eine zu hohe Hintergrundfärbung aufweisen. Nach Beendigung der Elektrophorese entfernte man das Gel aus der Gelkammer, hob vorsichtig die obere Glasplatte und löste den Spacer ab, so dass das Gel auf der unteren Glasplatte liegen blieb. Vor der Färbung war es sinnvoll, das Gel auf eine handliche Größe zu kürzen und nur den Bereich, in dem sich die Proben befanden, weiter zu verwenden. Das Gel wurde vorsichtig in die Färbewanne überführt. Der genaue Ablauf der Färbung ist Tab. 2.8 zu entnehmen.

Tab. 2.8 Färbeprotokoll zur Silberfärbung von PAGE

Lösung	Zeit	Funktion
Ethanol 10%	5 Minuten	Waschung
Salpetersäure 1%	2 x 3 Minuten	Denaturieren
Silbernitrat 0,2%	20 Minuten	Färben
Aqua bidest.	3 x 1 Minute	Auswaschen des überschüssigen Silbernitrats
Natriumbicarbonat 3%	3 x 20 Sekunden	Entwickeln
Essigsäure 10%	3 Minuten	Stoppen
Aqua bidest.	5 Minuten	Waschen
Gelfixierlösung	20 Minuten	Fixierung des Gels

Die Silbernitratlösung sollte vor jedem Färbevorgang frisch angesetzt werden, während die Ammoniumpersulfatlösung maximal eine Woche bei 4 °C haltbar war. Die Entwicklerlösung (30% Natriumcarbonat) wurde als Stammlösung angesetzt und auf eine 3%ige Lösung vor jedem Färbevorgang frisch verdünnt. Die Stopp- und Fixierlösung konnte zur Vereinfachung der Methode in größeren Mengen angesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Nach Zugabe der Entwicklerlösung musste das Gel genau beobachtet werden, um den erwünschten Farbton der Banden abzugassen. Anschließend wurde das Gel zwischen zwei Blättern Celophanfolie in einen Rahmen eingespannt, getrocknet und haltbar gemacht.

Über den Vergleich mit dem 100 bp-Längenstandard wurde die Größe der PCR-Produkte überprüft. Bei Vorliegen einer Heterozygotie für den entsprechenden Locus ergaben sich zwei unterschiedlich große Banden pro Elternteil (dialleles System), so dass sich die Allelverteilung im Abort exakt ermitteln ließ (Abb. 3.10b, Kap. 3.2). Im ungünstigsten Falle liegen beide elterlichen Banden auf einer Höhe. Aufgrund der Homozygotie war dann eine Auswertung bezüglich der parentalen Herkunft nicht möglich.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der CGH

Chorionzottenmaterial von insgesamt 60 Spontanaborten des 1. Schwangerschaftsdrittels, welches in der Zellkultur kein ausreichendes Wachstum gezeigt hatte, ist mittels CGH auf unbalancierte Chromosomenaberrationen hin nachuntersucht worden. In 57 Fällen (95%) war die CGH-Analyse erfolgreich durchführbar, in 3 Fällen (5%) konnte die Auswertung wegen inhomogener Hybridisierungen nicht erfolgen. Hinsichtlich der verschiedenen Untersuchungskollektive aus Marburg und Mainz ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, so dass im folgenden die Ergebnisse immer gemeinsam betrachtet wurden. Einen Überblick über alle Ergebnisse bietet Tab. 3.1a-c.

Tab.3.1a CGH-Ergebnisse und Interpretationen

Identifikations- Nummer	CGH-Ergebnis	Bestätigung der CGH	Karyotyp (parentale Herkunft)	Maternales Alter	Gestations- alter
MZ-383	rev ish XY	M	46,XY	29	9+1
MZ-2011	rev ish XY	F	46,XY	30	9
MR-40	rev ish XY	M	46,XY	28	10
MR-198	rev ish XY	M	46,XY	28	8
MR-259	rev ish XY	M	46,XY	33	9
MR-531	rev ish XY	F	46,XY	33	10+2
MR-599	rev ish XY	M	46,XY	33	1. Trim.
MZ-531	rev ish XX	M	46,XX	31	10+4
MZ-637	rev ish XX	F	46,XX	29	7
MZ-1593	rev ish XX	F	46,XX	21	10+2
MZ-2826	rev ish XX	M	46,XX	33	8
MZ-4077	rev ish XX	F	46,XX	38	8-9
MR-59	rev ish XX	M	46,XX	28	7-8
MR-72	rev ish XX	M	46,XX	33	1. Trim.
MR-92	rev ish XX	M	46,XX	24	8
MR-118	rev ish XX	M	46,XX	28	11

Tab.3.1b CGH-Ergebnisse und Interpretationen

Identifikations- Nummer	CGH-Ergebnis	Bestätigung der CGH	Karyotyp (parentale Herkunft)	Maternales Alter	Gestations- alter
Komplette Blasenmole					
MR-112	rev ish XX	M	46,XX	30	8-9
Triploidie					
MZ-1566	rev ish XX	M/F	69,XXX	37	9
MZ-2557	rev ish XX	M/F	69,XXX	39	1. Trim.
MR-172	rev ish XX	M	69,XXX (pat)	42	11+4
MZ-526	rev ish XX and Y	M	69,XXY	34	12+6
MZ-1438	rev ish XX and Y	M/F	69,XXY	31	6
MR-81	rev ish enh (Y)	M	69,XYY (pat)	35	9
MR-216	rev ish enh (Y)	M	69,XYY (pat)	24	9
Trisomie (I)					
MZ-1682	rev ish XY, enh(2)	M	46,XY/ 47,XY,+2	30	7
MZ-2816	rev ish XY, enh(4)	*	47,XY,+4	28	9
MR-380	rev ish XX, enh(4)	M	47,XX,+4	33	9
MZ-570	rev ish XX, enh(7)	F	47,XX,+7	33	1. Trim.
MR-120	rev ish XX, enh(7)	M	47,XX,+7(mat)	33	8
MR-137	rev ish XY, enh(7)	M	47,XY,+7(pat)	38	11
MR-138	rev ish XX, enh(8)	M	47,XX,+8	30	11
MZ-4618	rev ish XX, enh(10)	*	47,XX,+10	38	9-10
MZ-2070	rev ish XX, enh(13)	*	47,XX,+13	39	1. Trim.
MR-67	rev ish XY, enh(13)	M	47,XY,+13(mat)	35	10
MZ-4348	rev ish XY, enh(15)	*	47,XY,+15	37	1. Trim.
MR-60	rev ish XY, enh(15)	*	47,XY,+15	33	7
MZ-1832	rev ish XX, enh(16)	F	47,XX,+16	31	10
MZ-2025	rev ish XY, enh(16)	M/F	47,XY,+16	31	10
MZ-2992	rev ish XX, enh(16)	*	47,XX,+16	29	11
MZ-3586	rev ish XY, enh(16)	M	47,XX,+16	34	11

Tab.3.1c CGH-Ergebnisse und Interpretationen

Identifikations- Nummer	CGH-Ergebnis	Bestätigung der CGH	Karyotyp (parentale Herkunft)	Maternales Alter	Gestations- alter
Trisomie (II)					
MZ-4440	rev ish XX, enh(16)	*	47,XX,+16	30	5
MR-106	rev ish XY, enh(16)	M	47,XY,+16(mat)	28	9
MR-159	rev ish XY, enh(16)	M	47,XY,+16(mat)	30	11
MR-258	rev ish XY, enh(16)	*	47,XY,+16	23	9
MR-291	rev ish XX, enh(16)	M	47,XX,+16(mat)	19	14
MZ-4616	rev ish XX, enh(18)	*	47,XX,+18	32	10
MR-162	rev ish XY, enh(19)	M	46,XY/ 47,XY,+19	21	10
MZ-2600	rev ish XX, enh(21)	M	47,XX,+21	39	11
MR-95	rev ish XX, enh(21)	M	47,XX,+21	35	12
MZ-3943	rev ish XY, enh(22)	*	47,XY,+22	35	10
MZ-4677	rev ish XY, enh(22)	M	46,XY/ 47,XY,+22	33	8-9
MR-41	rev ish XY, enh(22)	M	47,XY,+22(mat)	38	10
Monosomie X					
MZ-3572	rev ish X	*	45,X	29	12
MR-45	rev ish X	M	45,X(pat)	38	10
MZ-1768	rev ish X	*	45,X	29	9-10
MR-62	rev ish X	M	45,X(pat)	29	11
Strukturelle Aberration					
MZ-1520	rev ish XX, dim(5) (p14ter)	*	46,XX,del(5) (p14pter)		

M = Mikrosatelliten-Analyse, F = FISH, * = kein ausreichendes Untersuchungsmaterial, mat = maternal, pat = paternal.

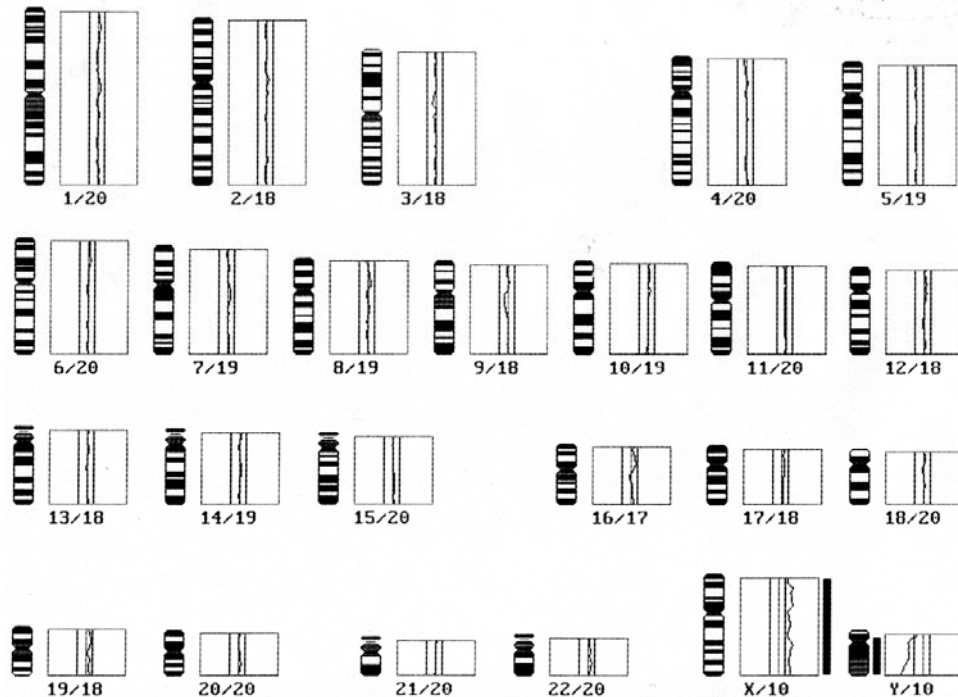
Die CGH-Ergebnisse sind nach ISCN (1995) erstellt. Chromosomen(regionen) mit einer Mehrbelegung an Fluoreszenzintensität werden als „enhanced = enh“ bezeichnet, solche mit einem Fluoreszenzverlust im Vergleich zum euploiden Status als „diminished = dim“.

In 20 Fällen ergaben sich bei der CGH keine Auffälligkeiten im CGH-Profil: Da die verwendeten Metaphasechromosomen als auch die Kontroll-DNA von einem männlichen Probanden stammten, mußte sich bei einer XY-Konstellation der Test-DNA auch für die Gonosomen eine Ratio von 1,0 ergeben. Dieses wurde in 7 Hybridisierungen beobachtet. In 13 Fällen zeigte die CGH für das X-Chromosom eine einheitliche Mehrbelegung, für das Y-Chromosom einen relativen Verlust von Genmaterial an, eine Konstellation, die auf einen XX-Genotyp des Aborts hinweist.

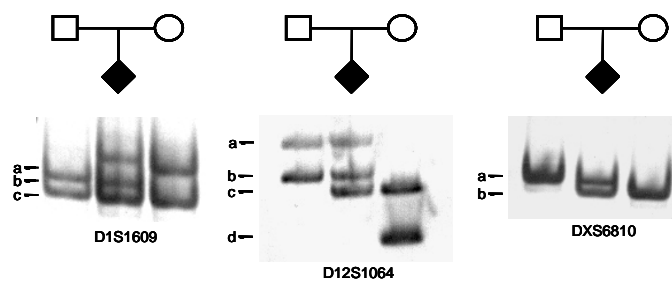
Alle 20 Fälle mit offensichtlich balanciertem Karyotyp wurden zum Ausschluß einer Ploidie-Veränderung nachuntersucht. In 16 Fällen wurde eine Mikrosatelliten-Analyse von verschiedenen Loci durchgeführt. (Drei aussagekräftige Primer wurden als ausreichend angesehen.) 4 Fälle wurden über eine Interphase-FISH-Analyse mit zentromerspezifischer Sonde überprüft. In 3 Fällen (MR-172, MZ-1566, MZ-2557) wurde eine Triploidie verifiziert, s. Abb. 3.1b. Im Fall MR-112 fand sich in der CGH-Analyse keine Abweichung der Ratioprofile, die Fluoreszenzintensitäten für die Geschlechtschromosomen entsprachen einem weiblichen Karyotyp. Die Mikrosatellitentypisierung belegte jedoch ausschließlich paternale Allele im Abort (Abb.3.2b).

Abb. 3.1 (MR-172) Missed abortion der 11+4. SSW, histologisch Partialmole

a. Das CGH-Profil entsprach einem unauffälligen weiblichen Karyotyp.



b. PAGE mit hochpolymorphen Mikrosatelliten: Für die Loci D1S1609 und D12S1064 waren drei Allele nachweisbar. Sie belegten eine Triploidie väterlicher Herkunft. Die entsprechenden Allele sind in Arbeitseinheiten (a-d) dargestellt.



c. Fragment des embryonalen Kopfes von 0,7 cm Durchmesser mit auffälligem Hypotelorismus.

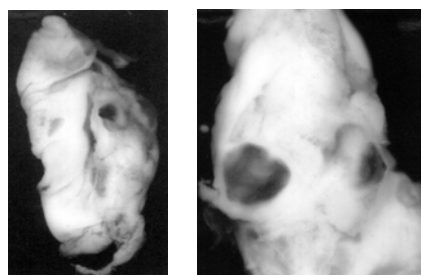
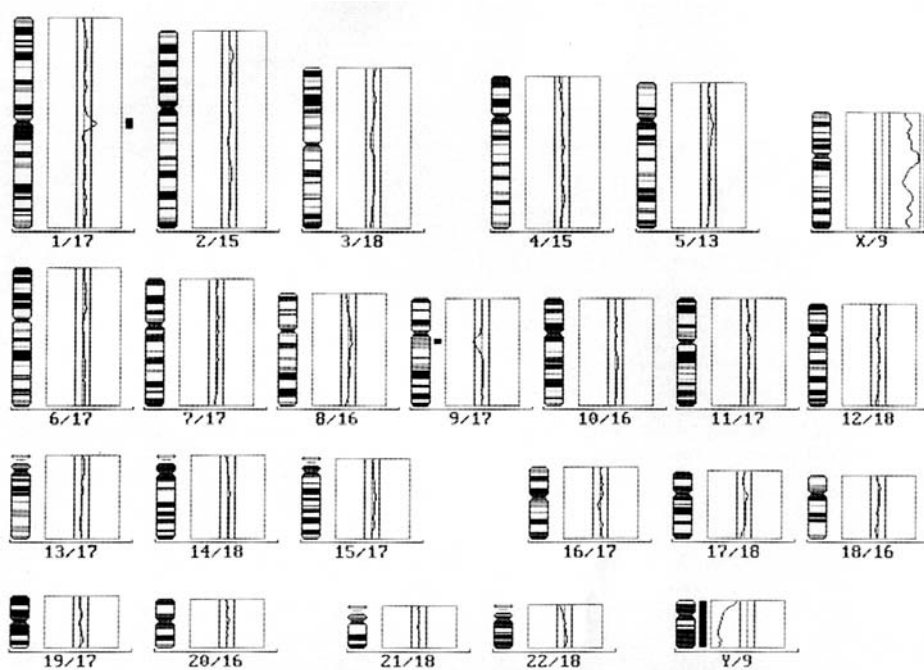
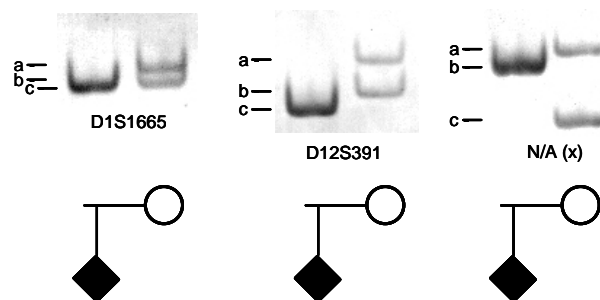


Abb. 3.2 (MR-112) Missed abortion der 8.-9. SSW, histologisch Blasenmole.

a. CGH-Profil hinweisend auf einen unauffälligen weiblichen Karyotyp.



b. Die Mikrosatelliten-Analyse zeigte ausschließliche Homozygotie für ein paternales Allel, da sich keine Übereinstimmung mit den mütterlichen Allelen ergab. Exemplarisch sind die Loci D1S1665, D12S391 dargestellt. Dieser Befund ist typisch für eine komplette Blasenmole. Paternale DNA war nicht verfügbar.



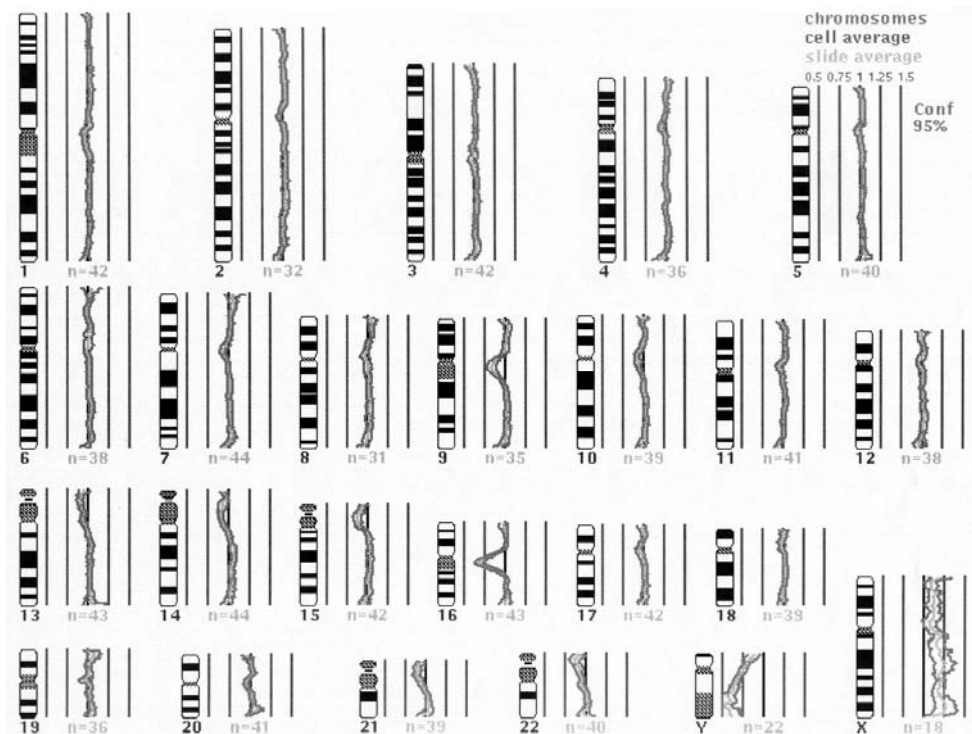
Es gab 8 Aborte mit Imbalancen bzgl. der gonosomalen Fluoreszenzverteilung: Zwei Fälle (MZ-526, MZ-1438) fielen durch ein balanciertes Profil für das Y-Chromosom (Yp) und eine Ratio $> 1,20$ für das X-Chromosom auf, hinweisend auf XXY-Karyotypen (Abb. 3.3a). In zwei weiteren Fällen (MR-81, MR-216) ergaben Abweichungen der Y-Chromosomen-Profile im Sinne eines Zugewinns an genetischem Material bei ansonsten ausgeglichener Fluoreszenzratio den Verdacht auf eine XYY-Gonosomenkonstellation (Abb. 3.4a). Jeweils zwei Fälle mit Triploidien (69, XXY bzw. 69, XYY-Karyotyp) konnten durch molekulargenetische Untersuchungen bewiesen, und somit die Verdachtsdiagnosen durch CGH bestätigt werden, Abb. 3.3b bzw. 3.4b.

Der Verlust eines X-Chromosoms stellte sich in der CGH bei einer Hybridisierung auf Metaphasen eines männlichen Spenders durch ein rot-zu-grün-Fluoreszenzprofil von 1,0 für das X-Chromosom bei gleichzeitigem Überwiegen des roten Fluorochroms für das Y-Chromosom dar. Dieses war in 4 Fällen zu beobachten (Abb 3.5a), so dass in diesen Fällen ein 45, X-Karyotyp erhoben wurde.

Abweichende Fluoreszenzprofile der Autosomen im Sinne eines Zugewinns chromosomalen Materials wurden in 28 Fällen detektiert. Trisomien der Chromosomen 4, 7, 8, 10, 13, 15, 16, 18, 21 und 22 sind durch FR-Profile $\geq 1,2$ für die entsprechenden Chromosomen erkannt worden (Abb. 3.6a, Abb. 3.10a, Abb. 3.11a, Abb. 3.12a). In der Mehrzahl der Fälle (18/28) konnte über die Analyse von DNA-Polymorphismen oder FISH-Untersuchungen die entsprechenden Trisomien bestätigt werden (Bspl. Abb. 3.6b, Abb. 3.10b, Abb. 3.11b, Abb. 3.12b). In drei Fällen lagen die FR-Profile zwischen 1,0 und 1,2 für die Chromosomen 2, 19 bzw. 22 (MZ-1682, MR-162, MZ-4677). Die Nachuntersuchung mittels spezifischer Mikrosatelliten für die jeweiligen Chromosomen erbrachte den Nachweis von Trisomien. Allerdings zeigte sich eine unterschiedliche Intensität der Banden. Diese Ergebnisse belegen das Vorliegen von Mosaik-Karyotypen (Abb. 3.7a, b).

Abb. 3.3 (MZ 1438) Missed abortion der 6. SSW, histologisch herdförmige frühembryonale Entwicklungsstörung, überlagernd regressive Veränderungen der Chorionzotten .

- a. Das CGH-Profil zeigte einen unauffälligen Befund für die Autosomen und eine auffällige Ratio zwischen 1 und 1,2 für das X-Chromosom bei vorhandenem Y-Chromosomenmaterial (p-Arm), hinweisend auf eine XXY-Konstellation möglicherweise im Rahmen einer Triploidie.



- b. Die FISH-Untersuchungen an Interphasekernen aus Abortzotten mit zentromerspezifischer Sonde für das Chromosom 7 belegten das Vorhandensein von drei Chromosomen 7 (Bild Nr. 1). Die FISH mit Sonden für die Chromosomen X und Y untermauerten den Befund einer 69, XXY-Triploidie: Zu erkennen waren 2 Signale für das X- und ein spezifisches Signal für das Y-Chromosom (Bild Nr. 2).

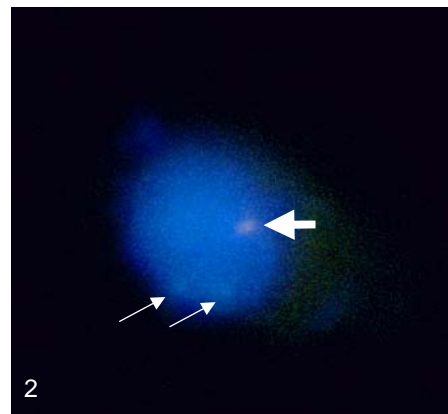
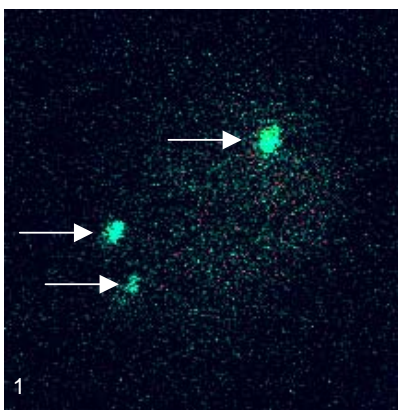
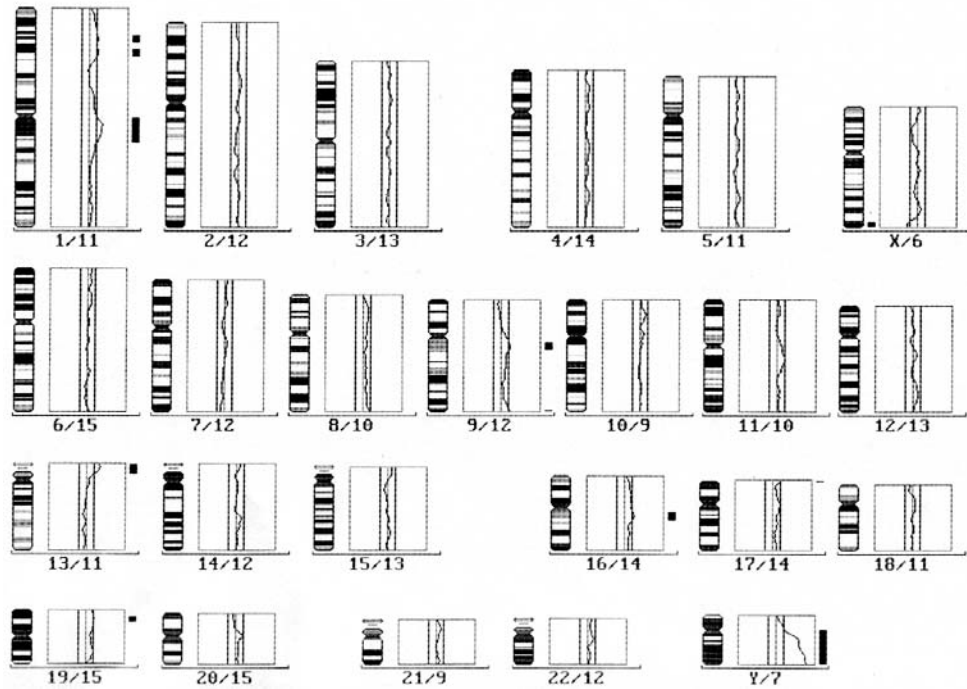


Abb. 3.4 (MR-216) Abort der 9. SSW, histologisch Partialmole.

- a. Das CGH-Profil zeigte ausgeglichene Verhältnisse für die Autosomen und das X-Chromosom und eine Abweichung des Y-Chromosomen-Profiles im Sinne eines Zugewinns an genetischem Material.



- b. Die Mikrosatelliten-Analyse wies eine eine Triplodie paternalen Herkunft (69, XYY) nach: Es stellten sich drei Allele (D1S1609) bzw. ein Dosiseffekt dar (D12S1064). Es war nur ein maternales X-Chromosom nachweisbar (DXS7132, N/A).

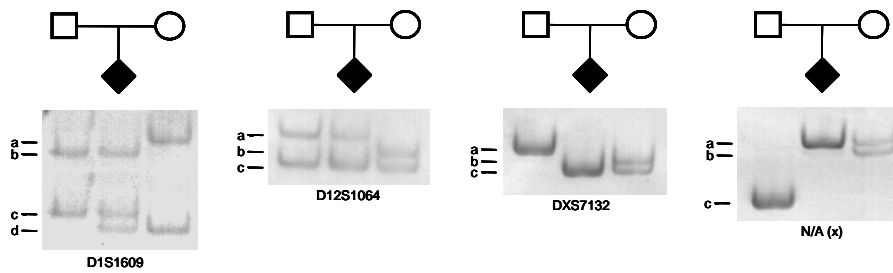
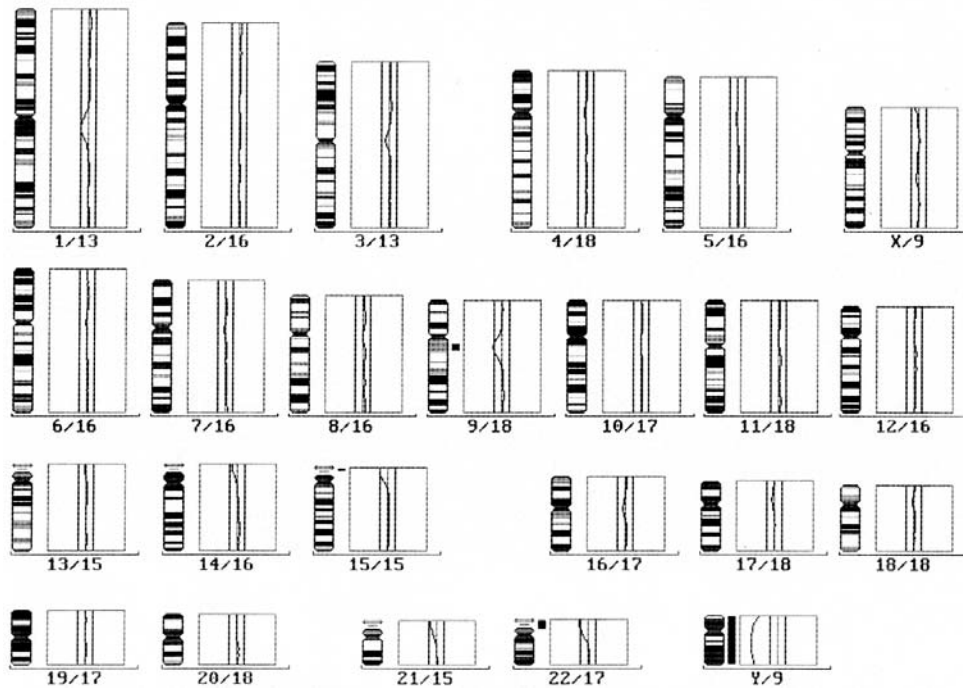


Abb. 3.5 (MR-45) Missed abortion der 8+5. SSW, histologisch Partialmole

- a. Das CGH-Profil zeigte unauffällige Verhältnisse für die Autosomen und das X-Chromosom. Es fehlte Y-Chromosom-Material, typisch für eine Monosomie X.



- b. Die Mikrosatelliten-Analyse bestätigte das Vorliegen eines singulären, maternalen X-Chromosoms (N/A (X), DXS6797).

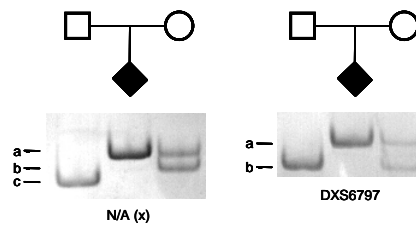
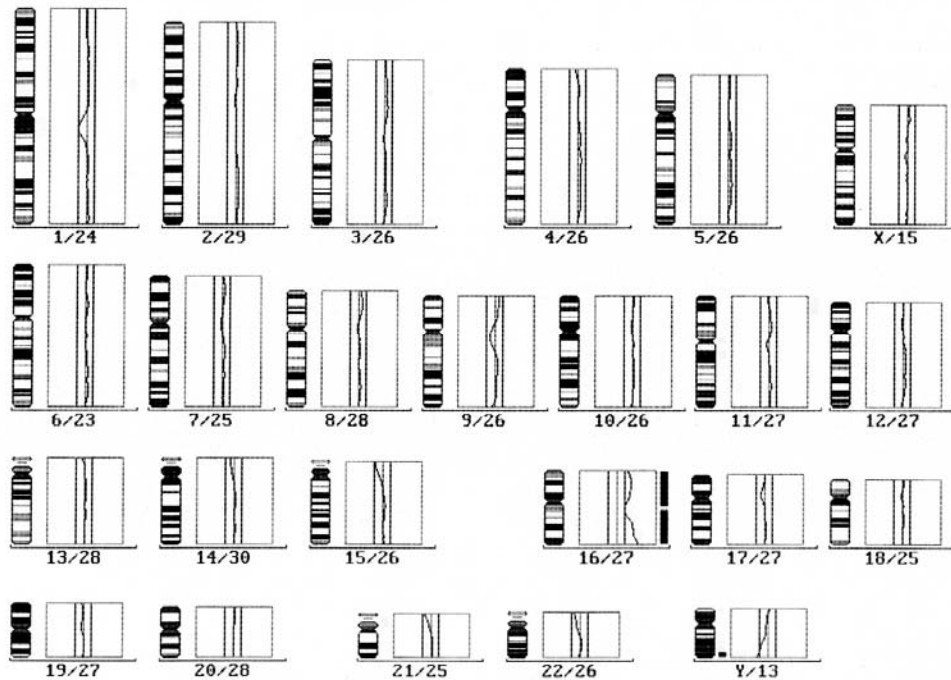


Abb. 3.6 **(MR-258)** Missed abortion der 9. SSW, histologisch herdförmige Vaskularisationsstörungen und Zottenhydrops.

- a. Das CGH-Profil zeigte einen männlichen Karyotyp und einen Zugewinn von Chromosom 16 mit einer Fluoreszenzratio $> 1,2$.



- b. In der PAGE stellten sich für den Locus D16S2624 drei Allele, bzw. ein deutlicher Dosiseffekt für den Locus D16S2619 dar. Die Allelverteilung belegte somit eine Trisomie 16 maternaler Herkunft.

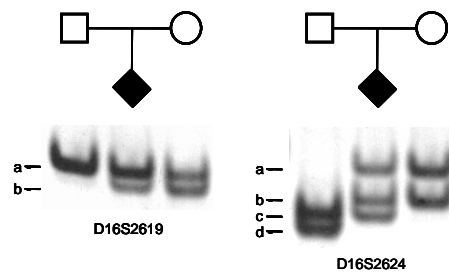
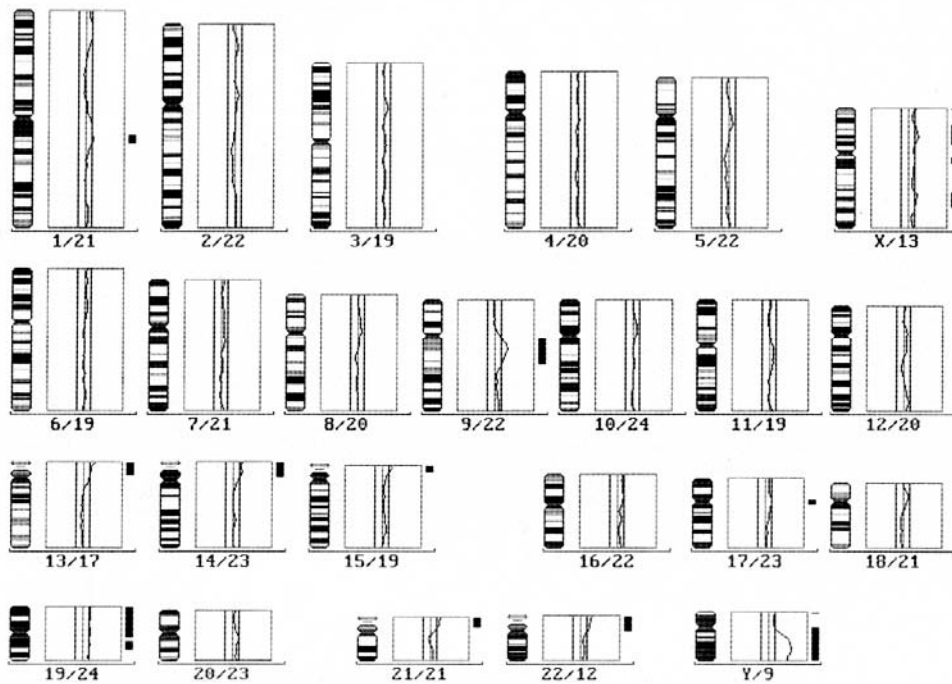


Abb. 3.7 **(MR-162)** Abort der 10. SSW, histologisch Vaskularisations- und Ramifikationsstörung.

- a. Die Auswertung des CGH-Profiles ergab eine Fluoreszenzratio für das Chromosom 19 von 1,2. Die Fluoreszenzverschiebungen im Bereich von Zentromer- und Telomerregionen zahlreicher anderer Autosomen waren als artifizuell zu werten.



- b. In der Mikrosatellitenanalyse stellten sich für unterschiedliche Loci des Chromosoms 19 (D19S246, D19S254, D19S714) eine zusätzliche schwache Bande dar. Aufgrund der unterschiedlichen Allelintensität ist dieser Befund als Mosaik-Trisomie 19 zu werten.

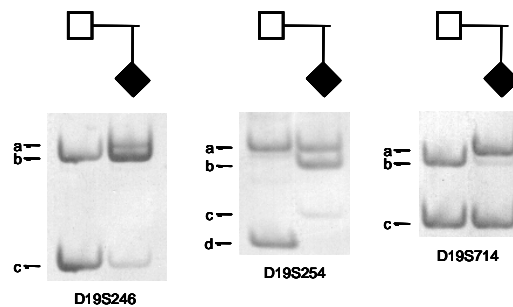
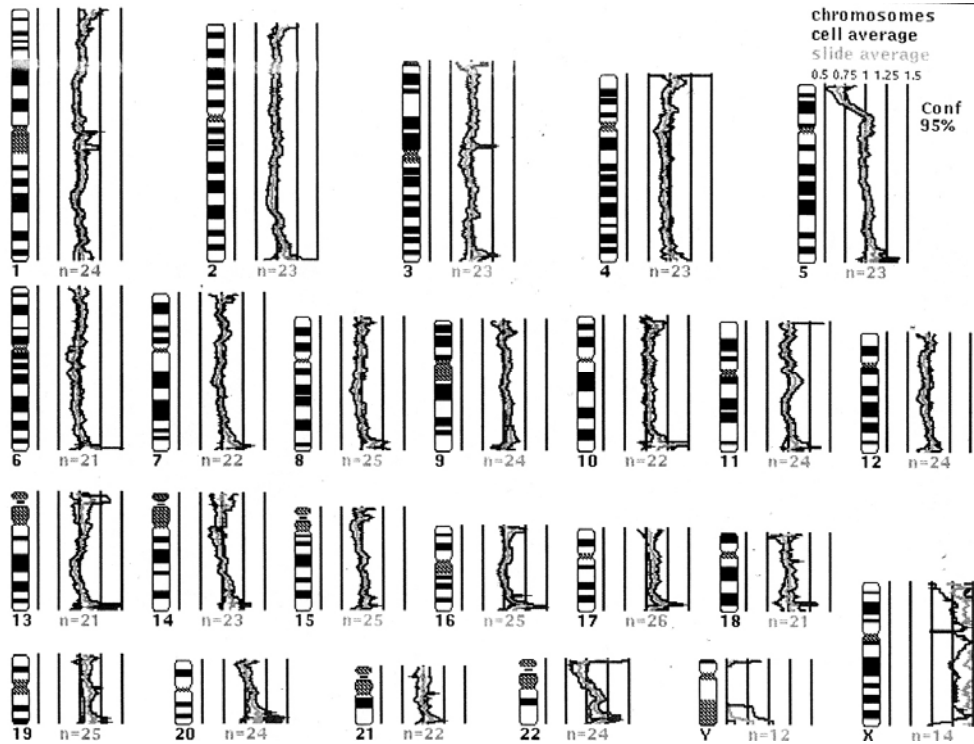
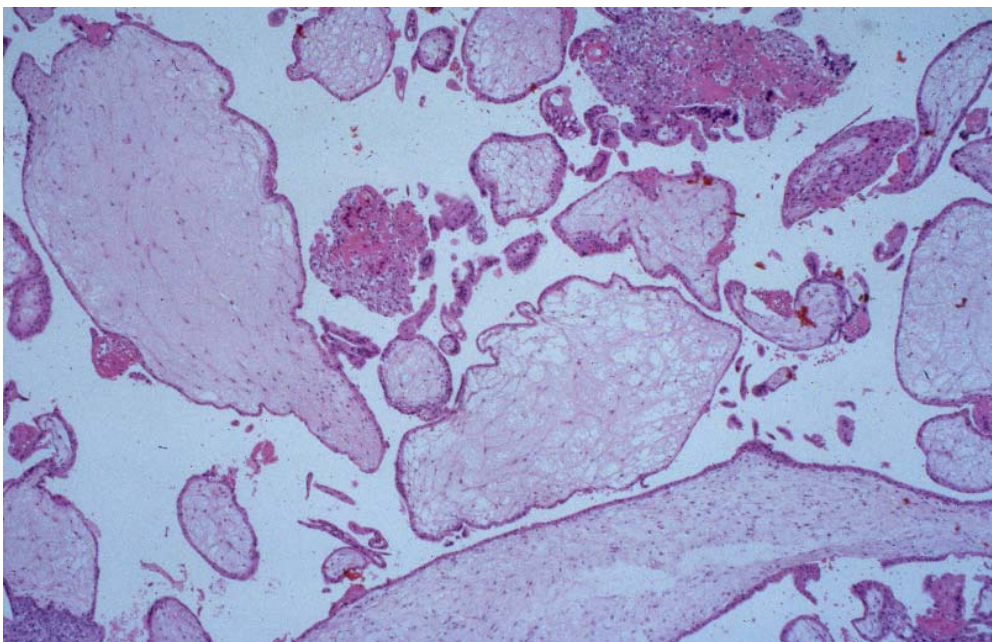


Abb. 3.8 (MZ 1520) Missed abortion der 10. SSW.

- a. Das CGH-Profil zeigte einen weiblichen Karyotyp mit Verlust von Material des kurzen Arms von Chromosom 5 (5p).



- b. Das histologische Bild zeigte hydatiforme Chorionzotten mit Trophoblasthyperplasien (HE-Färbung). Dieser Befund spricht für eine primäre Anlagestörung der Konzeption.



Durch die CGH ist in einem Fall (MZ-1520) eine segmentale Aneuploidie aufgedeckt worden. In den distalen Regionen der kurzen (p-) Arme von Chromosom 5 fiel im Gegensatz zu den übrigen Autosomen ein deutliches Überwiegen der roten Fluoreszenz auf, so dass in diesem Fall eine Monosomie 5p diagnostiziert werden konnte. Die zytogenetische Untersuchung der Eltern ergab Normalbefunde. Die Strukturaberration im Abort ist demzufolge neu (de novo) entstanden.

Insgesamt fand sich unter den 57 erfolgreich mittels CGH analysierten Spontanaborten eine Aberrationsrate von 70,2% (n = 40). Unter Berücksichtigung der kompletten Blasenmole erhöht sich die Rate auf 72,0%. Eine Zusammenfassung der ermittelten Ergebnisse bietet Tabelle 3.2.

Tab. 3.2 Häufigkeit und Art von Chromosomenanomalien unter 60 Spontanaborten ohne erfolgreiche in vitro Kultur („Kulturversager“)

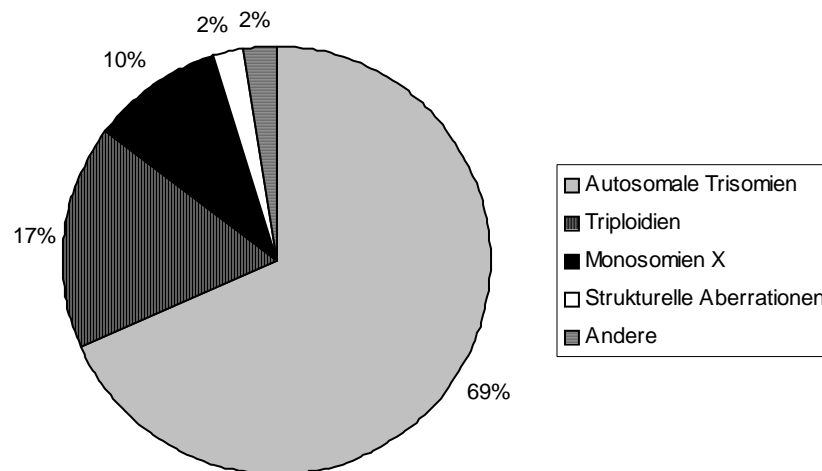
Spontanaborte des 1. Trimenons	Anzahl der Fälle	Mittleres maternales Alter (in Jahren)	Gemittelttes Gestationsalter (in Wochen)	Geschlechterverhältnis m:f
Gesamt	60			
Erfolgreiche CGH	57 95,0%			
Unauffällige	16 28,0%	29,9 ± 3,9	9,5 ± 1,4	7:9 (0,78)
Aberrante ¹	41 72,0%	32,4 ± 5,0	10,0 ± 1,7	19 :18 ² (1,06)
Autosomale Trisomie	28 68,3%	32,0 ± 5,0	9,9 ± 1,6	
Monosomie X	4 9,8%	31,3 ± 3,9	10,8 ± 0,8	
Triploidie ³	7 17,1%	34,6 ± 5,4	9,7 ± 2,0	
Tetraploidie	---	---	---	
Strukturelle Aberration	1 2,4%	38	10	
Andere	1 2,4%	30	9	
Mosaik	3 7,3%	28,0 ± 5,0	8,7 ± 1,2	

¹ Inklusive einer kompletten Blasenmole

² Monosomien X ausgeschlossen

³ Triploidien 3 XXX : 2 XXY : 2 XYY

Abb. 3.9 Chromosomenaberrationen unter Spontanaborten der CGH Studie



Die größte Gruppe unter den Anomalien stellten die autosomalen Trisomien dar mit 68,3% ($n = 28$), gefolgt von den Triploidien mit 17,1% ($n = 7$) und den Karyotypen mit Monosomie X mit 9,8% ($n = 4$). Eine strukturelle Aberration und eine komplette Blasenmole konnten in jeweils einem Fall ermittelt werden, entsprechend jeweils 2,4%. Einen zusammenfassenden Überblick bietet Tab. 3.2 und Abb. 3.9.

Unter den autosomalen Trisomien fanden sich gehäuft die Trisomie 16 (32,1%), Trisomien 7 und 22 (jeweils 10,7%), und die Trisomien 4, 13, 15 und 21 mit jeweils 7,2%. 10,7% der Trisomien waren Mosaik, entsprechend 7,3% der Chromosomenaberrationen insgesamt.

3.2 Parentale Herkunft der Chromosomenaberrationen

Untersuchungen zur parentalen Herkunft der Chromosomenaberrationen waren ausschließlich bei den Fällen aus dem hiesigen Labor für Zytogenetik möglich, da gleichzeitig im Rahmen einer Studie mit dem Abortmaterial elterliches Blut asserviert wurde.

Von insgesamt 28 Spontanaborten aus Marburg konnten in 19 Fällen (67,9%) chromosomale Imbalancen mittels CGH diagnostiziert werden. In 16 Fällen stand elterliche DNA für die Untersuchung zur parentalen Herkunft der

Chromosomenaberration zur Verfügung. Die Abklärung erfolgte durch Auswertung von DNA-Polymorphismen nach PCR von hochpolymorphen Mikrosatelliten. Für eine eindeutige Zuordnung waren mindestens 2 heterozygote Marker notwendig. Unter diesen Kriterien konnten in 14 von 16 Fällen eine eindeutige Zuordnung der Chromosomenaberration erfolgen (exemplarische Darstellung Abb. 3.6b).

Insgesamt wurden 8 Fälle mit Trisomie, 3 Triploidien sowie 2 Aborte mit Monosomie X untersucht (Tab. 3.3). Von den 8 autosomalen Trisomien waren 7 (87,5%) maternalen Ursprungs, eine paternale Trisomie 7 konnte ermittelt werden (Abb. 3.10b). Bei den drei Triploidien erwies sich der überzählige Chromosomensatz als paternal (Abb. 3.1b, 3.4b). Bei beiden Fällen mit Monosomie X konnte das vorhandene X-Chromosom als maternal bestimmt werden, das paternale Geschlechtschromosom war folglich verloren gegangen (Abb. 3.5b).

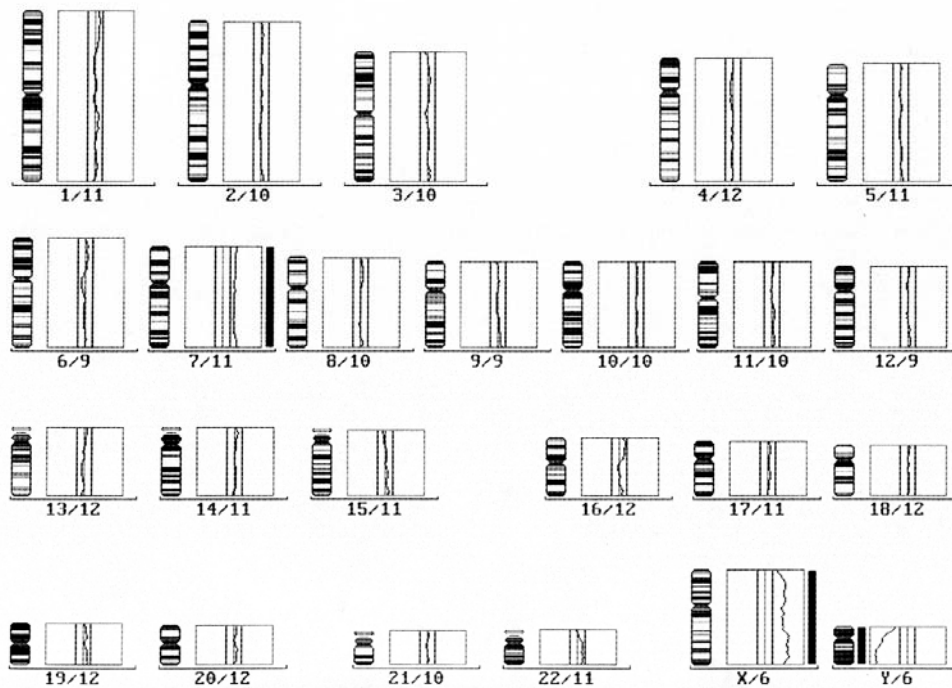
Tab 3.3 Parentale Herkunft der Chromosomenaberrationen, Abklärung über Typisierung von hochpolymorphen Mikrosatelliten (14 Spontanaborte, Untersuchungskollektiv Marburg)

Chromosomen- Aberrationen	Anzahl	Parentale Herkunft der Aberrationen	
		maternal	paternal
Autosomale Trisomien	8	7	1
Triploidien	3		3
Monosomien X	2	2	
Komplette Blasenmole	1		1

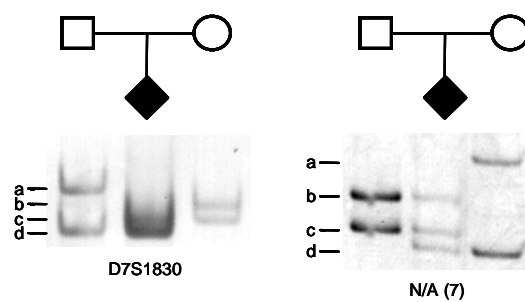
Im Falle der kompletten Blasenmole stand paternale DNA nicht zur Verfügung. Für die Untersuchung wurden drei hochpolymorphe Marker unterschiedlicher Chromsomen (1, 12, X) verwendet. Im Falle informativer Marker sollte bei homozygoter Blasenmole stets ein Allel, bei heterozygoter Blasenmole zwei Allele unterschiedlich zu den mütterlichen Allelen sein. Das Ergebnis bestätigte das Vorliegen einer homozygoten Blasenmole. Es konnten für unterschiedliche Loci beim Abort jeweils nur ein Allel nachgewiesen werden (Abb. 3.2b).

Abb. 3.10 (MR-137) Abortus incompletus der 11. SSW, histologisch deutlich ramifikations- und regressiv veränderte Plazenta.

- a. Das CGH-Profil zeigte einen weiblichen Karyotyp mit deutlichem Zugewinn an genetischem Material für das Chromosom 7, entsprechend einem 47, XX + 7 Karyotyp.



- b. Die Mikrosatelliten-Analyse belegte die Trisomie 7 (D7S1830). Zwei der drei Allele waren paternalen Herkunft (N/A (7)).



3.3 Zottenhistologie der Spontanaborte

In 54/57 Fällen war nach Eingang des Abortmaterials die Plazentamorphologie beurteilt worden. Schwerwiegende Alterationen der Plazenta wurden als primäre Unterwertigkeit der Gewebe beschrieben. Dazu gehören Veränderungen wie Hydrops der Chorionzotten, Zottenstromafibrose, Trophoblastinklusionen, fehlende oder mangelhafte Vaskularisation, atypische Kontur und Größe der Zotten. Dieser Gruppe gegenübergestellt wurden leichtere morphologische Veränderungen der Plazenta, zusammengefaßt als unspezifische regressive Alterationen: Zottenfibrose, Trophoblastatrophie, -eosinophilie, Gefäßkollaps und Kalkablagerungen. Die retrospektiv durch die CGH-Analyse ermittelten Chromosomenbefunde wurden mit den vorliegenden Aussagen über die Zottenhistologie korreliert (Tab. 3.4).

Tab. 3.4 Korrelation von Plazentamorphologie mit Ergebnissen der CGH-Analyse

CGH-Ergebnisse	Primäre Unterwertigkeit der Gewebe	Unspezifische, regressive Veränderungen
Normaler Karyotyp	11	3
Chromosomenanomalie	32	8
Triploidie	6	1
Monosomie X	3	1
Strukt. Aberration	1	
Komplette Blasenmole	1	
Autosomale Trisomie	21	6
	Trisomie 4	
	Trisomie 7 (3x)	
	Trisomie 8	Trisomie 2 (Mosaik)
	Trisomie 13 (2x)	Trisomie 10
	Trisomie 15	Trisomie 15
	Trisomie 16 (9x)	Trisomie 21 (2x)
	Trisomie 18	Trisomie 22
	Trisomie 19 (Mosaik)	
	Trisomie 22	
	Trisomie 22 (Mosaik)	
Gesamt	43	11

Schwerwiegende Schädigungsmuster der Chorionzotten lagen in 79,6% (43/54) der mittels CGH untersuchten Fälle vor. In 74,4% der Fälle mit

schwerwiegenden Veränderungen waren Chromosomenaberrationen ermittelt worden. Darunter eine komplette (klassische) Blasenmole, die sich durch hydropische Degeneration aller plazentaren Villi, Hyper- oder Anaplasie des Trophoblasten sowie fehlende oder stark gestörte Zottenvascularisation auszeichnete.

In der Gruppe der Triploidien waren 86% (6/7) schwere Zottenalterationen beschrieben. Plazentamorphologien im Sinne von Partialmolen fanden sich jedoch nur in zwei Fällen: Das Plazentagewebe zeigte fokal große, hydropische und avaskuläre Zotten mit Zisternenbildung.

In der Gruppe der autosomalen Trisomien fanden sich 77,8% (21/27) mit schweren Zottenalterationen. Ein einheitliches histologisches Bild mit herdförmiger Entwicklungsstörung zeigte sich in allen Fällen mit Trisomie 16: In großräumigen Arealen waren die Zotten als ödematös, mangelhaft ramifiziert und avaskulär beschrieben worden. Auch bei beiden Spontanaborten mit nachgewiesener Trisomie 13 waren die histologischen Befunde vergleichbar mit einer ramifikationsgestörten, hypovaskulären und regressiv veränderten Plazenta.

Einheitliche Schädigungsmuster der Chorionzotten ließen sich weder bei den drei Fällen mit Trisomie 7 bzw. Trisomie 22 nachweisen. Alle übrigen autosomalen Trisomien hatten ebenso divergierende Schweregrade der beschriebenen Chorionzottenveränderungen.

Die vier Aborte mit Monosomie X waren bezüglich der Zottenhistologie weit gefächert: Auf der einen Seite fand sich das Bild einer Partialmole, andererseits auch ein Fall mit uncharakteristischen, regressiven Entwicklungsstörungen der Chorionzotten. In zwei der vier Fälle mit Monosomie X waren die Befunde einer ramifikationsgestörten Plazenta mit fokal hypovaskulären, ödematös bis hydropisch aufgelockerten Zotten und überlagernd regressiven Veränderungen einheitlich.

Bemerkenswerterweise zeigten 78,6%% (11/14) der Spontanaborte mit unauffälligen Karyogrammen ebenfalls deutliche Zottenalterationen, darunter zwei Fälle mit herdförmig angelegten großen plumpen Zotten und gefäßlosem Stroma, im Sinne einer schweren frühembryonalen Entwicklungsstörung. Den übrigen acht Aborten mit normalem Karyotyp waren Plazentamorphologien mit

herdförmiger Ramifikationsstörung, avaskulärem und ödematösem Zottenstroma und auch regressiven Veränderungen zugeordnet worden.

Ein uneinheitliches Bild ergab sich auch bei den weniger stark ausgeprägten Plazentaveränderungen. Zwei Aborte mit normalem Karyotyp, Trisomien (Mosaiktrisomie 2, Trisomie 10, Trisomie 15, Trisomie 22 und zwei Fälle mit Trisomie 21), als auch eine Triploidie (69, XXX) und ein Fall mit Monosomie X zeigten unspezifische, regressive Veränderungen der Chorionzotten. Insgesamt ist diese Gruppe aus praktisch gleichen Anteile aus Aborten mit unauffälligem bzw. auffälligem Karyotyp von 27,2% und 72,7% (3 und 8 Fälle) im Vergleich zur Gruppe mit schweren Zottenalterationen mit 25,6% und 74,4% (11 und 32 Fälle, inklusive der kompletten Blasenmole) zusammengesetzt.

3.4 Fetalpathologische Untersuchungen

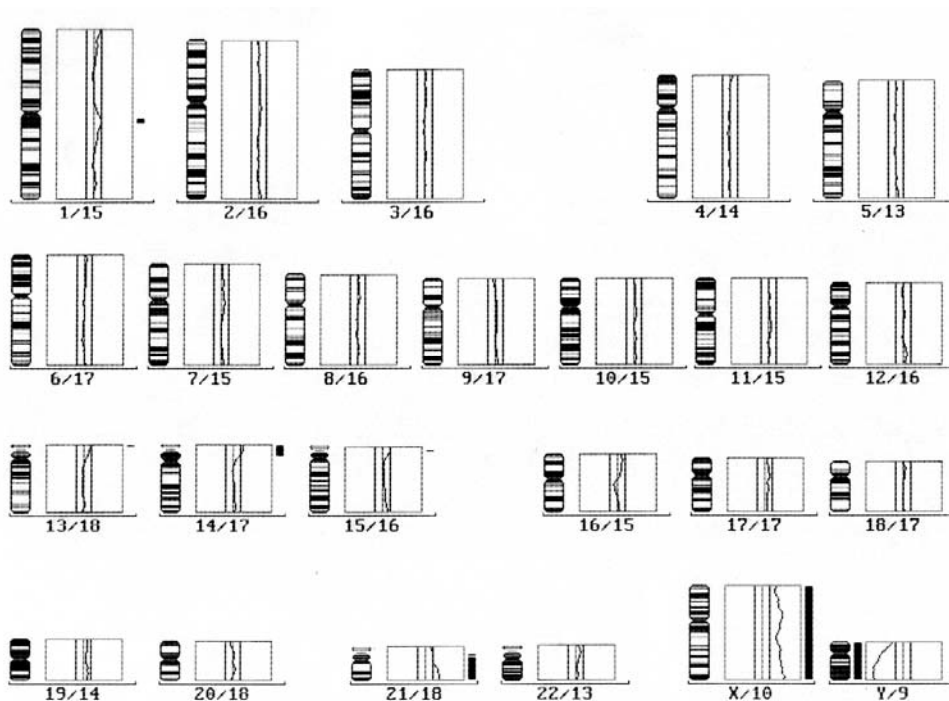
In fünf Fällen (5/60) lagen Embryonen bzw. -fragmente vor, die makroskopisch und in einem Fall histologisch untersucht worden waren. In drei Fällen wurden aufgrund der vorliegenden Fehlbildungen chromosomale Krankheitsbilder vermutet.

MR-95: Im Abradat war ein lädierter Embryo von 4,1 cm Scheitel-Steißlänge und 4,5 cm Scheitel-Ferslänge vorhanden (Abb. 3.11c). Er zeigte eine artefizielle Querläsion des Gesichts mit Vorhandensein des rechten Auges sowie artefizieller Bauchläsion mit Organventeration. Die Nabelschnur war abgerissen. Das Restgewicht betrug 2,373 g. Die Embryonallänge entsprach etwa 10 Schwangerschaftswochen. Trotz Gesichtsläsion war eine deutliche craniofaciale Dysmorphie mit kleinen, tief sitzenden und mangelhaft modellierten Ohrmuscheln, rechtsseitiger Lippen-Kiefer-Gaumenspalte mit partieller Pierre-Robin-Sequenz, Makrostomie, Makroglossie und Mikrogenie zu erkennen. Die reichliche Nackenhaut deutete auf eine kollabierte Nackenblase hin. Die Hände hatten im Verhältnis zur Nagelentwicklung (die etwa der 11. Schwangerschaftswoche entsprach) sehr kurze und plumpe Finger und eine angedeutete Vierfingerfurche rechts. Eine Sandalenfurche war angedeutet zwischen 1. und 2. Zehe beider Füße. Caudal der artefiziellen Bauchläsion war eine primäre Bauchläsion zu sehen, die einem erweiterten Nabelring entsprach. Das Herz zeigte einen sogenannten gemeinsamen atrioventrikulären Kanal

(AV-Kanal) mit einem großen Defekt des Atriumseptums und des membranösen Ventrikelseptums mit gemeinsamem Segelklappenring. Pulmonal- und Aortaostien hatten drei normale Semilunarklappen. Im übrigen normale Form und Lage der inneren Organe. Altersentsprechendes weibliches inneres und äußeres Genitale (aus Befundbericht Frau Prof. Dr. Rehder.)

Abb. 3.11(I) **(MR-95)** Missed abortion der rechnerisch 12. SSW, histologisch ramifikationsgestörte, regressiv veränderte Plazenta mit Mikroinfarkten.

a. Das CGH-Profil zeigte einen weiblichen Karyotyp mit einer Fluoreszenzratio $>1,2$ für das Chromosom 21.



b. Die Mikrosatellitenanalyse bestätigte das Vorliegen einer Trisomie 21. Es stellten sich in der PAGE drei Allele (D21S1432) bzw. ein Dosisseffekt dar (D21S1446).

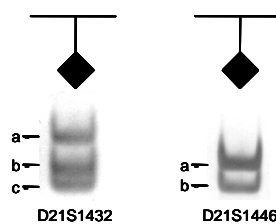


Abb. 3.11(II) (MR-95) Missed abortion der rechnerisch 12. SSW, histologisch ramifikationsgestörte, regressiv veränderte Plazenta mit Mikroinfarkten.

- c. Die Fotos zeigten einen entwicklungsverzögerten weiblichen Embryo (Nr. 1) (etwa 10. SSW) mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, Makrostomie und Makroglossie (Nr. 2), Brachydaktylie, angedeuteter Vierfingerfurche rechts (Nr. 3), Sandalenfurche der Füße (Nr. 4) sowie einem sogenannten AV-Kanal des Herzens (Nr. 5). Aus der autoptischen Beurteilung ergab sich bereits der Verdacht einer Trisomie 21. Da mit den angewandten Methoden nicht zwischen einer freien Trisomie 21 oder einer Translokations-Trisomie unterschieden werden kann, sollte zum Ausschluss einer familiär vorliegenden Translokation eine Chromosomenanalyse der Eltern erfolgen.

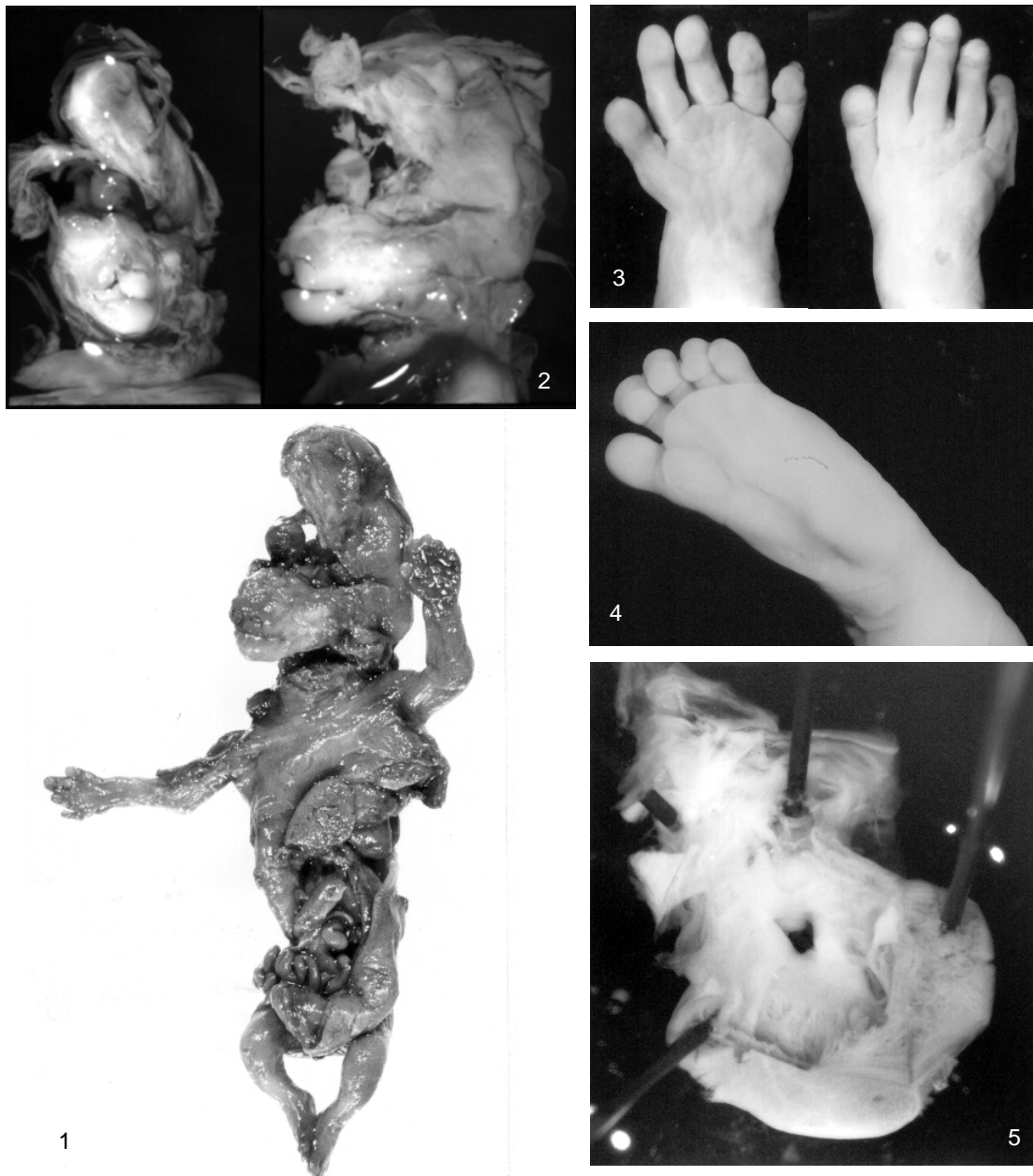
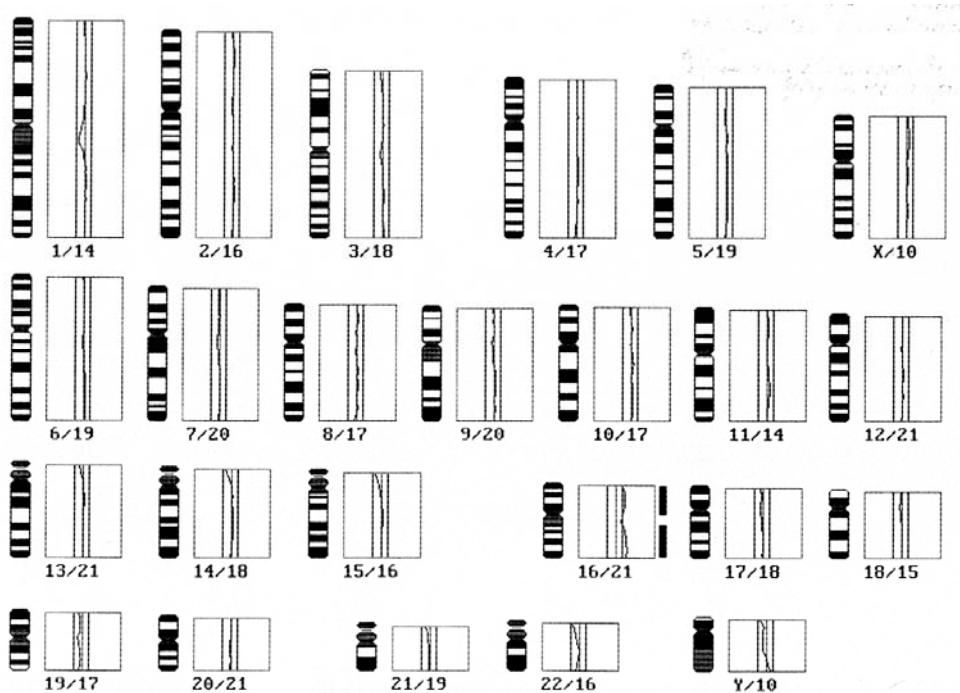
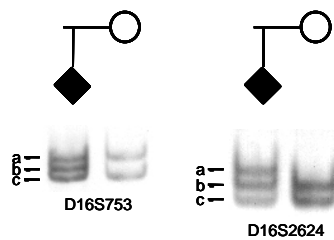


Abb. 3.12 (MR-159) Intrauteriner Fruchttod in der rechnerisch 11. SSW, histologisch partielle hydropische Degeneration der Plazentazotten.

- a. Das CGH-Profil zeigte einen männlichen Karyotyp mit einem Fluoreszenzverhältnisprofil $> 1,2$ für das Chromosom 16.



- b. Die Mikrosatelliten-Analyse der Loci D16S753 und D16S2624 bestätigte das Vorliegen einer Trisomie 16, wahrscheinlich maternaler Herkunft. Paternale DNA lag zu vergleichenden Untersuchungen nicht vor.



- c. Der disorganisierte Embryo mit einem Missverhältnis zwischen Kopfgröße und Rumpfregion.



MR-159: Als ursächlich für den Frühabort in der 11./12. SSW war die durch CGH nachgewiesene Trisomie 16 anzusehen (Abb. 3.12a). Bei der makroskopischen Beurteilung des Schwangerschaftsprodukts war eine geschlossene Fruchthöhle von knapp 3 cm Durchmesser mit einem 5 mm langen Embryo in der Lichtung beschrieben worden. Aus dem Befundbericht ging hervor, daß der Embryo autolytisch und disorganisiert war mit einem Mißverhältnis zwischen Kopfgröße und Rumpfregion (Abb. 3.12c).

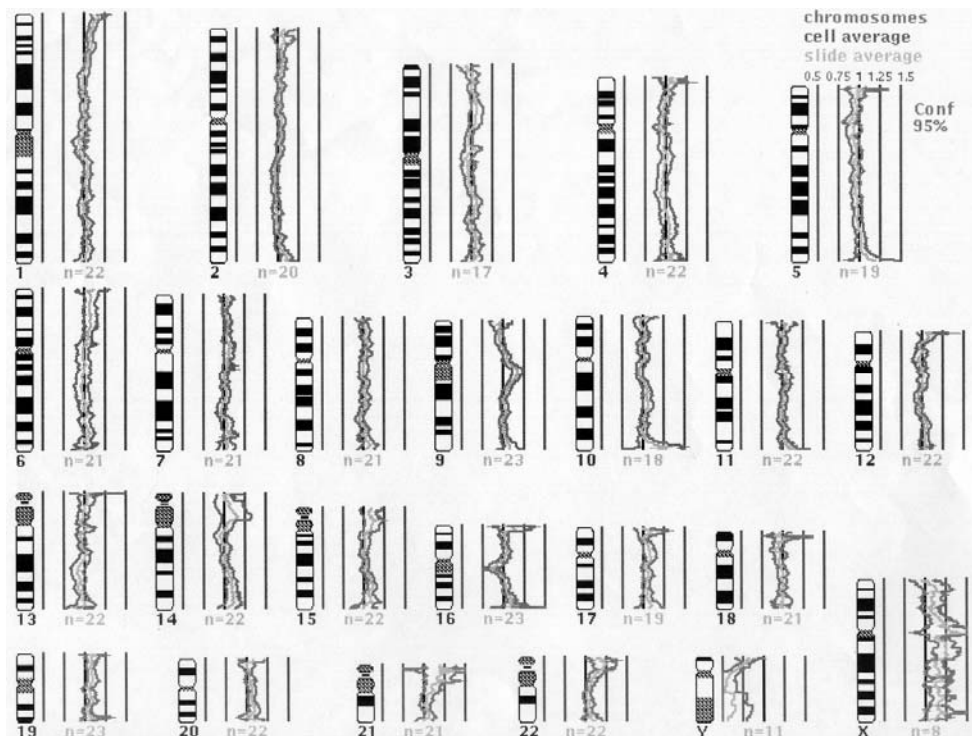
MR-172: Mittels CGH war eine Triploidie (69, XXX) paternalen Herkunft diagnostiziert worden (Abb. 3.1a). Das Abortmaterial bestand neben Plazentastücken aus einem embryonalen Kopffragment von 0,7 cm Durchmesser mit auffälligem Hypotelorismus (Abb. 3.1c). Die Mikrosatelliten-Analyse belegte eine Triploidie paternalen Herkunft (Abb. 3.1b).

MR-62: In der CGH wurde eine Monosomie X nachgewiesen. Im Abradat war ein 3 mm langes, disorganisiertes Embryofragment mit einer 1,0 cm langen Nabelschnur enthalten. In der Fruchthöhle erkannte man einen Dottersack von 1 x 2 cm Durchmesser.

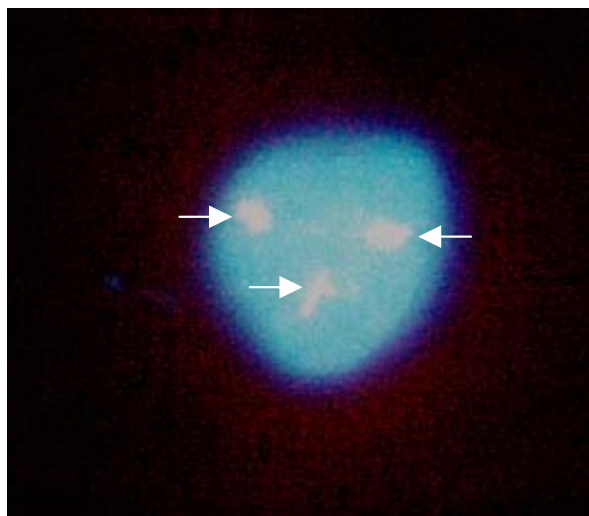
MZ-1566: Der CGH-Befund war hinweisend auf eine Triploidie, welche in der FISH-Untersuchung bestätigt wurde (Abb. 3.13a, b). Im Abradat befand sich eine geschlossene Fruchthöhle von 2 cm mit darin enthaltenem Embryo.

Abb. 3.13 (MZ-1566) Abortus incompletus der 9. SSW, histologisch regressive Veränderungen der Chorionzotten. Eine geschlossene Fruchthöhle von 2 cm mit darin enthaltenem Embryo.

- a. CGH-Profil mit unauffälligen Verhältnissen für die Autosomen und einem auffälligen Fluoreszenzverhältnisprofil für das X-Chromosom zwischen 1 und 1,2. Y-Chromosommaterial schien vorhanden, zumindest im Bereich des p-Armes.



- b. Die FISH-Untersuchung an Interphasekernen (Chorionzotten) zeigten drei Signale für das Chromosom 18. Zusammenfassend schien damit das Vorliegen einer Triploidie 69, XXY wahrscheinlich.



3.5 Vergleich der Ergebnisse mit denen der Kontrollgruppen

Aborte, die unter in vitro Bedingungen kein Wachstum zeigten und mittels CGH retrospektiv analysiert worden waren, wurden Kontrollgruppen gegenüber gestellt. Die Kontrollgruppen bestanden aus 433 (MR) bzw. 6198 (MZ) unselektierten frühen Spontanaborten (6.-12. SSW), die im gleichen Zeitraum (1993-1999) im hiesigen Labor für Zytogenetik sowie in Kooperation mit dem Labor für Zytogenetik der Abteilung für Kinderpathologie der Universität Mainz untersucht worden waren. Die beiden Gruppen zeigten Inhomogenitäten bezüglich der Kulturerfolge: 87,5% (MR) bzw. 69,6% (MZ) der Spontanaborte konnten erfolgreich karyotypisiert werden. Die Aberrationsraten von 71,0% und 64,2% korrelierten dabei positiv mit den Kulturerfolgen. Weiterhin fand sich unter den 110 Aborten aus Marburg mit unauffälligem Karyotyp eine Sex-Ratio von exakt 1,0; in der Mainzer-Gruppe dagegen ein deutliches Überwiegen der weiblichen Karyotypen (Geschlechterverhältnis m:f = 533:990 = 0,6). Bezüglich der Häufigkeit und Verteilung der verschiedenen Aberrationen liegt weitgehende Übereinstimmung vor. Bei insgesamt 64,8% pathologischen Karyotypen sind im Mittel 53,9% autosomale Trisomien, 11,2% Monosomien X, 15,6% Triploidien, 11,3% Tetraploidien und 9,0% unbalancierte strukturelle Chromosomenanomalien gefunden worden. Weder das mittlere maternale Alter noch das mittlere Gestationsalter zum Zeitpunkt des Aborts differierte signifikant zwischen den beiden Kontrollgruppen, mit 29,4/30,3 Jahren und 9,6/9,8 Wochen für die karyotypisch unauffälligen Aborte und mit 31,5/31,4 Jahren und 9,6/9,9 Wochen für die chromosomal aberranten Aborte (Tab. 3.5 und 3.6).

Tab. 3.5 Kontrollgruppe Marburg: 379 karyotypisierte Spontanaborte des 1. Trimenons

Spontanaborte des 1. Trimenons	Anzahl der Fälle		Mittleres mater- nales Alter (in Jahren)	Gemittelt es Gestationsalter (in Wochen)	Geschlechter- verhältnis m:f	
Gesamt	433					
Erfolgreiche Chromosomenanalyse	379	87,5%				
Unauffällige	110	29,0%	29,4 ± 4,9	9,6 ± 1,8	55:55	(1,0)
Aberrante	269	71,0%	31,5 ± 5,3	9,6 ± 1,5	126:102 ²	(1,24)
Autosomale Trisomie ²	158	58,8%	32,6 ± 5,3	9,6 ± 1,5	84:74	(1,14)
Monosomie X	41	15,3%	29,2 ± 6,2	10,2 ± 1,5	---	
Triploidie ³	25	9,3%	30,0 ± 3,9	9,3 ± 1,5	14:11	(1,27)
Tetraploidie	13	4,8%	29,6 ± 4,4	8,9 ± 1,6	7:6	(1,17)
Strukturelle Aberration	31	11,5%	30,7 ± 4,4	9,3 ± 1,6	20:11	(1,82)
Andere	1	0,4%	30,2	11,0	---	
Mosaik gesamt	26	11,6%	30,7 ± 6,7	9,2 ± 1,4	13:13	(1,0)

³ Triploidien: 11 XXX : 14 XXY

Tab. 3.6 Kontrollgruppe Mainz: 4314 karyotypisierte Spontanaborte des 1. Trimenons

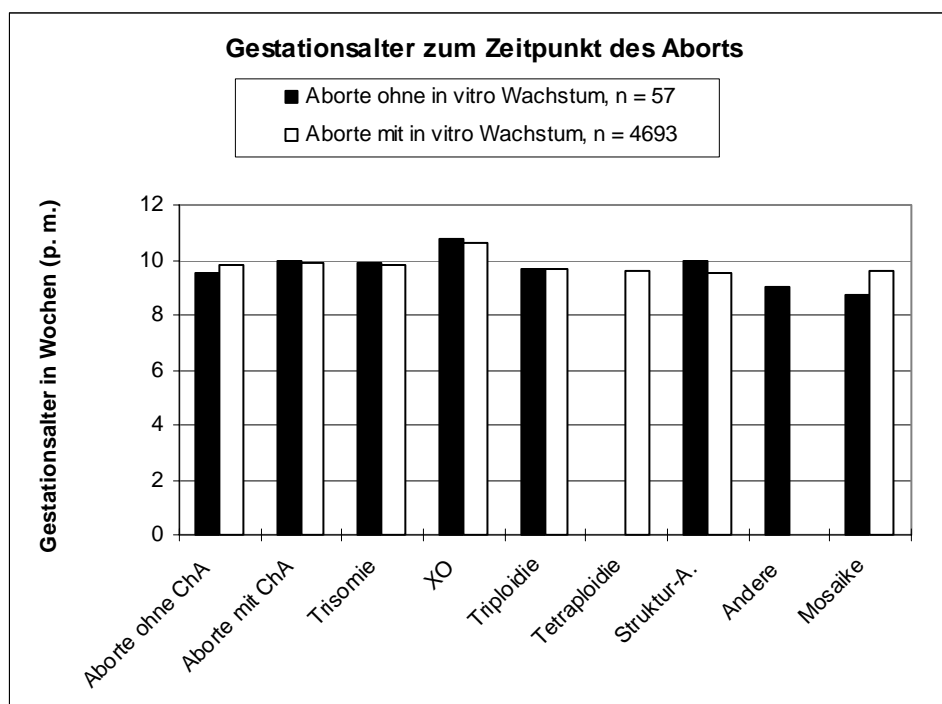
Spontanaborte des 1. Trimenons	Anzahl der Fälle		Mittleres mater- nales Alter (in Jahren)	Gemittelt es Gestationsalter (in Wochen)	Geschlechter- verhältnis m:f	
Gesamt	6198					
Erfolgreiche Chromosomenanalyse	4314	69,6%				
Unauffällige	1543	35,8%	30,3 ± 4,4	9,8 ± 1,6	553:990	(0,56)
Aberrationen	2771	64,2%	31,4 ± 4,6	9,9 ± 1,4	1181:1262	(0,94)
Autosomale Trisomie	1480	53,4%	32,8 ± 4,6	9,8 ± 1,3	700:780	(0,90)
Monosomie X	314	11,3%	29,8 ± 4,0	10,6 ± 1,3	---	
Triploidie ³	434	15,7%	29,6 ± 3,9	10,0 ± 1,5	265:169	(1,57)
Tetraploidie	331	11,9%	29,9 ± 4,3	9,6 ± 1,4	137:194	(0,71)
Strukturelle Aberration	244	8,8%	30,8 ± 4,6	9,5 ± 1,4	92:140	(0,66)
Mosaik	431	15,6%	30,7 ± 4,5	9,6 ± 1,4	150:271	(0,55)

³ Triploidien: 168 XXX : 252 XXY : 14 XYY

3.5.1 Gestationsalter zum Zeitpunkt des Aborts

Sowohl für die CGH-Studie als auch für die Kontrollgruppe sind ausschließlich Spontanaborte des 1. Schwangerschaftsdrittels (bis zur 14. SSW p. m.) eingeschlossen worden. Das Gestationsalter errechnete sich für die Aborte mit nachgewiesener Chromosomenaberration in der CGH-Analyse mit durchschnittlich 10,0 Wochen und 9,5 Wochen für die unauffälligen Fälle. Die Kontrollgruppe unterschied sich davon nur unwesentlich mit gemittelten 9,9 Wochen für die zytogenetisch aberranten Fälle und 9,8 Wochen für die zytogenetisch unauffälligen. Vergleicht man den Abortzeitpunkt aufgeschlüsselt für die verschiedenen Chromosomenaberrationen, so zeigte sich auch hier eine hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Gruppen (Abb 3.14).

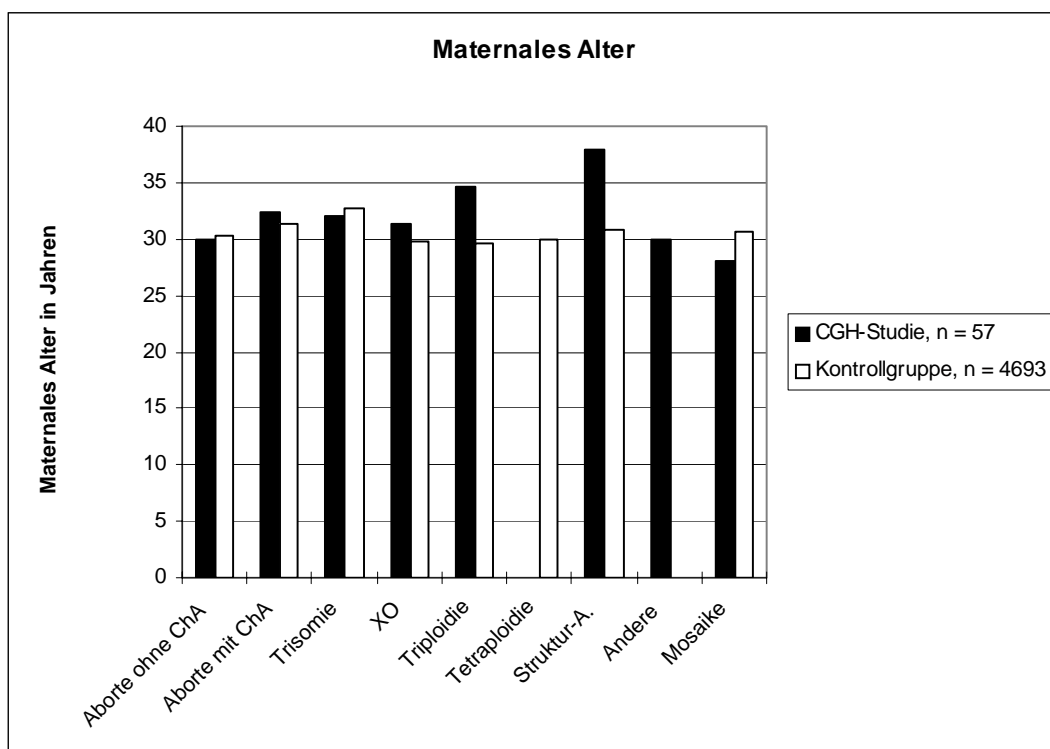
Abb. 3.14 Korrelation von Chromosomenaberration und Gestationsalter



3.5.2 Maternales Alter

Hinsichtlich des maternalen Alters zum Zeitpunkt des Aborts ergab sich in beiden Kollektiven ein einheitliches Bild. Bei den retrospektiv untersuchten Aborten (CGH-Studie) umfaßte das Alter der Frauen zum Abortzeitpunkt 19 bis 42 Jahre. Das durchschnittliche Alter der Frauen mit chromosomal aberranten Spontanaborten lag bei 32,4 Jahren und damit höher als unter den Frauen mit chromosomal unauffälligen Aborten mit gemittelten 29,9 Jahren. Sehr ähnliche Verhältnisse lagen auch in den Kontrollgruppen vor. Durchschnittlich betrug das Alter der Frauen mit aberranten Aborten 31,4 Jahre bzw. 30,3 Jahre für die Frauen mit zytogenetisch unauffälligen Aborten. In beiden Gruppen lag das Alter der Frauen mit trisomer Abortanlage tendenziell höher als unter den Aborten mit Monosomien X und Polyploidien (zumindest in der Kontrollgruppe). Ein deutlich erhöhtes mittleres Alter der Frauen mit 34,6 Jahren errechnete sich für die Triploidien der CGH-Studie ($n = 7$). Für eine statistische Aussage ist die Fallzahl jedoch zu gering (Abb. 3.15).

Abb. 3.15 Maternales Alter zum Zeitpunkt des Aborts



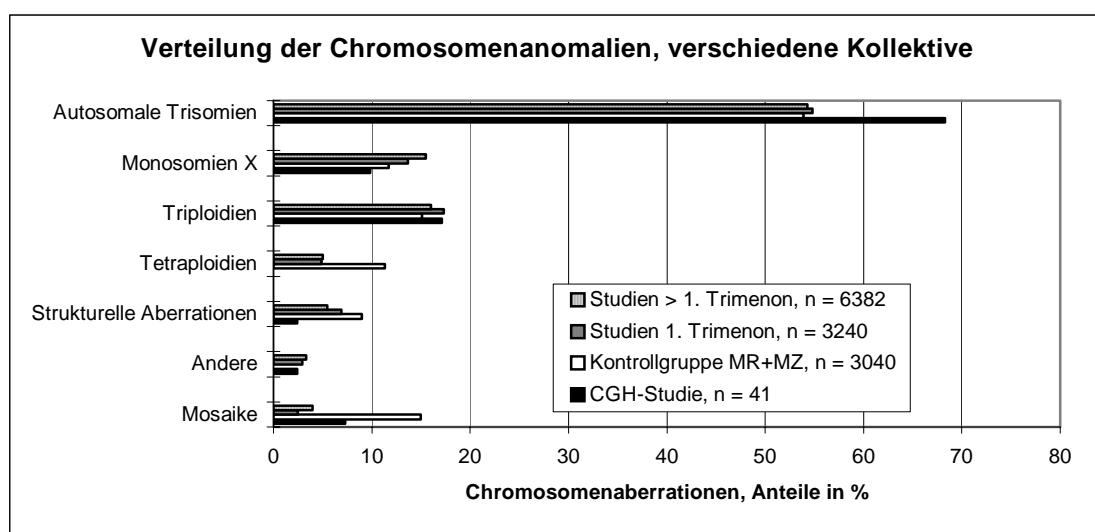
3.5.3 Aberrationsrate und Aberrationstyp

Unter den durch die Comparative Genomhybridisierung retrospektiv untersuchten Spontanaborten fanden sich chromosomale Imbalancen in 72,0% der Fälle. Damit liegt die ermittelte Aberrationsrate deutlich über der der Kontrollgruppe mit 64,8%. Auffällig ist allerdings die Inhomogenität innerhalb der Kontrollgruppe. Chromosomale Anomalien traten in 71,0% in der Marburger Referenzgruppe bzw. in 64,2% in dem Mainzer Kollektiv auf.

Das Verteilungsmuster für die einzelnen Gruppen von Chromosomenanomalien entspricht sich weitgehend und auch im Vergleich mit den Literaturdaten ergibt sich ein einheitliches Bild (Abb. 3.16). Lediglich der Anteil an Trisomien mit 68,3% war deutlich höher als in der Kontrollgruppe mit 53,9%. Für die Triploidien ergab sich ein Wert von 17,1% vs. 15,1%, Karyotypen mit Monosomie X wurden in 9,8% bzw. 11,7% der Spontanaborte gefunden.

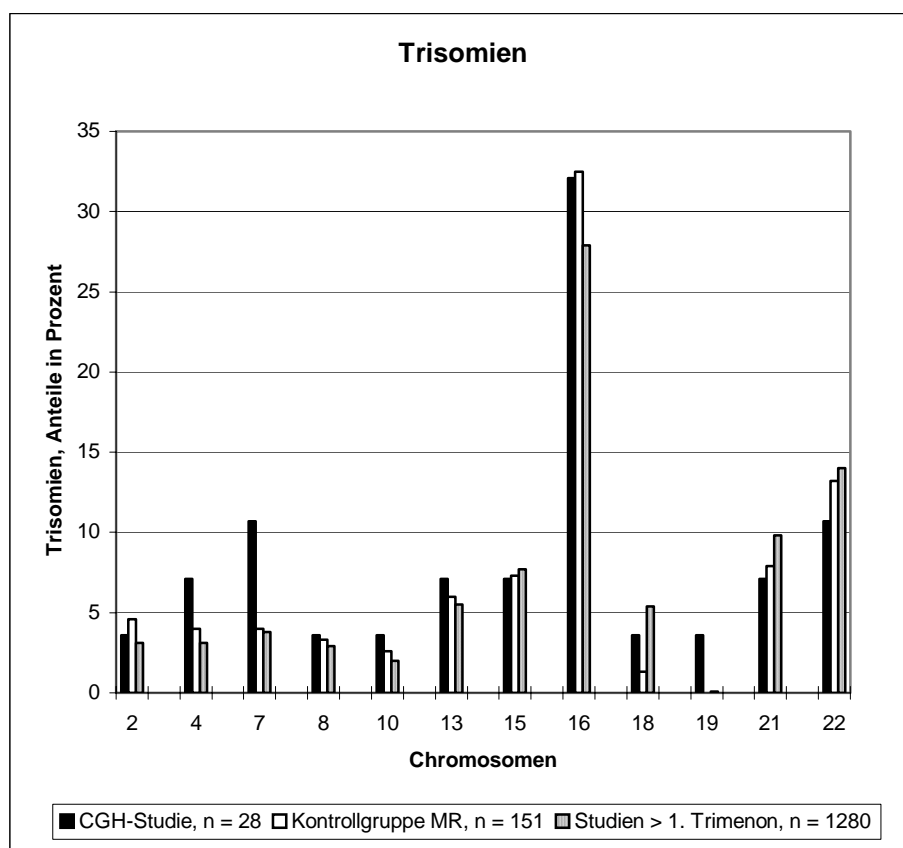
Größere Unterschiede ergaben sich für den Anteil der Aborte mit strukturellen Aberrationen (2,4% vs. 9,0%) sowie bei Mosaikkaryotypen (7,3% vs. 15%). Aufgrund der geringen Fallzahl sind diese Zahlen jedoch als nicht aussagekräftig genug zu werten.

Abb. 3.16 Vergleich der chromosomalen Aberrationen in unterschiedlichen Abortkollektiven



Die prozentuale Aufteilung der autosomalen Trisomien auf die beteiligten Chromosomen lässt sich aus dem Diagramm 3.17 ablesen. Auffällig ist der hohe Anteil an Trisomien 7 und die ansonsten nur selten diagnostizierte Trisomie 19 unter den durch CGH untersuchten Spontanaborten im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu anderen Studien.

Abb. 3.17 Autosomale Trisomien unter Spontanaborten, Vergleich verschiedener Abortkollektive



3.5.3.1 Gonosomenkonstellation bei triploiden Abort-Karyotypen

Das Geschlechterverhältnis der Triploidien mit 1,5 XXX : 1 XXY : 1 XYY in der CGH-Studie (n = 7) und 1 XXX : 1,5 XXY : 0,08 XYY in der Kontrollgruppe (n = 459) unterscheidet sich auffallend in der XYY-Konstellation.

3.5.4 Sex-Ratio

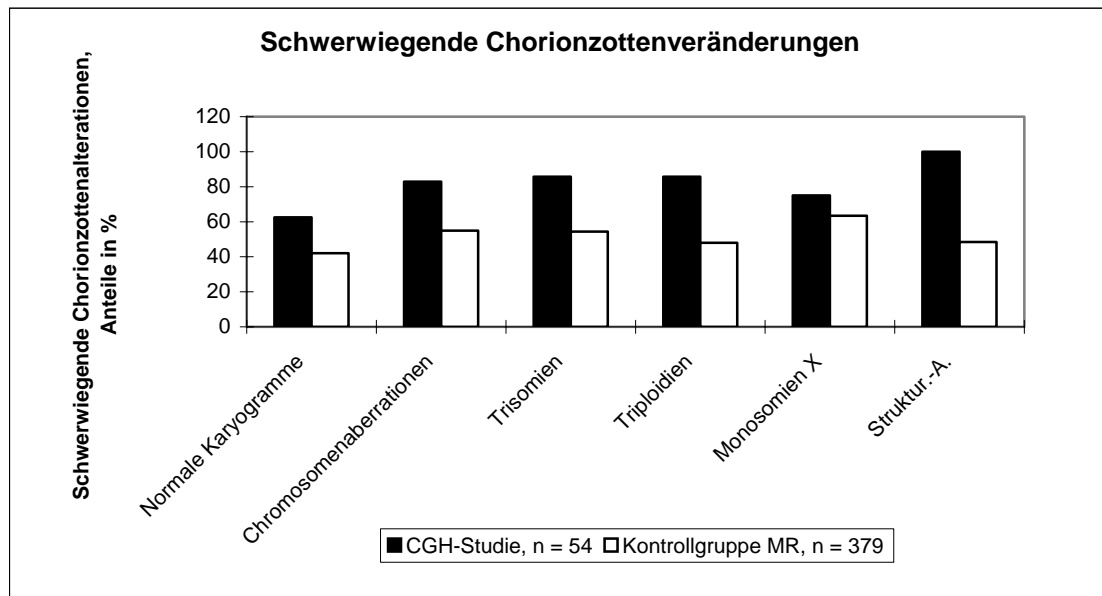
Unter den 57 Spontanaborten der CGH-Studie fand sich ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis von exakt 1,0. Die als chromosomal unauffällig befundenen Fälle hatten eine Ratio von 0,78 (m:w), die chromosomal aberranten eine von 0,86 (m:w). Bei der Kontrollgruppe war das Überwiegen der weiblichen Karyotypen unter den chromosomal normalen Fällen besonders deutlich mit einer Sex-Ratio von 0,58. Unter denen mit aberranten Karyogrammen war das Verhältnis mit 0,93 ausgeglichener. Betrachtet man die Marburger Referenzgruppe getrennt, so fällt ein Geschlechterverhältnis von 1,0 unter den zytogenetisch unauffälligen Fehlgeburten auf. Im Gegensatz dazu steht das Verhältnis von 0,56 (m:w) in der Mainzer Kontrollgruppe (Tab. 3.6).

3.5.5 Zottenhistologie

In 43 von 57 Spontanaborten der CGH-Studie wurden Plazentaveränderungen beschrieben, die für eine primär gewebliche Unterwertigkeit (PGU) der Fruchtanlage sprechen und somit eine Chromosomenanomalie als Abortursache unterstellen. In 74,4%% der Fälle mit diagnostizierter PGU konnten wir durch die CGH-Analyse auch eine Chromosomenaberration nachweisen. Ein hoher Anteil an schwerwiegenden Plazentaveränderungen im Sinne einer PGU ergab sich auch für die euploiden Aborte mit 78,6%.

Aus organisatorischen Gründen waren uns nur die Plazentahistologien der Marburger Kontrollgruppe (n = 379) zugänglich, so daß ein direkter Vergleich zwischen der CGH-Gruppe und dem gesamten Kontrollkollektiv an dieser Stelle nicht möglich war. Aus dem Diagramm (Abb. 3.18) läßt sich ablesen, daß der Anteil schwerwiegender Plazentaveränderungen bei den Aborten ohne in vitro Wachstum sowohl unter den als unauffällig befundenen (78,6%) als auch unter den Spontanaborten mit nachgewiesener Chromosomenaberration (74,4%) deutlich höher lag als in der Marburger Kontrollgruppe (42,0% bzw. 54,9%). Diese Beobachtung trifft auch hinsichtlich der verschiedenen Chromosomenaberrationen zu, allerdings sind die z. T. sehr kleinen Fallzahlen zu berücksichtigen (Abb. 3.19).

Abb 3.18 Anteil der schwerwiegenden Chorionzottenveränderungen in unterschiedlichen Abortkollektiven, aufgeschlüsselt nach Art der Chromosomenveränderung



4. Diskussion

4.1 CGH

4.1.1 Effizienz der CGH im Vergleich zur Effizienz der Aussage nach Zellkultur

In einer Zusammenarbeit zwischen der Universität Mainz (Abteilung für Kinderpathologie) und der Universität Marburg (Abteilung für Klinische Genetik) wurde die CGH zur Analyse von frühen Spontanaborten angewandt mit dem Ziel, von einem zytogenetisch bisher nicht zugänglichen Kollektiv früher Spontanaborte den chromosomalen Status zu erheben. Unter Zugrundelegung der dargestellten Häufigkeit von Chromosomenaberrationen bei Spontanaborten, insbesondere aber auch der neuen Erkenntnisse aus der Präimplantationsdiagnostik mit ihren hohen Inzidenzzahlen für chromosomale Aberrationen auch unter normal entwickelten Embryonen (Kap. 1.4.3), stellten wir die Hypothese auf, dass in dem oben genannten Abortkollektiv mit ungenügendem in vitro Zellwachstum eine hohe Frequenz chromosomaler Anomalien aufzufinden ist. Insbesondere unter sehr frühen Aborten mit Autolysezeichen sollten unserer Meinung nach schwere chromosomale Imbalancen zu finden sein.

Die Sensitivität der CGH in der Identifikation von Aneuploidien und unbalancierten strukturellen Chromosomenaberrationen liegt im Bereich der konventionell zytogenetischen Chromosomenanalyse. Dabei umgeht die CGH die Limitationen der Zellkultur wie Kulturversagen, Kontamination oder Kulturartefakte. In der vorliegenden Studie konnte in 95% der Fälle (57/60) mittels CGH in Verbindung mit molekularzytogenetischen oder molekularen Methoden ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Diese hohe Effizienz bei der Analyse von Abortmaterial wird durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt (Lomax et al. 2000).

Die Erfolgsrate einer zytogenetischen Analyse nach in vitro Kultivierung der Gewebe hat sich in den letzten drei Jahrzehnten ständig verbessert (von durchschnittlich ca. 60% in den 70er und 80er Jahren auf 80% in den 90er Jahren, Tab. 4.1a und b).

Tab. 4.1a Erfolgsraten von zytogenetischen Studien in Abhängigkeit der Kulturbedingungen (Zeichenerklärung siehe Tab. 4.1b)

Autor	Untersuchungs- material	Kultur- Dauer	Aberrations- rate	Kultur- Erfolg	Ausschluß von Abortmat.
Creasy et al. 1976	EM ¹	LTC ³	30,5%	53,3%	32,2%
Lauritsen 1976	EM ¹	LTC ³	54,9%	88,5%	37,4%
Takahara et al. 1977	EM ¹	LTC ³	47,0%	64,7%	23,5%
Hassold et al. 1980	EM ¹	LTC ³	46,3%	89,3%	46,8%
Kajii et al. 1980	EM ¹	LTC ³	53,9%	70,0%	45,9%
Warburton et al. 1980	EM ¹	LTC ³	32,2%	59,1%	k. A. ⁴
Meulenbroek et al. 1982	EM ¹	LTC ³	61,7%	62,3%	15,0%
Andrews et al. 1984	EM ¹	LTC ³	18,8%	49,8%	31,3%
Geisler et al. 1987	EM ¹	LTC ³	39,2%	53,2%	51,4%
Dejmek et al. 1992	EM ¹	LTC ³	46,0%	61,4%	21,1%
Cowchock et al. 1993	bevorzugt CVS ²	k. A. ⁴	45,2%	84,0%	0%
Hansmann et al. 1986	CVS ²	direkt	50,0%	82,4%	0%
Gueneri et al. 1987	CVS ²	24-48 h	76,7%	93,6%	0%
Eiben et al. 1990	CVS ²	24 h	50,7%	76,3%	0%
Ohno et al. 1991	CVS ²	24 h	69,4%	92,3%	0%
Garbó et al. 1992	CVS ²	über Nacht	51,3%	90,3%	0%
Bé et al. 1997	CVS ²	k. A. ⁴	63,7%	95,2%	0%
Brajenovic et al. 1998	CVS ²	LTC ³	38,8%	82,1%	0%
Kontrollgruppe Mainz, 1999	CVS ²	LTC ³	64,2%	69,6%	0%

Tab. 4.1b Erfolgsraten von zytogenetischen Studien in Abhängigkeit der Kulturbedingungen

Autor	Untersuchungs- material	Kultur- Dauer	Aberrations- rate	Kultur- erfolg	Ausschluß von Abortmat.
Kontrollgruppe MR, 1999	CVS ²	LTC ³	71,0%	87,5%	0%
Nagaishi et al. 2004	CVS ²	LTC ³	56,5%	85,3%	0%
Menasha et al. 2005 (1990-1997)	CVS ²	LTC ³	42,8%	79,1%	6,2%
Menasha et al. 2005 (1998-2002)	CVS ²	LTC ³	71,9%	94,5%	0,7%
Strom et al. 1992	Chorionzotten- biopsie	k. A. ⁴	83,2%	99,0%	0%
Sánchez et al. 1999	Chorionzotten- biopsie	k. A. ⁴	62,4%	91,4%	0%
Appleman et al. 1991	Chorionzotten- biopsie	k. A. ⁴	41,7%	100%	0%
Sorokin et al. 1991	Chorionzotten- biopsie	über Nacht	100%	100%	0%

¹EM embryonales (fetales) Gewebe und Membranen, keine Chorionzotten

²CVS Chorionic villus sample = Chorionzotten

³LTC long term culture = Langzeitkultur

⁴k. A. keine Angaben

In der Vergangenheit war die Vorgehensweise in hohem Maße unterschiedlich. Vielfach wurden nur solche Abortmaterialien zur Zellkultur zugelassen, die makroskopisch embryonale bzw. fetale Strukturen erkennen ließen (Boué 1975, Creasy 1975, Lauritsen 1976, Geisler 1978, Hassold 1980, Kajii 1980, Andrews 1984 u. a.), später wurde zunehmend mehr die Kultur von Chorionzotten versucht (Cowchock 1993, Kalousek 1993 u.a.) So erklärt sich, daß je nach Studie bis zu 50% der Ausgangsmaterialien aus unterschiedlichen Gründen von der Zellkultur ausgeschlossen worden sind, wenn nach Ansicht der Autoren keine Aussicht auf Kulturerfolg bestand (Tab. 4.1). Neben verbesserten Kulturbedingungen, insbesondere durch Medien, die mit Wachstumshormonen supplementiert sind, ist jedoch die rasche Aufbereitung des Materials wesentlich für eine erfolgreiche Kultivierung von Abortmaterial. Kurze Transportwege und gute Logistik sind dafür entscheidend.

Da bei Aborten häufig die Frucht bereits intrauterin abstirbt, bevor es zu klinischen Symptomen kommt, ist das Material häufig autolytisch und bakteriell kontaminiert. Durch den routinemäßigen Einsatz von Ultraschall-Diagnostik schon in der Frühschwangerschaft lassen sich Zeichen des Aborts wie fehlende Fruchtanlage, fehlende Herzaktionen oder Wachstumsstillstand schon vor Einsetzen von Symptomen erkennen. Beeindruckend sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Strom (1992) und Sánchez (1999), die durch Chorionzottenbiopsie vor Abortkürettage in 99,9% bzw. 91,4% ein Ergebnis erzielen konnten. Die Chorionzottenbiopsie wurde bei sonographisch diagnostiziertem Abort vor Einsetzen jeglicher Symptome durchgeführt. Die direkte Präparation der Chorionzotten hat ebenfalls überzeugende Ergebnisse erbracht. Bei Gueneri und Mitarbeitern (1987) konnte in 94%, bei Ohno et al. (1991) in 92,3%, bei Garbó et al. (1992) in 90% der fetale Karyotyp erhoben werden. Auch hier erfolgte die Abortkürettage vor Einsetzen von Symptomen. In neueren Studien werden auch mit der herkömmlichen Langzeitkultur von Abortzotten gute Ergebnisse erzielt. So liegt der Kulturerfolg bei Brajenovic-Milic et al. (1998) bei 82,1%, 87,5% im eigenen Labor (1999) und sogar 94,5% bei Menasha et al. (2005). Neueste Studien erreichen somit eine Effizienz, die vergleichbar ist mit der der CGH-Analyse.

Chorionzotten scheinen sich als Ausgangsmaterial deshalb gut zu eignen, weil sie nach Absterben des Embryos durch die direkte Ankoppelung an die maternale Blutperfusion noch länger vital bleiben (Appleman et al. 1991). Eine Chorionzottenbiopsie einer ohnehin notwendigen instrumentellen Entleerung des Uterus vorzuschalten, um eine möglichst sichere Aussage über zugrundeliegende Chromosomenstörungen treffen zu können, hat sich jedoch in der klinischen Routine nicht durchsetzen können.

Insgesamt läßt sich eine positive Korrelation zwischen Kulturerfolg und ermittelter Anzahl an Anomalien feststellen (Tab. 4.1a und b).

4.1.2 Wertigkeit der CGH im Rahmen der Aufdeckung chromosomaler Imbalancen bei Frühaborten

In 72% des Untersuchungskollektivs konnten mittels CGH in Kombination mit ergänzenden Techniken, wie Interphase-FISH und Mikrosatellitenanalyse, chromosomale Fehlverteilungen nachgewiesen werden. Dagegen konnte eine Korrelation zum Autolysegrad nicht erhoben werden.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Verteilung bezüglich der unterschiedlichen Gruppen von Chromosomenanomalien weitgehend vergleichbar den Daten ist, die nach konventioneller zytogenetischer Analyse erhoben wurden. Unter den mittels CGH analysierten aberranten Fällen dominierten die Trisomien mit 68,3%, gefolgt von Triploidien (17,1%), Monosomie-X-Karyotypen (9,8%) und strukturellen Chromosomenaberrationen (2,4%). Autosomale Monosomien wurden nicht beobachtet. Bei Vorliegen einer Trisomie im Abort waren die Chromosomen 16 (mit mehr als 32% der trisomen Karyotypen) und 22 (mit ca. 11% der trisomen Karyotypen) überdurchschnittlich häufig beteiligt. Unterschiede ergaben sich jedoch für die Häufigkeit der Trisomie 7, die mit 10,7% wesentlich häufiger war als in den herkömmlich untersuchten Aborten (3,2% in der Kontrollgruppe und durchschnittlich 3,8% in anderen Studien (Tab. 4.2)). Die Trisomie 7 nimmt auch ätiologisch eine Sonderstellung ein. Während bei der überwiegenden Anzahl der Trisomien 15, 16, 18, 21 und 22 eine Nondisjunction in der maternalen Meiose I ursächlich ist, haben Zaragoza et al. (1998) in über 50% der molekulargenetisch untersuchten Fälle von Trisomien 7 mitotische Nondisjunction gefunden. Weiterhin ist der Mechanismus des „Genomic Imprintings“ auch für das Chromosom 7 bekannt. Da das Chromosom 7 für mehrere Wachstumsfaktoren, Zytokine und Rezeptoren kodiert, könnte möglicherweise ein Imprinting-Effekt Einfluß auf das Zellwachstum in der Kultur haben (Kotzot et al. 2000).

Andererseits werden Trisomien 7 in Chorionzottenbiopsien häufig bei confined placental mosaicisms (CPM) gesehen und eine Auswirkung auf das intrauterine Wachstum des Embryos scheint nicht gegeben (Kalousek et al. 1996). Unter CPM versteht man das Vorliegen einer Chromosomenaberration ausschließlich im placentaren Gewebe und nicht in Zellen des Embryos. Ursächlich hierfür wird ein sogenannter „trisomic rescue“ angenommen: Eine trisome Anlage im

Blastomerenstadium wird durch Verlust eines der drei Chromosomen in eine euploide Zelllinie überführt, welche die Vorläuferzellen für den Embryo darstellen. Die Blastomeren mit Trisomie waren die Anlagen für die Plazenta. Scheinbar sind die euploiden Zellen in der Lage, einen möglichen Wachstumsnachteil der trisomen Zellen auszugleichen. In die außergewöhnliche Gruppe der Aborte mit Trisomie 7 paßt auch die Beobachtung, daß die einzige Trisomie paternaler Herkunft in der CGH-Gruppe eine Trisomie 7 war (Kap. 3.1, Abb 3.10).

Eine Trisomie 19 wird unter Spontanaborten nur sporadisch gefunden. In der vorliegenden Studie konnte ein Abort mit einer Mosaiktrisomie 19 diagnostiziert werden. Möglicherweise wird ihre Inzidenz aufgrund von Mosaikbefunden unterschätzt. In den großen Abortstudien wird nur vereinzelt von einer Trisomie 19 berichtet (Tab. 4.2, Literatur ebendort). Interessanterweise konnte eine Trisomie 19 in einer Chorionzottenbiopsie durch Strom und Mitarbeitern (1992) nachgewiesen werden. Strom et al. untersuchten Abortzotten bei sonographisch diagnostiziertem Abortgeschehen zeitlich vor dem Einsetzen von Symptomen. Damit erfolgte die zytogenetische Analyse an relativ vitalem Plazentagewebe und der Abortkürettage vorgeschaltet. In Zusammenhang mit unserem Ergebnis könnte dieses besondere Studiendesign als ein Hinweis auf eine durch die Trisomie 19 bedingte Kulturschwierigkeit gewertet werden. Zudem sind auf dem Chromosom 19 lokalisierte Gene bekannt (Transkriptionsfaktoren USF1 und USF2), die die Differenzierung des Trophoblasten beeinflussen (Jiang und Mendelson, 2003). Ihr Einfluß über die frühen Schwangerschaftswochen hinaus unterbindet die notwendige Reifung der Chorionzotten. Eine höhere Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren wäre möglicherweise auch durch eine höhere Gendosis bei trisomer Fruchtanlage denkbar.

Tab. 4.2 Autosomale Trisomien unter Spontanaborten

Autor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Alle
Lauritsen 1976	1			2			2	3	3	2		1	4	11	21			6			4	2	62
Takahara 1977	2	3	1				4	2	2	1		1	2	1	14			4			3	4	44
Hassold 1980	5	1	8	1	3		8	7	5	1	1	5	10	5	14	51	2	5		7	26	29	194
Kajji 1980	4	1	2	2	1		6	4	1	4	1	2	5	10	11	39		7		1	12	19	130
Warburton 1980	15		3				7	4	5	3		9	4	10	48	1	8		5	9	8		139
Meulenbroek 1982			2						1	2		4		2	6				1	4	4		26
Gueneri 1987	1		1				4	1	1	1	1	9	3	12	18	1	6		3	12	14		88
Eiben 1990	3	7	7	6			8	4	6	4	4	6	20	5	7	50		15		11	23	41	227
Ohno 1991	2		4	1				2	2	1		1	5	2	23		2		2	8	11		64
Strom 1992	3	1	2	1			1	1	3		1	5	1	6	8		3		1	9	11		59
Be 1997	1	3	2	8	1	1	9	9	10	5	4	4	3	7	20	73	5	7		4	8	31	215
Sánchez 1999	1								1			2		3	6		6			8	5		32
Alle	1	40	15	40	3	12	49	37	39	25	10	19	70	46	99	357	9	69	1	34	126	179	1280
Anteil in %	0,08	3,1	1,2	3,1	0,2	0,9	3,8	2,9	3,0	2,0	0,8	1,5	5,5	3,6	7,7	27,9	0,7	5,4	0,08	2,7	9,8	14,0	100
Kontrollgruppe MR	7	2	6	2	4		6	5	4	4	2	2	9	1	11	49	1	2		2	12	20	151
Anteil in %	4,6	1,3	4,0	1,3	2,6		4,0	3,3	2,6	2,6	1,3	1,3	6,0	0,7	7,3	32,5	0,7	1,3		1,3	7,9	13,2	100
CGH-Studie	1		2				3	1	1	1		2		2	9		1		1	2	3		28
Anteil in %	3,6		7,1				10,7	3,6	3,6	3,6		7,1		7,1	32,1		3,6		3,6	7,1	10,7		100

Die Inzidenz der Triploidien in der CGH-Studie (17,1%) liegt nur wenig über der der Kontrollgruppe mit 15,6%. Nach Warburton et al. (1980) stammt der überzählige haploide Chromosomensatz in circa 75% vom Vater. Dies bestätigten auch die eigenen Ergebnisse zur Klärung der parental Herkunft des überzähligen Chromosomensatzes. In drei von sieben Fällen ließ sich die Herkunft ermitteln. In allen drei Fällen war der überzählige Chromosomensatz paternalen Ursprungs (Kap. 3.1, Tab. 3.3). In den meisten der paternal erblichen Fälle ist die Triploidie durch Dispermie entstanden (Zaragoza et al. 2000), mit einem erwarteten Geschlechterverhältnis von 1XXX : 2XXY : 1XYY.

Tab. 4.3 Gonosomenkonstellation bei triploiden Abort-Karyotypen

Autoren	XXX	XXY	XYY
Creasy et al. 1975	18	18	1
Lauritsen 1976	9	5	-
Takahara et al. 1977	8	11	-
Hassold et al. 1980	16	53	1
Kajii et al. 1980	8	13	-
Warburton et al. 1980	23	25	1
Meulenbroek et al. 1982	2	4	-
Andrews et al. 1984	6	5	1
Geisler et al. 1987	5	7	-
Eiben et al. 1990	15	28	3
Dejmek et al. 1992	47	28	1
Strom et al. 1992	2	2	1
Neuber et al. 1993	26	36	1
Bé et al. 1997	21	39	2
Brajenovic-Milic et al. 1998	3	10	-
Gesamt	209	284	12
	(1	1,4	0,06)
Kontrollgruppe MR + MZ	179	266	14
	(1	1,5	0,08)
CGH-Studie	3	2	2
	(1,5	1	1)

(Das relative Geschlechterverhältnis ist in Klammern mit Fettdruck angegeben)

Ist die Triploidie maternalen Ursprungs, so spricht man von Digynie, mit einem postulierten Geschlechterverhältnis von 1XXX : 1XXY. Tatsächlich wird aber ein Überwiegen der 69, XXY- Konstellation in vielen Studien beobachtet (Tab. 4.3, Literatur ebendort). Triploidien mit einer XYY-Gonosomen-Konstellation machen nur einen kleinen Anteil der untersuchten Triploidien aus (2-3%). Um so erstaunlicher die Tatsache, daß in der CGH-Studie in 2/7 triploiden Aborten ein 69, XYY-Karyotyp ermittelt werden konnte. In dieser Gruppe der triploiden Aborte fand sich insgesamt eine Relation im Geschlechterverhältnis von 1,5 XXX : 1 XXY : 1 XYY, in der Kontrollgruppe (n=458 Triploidien) wurde ein Verhältnis von 1 XXX : 1,5 XXY : 0,08 XYY ermittelt. Die unterschiedliche Anzahl an triploiden Aborten mit XYY-Gonotyp ist hoch auffällig. Wie schon Bouè und Boué (1985) vermuteten, könnte das geringe Vorkommen dadurch erklärt werden, daß die XYY-Konstellation möglicherweise zu einem sehr frühen Absterben der Frucht und als Folge zu schlechtem Zellwachstum in der Kultur führt. Interessanterweise findet man bei Eiben und Mitarbeitern (1990) ebenfalls einen auffällig großen Anteil an Triploidien mit XYY-Konstellation (3/46) (Tab. 4.3). Die zytogenetischen Analysen wurden durch eine direkte Präparation des Chorionzottenmaterials durchgeführt, so dass eine Zellkultur umgangen werden konnte. Strom und Mitarbeiter (1992) haben nach Chorionzottenbiopsie und direkter Präparation (99%ige Ergebnissicherheit) unter 1/5 triploiden Aborten ebenfalls eine anteilmäßig nicht zu erwartende XYY-Gonosomen-Konstellation ermitteln können. Diese Beobachtungen stützen die Theorie, daß triploide Aborte mit XYY-Gonosomenkonstellation schwieriger zu kultivieren sind und deshalb dem zytogenetischen Nachweis (unter Kultivierung des plazentaren/embryonalen Gewebes) entgehen können.

4.1.3 Plazentamorphologie, Korrelation mit den chromosomalen Befunden der CGH-Analyse und mit der parentalen Herkunft der Chromosomenaberrationen

Die histopathologischen Veränderungen der Plazenta bei Chromosomenaberrationen wurden in zahlreichen Studien beschrieben (Genest et al. 1995, Rehder et al. 1989, Minguillion et al. 1989, Göcke et al. 1985). Die Fehlbildungen der Chorionzotten entstehen durch die unterschiedliche

Kombination relativ weniger Einzelkomponenten. Diese sind: Mangelhafte Ramifikation und Vaskularisation, wandernde Trophoblastzellen im Stroma, Atrophie des Trophoblasten, hydropische Alteration des Stromas. Diese schwerwiegenden Veränderungen der Chorionzotten werden im allgemeinen mit frühletalen Chromosomenaberrationen als Abortursache in Verbindung gebracht. Dieser Zusammenhang war in unserer CGH-Studie in 74,4% (43/54) der Fälle gegeben, zum Vergleich in 73% bei Minguillon und Mitarbeitern (1989).

Trotz unterschiedlicher Ergebnisse zeigen verschiedene Studien, dass sich lediglich die Triploidie väterlicher Herkunft mit großer Sicherheit von der Histologie ableiten lässt (Müntefering et al. 1987, Rehder et al. 1989). Typischerweise ist dabei eine zu kleine, nicht zystische Plazenta bei digynischen Triploidien; eine riesige, molenartige Plazenta bei diandrischen Triploidien aufzufinden. Histologisch findet sich bei diandrischen Triploidien in vielen Fällen eine in verschiedenen Schweregraden ausgeprägte Partialmole, eine abgeschwächte Form der kompletten Blasenmole. Histologisch ist die klassische Blasenmole durch eine früh eintretende hydropische Degeneration der plazentaren Villi und eine Trophoblasthypertrophie gekennzeichnet. Komplette (klassische) Blasenmolen sind diploid mit zwei väterlich erblichen Chromosomensätzen. Diese Konstellation konnte durch die eigenen Untersuchungen (im Fall MR 112, Abb. 3.2a, b) verifiziert werden. Bei der Partialmole ist der Zottenhydrops nur fokal zu finden. Der pathogene Effekt beruht auf der unterschiedlichen Aktivität paternaler und maternaler Gene, ein Effekt, der als genomisches Imprinting bezeichnet wird. In bis zu 75% liegen unter Abort-Triploidien überzählige paternale Chromosomenkompartimente vor, welche in den meisten Fällen auf einer Dispermie beruhen (Zaragoza et al. 2000, Müntefering et al. 1987). Zwar waren in der Gruppe der Triploidien mehrheitlich schwere Zottenalterationen beschrieben (6 von 7), den histologischen Kriterien der Partialmole entsprachen jedoch nur zwei Fälle (29%). Die erwartete paternale Herkunft des überzähligen Chromosomensatzes konnte in diesen Fällen belegt werden (Kap. 3.1, Tab. 3.3).

Bei einer der sieben Triploidien (69, XXX) ergab das histologische Bild eher leichte morphologische Veränderungen der Abortzotten. Dies legte eine maternale Herkunft des überzähligen Chromosomensatzes nahe.

Relativ einheitliche morphologische Veränderungen der Abortzotten waren für Spontanaborte mit Trisomie 16 gefunden worden. Mit dieser bereits intrauterin letalen Trisomie ist eine ausgeprägte plazentare Dysfunktion verbunden, wie sie charakteristisch für frühletale Chromosomenaberrationen ist (Sobotta, 1998). In der Literatur waren nahezu alle untersuchten Fälle mit einer Trisomie 16 maternalen Herkunft (Kap. 1.4.6, Tab.1.8), so auch in unserem Kollektiv (Kap. 3.1, Tab. 3.3). Nach Scheer (1996) bleibt die plazentare Wachstumsretardierung jedoch unbeeinflusst durch die parentale Herkunft der Chromosomenaberration. Das Schädigungsmuster ist jedoch nicht pathognomonisch, das heißt, auch andere Chromosomenanomalien und auch nicht-chromosomal begründbare Aborte in unserer Studie hatten vergleichbare Plazentamorphologien gezeigt.

In beiden Fällen mit nachgewiesener Trisomie 21 ergaben die Beurteilungen der Zottenmorphologie weniger ausgeprägte Veränderungen. Nach Rehder et al. (1989) werden bei Trisomien, welche auch im fortgeschrittenen Gestationsalter und unter Lebendgeborenen beobachtet werden, leichtere Alterationen der Chorionzotten erwartet. Zumindest für die Trisomie 21 trifft das in unserer Studiengruppe zu. Der Trisomie 13 würden dieser Hypothese folgend vergleichbar milde Entwicklungsstörungen der Plazenta entsprechen. Die beiden Fälle aus unserem Kollektiv zeigten histologisch jedoch eindeutige Hinweise auf eine frühembryonale Entwicklungsstörung. Für einen der beiden Fälle ließ sich das zusätzliche Chromosom als maternal identifizieren. Da die Trisomie 13 in den überwiegenden Fällen auf eine maternale Chromosomenfehlverteilung zurückzuführen ist (Kap. 1.4.6, Tab. 1.8), scheint es trotz einheitlicher parentaler Herkunft des überzähligen Chromosoms unterschiedliche Manifestationszeitpunkte der plazentaren Funktionsstörung zu geben.

Für alle anderen Trisomien ergab sich kein einheitliches Bild. Der überwiegende Anteil ging mit schweren Veränderungen der Plazenta einher, aber auch einige frühletale Trisomien (Trisomie 2, 10, 15, 22) waren mit unspezifischen und regressiven Alterationen beschrieben. Damit ist ausgehend vom histologischen Bild nur eine unsichere Aussage über autosomale Trisomien als Abortursache möglich. Eine Übereinstimmung von pathologischer Zottenmorphologie und zugrunde liegender Trisomie lag in unserer Studie bei 77,8% vor. Andere

Untersuchungen gaben 65,5% Übereinstimmungen in dieser Untergruppe an (Minguillon et al. 1989).

Bei X-Monosomie ist die Plazenta vor allem durch fokale Veränderungen mit Verbänden avaskulärer hydropischer Stammzotten und kleinen hypovaskulären, fibrotischen Zottenaufzweigungen, sowie fokaler Trophoblastatrophie charakterisiert (Göcke et al. 1985, Röckelein et al. 1989). Diese Merkmalskonstellation wurde bei 2/4 Aborten mit Monosomie X gefunden. In einem Fall ist das Bild einer Partialmole, im 4. Fall überwiegend regressive Veränderungen beschrieben, so dass der Plazenta-Phänotyp bei Monosomie X weit gefächert erscheint. In der Literatur gibt es mehrfach Angaben zur schwierigen Abgrenzung eines XO-Status anhand der begleitenden Plazentamorphologie (Minguillon et al. 1989, Röckelein et al. 1989, Bartho et al. 1992). Möglicherweise ist die Vielfalt der Zottenalterationen durch die unterschiedliche Expression und Aktivität des maternalen bzw. paternalen X-Chromosoms bedingt (Monk 1988). In unserem Untersuchungsgut konnten wir in zwei Fällen die maternale Herkunft des X-Chromosoms belegen. Damit war das paternale Geschlechtschromosom verloren gegangen. Histologisch waren die Befunde jedoch uneinheitlich, einerseits mit dem Vorliegen einer Partialmole als Ausdruck einer frühen Entwicklungsstörung der Plazenta, andererseits mit den eher typischen Zottenveränderungen korreliert. Möglicherweise zeigen Aborte mit 45, X Karyotyp mit maternalem X-Chromosom eine gravierendere plazentare Wachstumsstörung als solche mit väterlich erblichem X-Chromosom (Scheer, 1996).

Nicht chromosomal begründbare Aborte lassen sich laut Müntefering et al. (1987) mit großer Wahrscheinlichkeit von der Plazentahistologie ableiten. Diese Beobachtung war in unserer Untersuchung nicht zu treffen, da 78,6% der Aborte mit normalem Karyotyp schwere Alterationen der Chorionzotten hatten. Eine Kontamination des Materials mit maternalen Zellen, welche die Diagnose in Frage stellen könnte, ist bei der CGH-Technik nicht gegeben. Folglich scheinen Chorionzotten in ähnlicher Weise auf ein Spektrum von chromosomalen, aber auch auf exogene Noxen zu reagieren. Die Plazentaentwicklung soll in erster Linie vom Entstehungszeitpunkt der Schädigung und ihrer Schwere abhängig sein (Rehder et al. 1989). So finden

sich z. B. herdförmige Zottenreifungsstörungen auch bei bestimmten Virusinfektionen (z. B. CMV) oder bei maternalen Grunderkrankungen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Morphologie der Plazentazotten kaum Rückschlüsse auf den zytogenetischen Befund zulässt. Im eigenen Untersuchungskollektiv lag die histologische Fehleinschätzung bei 35%. Vergleichbare Werte von 33% wurden von Müntefering et al. (1988) nach histologischer und zytogenetischer Untersuchung von 501 Aborten gefunden. Ausnahmen bilden übereinstimmend nur die Gruppe der Polyploidien und Aborte mit Trisomie 16. Rechnet man diese beiden Gruppen aus den Ergebnissen heraus, so lässt sich bei den restlichen Fällen nur noch mit 53%iger Sicherheit eine Chromosomenanomalie als Abortursache anhand der Plazentamorphologie diagnostizieren. Dieses ist bei einer a priori – Wahrscheinlichkeit von mindestens 50-60% für eine Chromosomenstörung im Abortmaterial keine gute Entscheidungsgrundlage.

4.1.4 Sex-Ratio

Das Geschlechterverhältnis von 0,77 (m:f = 7:9) unter den als unauffällig befundenen Aborten in der CGH-Gruppe überrascht deshalb, weil ein Überwiegen des weiblichen Karyotyps meist als Hinweis auf eine maternale Zellkontamination unter in vitro Bedingungen gewertet wird. Tatsächlich ist diese Beobachtung in vielen, vor allem auch älteren Studien zu machen (s. Tab. 4.4). Dennoch wird auch in Untersuchungen neueren Datums mit differenziertem Vorgehen (Dissektionsmikroskop, direkte Präparation der Chorionzotten) ein zum Teil deutlich zum weiblichen Geschlecht hin verschobenes Verhältnis (0,7-0,75) gefunden (Eiben 1990, Brajenovic-Milic 1998, Yusuf/Naeem 2004, Tab. 4.4). Eine Verfälschung des Ergebnisses durch ein Anwachsen maternaler Zellen unter Kulturbedingungen ist allerdings bei der CGH-Methodik nicht gegeben. Zudem ist die CGH-Analyse in dieser Studie überwiegend bei frühen Aborten durchgeführt worden. Yusuf und Mitarbeiter (2004) konnten in diesem Zusammenhang anhand einer umfangreichen Studie zeigen, dass das Geschlechterverhältnis unter Aborten mit unauffälligem Karyotyp je nach Abortzeitpunkt variiert. In der Untergruppe der Aborte mit einem Gestationsalter von 5 - 9 Wochen wurde eine Ratio von 0,36, bei Aborten

der 10. – 13. SSW ein Verhältnis (m:f) von 0,67 ermittelt. Danach wurde das Geschlechterverhältnis als annähernd ausgeglichen angegeben mit leichter Dominanz der männlichen Karyotypen (Ratio von 1,11 bei Aborten >13 SSW), ähnlich der Ratio unter Neugeborenen. In den meisten Studien mit ermitteltem Geschlechterverhältnis unter Spontanaborten mit unauffälligem Karyotyp gibt es keine Unterteilung hinsichtlich des Gestationsalters.

Tab. 4.4 Geschlechterverhältnis bei Spontanaborten mit unauffälligen Karyotyp

Studien	Männlich	Weiblich	Gestationsalter	Verhältnis
Lauritsen 1976	55	60	16. SSW	0,92
Takahara 1977	52	54	1.+ 2. Trimenon	0,96
Hassold 1980	230	307	1.+ 2. Trimenon	0,75
Warburton 1980	308	347	1.+ 2. Trimenon	0,89
Meulenbroek 1982	15	16	1. Trimenon	0,94
Geisler 1987	45	56	1.+ 2. Trimenon	0,80
Gueneri 1987	15	23	1. Trimenon	0,65
Eiben 1990	129	167	1.+ 2. Trimenon	0,77
Ohno 1991	20	24	16. SSW	0,83
Garbó 1992	59	74	1. Trimenon	0,79
Brajenovic-Milic 1998	31	43	16. SSW	0,72
Creasy 1975	330	267	1.+ 2. Trimenon	1,24
Kajii 1980	111	95	1.+ 2. Trimenon	1,17
Andrews 1984	69	56	1.+ 2. Trimenon	1,23
Dejmek 1992	286	214	1.+ 2. Trimenon	1,34
Sánchez 1999	17	15	1.+ 2. Trimenon	1,13
Yusuf, Naeem 2004	75	153	1. Trimenon	0,49
Yusuf, Naeem 2004	249	224	2. Trimenon	1,11
Laborinterne Daten 1999	55	55	1. Trimenon	1,0
CGH-Studie	7	9	1. Trimenon	0,77

Tab. 4.4 fasst einige Studienergebnisse zusammen. Studien, die sich auf Aborte des ersten Trimenons beziehen, sind kenntlich gemacht. Die Sex-Ratio liegt bei frühen Aborten deutlich niedriger (0,65-0,79), vergleichbar mit dem Geschlechterverhältnis von 0,77 der CGH-Analyse. Studien, welche Aborte des ersten und zweiten Schwangerschaftsdrittels zusammenfassen, ermitteln ein

Geschlechterverhältnis zwischen 0,75 und 1,34. Die Dominanz weiblicher Genotypen unter unauffälligen Aborten in der CGH-Studie ist deshalb eher als ein biologisches Phänomen zu werten.

Als biologische Ursache für ein Überwiegen von weiblichen Embryonen unter Spontanaborten wurden Fehler in der In- bzw. Reaktivierung des X-Chromosoms diskutiert, die zu einer abnormen Funktion des X-Chromosoms führen können (Bartels et al. 1990). Daraus würde in den frühen Gestationswochen ein Entwicklungsnachteil für weibliche Embryonen resultieren. Männliche Embryonen zeigen in den frühen Entwicklungsstadien eindeutig ein im Vergleich zu weiblichen Embryonen beschleunigtes Wachstum und eine höhere metabolische Aktivität (Mittwoch 1996). In diesem Zusammenhang wird der Einfluß des SRY-Gens, welches auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist und bereits im 2-Zellstadium transkribiert wird, vermutet (Zwingman et al. 1993). Das akzelerierte Zellwachstum könnte einen Implantationsvorteil für männliche Embryonen bedeuten (Clarke u. Mittwoch 1995), und auf diese Weise das wechselnde Geschlechterverhältnis unter Spontanaborten erklären.

4.1.5 Limitationen der CGH

In der vorliegenden Studie konnte in 95% der Fälle (57/60) mittels CGH in Verbindung mit molekularzytogenetischen bzw. molekularen Methoden ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden.

Es muß jedoch berücksichtigt werden, dass die Aussage einer CGH-Analyse in einigen Fällen limitiert ist, und die Ergebnisse durch zusätzliche Methoden verifiziert werden müssen.

Die CGH detektiert ausschließlich chromosomale Nettogewinne oder -verluste, nicht aber balancierte Chromosomenaberrationen wie Inversionen oder balancierte Translokationen. Balancierte Chromosomenveränderungen spielen jedoch im Abortgeschehen eine untergeordnete Rolle.

Da mittels CGH nur Änderungen der Anzahl eines DNA-Abschnitts in Relation zur durchschnittlichen Kopienzahl der Test-DNA erfasst werden, können Ploidie-Änderungen (zahlenmäßige Veränderungen des gesamten

Chromosomensatzes) nicht sicher nachgewiesen werden. Tetraploidien erzeugen keine Verschiebung des Fluoreszenz-Ratioprofils, Triploidien können u. U. am Profil der Gonosomen vermutet werden. Bei Vorliegen eines 69, XXY Genotyps z. B. verschiebt sich das Ratioprofil des X-Chromosoms im Vergleich zu einem 46, XY Genotyp von 0,5 zu 0,66 (Lomax et al. 2000). Diese Verschiebung des Ratioprofils war in unseren Triploidie-Fällen mit XXY-Genotyp auch zu sehen (Kap. 3.1, Abb. 3.3). Differentialdiagnostisch konnte es sich jedoch auch um einen 47, XXY-Karyotyp handeln, so dass in jedem Fall eine abschließende Klärung durch Mikrosatelliten- oder FISH-Analyse angeschlossen werden muß. Schon leichte Inhomogenitäten der CGH-Profile und mögliche Kontaminationen bzw. Mosaik machen die Detektion von Triploidien praktisch nicht möglich.

Kreuzhybridisierung repetitiver Sequenzen im Test- und Referenz-Genom können das CGH-Ergebnis verfälschen. Zur Abblockung dieser repetitiven Sequenzen wird COT-1-DNA, welche ausschließlich aus hochrepetitiven Sequenzen genomischer DNA besteht, im Versuchsansatz dazugegeben. Dadurch werden allerdings die zentromerischen und perizentromerischen Regionen sowie die kurzen (p-) Arme der akrozentrischen Chromosomen (ca. 10% des Genoms) von der CGH-Analyse ausgegrenzt (Nacheva et al. 1998). Desweiteren sind Abweichungen der Fluoreszenzintensität in den Telomerbereichen der Chromosomen mit Vorsicht zu werten, da die Fluoreszenzintensität zu den Telomeren hin graduell abnimmt (Kallioniemi et al. 1994). Es gibt Hinweise, dass die Subtelomerbereiche einiger Chromosomen besonders häufig in meiotische Rekombinationsereignisse involviert sind, mit geschlechtsspezifischen Unterschieden (Wintle et al. 1997). Einige der Subtelomerbereiche sind reich an transkriptionsaktiven Sequenzen (Carlock et al. 1992, Rommens et al. 1993). Ob ungleiches Crossing over zu Gen-Duplikationen oder Genverlust führen und in der Pathogenese früher Spontanaborte von Bedeutung sein kann, ist noch Gegenstand der Forschung. Das systematische Screening der Subtelomerbereiche aller Chromosomen mittels hochauflösender Matrix-CGH im Abgleich mit zytogenetischen Daten erbrachte bei Schaeffer und Mitarbeitern (2004) keinen Hinweis auf derartige Veränderungen bei frühen Spontanaborten.

Gelegentlich werden falsch positive Zugewinne der Chromosomenregionen 1p32→pter, 14q, 16pq, 17pq, 19pq, 20q und 22q beschrieben. Erklärt wird das Phänomen durch unterschiedliches Hybridisierungsverhalten von Digoxigenin- bzw. Biotin-markierter DNA in GC-reichen Regionen. Dieses Problem kann durch eine inverse Hybridisierung, d. h. die Fluorochrommarkierung von Test- und Referenz-DNA wird vertauscht, oder durch eine Markierung der DNA mit direkten Fluorochromen umgangen werden (Kallioniemi et al. 1994, Isola et al. 1994). Aufgrund dieser methodisch bedingten Schwierigkeit sind die bei Aborten häufigen Trisomien 16 und 22, die zusammengenommen bis zu 40% der trisomen Fälle ausmachen, erschwerend nachzuweisen. Aus unserer Erfahrung heraus waren Aborte mit Trisomie 16 jedoch unproblematisch nachzuweisen, eine Trisomie 22 war gelegentlich erst über eine Untersuchung von chromosomenspezifischen hochpolymorphen Mikrosatelliten zweifelsfrei darstellbar gewesen.

Eine weitere Limitation stellt die Präsenz normaler Zellen in der zu untersuchenden Zellpopulation dar. Mosaike können nur dann sicher erkannt werden, wenn (30-) 50 Prozent der Zellen von der Chromosomenanomalie betroffen sind (Kallioniemi et al. 1994). Die CGH ist somit nicht zur Untersuchung der klonalen Heterogenität geeignet (Du Manoir et al. 1993). Durch Trennverfahren wie Mikrodisektion gelingt es jedoch, Subpopulationen von Zellen aus einer Probe zu isolieren (Zhuang et al. 1995). In diesen Fällen liegt dann häufig so wenig Ausgangsmaterial vor, daß zunächst eine universelle Vermehrung der DNA über degenerierte PCR-Verfahren (DOP-PCR = degenerate oligonucleotide primed-PCR) erforderlich ist. 100 pg DNA aus formalinfixierten, paraffingebetteten Proben (entsprechend 2000 Zellen oder ca. 1 mm³ Probe) und 50 pg DNA aus nativem Gewebe werden als ausreichend für eine Amplifikation angesehen (Speicher et al. 1993).

Die Sensitivität der CGH bezüglich der Größe detektierbarer Chromosomenveränderungen ist noch nicht abschließend geklärt (Daniely et al. 1999). Einfache Gewinne oder Verluste chromosomaler Regionen sind bisher nur sicher diagnostiziert worden, wenn sie ≥ 10 Mb betragen (Du Manoir et al. 1995, Bentz et al. 1998, Nacheva et al. 1998). Dies entspricht in etwa einer Bande in einem Karyogramm bei einer Auflösung von ca. 400 Banden (gemäß ISCN). Anhand eines Rechenmodells postulieren Piper und Mitarbeiter (1995),

daß unter optimalen Bedingungen eine einfache Amplifikation bzw. Deletion von 2 Mb detektierbar sein müßte. Mikrodeletionssyndrome wie Prader-Willi-, Angelman- oder DiGeorge-Syndrome sind aber in praxi der CGH-Analyse bisher nicht zugänglich (Lapierre et al. 1998).

Zugewinne kleinerer Chromosomenregionen können nur im Falle sogenannter „high-level“-Amplifikationen nachgewiesen werden, wenn das Produkt aus Kopienanzahl und Größe des Amplikons > 2 Mb ist (Joos et al. 1993, Piper et al. 1995). Unter experimentellen Bedingungen sind nur Amplifikationen von ≥ 15 Mb gefunden worden (Parente et al. 1997).

Trotz der genannten Einschränkungen erweitert die Comparative Genomhybridisierung das diagnostische Spektrum ganz erheblich. Wie sich gezeigt hat, ist die CGH besonders dann hilfreich, wenn konventionelle zytogenetische Methoden versagen. Mittels dieser Technik kann eine umfassende retrospektive Analyse auch an asservierten Geweben durchgeführt werden, die durch zytogenetische Untersuchungsmethoden nicht zugänglich sind. Eine Potenzierung des Informationsgehalts ist mit der Kombination aus konventioneller Chromosomenanalyse und FISH bzw. ergänzenden molekulargenetischen Methoden zu erzielen. Wesentlich ist jedoch, dass man sich bei der Anwendung der verschiedenen Verfahren über deren Vor- und Nachteile und insbesondere über das jeweilige Auflösungsvermögen im klaren ist.

Die CGH-Analyse kann aufgrund der personellen und finanziellen Notwendigkeiten die Zellkultur nicht ersetzen, wohl aber ergänzend eingesetzt werden: Sie erfordert den Einsatz von anspruchsvollen Methoden (DNA-Extraktion, NICK-Translation und Hybridisation) und kostenintensiver Datenverarbeitung. Laboratorien, welche die Fluoreszenz in situ Hybridisierung routinemäßig einsetzen, verfügen schon über die wesentlichen Arbeitsmaterialien und -geräte. Zur Datenverarbeitung wird dann zusätzlich ein „Image Analysis System“ benötigt. Bis diese Methode routinemäßig eingesetzt werden kann, werden unserer Erfahrung nach ungefähr sechs Monate benötigt. Dann liegen Aufwand und Kosten in einem vertretbaren Rahmen vergleichbar mit der FISH.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie erscheint es wahrscheinlich, daß die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen als Abortursache noch immer

unterschätzt wird. Der Anteil an Anomalien unter frühen Spontanaborten wird allgemein mit 50-60% angenommen, nicht berücksichtigt bleiben allerdings die Aborte, die als „Kulturversager“ einer zytogenetischen Analyse nicht zugänglich sind (je nach Studie bis zu 60%). Überträgt man die 72%ige Aberrationsrate in unserer CGH-Studie auf die Gesamtanzahl der zytogenetisch nicht beurteilbaren Aborte in den Kontrollgruppen, so müßte man die Aberrationsrate auf 71,1% (MR) und 66,6% (MZ) korrigieren. Nach unseren Untersuchungen dürfte deshalb die tatsächliche Aberrationsrate unter frühen Spontanaborten annähernd 70% betragen. Unter Berücksichtigung einer nicht unerheblichen Anzahl an falsch negativen Befunden in der Zellkultur aufgrund maternaler Zellkontamination ist davon auszugehen, daß die wahre Aberrationsrate noch weiter nach oben korrigiert werden muß (Lomax et al. 2000). Bell und Mitarbeiter (1999) halten es sogar für möglich, daß die Hälfte der als 46, XX befundeten Spontanaborte in der Zytogenetik aus diesem Grund Fehldiagnosen sein könnten.

Für die genetische Beratung ist eine umfassende zytogenetische und molekularzytogenetische Untersuchung essentiell. Die Ergebnisse sind Grundlage einer gezielten genetischen Beratung betroffener Paare und Eltern hinsichtlich der prognostischen Interpretation für weitere Schwangerschaften sowie zur präzisen Angabe zum Wiederholungsrisiko von Fehlgeburten. Die Korrektur zu einer höheren Chromosomenaberrationsrate unter frühen Spontanaborten, wie in dieser Arbeit postuliert, stellt für betroffene Paare ein positives Ergebnis dar, denn für Folgeschwangerschaften ergibt sich nur ein geringfügig erhöhtes Wiederholungsrisiko. Ein aneuploider Abort jedoch würde eine Indikation für das Angebot zur pränatalen Diagnostik bei weiteren Schwangerschaften bedeuten. Beim Ausschluß einer Chromosomenanomalie als Abortursache muß gezielt nach anderen Ursachen gesucht werden, um mögliche Prophylaxemaßnahmen einleiten zu können (Kap. 1.4.8, Tab. 1.10).

Eine routinemäßige Chromosomenanalyse aller Abortfälle scheint nicht umsetzbar und auch ökonomisch nicht sinnvoll. Da das Differenzierungspotential histopathologischer Plazentabefunde für die Ursachenabklärung früher Spontanaborte nicht zufriedenstellend ist, sollte die Kryokonservierung unfixierter Gewebe in der Abortpathologie mehr Anwendung

finden. Somit kann im Bedarfsfall von der wertvollen Möglichkeit der retrospektiven Analyse mittels CGH -Technik Gebrauch gemacht werden.

4.1.6 Zukünftige Entwicklungen

Eine entscheidende Erhöhung des Auflösungsvermögens wird durch das neu entwickelte Verfahren der Matrix-CGH (M-CGH) erreicht. Anstelle von Metaphasechromosomen erfolgt die simultane Hybridisierung auf immobilisierte DNA-Fragmente (Pinkel et al. 1998). Durch die Anzahl der Fragmente, welche jeweils kleinen Sequenzen des Genoms entsprechen, kann das Auflösungsvermögen beeinflusst werden. Einfache Gewinne oder Verluste können nun mit einer sehr viel höheren Auflösung von 75-100 kb, „high-level“-Amplifikationen im Bereich ≥ 40 kb nachgewiesen werden (Solinas-Toldo 1997). Die Detektion chromosomaler Imbalancen erfolgt dann nicht mehr lichtmikroskopisch, sondern basierend auf Microchips durch eine computergestützte Bildanalyse. Erste orientierende Untersuchungen an 41 Spontanaborten ermöglichten in 10% der Fälle den Nachweis subtiler Imbalancen, welche in der konventionellen Chromosomenanalyse nicht nachweisbar gewesen waren (Schaeffer et al. 2004): So konnte eine Mosaiktrisomie 20, eine interstitielle Deletion 9p, eine terminale Duplikation 10q sowie eine interstitielle Duplikation 15q nachgewiesen werden. Neueste Untersuchungen mittels M-CGH an Spontanaborten mit ungenügender in vitro-Zellproliferation deckten einen unerwartet hohen Anteil von 11,5% (3/26) unbalancierter struktureller Aberrationen auf (Benkhalifa et al. 2005). In Ergänzung zu unserer Studie mittels konventioneller CGH-Technik sind durch diese methodische Weiterentwicklung weitere Erkenntnisse über das Spektrum angeborener Chromosomenveränderungen zu erwarten.

Die Comparative Genomhybridisierung mittels Microarrays zeichnet sich durch eine einfachere Handhabung aus, ist weniger personalintensiv und hat ein hohes Automatisierungspotential. Wenn es gelingt, die Prozedur weiter zu verkürzen, wird sich die M-CGH in der Präimplantationsdiagnostik als ein wertvolles Instrument durchsetzen. Die klassische CGH-Technik war zeitlich zu aufwendig und deshalb bei engem Zeitfenster nicht routinemäßig einsetzbar gewesen. Man erhofft sich davon, Präimplantationsembryonen in einem

Arbeitsgang auf jedwelche Form der Aneuploidie untersuchen zu können, um auf diese Weise die Erfolge der Präimplantationsdiagnostik weiter zu verbessern. Microarray-CGH ist in diesem Zusammenhang bereits erfolgreich an Blastomeren eingesetzt worden (Handyside et al. 2004).

Zur Zeit gibt es Microarrays für verschiedene Fragestellungen (Mikrodeletionen, Subtelomerbereiche). Es ist zu erwarten, dass sich das Einsatzgebiet in Zukunft erheblich ausweiten wird.

5. Zusammenfassung

Der hohe Anteil chromosomaler Imbalancen in der Frühschwangerschaft impliziert die Notwendigkeit einer intensiven zytogenetischen Untersuchung sowohl der Paare mit Aborten als auch der Aborte selbst.

Die konventionelle Chromosomenbandenanalyse erlaubt die Identifizierung von numerischen wie auch strukturellen Chromosomenanomalien. Grundvoraussetzung für die Darstellung der Chromosomen ist der Zugang zu proliferierenden (vitalen) Zellen. Bei der Kultivierung von Chorionzottenmaterial aus Spontanaborten kommt es in einem nicht unerheblichen Anteil (ca. 20%) zum Kulturmiss Erfolg. Die Ursache hierfür ist unklar. Diskutiert werden u. a. chromosomale Aneuploidien, die ein Zellwachstum in Kultur nicht zulassen.

Die CGH ist eine molekularzytogenetische Methode, welche chromosomale Imbalancen durch reverse Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zuverlässig aufdecken kann. Dadurch dass ausschließlich genomische DNA und keine Metaphasen des zu untersuchenden Materials benötigt werden, umgeht die CGH damit die Einschränkungen der konventionellen Chromosomenanalyse.

In dieser Studie wurde das diagnostische Potential der Comparativen Genomhybridisierung (CGH) zur retrospektiven Abklärung genetischer Imbalancen bei frühen Spontanaborten vorgestellt:

In einer Zusammenarbeit zwischen der Universität Mainz (Abteilung für Kinderpathologie) und der Universität Marburg (Abteilung für Klinische Genetik) wurde die CGH zur Analyse von 60 frühen Spontanaborten angewandt, welche aufgrund von ungenügender Zellproliferation in der Kultur ohne zytogenetischen Befund geblieben waren. Die Kontrollgruppe bestand aus 433 (MR) bzw. 6198 (MZ) unselektierten frühen Spontanaborten (6.-12. SSW), die im gleichen Zeitraum (1993-1999) in den Marburger bzw. Mainzer Labors zytogenetisch untersucht worden waren.

In der vorliegenden Studie konnte in 95% der Fälle (57/60) mittels CGH in Verbindung mit Mikrosatelliten-Analysen oder FISH-Untersuchungen ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Bei 72% der Aborte (41/57) ohne in vitro Wachstum wurde mittels CGH eine chromosomale Aberration nachgewiesen. Die Verteilung bezüglich der unterschiedlichen Gruppen von Chromosomen-

anomalien entsprach weitgehend den Daten, die nach konventioneller zytogenetischer Analyse erhoben werden. Unter den aberranten Fällen dominierten die Trisomien (68,3%), gefolgt von den Triploidien (17,1%), den Monosomie-X-Karyotypen (9,8%) und strukturellen Chromosomenaberrationen (2,4%). Bei Vorliegen einer Trisomie im Abort waren die Chromosomen 16 und 22 überdurchschnittlich häufig beteiligt (32,1% und 10,7%). Im Vergleich zu den herkömmlich untersuchten Aborten ergaben sich Unterschiede bezüglich der Häufigkeit der Trisomie 7 (10,7% versus 3,2%) und des Anteils von Triploidien mit einer 69, XYY-Konstellation (28% versus 3,1%).

In 16 Fällen des Marburger Untersuchungskollektivs war gleichzeitig mit dem Abortmaterial Blut der Eltern asserviert worden, so dass eine Klärung der parentalen Herkunft der Chromosomenaberration durch Mikrosatelliten-Analysen erfolgen konnte. Die Ergebnisse entsprachen den Angaben in der Literatur: Von den 8 autosomalen Trisomien waren 7 (87,5%) maternalen Ursprungs, eine paternale Trisomie 7 konnte ermittelt werden. Der überzählige Chromosomensatz erwies sich bei den drei Triploidien als paternal. Bei beiden Monosomien X konnte das vorhandene X-Chromosom als maternal bestimmt werden.

Die Korrelation der mittels CGH erhobenen Befunde mit den Plazentahistologien zeigte, dass Chromosomenaberrationen in 74% der Fälle mit schwerwiegenden Veränderungen der Chorionzotten einhergehen. Doch auch in der Gruppe der Spontanaborte mit unauffälligem Karyotyp fand sich ein hoher Anteil (63%) an Plazentaveränderungen, die üblicherweise als hinweisend auf eine Chromosomenstörung gewertet werden. Die Schädigungsmuster der Plazenta sind somit als nicht pathognomonisch anzusehen.

In 5/60 Fällen waren embryonale Fragmente im Abradat vorhanden. Auf Grund der makroskopischen Inspektion und histologischen Untersuchung wurde eine zugrundeliegende Chromosomenstörung vermutet. Durch die CGH-Untersuchung ließen sich diese retrospektiv zwei Fällen mit Triploidien, einer Trisomie 16 bzw. 21 und einer Monosomie X zuordnen.

Ausgehend von diesen Studienergebnissen scheint das Nicht-Wachsen unter in vitro-Bedingungen nicht, wie ursprünglich angenommen, auf seltenen Chromosomenaberrationen zu beruhen. Entgegen unserer Hypothese scheinen

nur vereinzelte Chromosomenaberrationen wie z. B. eine paternale Trisomie zu schlechtem in-vitro-Wachstum zu prädisponieren. Möglicherweise spielen exogene Faktoren wie Art der Abortinduktion oder –durchführung und Transportdauer eine entscheidendere Rolle.

Die Untersuchungen zeigen eine hohe Effizienz der CGH in Kombination mit supplementierenden Techniken wie Interphase-FISH und Mikrosatellitenanalysen bei der Abklärung genetischer Imbalancen an archiviertem Abortmaterial, welches einer konventionellen Chromosomenanalyse nicht zugänglich war.

Die erhobenen Daten belegen, dass annähernd 70% der frühen Schwangerschaftsverluste auf genetischen Imbalancen beruhen. Dieser Wert ist deutlich höher als die zur Zeit in der Literatur etablierten Angaben mit 50-60%. Im Rahmen einer genetischen Beratung betroffener Paare stellt die Korrektur zu einer höheren Chromosomenaberrationsrate ein positives Ergebnis dar, denn für Folgeschwangerschaften ergibt sich nur ein geringfügig erhöhtes Wiederholungsrisiko. Im Fall einer nachgewiesenen trisomen Abortanlage würde dieser Befund eine Indikation für das Angebot zur pränatalen Diagnostik bei weiteren Schwangerschaften bedeuten. Dagegen muß bei Ausschluß einer Chromosomenanomalie als Abortursache gezielt nach anderen Faktoren sowie nach prophylaktischen Maßnahmen zur Vermeidung weiterer Schwangerschaftsverluste gesucht werden.

Literaturverzeichnis

- Alberman E. (1988): The epidemiology of repeated abortion. In: Beard R. W., Sharp F. (eds) Early pregnancy loss: mechanism and treatment. RCOG, London, 9-17.
- Alberman E., Elliot M., Creasy M., Dhadi R. (1975): Previous reproductive history in mothers presenting with spontaneous abortions. *Brit J Obstet Gynaec* 82: 366-373.
- Amiel A., Reish O., Gaber E., Kadar I., Diukman R., Fejgin M. (2000) Replication asynchrony increases in women at risk for aneuploid offspring. *Chromosome Research* 8: 141-150.
- Andrews T., Dunlop W., Roberts D. F. (1984) Cytogenetic studies in spontaneous abortuses. *Hum Genet* 66: 77-84.
- Angell R. R., Sandison A., Bain A. D. (1984) Chromosome variation in perinatal mortality: a survey of 500 cases. *J Med Genet* 21: 39-44.
- Angell R. R., Templeton A. A., Aitken R. J. (1986) Chromosome studies in human in vitro fertilization. *Hum Genet* 72: 333-339.
- Angell R. R., Xian J., Keith J., Ledger W., Baird D. T. (1994) First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. *Cytogenet Cell Genet* 65: 194-202.
- Antonarakis S. E. (1991): Parental origin of the extra chromosome 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med*, 324:872-876.
- Antonarakis S. E., Down Syndrome Collaborative Group (1991) Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 324: 872-876.
- Antonarakis S. E., Petersen M. B., McInnis M. G., Adelsberger p. A., Schinzel A. A., Binkert F., Pangalos C., Raoul O., Slaugenhaupt S. A., Hafez m., Cohen m. M., Roulson D., Schwartz S., Mikkelsen M., Trandebjaerg L., Greenberg F., Hoar D. I., Rudd N. L., Warren A. C., Metaxotou C., Bartsocas C., Chakravarti A. (1992) The Meiotic Stage of Nondisjunction in Trisomy 21: Determination by Using DNA Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 544-550.
- Appleman Z., Rosensaft J., Elchalal U., Caspi B., Chemke J. (1991) Chorionic villus sampling for fetal karyotyping in missed abortions. *Prenatal Diagnosis* 11: 55-57.
- 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.

- Bartels I., Hansmann I. (1990) Excess of Females in Chromosomally Normal Spontaneous Abortuses. *Am J Med Genet* 35: 297-298.
- Batho S., Elias T. S., Luther A., Ensikat M. (1992) Pathomorphologische und zytogenetische Untersuchungen embryonaler Aborte. *Zentralbl Pathol* 138: 35-39, Gustav Fischer Verlag Jena.
- Bé C. R., Velásquez P. M., Youlton R. R. (1997) Aborto espontáneo: estudio citogenético en 609 casos. *Rev Méd Chile* 125: 317-322.
- Bell K. A., Van Deerlin P. G., Haddad B. R., Feinberg R. F. (1999) Cytogenetic diagnosis of „normal 46, XX“ karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertil Steril* 71: 334-341.
- Benkhalifa M., Kasakyan S., Clement P., Baldi M., Tachdjian G., Demireol A., Gurgan T., Fiorentino F., Mohammed M., Qumsiyeh M. B. (2005) Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat Diagn* 2005; 25: 894-900.
- Bentz M., Plesch A., Stilgenbauer S., Döhner H., Lichter P. (1998) Minimal Sizes of Deletions Detected by Comparative Genomic Hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 172-175.
- Benzacken B., Lapierre J. M., Siffroi J. P., Chalvon A., Tachdjian G. (1998) Identification and characterization of a *de novo* partial trisomy 10p by comparative genomic hybridization (CGH). *Clin Genet* 54: 334-340.
- 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. G., Boué A. (1969) : Frequency of chromosomal aberrations in spontaneous human abortions. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 269(2): 283-288.
- Boué J., Boué A. (1973) : Anomales chromosomiques dans les avortements spontanés, in *Les Accidents Chromosomiques de la Reproduction*, edited by Boué A. Thibault C., Paris, INSERM.
- Boué J., Boué A., Lazar P. (1975) Retrospective and Prospective Epidemiological Studies of 1500 Karyotypes Spontaneous Human Abortions. *Teratology* 12: 11-26.
- Brackertz M. (1983) Zur Genetik der Blasenmolen. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* 43: 461-468.
- Brajenovic-Milic B., Petrovic O., Krasevic M., Ristic S., Kapovic M. (1998) Chromosomal Anomalities in Abnormal Human Pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 13: 187-191.

Byrne J. L. B., Ward K. (1994) Genetic Factors in Recurrent Abortion. *Clin Obstet Gynecol* 37(3): 693-704.

Carlock L., Wisniewski D., Lorincz M., Pandrangi A., Vo T. (1992): An estimate of the number of genes in the Huntington disease gene region and the identification of 13 transcripts in the 4p16.3 segment. *Genomics* 13(4): 1108-1118.

Christiaens G. C. M. L., Vissers J., Poddighe P. J., de Pater J. M. (2000) Comparative Genomic Hybridization for Cytogenetic Evaluation of Stillbirth. *Obstet Gynecol* 96: 281-286.

Clarke C. A., Mittwoch U. (1995): Changes in the male to female ratio at different stages of life. *Brit J Obstet Gynaecol* 102: 677-679

Clifford K., Rai R., Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Human Reprod* 1997; 12 no.2: 387-389.

Cowchock F. S., Gibas Z., Jackson L. G. (1993) Chromosome errors as a cause of spontaneous abortion: the relative importance of maternal age and obstetric history. *Fertility and Sterility* 59: 1011-1014.

Creasy M. R., Crolla J. A., Alberman E. D. (1976) A Cytogenetic Study of Human Spontaneous Abortions Using Banding Techniques. *Hum. Genet.* 31: 177-196.

Creasy M. R., Crolla J. A., Alberman E. D. (1976): A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. *Hum Genet* 31(2): 177-196.

Daniely M., Barkai G., Goldman B., Aviram-Goldring A. (1999b) Structural unbalanced chromosome rearrangements resolved by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 86: 51-55.

Daniely M., Aviram-Goldring A., Barkai G., Goldman B. (1998) Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 13(4): 805-809.

Daniely M., Barkai G., Goldman B., Aviram-Goldring A. (1999) Detection of Numerical Chromosome Aberrations by Comparative Genomic Hybridization. *Prenat. Diagn.* 19: 100-104.

Dejmek J., Voijtassák J., Malová J. (1992). Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol* 46: 129-136.

Delhanty J. D. (1997) Chromosome analysis by FISH in human preimplantation genetics. *Hum Reprod* 12: 153-155.

Delhanty J. D., Harper J. C. (2000) Preimplantation genetic diagnosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14: 691-708.

Delhanty J. D., Harper J. C., Ao A., Handyside A. H., Winston R. M. (1997) Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 99: 755-760.

Dotan A., Avivi L. (1986) Increased spindle resistance to antimicrotubule agents in women of high risk for meiotic nondisjunction. *Hum Genet.* 73 (3): 199-204.

Du Manoir S., Schröck E., Bentz M., Speicher M. R., Joos S., Ried T., Lichter P., Cremer T. (1995) Quantitative Analysis of Comparative Genomic Hybridization. *Cytometry* 19: 27-41.

Du Manoir S., Speicher M. R., Joos S., Schröck E., Popp S., Dohner H., Kovacs G., Robert-Nicoud M., Lichter P., Cremer T. (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet*; 90: 590-610

Dunn T. M., Grunfeld L., Kardon N. B. (2001) Trisomy 1 in a clinically recognized IVF pregnancy. *Am J Med Genet* 99: 152-153.

Edmonds D. K., Lindsay K. S., Williamson E., Wood P. J. (1982) Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* 38: 447-453.

Eiben B., Bartels I., Bähr-Porsch S., Borgmann S., Gatz G., Gellert G., Goebel R., Hammans W., Hentemann M., Osmers R., Rauskolb R., Hansmann I. (1990) Cytogenetic Analysis of 750 Spontaneous Abortions with the Direct-Preparation Method of Chorionic Villi and Its Implications for Studying Genetic Causes of Pregnancy Wastage. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 656-663.

Eiben B., Hammans W., Goebel R. (1996) Triploidy, imprinting, and hCG levels in maternal serum screening. *Prenat. Diagn.* 16: 377-378.

Erdel M., Duba H.-C., Verdorfer I., Lingenhel A., Geiger R., Gutenberger K.-H., Ludescher E., Utermann B., Utermann G. (1997) Comparative genomic hybridization reveals a partial de novo trisomy 6q23-qter in an infant with congenital malformations: delineation of the phenotype. *Hum Genet* 99: 596-601.

Fantel A. G., Shepard T. H., Vadheim-Roth C. et al. (1980) Embryonic and fetal phenotypes: prevalence and other associated factors in a large study of spontaneous abortions. In: Porter I. M., Hook E. B., eds. *Human embryonic and fetal death*. New York: Academic Press, 71-87.

Fisher J. M., Harvey J. F., Lindenbaum R. H., Boyd P. A., Jacobs P. A. (1993) Molecular Studies of Trisomy 18. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 1139-1144.

Ford J. H. (1984) Spindle microtubular dysfunction in mothers of Down syndrome children. *Hum Genet.* 68 (4): 295-8.

- Ford J. H., Wilkin H. Z., McCarthy C., McCarthy T. (1996) A 13-Year Cytogenetic Study of Spontaneous Abortion: Clinical Applications of Testing. *Aust. NZ J Obstet Gynaecol* 36: 3: 314-318.
- Forozan F., Karhu R., Kononen J., Kallioniemi A., Kallioniemi O.-P. (1997) Genome screening by comparative genomic hybridization. *TIG* 13 (10): 405-409.
- Frech F. E., Bierman J. M. (1962) Probabilities of Fetal Mortality. *Public Health Reports* 77: 835-847.
- Fritz B., Greber-Platzer S., Frischer T., Streubel B., Gröblacher J., Amann G., Ventruba P., Rehder H., Fronatsch C. (2000) Familiar Cryptic Translocation With der 4q34 qter and dup 12pter p13 in Sibs With Tracheal Stenosis: Clinical, Classical and Molecular Cytogenetic Studies and CGH Analysis From Archival Placental Tissues Evidencing Tertiary Trisomy 4 in One Abortion Specimen. *Am. J. Med. Genet.* 94: 271-280.
- Gadow E. C., Lippold S., Otano L., Serafin E., Scarpati R., Matayoshi T. (1991) Chromosome rearrangements among couples with pregnancy losses and other adverse reproductive outcomes. *Am Med Genet* 41: 279-281.
- Gaillard D. A., Paradis P., Lallemand A. V., Vernet V. M., Carquin J. S., Chippaux C. G., Visseaux-Coletto B. J. (1993) Spontaneous abortions during the second trimester of gestation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117(10): 1022-1026.
- Garbó S., Bajnóczky K. (1992) Cytogenetic analysis of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol* 47: 117-120.
- Gardo S. (1993) Spontaneous abortion and genetic natural selection. *Orv Hetil* 134: 1459-1464.
- Geisler M., Kleinebrecht J. (1978) Cytogenetic and Histologic Analyses of Spontaneous Abortions. *Hum. Genet.* 45: 239-251.
- Genest D. R., Roberts D., Boyd T., Bieber F. R. (1995): Fetoplacental History as a Predictor of Karyotype: A Controlled Study of Spontaneous First Trimester Abortions. *Hum Pathol* 26(2): 201-209.
- Göcke H., Schwanzitz G., Muradow I., Zerres K. (1985) Pathomorphologie und Genetik in der Frühschwangerschaft. *Pathologie* 6: 249-259.
- Griffin D. K. (1996) The Incidence, Origin, and Etiology of Aneuploidy. *International Review of Cytology* 167: 263-294.
- Griffin D. K., Handyside A. H., Penketh R. J. A., Winston R. M. L., Delhanty J. D. A. (1991): Fluorescent in situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Hum Reprod* 6: 101-105.

Griffin D. K., Wilton L. J., Handyside A. H., Winston R. M. L., Delhanty J. D. A. (1992): Dual Fluorescent in situ hybridisation for the simultaneous detection of X and Y chromosome specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum Genet* 89: 18-82.

Griffith D. K. (1996) The incidence, origin and etiology of aneuploidy. *Int Rev Cytology* 167: 263-296.

Gueneri S., Bettio D., Simoni G., Brambati B., Lanzani A., Fraccaro M. (1987) Prevalence and distribution of chromosome abnormalities in a sample of first trimester internal abortions. *Human Reproduction*, 2: 735-739.

Handyside A. H., Robinson M. D., Simpson R. J., Omar M. B., Shaw M. A., Grundzinskas J. G., Rutherford A. (2004): Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod.* 10(10): 767-772.

Hansmann I., Bartels I., Schübbe I. (1986) Cytogenetic analysis of early human abortuses after preparation of chromosomes directly from chorionic villi. *Hum Genet* 72: 189.

Hassold T. J., Pettay D., Freeman S. B., Grantham M., Takaesu N. (1991) Molecular studies of non-disjunction in trisomy 16. *J Med Genet* 28: 159-162.

Hassold T. J., Sherman S. L., Pettay D., Page d. C. (1991) XY Chromosome Nondisjunction in Man is Associated with Diminished Recombination in the Pseudoautosomal Region. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 253-260.

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. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28: 167-175.

Hassold T., Chen N., Funkhouser J., Jooss T., Manuel B., Matsuura J., Matsuyama A., Wilson C., Yamane J. A., Jacobs P. A. (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann. Hum. Genet. Lond.* 44: 151-178.

Hassold T., Chiu D. (1985) Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 70: 11-17.

Hassold T., Jacobs P. A., Leppert M., Sheldon M. (1987) Cytogenetic and molecular studies of trisomy 13. *J. Med. Genet.* 24: 725-732.

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.

Hawley R. S., Frazier J. A., Rasooly R. (1994) Separation anxiety: the etiology of nondisjunction in flies and people. *Hum Mol Genet* 3: 1521-1528.

Hecht F., Hecht B. K., Berger C. S. (1984) Aneuploidy in recurrent spontaneous aborters: the tendency to parental nondisjunction. *Clin Genet.* 26 (1): 43-45.

Hemminki A., Tomlinson J., Markie D., Järvinen H., Sistonen P., Björkqvist A.-M., Knuutila S., Salovaara R., Bodmer W., Shibata D., de la Chapelle A., Aaltonen L. A. (1997) Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nature genetics* 15: 87-90.

Hinney B. Habituelle Abortneigung. *Gynäkologe* 2001; 34: 339-356.

Horn L.-C., Rosenkranz M., Bilek K. (1990) Genetische Aspekte bei frühen Spontanaborten. *Zent. bl. Gynäkol.* 112: 123-133.

ISCN (1995) International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Karger Verlag Basel.

Isola J., De Vries S., Chu L., Ghazvini S., Waldman F. (1994) Analysis of Changes in DNA Sequence Copy Number by Comparative Genomic Hybridization an Archival Paraffin-Embedded Tumor Samples. *Am J Pathol* 145: 1301-1308.

Jacobs P. A. (1992) The chromosome complement of human gametes. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 14: 48-72.

Jacobs P. A., Angell R. R., Buchanan I. M., Hassold T. J., Matsuyama A. M., Manuel B. (1978) The origin of human triploids. *Ann. Hum Genet.* 42: 49-57.

Jamieson M. E., Coutts J., Connor J. (1994) : The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod* 9: 709-715.

Jiang B., Mendelson C. R. (2003) USF1 and USF2 Mediate Inhibition of Human Trophoblast Differentiation and CYP19 Gene Expression by Mash-2 and Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, Sept. 2003, p. 6117-6128.

Jiang B., Mendelson C. R. (2003): USF1 and USF2 Mediate Inhibition of Human Trophoblast Differentiation and CYP19 Gene Expression by Mash-2 and Hypoxia. *Mol Cell Biol* 23: 6117-6128.

Joos S., Scharthan H., Speicher M. R., Schlegel J., Cremer T., Lichter P (1993) Detection of amplified genomic sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet* 90: 584-589.

Juberg R. C., Klops J., Mowrey P. N. (1985) Increased frequency of lymphocytic mitotic non-disjunction in recurrent spontaneous aborters. *J Med Genet.* 22 (1): 32-5.

Kajii T., Niikawa N., Takahara H., Ohama K., Avirachan S. (1980) Anatomic and Chromosomal Anomalies in 639 Spontaneous Abortuses. *Hum. Genet.* 55: 87-98.

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 O.-P., Kallioniemi A., Piper J., Isola J., Waldman F. M., Gray J. W., 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. K., Langlois S., Robinson W. P., Telenius A. Bernanrd L., Barrett I. J., Howard-Peebles P. N., Wilson R. D. (1996) Trisomy 7 CVS Mosaicism: Pregnancy Outcome, Placental and DNA Analysis in 14 Cases. *Am J Med Genet* 65: 348-352.

Kalousek D. K., Pantzar T., Tsai M., Paradise B. (1993) Early Spontaneous Abortion: Morphologic and Karyotypic Findings in 3,912 Cases. *Birth Defects: Original Article Series*, 29 (1): 53-61.

Kline J., Stein Z. (1987) Epidemiology of chromosomal anomalies in spontaneous abortion: In: Bennet MJ, Edmonds DK (eds), *Prevalence, manifestation and determinats*, Oxford, Blackwell Scientific Publisher, pp 29-50.

Kotzot D., Balmer D., Balmer A. (2000) Maternal uniparental disomy 7 - review and further delineation of the phenotype. *Eur J Pediatr* 159: 247-256.

Kupke K. G., Müller U. (1989) Parental Origin of the Extra Chromosome in Trisomy 18. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 599-605.

Kupke K. G., Müller U. (1989): Parental Origin of the Extra Chromosome in Trisomy 18. *Am J Hum Genet* 45: 599-605.

Lapierre J. M., Cacheux V., Collot N., Da Silva F., Hervy N., Rivet D., Romana S., Wiss J., Benzaken B., Aurias A., Tachdjian G. (1998): Comparison of comparative genomic hybridization with conventional karyotype and classical fluorescence in situ hybridization for prenatal and postnatal diagnosis of unbalanced chromosome abnormalities. *Ann Génét*, 41(3): 133-140.

Lauritsen J. G. (1976) Aetiology of Spontaneous Abortion. A Cytogenetic and Epidemiological Study of 288 Abortuses and Their Parents. *Acta Obstet Gynecol Scandinavia, Suppl* 52: 2-29.

Levy B., Gershin I. F., Desnick R. J., Babu A., Gelb B. D., Hirschhorn K. Cotter P. D. (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 T. C. (1998) Recurrent miscarriage: principles of managment. *Hum Reprod* 13: 478-482.

Lomax B., Tang S., Separovic E., Phillips D., Hillard E., Thomson T., Kalousek D. K. (2000) Comparative Genomic Hybridization in Combination with Flow Cytometry Improves Result of Cytogenetic Analysis of Spontaneous Abortions. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1516-1521.

Lomax B., Tang S., Separovic E., Philips D., Hillard E., Thomson T., Kalousek D. K. (2000): Comparative Genomic Hybridization in Combination with Flow Cytometry Improves Results of Cytogenetic Analysis of Spontaneous Abortions. *Am J Hum Genet* 66: 1516-1321.

Lorda-Sanchez I., Binkert F., Maechler M., Robinson W. P., Schinzel A. A. (1992) Reduced recombination and paternal age effect in Klinefelter syndrome. *Hum Genet* 89: 524-530.

Lottspeich F., Zorbas H. (1998): *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, S. 842.

MacDonald M., Hassold T., Harvey J., Wang L. H., Morton N. E., Jacobs P. (1994) The origin of 47, XXY and 47, XXX aneuploidy: heterogenetic mechanisms and role of aberrant recombination. *Hum Mol Genet* 3 (8): 1365-1371.

Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1989): *Molekular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Martius G. aus: Martius G., Breckwoldt M., Pfleiderer A. (1996) *Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, pp 175-178.

McFadden D. E., Kwong L. C., Yam I. Y. L., Langlois S. (1993) Parental origin of triploidy in human fetuses: evidence for genomic imprinting. *Hum Genet* 92: 465-469.

McFadden D. E., Kwong L. C., Yam I. Y.L., Langlois S. (1993) Parental origin of triploidy in human fetuses: evidence for genomic imprinting. *Hum Genet* 92: 465-469.

Menasha J., Levy B., Hirschhorn K., Kardon N. (2005) Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: New insights from a 12-year study. *Genet Med*, 7 (4): 251-263.

Meulenbroek G. H. M., Geraedts P.M. (1982) Parental Origin of Chromosome Abnormalities in Spontaneous Abortions. *Hum Genet* 62: 129-133.

Mikkelsen M., Stene J. (1981) European collaborative study on recurrence risk of chromosomal aberrations. Prenatal diagnosis data. 6th Int Congr human Genet. Jerusalem.

Miller J. F., Williamson E., Glue J., Gordon Y. B., Grudzinskas J. G., Sykes A. (1980) Fetal loss after implantation. *Lancet* II 554-556.

Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16: 1215.

Minguillon C., Eiben B., Porsch-Bähr S., Vogel M., Hansmann I. (1989) The predictive value of chorionic villus histology for identification chromosomally normal and abnormal spontaneous abortions. *Hum Gent* 82: 373-376.

Mittwoch U. (1996): Differential implantation rates and variations in the sex ratio. *Hum Reprod.* 11(1): 8-9.

Monk M (1988) Genomic imprinting. *Genes Dev* 2: 921-925.

Munné S., Grifo J., Cohen J., Weier H. (1994) Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. *Am J Hum Genet* 55: 150-159.

Munné S., Grifo J., Cohen J., Weier H.-U. G. (1994) Chromosome Abnormalities in Human Arrested Preimplantation Embryos: A Multiple-Probe FISH Study. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 150-159.

Munné S., Magli C., Bahce M., Fung J., Legator M., Morrison L., Cohert J., Gianaroli L. (1998) Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn* 18: 1459-1466.

Munné S., Sandalinas M., Escudero T., Velilla E., Walmsley R., Sadowy S., Cohen J., Sable D. (2003) Improved implantaion after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 7(1) : 91-7.

Munné S., Sandalinas M., Magli C., Gianaroli L., Cohen J., Warburton D. (2004) Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diag* 2004; 24: 638-643.

Müntefering H., Dallenbach-Hellweg G., Ratschek M. (1988) Pathologisch-anatomische Befunde bei der gestörten Frühschwangerschaft. *Gynäkologe* 21: 262-272.

Münterer H., Schmidt C., Geisler M. (1987) Korrelation zwischen morphologischen und zytogenetischen Befunden an der Chorionzotte. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 71, 454.

Nacheva E. P., Grace C. D., Bittner M., Ledbetter D. H., Jenkins R. B., Green A. R. (1998) Comparative Genomic Hybridization: A Comparison with Molecular and Cytogenetic Analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 100: 93-105.

Nasmyth K. (2001) Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Gent.* 35 : 673-745.

Neuber M., Rehder H., Zuther C., Lettau R., Schwinger E. (1993) Polyploidies in abortion material decrease with maternal age. *Hum Genet* 91: 563-566.

Nöthen m. M., Eggermann T., Erdmann J., Eiben B., Hofmann D., Propping P., Schwanitz G. (1993) Retrospective study of the parental origin of the extra chromosome in trisomy 18 (Edwards syndrome). *Hum Genet* 92: 347-349.

Nybo Andersen A.-M., Wohlfahrt J., Christens P., Olsen J., Melbye M. (2000) Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 320: 1708-1712.

Ohama K., Kajii T., Okamoto E., Fukuda Y., Imaizumi K., Tsukahara M., Kobayashi K., Hagiwara K. (1981) Dispermic origin of XY hydatiform moles. *Nature* 292: 551-552.

Ohlsson R. (1989) Growth factors, protooncogenes and human placental development. *Cell Differentiation and Development*, 28. 1-16.

Ohno M., Maeda T., Matsunobu A. (1991) A Cytogenetic Study of Spontaneous Abortions With Direct Analysis of Chorionic Villi. *Obstet Gynaecol* 77: 394-398.

Parente F., Gaudray P., Carle G. F., Turc-Carel C. (1997) Experimental assessment of the detection limit of genomic amplification by comparative genomic hybridization CGH. *Cytogenet Cell Genet* 78: 65-68.

Pauer H.-U., von Beust G., Bartels I. (1999) Zytogenetische Ursachen von Aborten. *Reproduktionsmedizin* (1999) 15: 124-132, Springer Verlag.

Pellestor F. (1991) Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. *Hum Genet* 86: 283-288.

Pellestor. F., Quennesson I., Coignet L., Girardet A., Andréo B., Charlieu J. P. (1996) : Direct detection of disomy in human sperm by the PRINS technique. *Hum Genet* 97: 21-25.

Persutte W. H., Lenke R. R. (1995) Failure of amniotic-fluid-cell growth: is it related to fetal aneuploidy? *Lancet* 345: 96-97.

Pinkel D., Seagraves R., Sudar D., Clark S., Poole I., Kowbel D., Collins C., Kuo W.-L., Chen C., Zhei Y., Dairkee S. H., Ljung B.-M., Gray J. W., Albertson D. G. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature genetics* 20: 207-211.

Piper J., Rutovitz D., Sudar D., Kallioniemi A., Kallioniemi O-P., Waldman F. M., Gray J. W., Pinkel D. (1995) Computer Image Analysis of Comparative Genomic Hybridization. *Cytometry* 19: 10-26.

Poland B. J., Miller J. R., Jones D. C., Trimble B. K. (1977) Reproductive counseling in patients who have had a spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 127: 685-691.

- Rehder H., Coerdt 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: 377-385.
- Reid R., Sepulveda W., Kyle P. M., Davies G. (1996) Amniotic Fluid Culture Failure: Clinical Significance and Association With Aneuploidy. *Obstet Gynecol* 87: 588-592.
- Roberts C. J., Lowe C. R. (1975) Where have all the conceptions gone? *Lancet* 1: 498-499.
- Röckelein G., Ulmer R., Schröder J. (1989) Korrelation von Karyotyp und Plazentamorphologie beim Frühabort. *Pathologie* 10: 306-314.
- Rommens J. M., Lin B., Hutchinson G. B., Andrew S. E., Goldberg Y. P., Graves M. L., Graham R., Lai V., McArthur J., Nasir J. (1993): A transcription map of the region containing the Huntington disease gene. *Hum Mol Genet* 2(7): 901-907.
- Rudak E., Jacobs P. A., Yanagimachi R. (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274: 911-913.
- Sachs E. S., Jahoda M. G., Los F. J., Pijpers L., Wladimiroff J. W. (1990) Trisomy 21 mosaicism in gonads with unexpected high recurrence risk. *Am J Med Genet (Suppl)* 7: 186-188.
- Sánchez J. M., Franzi L., Collia F., De Díaz S., Panal M., Dubner M. (1999) Cytogenetic Study of Spontaneous Abortions by Transabdominal Villus Sampling and Direct Analysis of Villi. *Prenat. Diag.* 19: 601-603.
- Sanford Hanna J., Shires P., Matile G. (1997) Trisomy 1 in a Clinically Recognized Pregnancy. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 98.
- Schaeffer A. J., Chung J., Heretis K., Wong A., Ledbetter D. H., Martin C. L. (2004): Comparative Genomic Hybridization-Array Analysis Enhances the Detection of Aneuploidies and Submicroscopic Imbalances in Spontaneous Miscarriages. *Am J Hum Genet* 74: 1168-1174.
- Scheer C. (1996): Der Frühabort – Korrelation zwischen zytogenetischen, morphologischen und klinischen Befunden. Inaugural-Dissertation. Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg.
- Sherman S. L., Takaesu N., Freeman S. B., Grantham M., Philips C., Blachston R. D., Jacobs P. A., Cockwell A. E., Freeman V., Uchida I., Mikkelsen M., Kurnit D. M., Buraczynska M., Keats B. J. B., Hassold T. J. (1991) Trisomy 21: Association between Reduced Recombination and Nondisjunction. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 608-620.

Simpson J. L., Mills J. L., and the NICHD Diabetes in Early Pregnancy Project (1985) Methodological Problems in Determining Fetal Loss Rates : Relevance to Chorionic Villi Sampling. First Trimester Fetal Diagnosis , edited by M. Fraccaro et al., Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1985.

Simpson J. L., Mills J. L., NICHD Diabetes in Early Pregnancy Project (1985) Methodological Problems in Determining Fetal Loss Rates: Relevance to Chorionic Villi Sampling. First Trimester Fetal Diagnosis, M. Fraccaro (edit), Springer-Verlag, pp 320.

Sobotta, K. (1998): Molekulargenetische Untersuchung zur parentalen Herkunft chromosomaler Aberrationen bei Frühaborten. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg.

Solinas-Toldo S., Lampel S., Stilgenbauer S., Nickolenko J., Benner A., Döhner H., Cremer T., Lichter P. (1997) Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances. Genes, Chromosomes & Cancer 20: 399-407.

Speicher M. R., 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.

Spriggs E. L., Rademaker A. W., Martin R. H. (1996) Aneuploidy in Human Sperm: The Use of Multicolor FISH to Test Various Theories of Nondisjunction. Am. J. Hum. Genet. 58: 356-362.

Stephenson M. D. (1996) Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. Fertil Steril 66: 24-29.

Stirrat G. M. (1990) Recurrent miscarriage: Definition and epidemiology. Lancet 336: 673-675.

Störkel S., Simon R., Brinkschmidt C., Gronwald J., Böcker W. (1996) Komparative genomische Hybridisierung in der Pathologie. Pathologie 17: 189-194.

Strom C. M., Ginsberg N., Applebaum M., Bozorgi N., White M., Caffarelli M., Verlinsky Y. (1992) Analyses of 95 First-Trimester Spontaneous Abortions by Chorionic Villus Sampling and Karyotype. J Ass Reprod Genet 9(5): 458-461.

Surbek D. V., Holzgreve W. aus: Diedreich K., Holzgreve W., Jonat W., Schneider K.-T. M., Weiss J. M. (2000) Gynäkologie und Geburtshilfe, Springer Verlag, pp 365.

Surti U., Szulman A. E., O'Brien S. O. (1979) Complete (Classic) Hydatiform Mole with 46, XY Karyotype of Paternal Origin. Hum Genet 51: 153-155.

- Takahara H., Ohama K., Fujiwara A. (1977) Cytogenetic study in early spontaneous abortion. *Hiroshima Journal of Medical Sciences* 26(4): 291-296.
- Uchida I. A., Freeman V. C. P. (1985) Triploidy and chromosomes. *Am J Obstet Gynecol* 151: 65-69.
- Van Blerkom J. (1996) The Influence of Intrinsic and Extrinsic Factors on the Development Potential and Chromosomal Normality of the Human Oocyte. *J Soc Gynecol Invest* 3: 3-11.
- Van Heemst D., Heyting C. (2000) Sister chromatid cohesion and recombination in meiosis. *Chromosoma* 109: 10-26.
- Visakorpi T., Kallioniemi A., Syvanen A. C., Hyytinen E. R., Karhu R., Tammela T., Isola J. J., Kallioniemi O.-P. (1995) Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 55(2): 342-347.
- Voullaire L., Slater H., Williamson R., Wilton L. (2000) Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 106: 210-217.
- Wallace D. C., Surti U., Adams C. W., Szulman A. E. (1982) Complete Moles have Paternal Chromosomes but Maternal Mitochondrial DNA. *Hum Genet* 61: 145-147.
- Wang B. B. T., Yu L.-C., Peng W., Falk R. E., Willians J. (1995) Prenatal identification of i(Yp) by molecular cytogenetic analysis. *Prenat diagn* 15: 1115-1119.
- Warburton D., Kline J., Stein Z., Hutzler M., Chin A., Hassold T. (1987) Does the karyotype of a Spontaneous Abortion Predict the Karyotype of a Subsequent Abortion?-Evidence from 273 Women with Two karyotyped Spontaneous Abortions. *Am. J. Hum. Gent.* 41:465-483.
- Warburton D., Stein Z., Kline J., Susser M. (1980) Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: Data from the New York study. Porter IH, Hook EB: *Human embryonic and fetal death*, Academic Press, New York, pp 216-287.
- Wells D., Delhanty J. D. A. (2000) Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol. Hum. Reprod.* 6 (11): 1055-1062.
- Wells D., Escudero T., Levy B., Hirschhorn K., Delhanty J. D., Munne S. (2002) First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil. Steril.* 78 (3):543-549.
- Wieacker P., Jakubiczka S., Volleth m. (2002) *Genetische Aspekte von Aborten*. *Reproduktionsmedizin* 18: 83-87, Springer Verlag 2002

Wilcox A. J., Weinberg C. R., O'Connor J. F., Baird D. D., Schlatterer J. P., Canfield R. E., Armstrong E. G., Nisula B. C. (1988) Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 319: 189-94.

Wintle R. F., Nygaard T. G., Herbrick J. A., Kvaloy K., Cox D. W. (1997): Genetic polymorphism and recombination in the subtelomeric region of chromosome 14q. *Genomics* 40(3): 409-414.

Wolstenholme J., Angell R. R. (2000) Maternal age and trisomy – a unifying mechanism of formation. *Chromosoma* 109: 435-438.

Yu L.-C., Moore D. H., Magrane G., Cronin J., Pinkel D., Lebo R. V., Gray J. W. (1997) Objective Aneuploidy Detection for Fetal and Neonatal Screening Using Comparative Genomic Hybridization (CGH). *Cytometry* 28: 191-197.

Yusuf R. Z., Naeem R. (2004) Cytogenetic Abnormalities in Products of Conception: A Relationship Revisited. *AJRI* 2004; 52: 88-96 Blackwell Munksgaard, 2004.

Zaragoza M. V., Jacobs P. A., James R. S., 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 M. V., Millie E., Redline R. W., Hassold T. J. (1998) Studies of non-disjunction in trisomies 2, 7, 15 and 22: does the parental origin of trisomy influence placental morphology? *J Med Genet* 35: 924-931.

Zaragoza M. V., Surti U., Redline R. W., Millie E., Chakravarte A., Hassold T. J. (2000) Parental Origin and Phenotype of Triploidy in Spontaneous Abortions: Predominance of Diandry and Association with the Partial Hydatiform Mole. *Am J Hum Genet* 66: 1807-1820.

Zhuang Z., Bertheau P., Emmert-Buck M. R., Liotta L. A., Gnarra J., Linehan W. M., Lubensky I. A. (1995) A Microdissection Technique for Archival DNA Analysis of Specific Cell Populations in Lesions < 1 mm in Size. *Am J Pathol* 146: 620-625.

Zwingman T., Erickson R. P., Boyer T., Ao A. (1993): Transcription of the sex-determining region genes *Sry* and *Zfy* in the mouse preimplantation embryo. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 90: 814-817.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Zu meinen akademischen Lehrern gehörten folgende Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg, dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH (Standort Marburg) und der Klinikum Fulda gAG, Lehrkrankenhaus der Philipps-Universität Marburg:

Arnold	Fuhrmann	Kälble
Aumüller	Ganz	Kern
Barth	Gemsa	Kienapfel
Basler	Geus	Kleine
Baum	Göke	Klenk
Beato	Görg	Klose
Behr	Gotzen	Koch
Berger	Gressner	Koolmann
Bien	Griss	Koop
Bohner	Gröne	Krause
Bonzel	Grün	Kretschmer
Czernik	Grzeschik	Kroll
Daut	Haas	Kummer
Dölp	Habermehl	Lang
Doss	Happle	Langohr
Draf	Havemann	Lauer
Effendy	Hertel	Legrum
Engel	Hilgermann	Lennartz
Eschenbach	Höffkes	Lorenz
Fassbinder	Höfken	Maisch
Fehmann	Hoffmann	Manke
Feldmann	Hofmann	Martin
Feuser	Jaspersen	Mennel
Fritz	Joseph	Moll
Fruhstorfer	Kalbfleisch	Moosdorf

Müller	Rothmund	Steininger
Mutters	Rumpf	Steinmetz
Oertel	Schachtschabel	Sturm
Perst	Schäfer	Thomas
Peters	Schmitz-Moormann	Töllner
Pfab	Schüffel	Vohland
Podszus	Schulz	Voigt
Pohlen	Schwarz	von Wichert
Radsak	Seifart	Wallenfang
Rehder	Seitz	Werner
Remschmidt	Seyberth	Westermann
Richter	Slenczka	Westphal
Rogausch	Spätling	
Röhm	Stegmann	

Für meine Ausbildung möchte ich mich bei Ihnen herzlich bedanken.

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Rehder und Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Fritz für die freundliche Überlassung des Themas, die Unterstützung während der Arbeit und ihre vielen Anregungen.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Mann für die tatkräftige Unterstützung in „Computerfragen“, meinen Eltern und Schwiegereltern für Ihre unermüdliche Ermunterung.

Dem Personal des zytogenetischen Labors in Marburg danke ich für die angenehme und familiäre Atmosphäre und die geduldige Anleitung insbesondere durch Frau Dr. Arslan, Frau Kulemburg, Frau Walter, Frau Winter, Frau Lippmann, Frau PD Dr. Fritz, Herrn Balz und Herrn PD Dr. Rieder.