

Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik: Fragiles-X und Fragiles-X assoziiertes Tremor/Ataxie Syndrom

Peter Steinbach, Dieter Gläser

Das Fragile-X Syndrom (OMIM 300624¹), u. a. auch bekannt als Martin-Bell Syndrom und Marker-X Syndrom, ist eine *neuronale Entwicklungsstörung*. Die syndromale X-chromosomale geistige Behinderung tritt auf bei einem unter 4000 Knaben und einem unter 6000 Mädchen. Fragiles-X assoziiertes Tremor/Ataxie Syndrom (FXTAS, OMIM 300623) ist eine *neurodegenerative Erkrankung*. Beide Syndrome werden verursacht durch Veränderungen in dem Gen *FMR1* (OMIM 309550), haben aber fundamental verschiedene pathophysiologische Ursachen.

Einleitung und Definitionen

Die Bezeichnung „**Fragiles-X**“ leitet sich ab von einer spezifischen *chromosomalen* fragilen Stelle (FRAXA), an der das X-Chromosom zu mikroskopisch erkennbaren Chromatidveränderungen neigt, wenn Zellen von Betroffenen *ex vivo* unter geeigneten Bedingungen vermehrt werden. Die zugrundeliegende molekulare Veränderung betrifft das X-chromosomale Gen *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*). Dieses enthält in der nichttranslatierten Region des ersten Exons einen variablen repetitiven Abschnitt mit tandemartig wiederholten CGG-Triplets, der als **CGG-Repeat** bezeichnet wird². Normale *FMR1*-Allele enthalten in unserer Population meistens 29 oder 30 Triplets. Die Abfolge reiner CGGs ist typischerweise an etwa jeder 10. Position durch ein AGG unterbrochen.

Fragiles-X Syndrom

Die charakteristischen Symptome sind intellektuelle Defizite sowie somatische Auffälligkeiten (Große Ohren, langes schmales Gesicht, vorspringende Stirn, vorspringendes eckiges Kinn, hoher Gaumen, Makroorchidie, Mitralklappenprolaps, Sehstörungen) ferner syndromspezifische Entwicklungs- und Verhaltensmerkmale (verzögerte Sprachentwicklung, Impulsivität, Hyperaktivität, soziale Scheu, autistische Zeichen, Krampfanfälle, Hypersensitivität, schnelles repetitives Sprechen, Perseveration, Schlafstörungen). Die Bandbreite des intellektuellen Entwicklungsrückstandes reicht von leichten Lernschwierigkeiten bei normalem IQ bis zu schwergradiger geistiger Behinderung. Knaben sind generell stärker beeinträchtigt als Mädchen, unter denen eine Minderheit ohne erkennbare Abweichungen bleibt.

Die bei weitem häufigste **genetische Ursache** des Fragilen-X Syndroms ist ein **inaktiviertes, aberrant methyliertes *FMR1*-Gen**, dessen CGG-Repeat mindestens 220 – meistens 300 bis 600 – Triplets lang ist („**Vollmutation**“). Die Repeatexpansion allein führt *nicht* zum Fragilen-X Syndrom. Jedoch wird das aufgrund seiner Länge aberrant gefaltete CGG-Repeat in der Regel methyliert. Hierbei handelt es sich um eine *aberrante*, von der Repeatexpansion provozierte DNA-Modifikation. Die Methylierung erstreckt sich über einen großen Abschnitt des X-Chromosoms und ist mit einer Umstrukturierung des Chromatins verbunden. In diesem *aberranten epigenetischen Zustand* ist die Transkription des *FMR1*-Gens mehr oder weniger komplett inhibiert. Repeatexpansion (Mutation) und Hypermethylierung (epigenetische Modifikation) sind räumlich und zeitlich voneinander getrennte Ereignisse (s.

¹ www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/

² „Repeat“ bedeutet Wiederholungssequenz. In der englischen Literatur steht „Repeat“ auch für die einzelne Wiederholungseinheit.

german society of human genetics
www.gfhev.de

Vorsitzender

Prof. Dr. med. André Reis, Erlangen

Stellvertretende Vorsitzende

Prof. Dr. med. Olaf Riess, Tübingen

Prof. Dr. med. Evelin Schröck, Dresden

Schatzmeisterin

Prof. Dr. rer. nat. Iris Bartels, Göttingen

Schriftführerin

Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke,
Lübeck

Wissenschaftlicher Beirat

Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Rappold,
Heidelberg

Prof. Dr. med. Jürgen Kohlhase,
Freiburg

Prof. Dr. med. Michael Speicher, Graz

Prof. Dr. med. Jörg Schmidtke,
Hannover

(Tagungspräsident 2008)

Prof. Dr. med. Klaus Zerres, Aachen
(Tagungspräsident 2009)

Adresse des Vorsitzenden

Institut für Humangenetik
Universität Erlangen-Nürnberg
Schwabachanlage 10
91054 Erlangen
Tel. 0049 (0)9131-85 22318
Fax 0049 (0)9131-85 23232
reis@humgenet.uni-erlangen.de

Geschäftsstelle

Dipl.-Soz. Christine Scholz
Inselkammerstr. 5
82008 München-Unterhaching
Tel. 0049 (0)89-61 45 69 59
Fax 0049 (0)89-55 02 78 56
organisation@gfhev.de

gfh Bankverbindung

Deutsche Apotheker- und Ärztebank
Konto Nr. 0 006 456 030
BLZ 300 606 01
IBAN DE68 3006 0601 0006 4560 30
BIC DAAEEDDD

Vereinsregister München

VR 12341

u.). Die **pathophysiologische** Ursache des Fragilen-X Syndroms ist ein *Verlust* des funktionellen Genproduktes (FMR1-Protein, **FMRP**). Dieser kann auch durch andere *FMR1*-Mutationen verursacht sein. FMRP reguliert die Translation postsynaptischer Proteine in Nervenzellen mit Glutamatrezeptoren, verhindert die bei unregelmäßig hoher synaptischer Aktivität auftretende nachhaltige Internalisation ionotroper Rezeptoren (Langzeitdepression) und fördert den Aufbau stabiler neuronaler Netzwerke (Gedächtnis).

Das vollmutierte *FMR1*-Gen kommt bei betroffenen männlichen Probanden und bei einem Anteil der weiblichen Überträger vor (**Tabelle 1**). Es wurde stets von der Mutter ererbt. Diese kann selbst Trägerin eines vollmutierten *FMR1*-Gens sein. Meistens trägt sie jedoch ein Allel, dessen CGG-Repeat nur 59 bis 200 Triplets aufweist. Eine Repeatverlängerung dieser Größenordnung nennt man **Prämutation**. Der Begriff bezeichnet eine Veränderung des CGG-Repeats, die keine Auswirkung auf die *neuronale* Entwicklung des Trägers hat. *FMR1*-Allele ab 55 Triplets und insbesondere prämutierte Allele werden transkriptional überexprimiert. Sie können zu neurodegenerativen Veränderungen führen und ein **FXTAS** hervorrufen (s. u.). Frauen mit prämutiertem *FMR1*-Allel haben etwa 20 mal häufiger als andere Frauen eine primäre Ovarialinsuffizienz (**POI**), die normalerweise nur bei etwa 1 % aller Frauen auftritt. Prämutierte CGG-Repeats können eine Vorstufe der Vollmutation sein, die zum Fragilen-X Syndrom führt (**Tabelle 2**).

Viele Trägerinnen eines prämutierten *FMR1*-Allels erben dieses nicht von der Mutter sondern von ihrem Vater. Ein männlicher Überträger vererbt sein (prämutiertes) *FMR1*-Gen nie an einen Sohn – weil das *FMR1*-Gen auf dem X-Chromosom liegt – aber an jede Tochter. Anders als bei den Kindern von Überträgerinnen tritt die Vollmutation bei den Töchtern männlicher Überträger nicht auf. Sogar die Töchter von Männern mit vollmutiertem *FMR1*-Gen erben nur ein prämutiertes Allel. Die Expansion zum vollmutierten Krankheitsallel geschieht bei der *mitotischen* Proliferation der diploiden prämeiotischen Oogonien im Ovar von Überträgerinnen, aber niemals bei der Spermatogonien-Vermehrung in den Testes männlicher Überträger. Die aberrante epigenetische Modifikation und die Inaktivierung des vollmutierten *FMR1*-Gens erfolgt erst nach dessen Weitergabe an die nächste Generation, und zwar in den ersten embryonalen Entwicklungswochen (1. Trimenon). Ein maternales oder paternales ererbtes prämutiertes Allel kann aufgrund der mitotischen Instabilität hinreichend langer unmethylierter CGG-Repeats auch *postzygotisch* bis in den Vollmutationsbereich expandieren. Allerdings kommt es dann offensichtlich nicht mehr zu einer *aberranten* Methylierung.

Die Bezeichnung „Prämutation“ besagt nicht, dass das verlängerte Repeat zu irgendeinem zukünftigen Zeitpunkt weiter expandieren wird. Ob ein bestimmtes Allel aus dem Prämutationsbereich zur Vollmutation expandieren kann, lässt sich erst dann sicher sagen, wenn es bereits an einen *betroffenen* Nachkommen weitergegeben wurde. Für die Genetische Beratung relevant ist, ob ein vollmutiertes Allel bereits bei Sohn oder Tochter einer Prämutations-Trägerin auftreten kann. Das kürzeste in über 25 Jahren molekulargenetischer Diagnostik beobachtete Prämutationsallel, das bei der Weitergabe an ein Kind vollständig mutierte, hatte 59 CGGs, deren Folge nicht von einem AGG unterbrochen war. Die Wahrscheinlichkeit, ob eine Überträgerin ein prämutiertes Allel als Vollmutation weitergibt, hängt ab von der Länge des prämutierten Repeats (**Tabelle 2**). Auch bei einer mütterlichen Tripletzahl zwischen 100 und 200 – und selbst bei Überträgerinnen mit vollmutiertem *FMR1*-Allel – kann ein Kind ausnahmsweise entgegen der Erwartung kein vollmutiertes sondern ein prämutiertes Allel erben und frei von Symptomen des fragilen-X Syndroms bleiben.

CGG-Repeats mit 50 bis 58 Triplets werden als **Grauzonenallel** (oder „intermediäres“ Allel) bezeichnet (**Tabelle 1**). Bei einem Grauzonenallel ist eine Expansion zur Vollmutation in der unmittelbar folgenden Generation noch

nie beobachtet worden und demzufolge sehr unwahrscheinlich. Die mitotische Stabilität eines CGG-Repeats wird auch durch die Anzahl und Position von AGG-Unterbrechungen bestimmt, die beim Gentest ermittelt werden kann, um das potentielle Verhalten eines Grauzonenallels besser prognostizieren zu können.

FXTAS

ist eine spätmanifestierende neurodegenerative Störung bei Trägern eines prämutierten *FMR1*-Gens. Bei *FMR1*-Allelen mit 55 bis 200 Triplets ist die Transkriptionsrate zwei- bis achtfach erhöht. Die pathophysiologische Ursache des neuronalen Zelluntergangs ist höchstwahrscheinlich eine Toxizität der überexprimierten *FMR1*-mRNA. Die zelluläre RNA-Menge steigt mit zunehmender Länge des prämutierten Repeats. Wenn Allele mit voll expandiertem CGG-Repeat (≥ 220 Triplets) ausnahmsweise unmethyliert und transkriptionsaktiv bleiben, ist die Transkriptionsrate meistens nicht hoch genug um neurotoxisch zu wirken.

Etwa 80 % aller Betroffenen haben einen Intensionstremor und/oder eine Gangataxie, meistens beide Symptome. Weitere mögliche Krankheitsmerkmale sind vorzeitige Demenz, psychiatrische Störungen, periphere Neuropathie, Parkinsonismus und Dysautonomie (Impotenz, Inkontinenz). Keines der genannten Merkmale ist syndromspezifisch. Das FXTAS überschneidet sich signifikant mit dem cerebellären Subtyp der Multiplen Systematrophie (MSA-C) und mit den spätmanifestierenden Kleinhirntaxien. Das alleinige obligate Merkmal des FXTAS ist ein unmethyliertes, transkriptionsaktives *FMR1*-Gen mit verlängertem CGG-Repeat.

Die Prävalenz bei über 50 Jahre alten Männern liegt vermutlich zwischen 1 auf 3000 und 1 auf 6000. Bei Frauen tritt ein FXTAS viel seltener auf. Unter allen Prämutations-Männern erkranken vermutlich 15 % zwischen dem 50. und 60., 30 % zwischen dem 60. und 70., 50 % zwischen dem 70. und 80. sowie 75 % nach dem 80. Lebensjahr. Über das FXTAS-Risiko von Prämutations-Frauen gibt es keine verlässlichen Angaben. Im Vergleich zu Männern mit normalem CGG-Repeat bekommen etwa doppelt so viele Prämutationsträger einen Intensionstremor und/oder eine Gangataxie, wobei der Tremor typischerweise vor der Ataxie auftritt. Wenn letztere bei FXTAS-Patienten einsetzt, ist das etwa 10 Jahre früher als bei anderen Männern. Demenz kann das früheste FXTAS-Merkmal sein. Wir wissen aber nicht, wo hoch der Anteil aller FXTAS-Patienten ist, die eine Demenz bekommen.

Indikationen

Molekulargenetische Untersuchungen des *FMR1*-Gens werden veranlasst zur Differentialdiagnostik, Anlageträgerdiagnostik und zur Pränataldiagnostik des Fragilen-X Syndroms sowie zur Differentialdiagnostik bei klinischem Verdacht auf FXTAS. Gezielte Anfragen zur Feststellung einer FXTAS-Prädisposition sind bislang selten. Die Anlageträgerdiagnostik in Familien mit Fragilem-X Syndrom beinhaltet unvermeidbar einen prädiktiven FXTAS-Gentest. Dieser unterliegt in Deutschland den „Richtlinien zur prädiktiven genetischen Diagnostik der Bundesärztekammer“ (Deutsches Ärzteblatt 100/19 vom 9. Mai 2003).

Beim **Fragilen-X Syndrom** besteht eine Indikation zur Absicherung der klinischen Verdachtsdiagnose (**Differentialdiagnostik**) in der Regel bei allen Graden einer intellektuellen Leistungsschwäche unbekannter Ursache, unabhängig davon, ob die Familienvorgeschichte des (männlichen oder weiblichen) Patienten auf eine X-chromosomale Vererbung der Beeinträchtigung hinweist. Die Untersuchung ist auch begründet, wenn keine der weiteren, beim Fragilen-X Syndrom häufigen Merkmale offensichtlich sind. Eine Indikation zur **Anlageträgerdiagnostik** ist bei allen potentiellen und

vielen obligaten Überträgerinnen gegeben. Der frühzeitige Nachweis eines Vollmutationsallels bietet Mädchen die Chance einer rechtzeitigen Therapie zur Förderung ihrer intellektuellen Leistungsfähigkeit. Solche Hilfen sind bei den meisten Mädchen notwendig, die ein vollmutiertes *FMR1*-Gen ererbten (**Tabelle 1**). Die Klärung, ob bei der Mutter eines betroffenen Kindes ein vollmutiertes oder prämutiertes *FMR1*-Gen oder bei der Tochter eines männlichen Überträgers ein prämutiertes Allel mit weniger oder mehr als 100 Triplets vorliegt, ist von Bedeutung für die Einschätzung der Wahrscheinlichkeit, mit der das Fragile-X Syndrom bei einem (weiteren) Kind auftritt (Tabelle 2). Bei gesunden Knaben und Männern hat ein Gentest zur Klärung der Anlageträgerschaft für das Fragile-X Syndrom keine Relevanz im Hinblick auf die Familienplanung. Die **pränatale Diagnostik** ist in der Regel nur bei Schwangeren angezeigt, die aus einer Familie mit fragilem X stammen und deren Überträgerschaft (Vollmutation oder Prämutation) nachgewiesen ist. Bei den Trägerinnen eines Grauzonenallels ist eine vorgeburtliche Diagnostik nicht mehr ohne weiteres indiziert.

Eine Indikation zur differentialdiagnostischen Untersuchung des *FMR1*-Gens zum Nachweis oder Ausschluss eines prämutierten CGG-Repeats besteht auch bei allen Männern und Frauen mit klinischen Zeichen eines **FXTAS** wie Intensionstremor, Parkinsonismus und/oder Gangataxie, insbesondere wenn bei deren Enkeln, Nichten oder Neffen eine Lernbehinderung, autistisches Verhalten, geistige Behinderung oder das Fragile-X Syndrom aufgetreten sind. Ein *FMR1*-Prämutationstest ist ferner angezeigt bei Frauen mit vorzeitiger Ovarialinsuffizienz (**POI**) und positiver Familienanamnese einer POI.

Anforderungen

Die grundlegenden Anforderungen, die bei jeder molekulargenetischen Untersuchung im Bereich der Humangenetik zu erfüllen sind, regeln die Richtlinie der Bundesärztekammer vom 23. Nov. 2007, die Akkreditierungsnorm EN ISO15189 sowie nationale Gentechnik-Gesetze. Zu den spezifischen fachkundlichen Voraussetzungen zur Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen des *FMR1*-Gens gehört die Kenntnis aller echten und artefiziellen Resultate, die bei der Untersuchung normaler und betroffener männlicher und weiblicher Individuen auftreten können. Der (fachlich qualifizierte) Laborleiter muss mit dem Phänomen der X-Inaktivierung, der damit verbundenen Methylierung des *FMR1*-Promotors vertraut sein und die Methylierungsmuster kennen, die in untersuchten Zellen (Leukozyten, Chorionzellen, Fruchtwasserzellen) im Normalfall vorliegen. Er muss zwischen der normalen *FMR1*-Methylierung auf inaktiven X-Chromosomen und der aberranten Methylierung vollmutierter Allele unterscheiden und ihm müssen die bei Trägerinnen eines prämutierten oder vollmutierten *FMR1*-Gens zu beobachteten Abweichungen von einer zufälligen X-Inaktivierung vertraut sein.

Methoden zum Nachweis normaler und expandierter *FMR1*-Allele

Um die Untersuchung des *FMR1*-Gens in dem der jeweiligen Fragestellung voll angemessenen Umfang durchführen zu können, muss das Labor technisch in der Lage sein, alle diagnostisch relevanten Expansionen des CGG-Repeats-Gen direkt nachzuweisen oder auszuschließen. Das zuverlässigste Verfahren zum direkten Nachweis und zur Charakterisierung expandierter CGG-Repeats als „normal“, „prämutiert“ oder „vollmutiert“ ist der *genomische Southernblot*. Dieser ist unverzichtbar, wenn das Labor von sich beansprucht, eine vollständige molekulargenetische Diagnostik des Fragilen-X Syndroms durchführen zu können. Weltweit viel häufiger angewendet werden PCR-basierte Nachweisverfahren, allerdings in der Regel als Vortest. Ein genomischer Southernblot erfolgt lediglich dann, wenn bei einem männlichen

Probanden kein PCR-Produkt oder bei einem weiblichen Individuum ein PCR-Signal erhalten wurde, das von nur einem oder von zwei gleich langen normalen CGG-Repeats stammen kann. Bei dieser Vorgehensweise werden unter den Patienten mit vollmutiertem *FMR1*-Allel bis zu 1 % falsch negative Resultate erwartet, und zwar deshalb, weil in der Regel ein somatisches Mosaik aus Zellen mit unterschiedlich stark expandierten oder kontrahierten CGG-Repeats besteht. Darin können auch Zellen mit einem normal großen Repeat enthalten sein, wobei dieses dann bevorzugt oder ausschließlich amplifiziert wird. Auch bei Kontamination der DNA-Probe eines Patienten mit expandiertem CGG-Repeat kann nur ein normales Allel dargestellt werden.

Genomischer Southernblot

Die für den Southernblot benötigte Menge und Qualität an genomischer DNA wird im allgemeinen aus 2 bis 5 ml EDTA-Blut gewonnen, meistens mit der 1988 von Miller et al. eingeführten NaCl-Methode. Qualitativ und quantitativ ungeeignet sind in aller Regel säulenextrahierte DNA-Proben. Der Southernblot ermöglicht den zuverlässigen Nachweis aller prämutierten und vollmutierten CGG-Repeats sowie eine Bestimmung der Methylierung des *FMR1*-Promotors. Das seit 1990 zur direkten Genotypdiagnostik beim Fragilen-X Syndrom eingesetzte und vielfach validisierte Verfahren stellt weiterhin den „goldenen Standard“ dar. Zum Nachweis oder Ausschluß einer Expansion des CGG-Repeats werden pro Test etwa 10 µg intakte (kaum degradierte) **genomische** DNA komplett mit Restriktionsenzym gespalten, wobei Einzelspaltungen mit EcoRI, HindIII oder PstI und Doppelspaltungen mit EcoRI oder HindIII plus einem methylierungssensitivem Enzym (EagI, BssHII) in vielen Labors routinemäßig durchgeführt werden. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt im 0,8 bis 1,2 %igen Agarosegelen in 1 x TBE-Puffer über ca. 18 Stunden bei ca. 3 Volt/cm, und zwar *in Abwesenheit von Ethidiumbromid*. Die Restriktionsfragmente des *FMR1*-Gens mit dem CGG-Repeat werden durch Hybridisierung mit StB12.3¹ oder äquivalenter Sonde, bzw. Ox0.55² (PstI-Fragmente) oder äquivalenter Sonde detektiert. Die EcoRI- und HindIII-Fragmente des normalen *FMR1*-Gens sind etwa 5.2 kb groß, die normalen PstI-Fragmente aber nur etwa 1 kb. Bei den o. g. Doppelspaltungen mit EagI oder BssHII als methylierungssensitives Enzym ist das von der Sonde detektierte normale *FMR1*-Fragment des inaktiven X-Chromosoms ca. 5.2 kb groß während das entsprechende Fragment vom aktiven X nur ca. 2.7 kb lang ist. Werden bei einer weiblichen Person beide Normalfragmente dargestellt, beweist das *keineswegs*, dass zwei verschiedene Normalallele vorliegen und kein expandiertes Allel, sondern lediglich, dass zumindest ein normales Allel in methylierter (inaktiver) und unmethylierter (aktiver) Form vorkommt. Bei Repeatexpansion in den Prä- oder Vollmutationsbereich sind die jeweiligen Genfragmente um mindestens 180 bp, intermediäre Allele mindestens 150 bp größer. Prämutierte und intermediäre Allele werden am besten nach PstI-Einzelspaltung detektiert, weil hier die Auflösung hier besser ist als 30 bp entsprechend 10 Triplets). Im Zweifel (großes Normalallel, Grauzonenallel oder prämutiertes Allel) muss eine Abklärung durch PCR erfolgen. Vollmutierte *FMR1*-Allele sind mindestens 500 bp größer und meistens nicht als Einzelbande sondern als ein Muster mehrerer Banden (**somatisches Mosaik**) dargestellt und fast immer methyliert. Die Methylierung betrifft alle oder nur einen Anteil der Fragmente (**Methylierungsmosaik**). Manchmal besteht ein **Genotypmosaik** mit prämutiertem und vollmutiertem *FMR1*-Allel. Unter der Voraussetzung, dass die Elektrophorese in Abwesenheit interkalierender Ethidiumbromid-Moleküle erfolgte, kennzeichnet ein diffuser mehr oder weniger breiter „Schmier“ ein

¹ Ox1.9, Ox0.55 und Ox0.48 sind äquivalent zu StB12.3 bei EcoRI und HindIII-Spaltung.

² Ox0.48 ist äquivalent zu Ox0.55 bei PstI-Spaltung

mitotisch instabiles unmethyliertes (prä- oder vollmutiertes) Allel. Bei manchen phänotypisch unauffälligen männlichen Überträgern finden sich überwiegend oder ausschließlich *unmethylierte* vollmutierte *FMR1*-Genfragmente, deren Hybridierungssignal als breiter Schmier ausgeprägt ist, sich manchmal über den gesamten Bereich der Repeatlängen ausdehnt und bei erhöhtem Hybridisierungshintergrund nur schwer erkannt wird. Bei bis zu 1 % aller männlichen Patienten detektieren die diagnostischen Sonden kein Restriktionsfragment, weil dem *FMR1*-Gen der entsprechende Abschnitt fehlt. Gelegentlich findet sich bei Vollmutation zusätzlich ein unmethyliertes, Fragment, das infolge Deletion kürzer ist als ein Normalfragment. In weniger als 5 % der somatischen Mosaik findet sich neben mehreren expandierten Fragmenten auch ein Fragment normaler Größe. Bei inkompletter Spaltung, die unbedingt zu vermeiden ist, treten meistens sogenannte **Geisterbanden** auf, deren Muster im Gegensatz zu den Banden expandierter CGG-Repeats typisch ist für das jeweilige Restriktionsenzym.

PCR durch das CGG-Repeat mit flankierenden Primern (CGG-PCR)

Eine zuverlässige Amplifikation des CGG-Repeats aus genomischer DNA erfordert eine leistungsfähige DNA-Polymerase und ein PCR-Protokoll, das die äußerst CG-reichen DNA-Moleküle zuverlässig denaturieren und in allen Zyklen einzelsträngig halten kann. Mehrere CGG-PCR-Protokolle sind allgemein verfügbar. Mit diesen gelingt unter Umständen die Amplifikation von Genfragmenten mit mehr als 100 CGG-Wiederholungen und ihre Darstellung durch Sequenzgelelektrophorese, unter Verwendung radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierter Primer. Aufgrund der Ergebnisse von Ringversuchen kann die Repeatlänge nicht immer auf ein Triplet genau bestimmt werden. Die Ergebnisse verschiedener Laboratorien weichen etwa 4 % vom Referenzwert ab. Es werden kommerzielle PCR-Kits angeboten, mit denen auch vollmutierte CGG-Repeats amplifiziert werden können. Ringversuche haben in den vergangenen Jahren jedoch aufgezeigt, dass dieser Vorteil möglicherweise mit dem Nachteil falsch-positiver Tests erkauft wurde. Die elektrophoretische Mobilität von DNA-Fragmenten mit einer CGG-Wiederholungssequenz unterscheidet sich signifikant von der herkömmlichen „size standards“ gleicher Länge. Deshalb sollen bei der CGG-PCR zusätzlich zur Test-DNA in erster Linie *FMR1*-Allele mit exakt bekannter Tripletzahl (z.B. 30, 40 und 50 CGGs) koamplifiziert und mit aufgetrennt werden.

PCR durch das CGG-Repeat mit drei Primern (tPCR)

Bereits 1996 wurde von Warner et al. (J. Med. Genet. 33:1022-1026) eine Triple-PCR (**tPCR**) Methode beschrieben, mit deren Hilfe expandierte CAG-Repeat Sequenzen *detektiert* werden können, die für eine herkömmliche PCR-Amplifikation zu lang sind. Modifikationen der tPCR werden auch bei der Untersuchung des *FMR1*-Gens angewandt, insbesondere wenn ein Blot zu aufwendig ist, z.B. beim Populationscreening (Tassone et al. 2008) oder in Situationen, in denen nur eine minimale DNA-Menge zur Verfügung steht. Die tPCR kann zwar die Existenz eines expandierten, mit flankierenden Primern nicht amplifizierbaren CGG-Repeats aufzeigen, eine Klassifizierung nach der Repeatlänge (Prämutation oder Vollmutation) ist aber nicht möglich.

MS-PCR

Im Gegensatz zur herkömmlichen CGG-PCR, bei der ein vollmutiertes CGG-Repeat in der Regel nicht detektiert werden kann, wird bei der technisch deutlich schwierigeren methylierungssensitiven PCR (MS-PCR) auch DNA-Methylierung nachgewiesen. Ein relativ gut etabliertes MS-PCR Protokoll (Weinhäusel et al. 2001) amplifiziert genomische DNA, die mit Bisulfit deaminiert wurde. Dabei werden unmethylierte Cytosinreste zu Uracil deaminiert und bei der anschließenden PCR in Thyminreste „umgewandelt“.

Methylierte Cytosine bleiben unverändert. Die PCR der deaminierten DNA erfolgt mit Primern, die so konstruiert sind, dass sie entweder nur an der ursprünglich methylierten oder nur an ursprünglich unmethylierter DNA effektiv binden können, wobei drei verschiedene DNA-Abschnitte simultan getestet werden, nämlich (a) der Promotor des *FMR1*-Gens, (b) das CGG-Repeat des *FMR1*-Gens und (c) ein Kontrollfragment des XIST-Gens. XIST ist - umgekehrt wie der *FMR1*-Promotor - auf dem inaktiven X-Chromosom methyliert und auf dem aktiven X demethyliert. Die PCR an bisulfitbehandelter DNA kann CGG-Repeats mit bis zu etwa 160 Triplets darstellen und Methylierung im *FMR1*-Promotor nachweisen. Bei männlichen Patienten mit methyliertem vollmutierten *FMR1*-Gen wird das vollexpandierte CGG-Repeat nicht dargestellt. Nach positivem Methylierungsnachweis der Promotor-PCR (und nachgewiesener XIST-Methylierung) wird bei differentialdiagnostischer Fragestellung von vielen Untersuchern bereits ein Fragiles-X Syndrom befundet. Bei weiblichen Patienten und potentiellen Überträgerinnen bietet die MS-PCR keine wesentlichen Vorteile, weil hier immer bereits die normale Methylierung des *FMR1*-Promotors auf dem inaktiven X-Chromosom angezeigt wird. Die Raten der falsch-negativen und falsch-positiven Diagnosen nach MS-PCR sind noch nicht genau bekannt. Den Autoren der Leitlinien ist nur ein Fall einer falsch-positiven Diagnose bekannt.

Vorgehensweisen bei der Differentialdiagnostik des Fragilen-X Syndroms

Die differentialdiagnostische Fragestellung impliziert den Auftrag zum Nachweis oder Ausschluß der *FMR1*-Vollmutation bei einem männlichen oder weiblichen Patienten zur Überprüfung einer klinischen Verdachtsdiagnose. Alle hierfür notwendigen Laborergebnisse können einem genomischen Southernblot entnommen werden. Erforderlich ist zumindest eine Einzelspaltung mit HindIII oder EcoRI. Empfohlen wird jedoch eine Doppelspaltung mit methylierungssensitivem Enzym (z.B. EcoRI plus EagI) oder zwei Einzelspaltungen (z.B. EcoRI oder HindIII und PstI). Bei nur gering ausgeprägter Symptomatik und wenn die *FMR1*-Sonde Fragmente im unteren Vollmutationsbereich detektiert (unter 300 CGGs), sollte getestet werden, ob eine *klinisch-relevante* Methylierung des *FMR1*-Promotors besteht. Wurde bei einem betroffenen männlichen oder weiblichen Probanden eine Vollmutation nachgewiesen, ist die Diagnose eines Fragilen-X Syndroms definitiv gesichert. Entsprechendes gilt, wenn die Sonde bei einem Knaben kein *FMR1*-Genfragment detektiert. Wurde bei einem Knaben nur ein normal großes Fragment im Blot detektiert, ist nicht nur eine Vollmutation sondern auch eine Deletion des *FMR1*-Promotors ausgeschlossen, denn alle diagnostischen *FMR1*-Gensonden detektieren Fragmente, die auch den Promotor und die Startstelle der Transkription enthalten. Eine solche Deletion ist die genetische Ursache bei bis zu 1 % aller Fälle eines Fragilen-X Syndroms. Bei Frauen und Mädchen kann eine Promotordeletion oft bei Doppelspaltung mit einem methylierungssensitiven Enzym erkannt werden, weil nur selten genau die Hälfte aller normalen X-Chromosomen inaktiviert ist. Ein mittels Southernblot erhobenes normales Untersuchungsergebnis schließt ein Fragiles-X Chromosom nicht aus, weil nicht alle ursächlichen *FMR1*-Genveränderungen (weniger als 0,1 % aller Fälle) durch diese Methode entdeckt werden. Wir gehen davon aus, dass in hochwertigen Southernblots, die frei sind von breit geschmierten Hintergrundsignalen, alle diagnostisch relevanten Genotypmosaik entdeckt werden.

Eine andere Vorgehensweise beginnt mit einem PCR-Screening. Das Resultat wird als „normal“ befundet, wenn (a) bei einem männlichen Patienten ein normales CGG-Repeat detektiert wurde und (b) bei einer (auffälligen) weiblichen Patientin zwei normale CGG-Repeats verschiedener Länge nachgewiesen wurden. Ein Fragiles-X Syndrom ist aber nicht ausgeschlossen, weil – wie auch beim Southernblot – nicht alle kausalen *FMR1*-Genveränderungen detektiert werden. Ferner gibt es (selten) diagnostisch relevante somatische Mosaik, bei denen die PCR auch dann

genau ein normales Signal ergibt, wenn insgesamt nur wenige Moleküle eines normalen CGG-Repeats vorhanden sind. Wurde mit einer PCR-Methode, bei der vollmutierte Repeats im allgemeinen nicht detektiert werden, bei einem betroffenen Knaben kein Signal erhalten, darf ein abschließender Befund erst dann erstellt werden, wenn das vermutete vollmutierte Allel oder dessen aberrante Methylierung explizit nachgewiesen wurde. Wurde bei einem Mädchen nur ein PCR-Signal erhalten, das von einem oder zwei gleich langen Repeats stammen kann, muss ebenfalls ein adäquater Test zum Nachweis oder Ausschluß eines vollmutierten Allels erfolgen.

Vorgehensweisen bei der Anlageträgerdiagnostik des Fragilen-X Syndroms

Die diagnostische Fragestellung enthält den Auftrag zum Nachweis oder Ausschluß eines prämutierten (oder vollmutierten) *FMR1*-Allels bei einer in der Regel nicht minderjährigen Ratsuchenden ohne klinische Zeichen eines Fragilen-X Syndroms, und zwar weil (a) in ihrer Familie ein Fragiles-X Syndrom definitiv oder möglicherweise aufgetreten ist oder (b) bei ihr und/oder in ihrer Familie eine vorzeitige Ovarialinsuffizienz (POI) aufgetreten ist.

Die diagnostische Vorgehensweise einschließlich der für die Ergebnisinterpretation geltenden Einschränkungen entspricht der bei differentialdiagnostischen Fragestellungen. Im Southernblot wird ein prämutiertes Fragment nach EcoRI- oder HindIII-Einzelspaltung jedoch nicht hinreichend zuverlässig von einem Normalfragment unterschieden und nachgewiesen. Empfohlen wird insbesondere ein **PstI-Blot**. In jedem Fall sollte zur genaueren Abschätzung der Länge des prämutierten CGG-Repeats auch eine PCR erfolgen, und zwar aus zwei Gründen.

- (1) Im Bereich zwischen 59 und 100 Triplets steigt mit zunehmender Repeatlänge das Risiko einer Ratsuchenden, ein Kind mit vollmutiertem Allel zu bekommen (**Tabelle 2**). Die meisten Prämutationen liegen in diesem Längenintervall und sind durch gute PCR-Techniken oft direkt nachweisbar.
- (2) Die Bestimmung der Repeatlänge des normalen Allels mittels PCR erlaubt eine deutlich bessere Abschätzung der Länge eines im PstI-Blot detektierten aber nicht PCR-amplifizierten Prämutationsallels. Ohne einen solchen individuellen Referenzwert wird die Länge des prämutierten Fragmentes (und damit das Risiko der Ratsuchenden) meistens überschätzt.

Prämutierte Allele mit mehr als 130 Triplets zeigen immer eine mehr oder weniger ausgeprägte mitotische Instabilität und erzeugen postzygotisch ein somatisches Mosaik mit sowohl größeren Allelen, deren Länge im Vollmutationsbereich liegen kann, als auch kürzeren Repeats, deren Länge im Normalbereich liegen kann. Die **postzygotisch in den Vollmutationsbereich expandierten Prämutationsallele** werden nach allen bisherigen Beobachtungen nur auf dem inaktiven X-Chromosom der Überträgerin methyliert. Diese *normale* Methylierung des *FMR1*-Gens muss von der durch expandierte CGG-Repeats hervorgerufenen, zum Fragilen-X Syndrom führenden *aberranten* Methylierung unterschieden werden. Dazu muss im Methylierungsblot (z.B. EcoRI + EagI Doppelspaltung) die Test-DNA mit Kontroll-DNA normaler weiblicher Individuen verglichen werden. Bei aberranter Methylierung liegt der Anteil aller methylierten *FMR1*-Allele über dem Anteil aller unmethylierten Allele. Bei ausschließlich normaler Methylierung (Kontrolle) entspricht der Anteil aller methylierten *FMR1*-Allele dem aller unmethylierten Allele, denn jede Zelle enthält genau ein aktives und ein inaktives X-Chromosom. Eine nur durch quantitative Blotanalyse (z.B. mittels Phosphorimager) erkennbare Abweichung ist wahrscheinlich ohne prädiktive Bedeutung. **Postzygotisch in den Normalbereich verkürzte prämutierte Allele** können bei der PCR unter Umständen mit einem zweiten Normalallel verwechselt werden. Im Zweifel (ungewöhnliche Peakhöhen, ungewöhnliche Repeatlängen) muss ein klärender Southernblot erfolgen.

Der Befund eines prämutierten oder vollmutierten Allels bei einer Überträgerin soll – falls aufgrund der individuellen Situation der Ratsuchenden nicht unangemessen – mit Informationen zur Pränataldiagnostik des Fragilen-X Syndroms ergänzt werden.

Die Testung einer Anlageträgerschaft für das Fragile-X Syndrom in betroffenen Familien kann zu einer prädiktiven Diagnostik bezüglich FXTAS führen. Deshalb sollte im Rahmen einer genetischen Beratung vor der Testung auf eine Anlageträgerschaft für das Fragile-X Syndrom auf einen möglichen prädiktiven Charakter bezüglich des Risikos für ein FXTAS hingewiesen werden.

Vorgehensweise bei FXTAS-Gendiagnostik

Das einzige in der überwiegend US-amerikanischen Fachliteratur genannte obligate Merkmal bei FXTAS-Patienten ist ein *FMR1*-Gen mit 55 bis 200 CGG-Wiederholungen. Dieser Repeatlängenbereich ist in amerikanischen Leitlinien – anders als in Europa - der Prämutationsbereich des Fragilen-X Syndroms. Die diagnostische Fragestellung und die Vorgehensweise entspricht somit im Prinzip der einer Anlageträgerdiagnostik beim Fragilen-X Syndrom. Der Auftrag beinhaltet aber keinen Test auf ein (unmethyliertes) CGG-Repeat mit der Länge eines vollmutierten Allels. Die untersuchten Personen sind fast ausschließlich betroffene Männer.

Wenn bei einem männlichen Probanden ein prämutiertes *FMR1*-Repeat gefunden wurde, gilt die klinische Diagnose eines FXTAS als gesichert. Über diese Feststellung hinaus muss bei der Ergebnisinterpretation festgestellt werden, dass der Patient ein Überträger des Fragilen-X Syndroms ist, der ein prämutiertes CGG-Repeat an alle seine Töchter weitergibt, die somit obligate Überträgerinnen des Fragilen-X Syndroms sind.

Abgesehen von der Anlageträgerdiagnostik in Familien mit Fragilem-X Syndrom sind FXTAS-Gentests bei gesunden Personen sehr selten. Bei einem positiven Untersuchungsergebnis stehen zur Zeit nur für Männer prädiktive Informationen zur Verfügung.

Vorgehensweise bei der Pränataldiagnostik des Fragilen-X Syndroms

Die Vollmutation des Fragilen-X Syndroms ist pränatal diagnostizierbar an DNA aus Chorionzotten oder kultivierten Fruchtwasserzellen bei männlichen und weiblichen Föten. Die Indikation ist gegeben, wenn bei der **Mutter** ein *FMR1*-Allel mit vollmutiertem oder prämutiertem CGG-Repeat (mindestens 59 Triplets) nachgewiesen wurde. Die pränatale Untersuchung darf nur in Institutionen erfolgen, die nicht nur ein PCR-basiertes Vorscreening sondern eine vollständige Diagnostik des Fragilen-X Syndroms durchführen.

Zur Beantwortung der diagnostischen Fragestellung (Nachweis oder Ausschluß eines vollmutierten *FMR1*-Gens in der fötalen DNA) sind zwei methodisch voneinander unabhängige Nachweisverfahren zu empfehlen und gegebenenfalls zusätzlich ein Test zum Ausschluß einer den Befund verfälschenden maternalen Kontamination der fötalen DNA-Probe. Der Kontaminationstest ist mindestens dann erforderlich, wenn der Föt einen weiblichen Chromosomensatz hat und beide CGG-Repeats dem der beiden maternalen Allele größtmäßig entsprechen. Der erste Test ist in der Regel eine direkte Untersuchung des CGG-Repeats im Southernblot. In einem zweiten Test sollte mittels CGG-PCR die Weitergabe des normalen mütterlichen *FMR1*-Allels an das erwartete Kind überprüft werden. Bei weiblichem Föten ist auch die Untersuchung der DNA des Vaters sinnvoll, dessen CGG-Repeat die gleiche Länge haben kann wie das normale maternale Allel.

Das von den meisten Labors zur molekulargenetischen Pränataldiagnostik bevorzugte Gewebe sind frisch präparierte Chorionzotten. Das gilt auch beim Fragilen-X Syndrom. Die für eine schnelle und zuverlässige pränatale Diagnostik benötigte Menge an intakter, nicht denaturierter fötaler DNA liegt

bei etwa 25 µg und wird nach Chorionbiopsie unmittelbar aus 25 bis 30 mg mikroskopisch präparierter und von maternalem Gewebe befreiten Chorionzotten gewonnen. In der Plazenta weiblicher Föten ist die X-Inaktivierung normaler *FMR1*-Gene – anders als in Leukozyten – *nicht* verknüpft mit einer Methylierung des Promotors. Jede Methylierung des *FMR1*-Gens in Chorionzotten ist *aberrant*. Ein möglicher Nachteil von Chorionzotten ist aber der relativ späte Zeitpunkt der *aberranten* Methylierung eines vollmutierten *FMR1*-Gens. Gleichwohl ist die Befundinterpretation in dem nicht häufigen Fall eines *unmethylierten* vollmutierten *FMR1*-Gens, das im Prinzip mit einer normalen intellektuellen Entwicklung vereinbar ist, schwierig und sollte nicht ohne eine Überprüfung des Methylierungsstatus nach Amniozentese erfolgen. Die pränatale Diagnostik des Fragilen-X Syndroms aus Fruchtwasserzellen anstelle von Chorionzotten bietet, abgesehen von der Möglichkeit eines zuverlässigeren Methylierungstests, überwiegend Nachteile. Um die für einen Southernblot benötigte fötale DNA gewinnen zu können, müssen Fruchtwasserzellen über Wochen kultiviert werden. Die daraus gewonnene fötale DNA ist aufgrund des relativ hohen Anteils abgestorbener Amniozyten immer in hohem Maße degradiert, so dass für den Blot pro Spur mindestens 20 µg DNA³ eingesetzt werden müssen, um klare spezifische Hybridisierungssignale zu erhalten.

Befund

Ein Befundbericht mit wissenschaftlich fundierter humangenetischer Interpretation (Epikrise) ist wesentlicher Bestandteil der molekulargenetischen Diagnostik. Der Bericht soll klar, zielgerichtet, prägnant, akkurat und glaubhaft sein. Er muss eine vollständige Befundinterpretation enthalten, die an der diagnostischen Fragestellung des Einzelfalles orientiert ist. Beim Fragilen-X Syndrom und beim FXTAS sind Hintergrundinformationen notwendig. Sie müssen korrekt und aktuell sein, sollen sich auf das zum Verständnis des Berichtes erforderliche Maß beschränken und nicht im Vordergrund des Berichtes stehen. Die insgesamt erforderlichen Inhalte eines Befundberichts sind in diversen Leitlinien und Richtlinien vorgeschrieben: Best Practice Guidelines on Reporting in Molecular Genetic Laboratories in Switzerland (Swiss Society of Medical Genetics, www.ssgm.ch); Österreichisches Gentechnikgesetz; Leitlinie zur molekulargenetischen Labordiagnostik (Deutsche Gesellschaft für Humangenetik und Berufsverband Deutscher Humangenetiker 2007); Richtlinie der Bundesärztekammer vom 23. Nov. 2007.

Literatur

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3): 1215.

Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brondum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Vaisanen ML, von-Koskull H, Sherman SL (2003) Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am. J. Hum. Genet.* 72(2): 454-464.

Tassone F, Pan R, Amiri K, Taylor AK, Hagerman PJ (2008) A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (*FMR1*) gene in newborn and high-risk populations. *J. Mol. Diagn.* 10:43-49.

Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR, Brock DJ (1996) A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J. Med. Genet.* 33:1022-1026.

Weinhäusel A; Haas OA (2001) Evaluation of the fragile X (FRAXA) syndrome with methylation-sensitive PCR. *Hum. Genet.* 108(6): 450-458.

³ 20 µg entsprechen dem DNA-Gehalt von etwa 4 Millionen diploiden Zellkernen

Tabelle 1: Genotyp-Phänotyp Beziehungen

Genotyp*	Bezeichnung	Phänotyp
5 bis 49	Normalbereich	Normalpersonen
50 bis 58	Grauzone	Normalpersonen
59 bis 200	Prämutationsbereich	Normale männliche und weibliche Überträger des Fragilen-X Syndroms. Männliche und weibliche FXTAS-Patienten. Etwa 10 % aller Frauen mit primärer Ovarialinsuffizienz
ab 220	Vollmutationsbereich	Männliche und weibliche Patienten mit Fragilem-X Syndrom**. Weibliche und männliche Überträger des Fragilen-X Syndroms***

* Tripletzahl

** Alle Männer und etwa 60 % aller Frauen mit *aberrant* methyliertem inaktiviertem *FMR1*-Gen

*** Alle Frauen mit voll expandiertem, aber nur auf dem inaktiven X Chromosom methyliertem *FMR1*-Gen (*normale* Methylierung). Etwa 40 % aller Frauen mit voll expandiertem und *aberrant* methyliertem *FMR1*-Gen (Methylierung auf dem aktiven X-Chromosom). Alle Männer mit voll expandiertem aber unmethyliertem *FMR1*-Gen.

**Tabelle 2:
 Risiko einer Vollmutation bei Kindern von Überträgerinnen
 (Daten aus Nolin et al. 2003).**

Länge des maternalen Repeats	Risiko (%)	Kinder mit Vollmutation /alle Kinder
59 – 69*	6	7/115
70 – 79	31	28/ 90
80 – 89	58	81/140
90 – 99	80	89/111
100 – 200	99	194/197

* Das kleinste prämutierte Allel, das zur Vollmutation expandierte, hatte 59 reine CGG Wiederholungen.

Verfahren zur Konsensbildung

Diese Leitlinien ersetzen die unter Mitwirkung von Teilnehmern am Ulmer Workshop Fragiles-X Syndrom 2003 erstellten Leitlinien. Sie basieren auf Erfahrungen aus Ringversuchen des Berufsverbandes Medizinische Genetik e. V. und des Berufsverbandes Deutscher Humangenetiker e. V. sowie des European Molecular Genetics Quality Network (EMQN).

Verabschiedung der aktualisierten Version durch:

Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GfH)

Vorsitzender

Prof. Dr. André Reis, Institut für Humangenetik, Universität Erlangen

Berufsverband Deutscher Humangenetiker e.V. (BVDH)

Präsident

Dr. Bernt Schulze, Hannover

Leitlinien-Kommission der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik

Prof. Dr. Manfred Stuhmann-Spangenberg, Hannover (Sprecher), PD. Dr. Thomas Liehr, Jena, PD Dr. Barbara Fritz, Marburg (Delegierte des BVDH), Dr. Dieter Gläser, Neu-Ulm (Delegierter des BVDH)

Anschrift der Verfasser

Prof. Dr. Peter Steinbach

Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum
Parkstr. 11
D-89073 Ulm
(peter.steinbach@uni-ulm.de)

Dr. Dieter Gläser

Genetikum
Wegenerstr. 15
D-89231 Neu-Ulm
(glaeser@genetikum.de)

Erstellungsdatum: Februar 1998

Veröffentlicht: medgen 10 (1998) 40-42

1. Überarbeitung: Oktober 2003 durch Prof. Dr. rer. nat. Peter Steinbach, Dr. Dieter Gläser; veröffentlicht medgen 16 (2004) 351-357

2. Überarbeitung: 10.2.2009 durch Prof. Dr. rer. nat. Peter Steinbach, Dr. Dieter Gläser

Verabschiedung: 11.2.2009 durch den Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik

Überprüfung geplant März 2014

Zitierhinweis: medgen 21 (2009) im Druck