

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. T. Haaf

**Molekulargenetische Diagnostik
von FGFR-/TWIST-Defekten im Verlauf:
eine retrospektive Studie im Zeitraum 2000 – 2004**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Dorothee Kellner
aus Stuttgart

Würzburg, November 2009

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Korreferent: Prof. Dr. med. T. Grimm

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

22.02.2010

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.2 Ziel der Arbeit	2
2. Allgemeine Grundlagen	4
2.1 Klassifizierung der Kraniosynostosen.....	4
2.2 Ätiopathogenese der Kraniosynostosen - ein historischer Überblick	4
2.3 Die Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren	7
2.4 TWIST 1-Mutation.....	9
2.5 FGFR-/TWIST-Defekte	10
2.5.1 Apert-Syndrom.....	10
2.5.2 Crouzon-Syndrom	11
2.5.3 Muenke-Syndrom.....	13
2.5.4 Pfeiffer-Syndrom.....	14
2.5.5 Saethre-Chatzen-Syndrom	16
2.5.6 Achondroplasie.....	18
2.5.7 Hypochondroplasie.....	19
3. Material und Methoden	21
3.1 Patientengut.....	21
3.2 Methoden der molekulargenetischen Diagnostik von Kraniosynostosen	22
3.2.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	22
3.2.2 SSC-Analyse	23
3.2.3 Sequenzanalyse	23
3.2.4 Southern-Blot-Hybridisierung.....	24
3.3 Graphische Darstellung der Patientendaten	24
3.4 MapInfo Professional	24
4. Fallbeispiele.....	25
4.1 Fall 1: Crouzon-Syndrom.....	25
4.2 Fall 2: Muenke-Syndrom.....	26
4.3 Fall 3: Saethre-Chatzen-Syndrom	27

5. Ergebnisse	28
5.1 Überblick aller untersuchter Krankheitsgruppen des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg im Zeitraum 2000-2004	28
5.2 Überblick über die FGFR-/TWIST-Defekte 2000-2004	32
5.3.1 Apert-Syndrom	35
5.3.2 Crouzon-/Pfeiffer-Syndrom.....	36
5.3.3 Muenke-Syndrom	38
5.3.4 Saethre-Chotzen-Syndrom	39
5.3.5 Achondroplasie.....	41
5.3.6 Hypochondroplasie.....	43
5.4 Fünfjahresverlauf.....	45
6. Diskussion.....	47
6.1 Eigene Daten	47
6.2 Mutationsraten als Funktion des Alters – Der „paternal-age-effect“ beim Apert-Syndrom.....	49
6.3 Therapeutische Aspekte der FGFR-/TWIST-Defekte.....	52
6.4 Differentialdiagnostische Aspekte - das Muenke-Syndrom und das Saethre-Chotzen-Syndrom im Vergleich.....	56
6.5 Aspekte der pränatalen Diagnostik der Achondroplasie	58
6.6 Bedeutung der molekulargenetischen Bestätigung / Ausschluss der klinischen Verdachtsdiagnose bei FGFR- bzw- TWIST-Defekten	59
7. Zusammenfassung	60
8. Summary	62
9. Literaturverzeichnis.....	63
Anhang	71
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

Heutzutage sind viele unterschiedliche Erkrankungen und Syndrome bekannt, die auf Mutationen der Fibroblastenwachstums-Rezeptoren oder TWIST1-Gene beruhen.

Die Mehrzahl der klinisch relevanten FGFR-/TWIST-Defekte manifestieren sich als Kraniosynostosen, aber auch die Hypo-, und Achondroplasie gehören, diagnostisch betrachtet, zu Familie der FGFR-Defekte.

Die Kraniosynostosen stellen eine sehr heterogene Krankheitsgruppe dar.

Allen gemeinsam ist ein vorzeitiger Verschluss einzelner oder mehrerer knöchernen Schädelnähte (Suturen).

Ihre Prävalenz beträgt ca. 1 zu 2100-3000 Geburten (HEHR und MUENKE 1999).

Bedingt durch diese vorzeitige Synostierung kommt es zu einer fehlerhaften Entwicklung des Gehirnschädels, aber auch des Gesichtsschädels. Je nach Lokalisation entsteht eine typische Schädeldeformierung (siehe Abbildung 1). Kompensatorisch kommt es zu einem verstärkten Wachstum in Richtung der betroffenen Naht, was schon VIRCHOW 1851 in seiner Virchow'schen Regel zusammenfasste:

„Das Wachstum des Schädels ist senkrecht zur fusionierten Naht gestört und in Verlaufsrichtung derselben überdimensioniert. An den noch offenen Suturen sind kompensatorische Expansionen des Schädels zu beobachten.“

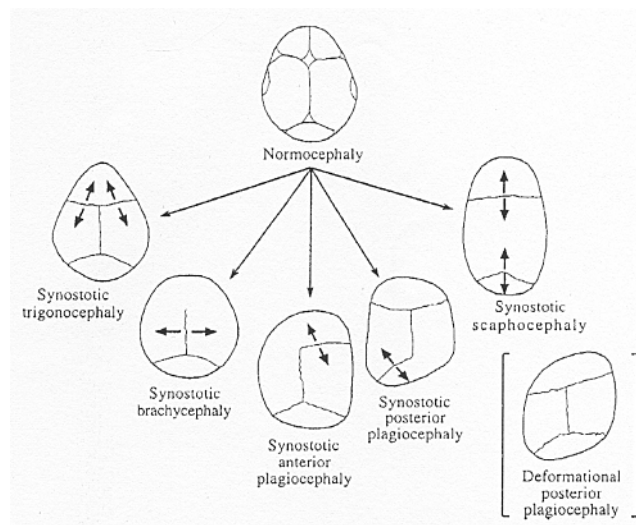


Abb 1: Aus Cohen et al. 2005 – Perspectives on Craniosynostosis

Da es sich bei den FGFR-/TWIST-Defekten um Krankheitsbilder handelt, die nicht nur die körperliche Entwicklung, sondern auch bedeutend die psychische Entwicklung der Kinder beeinflusst, ist es sehr wichtig, dass die Diagnostik auf diesem Gebiet Fortschritte macht. Es ist entscheidend, dass die Patienten frühzeitig diagnostiziert und einer entsprechenden, rechtzeitigen chirurgischen Korrektur zugeführt werden.

1.2 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit betrachtet in einer retrospektiven Studie die Entwicklung der molekulargenetischen Diagnostik von FGFR-/TWIST-Defekten in dem Zeitraum 2000-2004.

Das Institut für Humangenetik der Universität Würzburg gehört zu den führenden diagnostischen Zentren auf dem Gebiet der FGFR-/TWIST-Defekte.

Jährlich werden im Mittel 135 Patienten untersucht.

Dabei beruht der Schwerpunkt auf der Diagnostik des Apert-, Crouzon-, Muenke-, Saethre-Chatzen- und Pfeiffer-Syndroms sowie der Achondroplasie/Hypochondroplasie.

Da die Mehrzahl der klinisch relevanten FGFR-/TWIST-Defekte sich als Kraniosynostosen manifestieren wird in dieser Arbeit auch vorrangig auf diese Krankheitsgruppe eingegangen.

Ziel der Arbeit ist es, herauszufinden, ob innerhalb des Zeitraums 2000-2004 eine Tendenz erkennbar ist, was sowohl die Anzahl der zugesandten Patienten, das Diagnose-spektrum, als auch das Muster der überweisenden Ärzte und Kliniken anbelangt.

Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei der molekulargenetischen Diagnostik der einzelnen Krankheitsbilder.

Dem humangenetischen Institut der Universitätsklinik Würzburg werden aus ganz Europa Patienten zur Diagnostik zugewiesen. So ist es von besonderem Interesse festzustellen, ob sich bei den Einsendern Schwerpunkte erkennen lassen, was die geographische Verteilung der Einsender bzw. der überweisenden Kliniken und Ärzte anbelangt.

Auf aktuelle ätiopathogenetische Ergebnisse soll ebenfalls kurz eingegangen werden.

Exemplarisch werden 3 Familien mit syndromalen Kraniosynostosen vorgestellt.

Einleitung

In der abschließenden Diskussion werden folgende Aspekte der FGFR-/TWIST –Defekte, anhand der neuesten Literatur, dargestellt: Mutationsraten als Funktion des Alters, therapeutische Aspekte der FGFR-/TWIST-Defekte, differentialdiagnostische Aspekte – das Muenke-Syndrom und das Saethre-Chatzen-Syndrom im Vergleich – und pränatale Diagnostik der Achondroplasie.

2. Allgemeine Grundlagen

2.1 Klassifizierung der Kraniosynostosen

Zu unterscheiden sind einfache, isolierte Synostosen von syndromalen Synostosen.

Bei den isolierten Synostosen kann es sowohl zur frühzeitigen Verknöcherung einzelner Suturen kommen, als auch zu komplexeren Formen, bei denen mehrere Schädelnähte betroffen sind.

Die syndromalen Kraniosynostosen sind dadurch gekennzeichnet, dass zu den Synostosen weitere Defekte anderer Körperregionen hinzukommen. So treten vor allem Syndaktylien der Hände und Füße auf. Des Weiteren ist bei den syndromgebundenen Kraniosynostosen nicht nur das Wachstum der Schädelkalotte, sondern auch das des Gesichtsschädels betroffen. Folgen daraus können eine Mittelgesichtshypoplasie, gestörte Entwicklung des Nasenrachenraums und Hypertelorismus sein.

Handelt es sich bei den isolierten Kraniosynostosen meist um Neumutationen so sind bei den syndromalen Formen häufig die ursächlichen und spezifischen Genmutationen bekannt. Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit den bekannten FGFR- und TWIST-Gendefekten und deren molekulargenetischer Diagnostik.

2.2 Ätiopathogenese der Kraniosynostosen - ein historischer Überblick

Die Diagnostik und Einteilung syndromaler Kraniosynostosen erfolgte früher nach klinischen Aspekten. Dies führte jedoch häufig zu Widersprüchen.

In den letzten Jahrzehnten wurde die klinische Einteilung immer mehr durch die Errungenschaften der molekulargenetischen Diagnostik abgelöst (GRIMM und KRESS 1996).

Schon 1906 beschrieb Eugene Apert (1868-1940), ein Pariser Kinderarzt, das später nach ihm benannte Apert-Syndrom, bestehend aus einer kranialen Synostose und Syndaktylien. Im Jahr 1912 beobachtete L. Crouzon (1874-1938), ein Neurologe aus Paris, das gehäufte familiäre Auftreten einer kraniofazialen Dysostose, die jedoch ohne Syndaktylien auftrat.

Dabei handelte es sich um das später nach ihm benannte Crouzon-Syndrom.

Das Saethre-Chatzidakis-Syndrom geht auf die Erstbeschreiber Haakon Saethre, ein Psychiater aus Oslo, und F. Chatzidakis, ein Breslauer Arzt zurück.

1964 beschrieb Rudolf A. Pfeiffer, ein Erlanger Humangenetiker, eine Familie mit Kraniosynostosen und Syndaktilien, die aufgrund der besonders breiten Daumen und Großzehen als eigene Entität definiert wurde.

Seit diesen klinischen Erstbeschreibungen haben sich die Möglichkeiten der molekulargenetischen Diagnostik laufend weiter entwickelt.

Durch so genannte Kopplungsanalysen (engl.: linkage analysis) konnte zum Beispiel in den siebziger und achtziger Jahren der Genort für das Saethre-Chatzidakis-Syndrom auf dem kurzen Arm des Chromosom 7 (BRUETON et al. 1992) lokalisiert werden, für das Crouzon-Syndrom auf dem Chromosom 10q (PRESTON et al. 1994) und für das Pfeiffer-Syndrom wurde der Genort auf dem Chromosom 8 lokalisiert (ROBIN et al. 1994).

Durch molekulargenetische Untersuchungen konnten die verantwortlichen Genmutationen einiger bekannter syndromaler Kraniosynostosen identifiziert werden.

Eine Schlüsselrolle spielen dabei die Mutationen des Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor-Gen 1, -2 und -3 (FGFR 1, 2, 3), welche das Apert-, das Crouzon-, das Pfeiffer- und das Münke-Syndrom verursachen.

(REARDON et al. 1994, MUENKE et al. 1994, WILKIE et al. 1995 a u. b, SCHELL et al. 1995, RUTLAND et al. 1995, LAJEUNIE et al. 1995, WILKIE 1997, MUENKE et al. 1997).

Auch für das Saethre-Chatzidakis-Syndrom konnten HOWARD et al. (1997) und EL GHOUZZI et al. (1997) beweisen, dass die genetische Ursache auf einer Mutation des TWIST 1 Gens beruht. Des Weiteren gelang es HOWARD et al. (1997) sowohl Missense- und Nonsense- Mutationen, als auch Insertionen und Deletionen in betroffenen Patienten zu identifizieren.

Gen	Diagnose	Chromosomen-Lokalisation	OMIM	Referenzen
FGFR 1 (822 AS)	Pfeiffer	8p11.2-12	136350	MUENKE et al. 1994 SCHELL et al. 1995 TARTAGLIA et al. 1997
FGFR 2 (821 AS)	Apert	10q25.3-q26	176943	WILKIE et al. 1995 OLDRIGE et al. 1997
	Crouzon	10q26	176943	REARDON et al. 1994 OLDRIGE et al. 1995 MEYERS et al. 1996 RUTLAND et al. 1995
	Pfeiffer	10q26	176943	RUTLAND et al. 1995 MEYERS et al. 1996
FGFR 3 (806 AS)	Muenke	4p16.3	134934	BELLUS et al. 1996 MUENKE et al. 1997 WILKIE 1997 GRAHAM et al. 1998
	Achondroplasia	4p16	134934	SHIANG et al. 1994 ROUSSEAU et al. 1994
	Hypochondroplasia	4p16.3	146000	PRINOS et al. 1995 BONAVENTURE et al. 1996
TWIST 1	Saethre-Chotzen	7p21	101400	CAI et al. 2003 HOWARD et al. 1997 EL GHOUZZI et al. 1997

Tab. 1 : Überblick über die FGFR-/TWIST Defekte und ihre Genlokalisierungen (OMIM: Online Inheritance in Man)

2.3 Die Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren

Die Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der Tyrosinkinase-rezeptoren, welche ursächlich an der Zellproliferation und Zelldifferenzierung in der Fetalperiode, aber auch an malignen Transformationen beteiligt sind (PLOTNIKOV et al. 1999, SCHWERTFEGER 2009).

Aktuell sind vier FGF-Rezeptoren bekannt. Im Aufbau sind sich alle FGF-Rezeptoren ähnlich (siehe Abbildung 2). Sie bestehen jeweils aus einem extrazellulären, einem transmembranösen und einem intrazellulären Bereich.

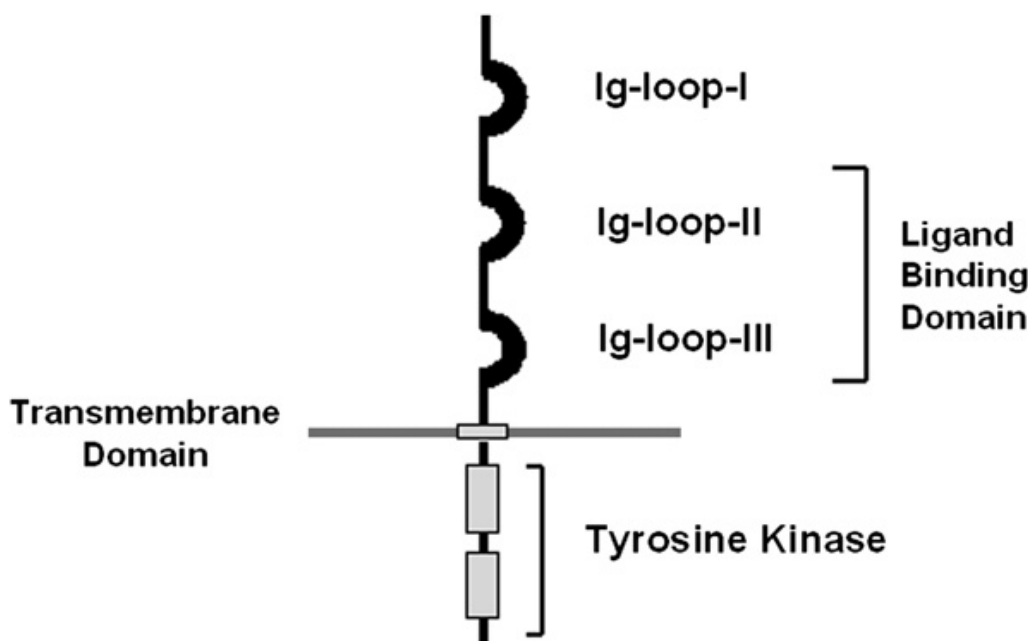


Abb. 2: Aus RICHETTE et al. 2008 – Achondroplasia - From genotype to phenotype

Der extrazelluläre Bereich ist aus mehreren Immunglobulin-ähnlichen Protein-Domänen zusammengesetzt (Ig I-III), wobei Ig II und Ig III für die Ligandenbindung verantwortlich sind.

Zwei Tyrosinkinase-Domänen entsprechen der intrazellulären Region (TKD 1 und TKD 2).

Die transmembranöse Region wiederum besteht aus 20 hydrophoben Aminosäuren (GRIMM u. KRESS 1996, PLOTNIKOV et al. 1999).

Drei verschiedene Regionen der FGF-Rezeptoren können von einer Mutation betroffen sein:

- 1.) der Immunglobulin-ähnliche Bereich I-III,
- 2.) die Transmembranregion
- 3.) die Tyrosinkinase des intrazellulären Bereichs (CUNNINGHAM et al. 2007).

Aktiviert werden die FGF-Rezeptoren durch die Bindung der Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs). Zurzeit sind über 23 FGFs bekannt, diese verfügen über unterschiedliche Affinitäten und Spezifitäten gegenüber den Rezeptoren (NIE et al. 2006).

Die Bindung eines FGFs führt zu einer Liganden-induzierten Dimerisierung des Rezeptors. Dies führt zu einer Aktivierung des Rezeptors und einer Aktivierung einer komplexen Signalkaskade im Inneren der Zelle. FGFs gehören zu einer großen Gruppe von Wachstumsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, der Angiogenese, der Wundheilung, der Schädel- und Extremitätenentwicklung sowie der malignen Transformation spielen (HELDIN 1995, ORNITZ 2001, SCHWERTFEGER 2009).

Auch in der Entwicklung der kraniofazialen Region spielen die FGFs eine wichtige Rolle, insbesondere in der Regulation des Wachstums der Schädelnähte (NIE et al. 2006).

So konnten ZHOU et al. 2000 anhand eines Tiermodells mit Mäusen beobachten, dass Mäuse die die pro250-to-arg-Mutation trugen, welche ortholog zu der FGFR1-Mutation beim Pfeiffer-Syndrom ist, einen deformierten Schädel aufweisen. Es kam bei den Mäusen zu vorzeitigen Verschlüssen der Suturen und zu einer vermehrten Proliferation der Osteoblasten. Das wurde als Hinweis gedeutet, dass es beim Pfeiffer-Syndrom zu einer verstärkten Knochenbildung entlang der Schädelnähte kommt.

DENG et al. 1996 gelang es im Rahmen eines Experiments mit Mäusen zu veranschaulichen, dass der FGF-3-Rezeptor mit verantwortlich für das Längenwachstum der Röhrenknochen ist, und normalerweise eine hemmende Wirkung auf die Chondrozytenproliferation ausübt.

Im Falle einer inaktivierenden Mutation fällt diese negative Wachstumsregulierung weg (DENG et al. 1996).

Der FGF-2-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Extremitätenanlagen sowie beim Aufbau der kraniofazialen Strukturen (MUNKE et al. 1995).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die FGFR-Familie eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Wundheilung und der Angiogenese spielt (WEBSTER et al. 1997). Von Funktionsausfällen dieser wichtigen Genfamilie sind vor allem Schädel- und Skelettsystem betroffen.

2.4 TWIST 1 - Mutation

Das Saethre-Chotzen-Syndrom beruht auf einer autosomal-dominant vererbten loss-of-function Mutation im TWIST-1-Gen, wie HOWARD et al. (1997) und EL GHOUZZI et al. (1997) zeigen. HOWARD et al. (1997) lokalisierten den Gendefekt auf dem Chromosom 7p21. Das TWIST-Gen kodiert für einen „basic helix-loop-helix“-Transkriptionsfaktor, welcher unter anderem Wachstumsfaktoren wie auch der FGFR-Familie vorgeschaltet ist. Dies konnten SHISHIDO et al. (1993) anhand von Studien mit *Drosophila* feststellen. Des Weiteren konnten SOSIC et al. (2003) zeigen, dass die TWIST-Gene eine wichtige Rolle in der Cytokinexpression spielen, indem sie über einen negativen Feedback-Mechanismus die NF-kappaB abhängige Cytokinexpression hemmen. CONNERNEY et al. (2006) wiesen nach, dass das TWIST-1 Gen sowohl eine hemmende als auch eine aktivierende Funktion in der mesenchymalen Zelldifferenzierung hat. Der Pathomechanismus der TWIST-Mutation beruht auf einer Haploinsuffizienz oder sogar einem totalen Funktionsverlust. Es sind mittlerweile über 100 Mutationen des Twist-Gens bekannt, die zum Phänotyp des Saethre-Chotzen-Syndroms führen (CUNNINGHAM et al. 2007).

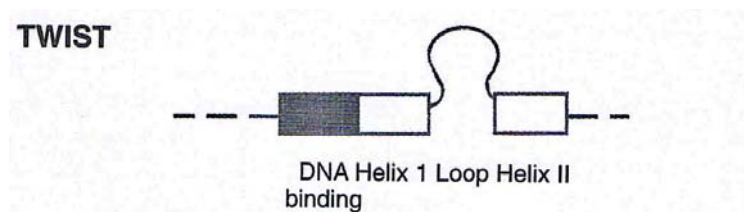


Abb. 3: Aus Siegel, Michael I. (2002): Understanding craniofacial anomalies. The etiopathogenesis of craniosynostoses and facial clefting. Mooney, Mark P. (Hg.). New York: Wiley-Liss.

2.5 FGFR-/TWIST - Defekte

2.5.1 Apert-Syndrom

Schon 1906 wurde dieses Syndrom (auch Akrozephalosyndaktilie genannt) erstmalig von dem französischen Kinderarzt Eugen APERT beschrieben.

Laut BLANK (1960) liegt die Inzidenz bei 1:160.000 Geburten.

Eine Inzidenz von 15,5:1.000.000 Geburten wurde von COHEN et al. (1992) beschrieben.

Obwohl das Syndrom, welches zu den schwerwiegendsten, aber auch zu den variabelsten Formen einer Kraniosynostose gehört, auch autosomal-dominant vererbt werden kann, handelt es sich in den meisten Fällen (98%) um Neumutationen.

Die Mutationen, die dem Apert-Syndrom zu Grunde liegt, befinden sich im FGFR2-Gen (fibroblast growth factor receptor-2) (WILKIE et al. 1995).

WILKIE et al. (1995) beschrieben zwei Mutationen im Exon 7 des FGFR2-Gen. Beide Mutationen Ser252Trp und Pro253Arg führen zu einem Aminosäuren-Austausch an kritischen Stellen des Rezeptor-Moleküls.

Klinisch findet man eine Vielfalt unterschiedlicher Ausprägungen.

Meistens betroffen ist die Koronarnaht, was zu dem charakteristischen Bild eines Turibrachyzephalus führt.

Des Weiteren liegt oft eine Mittelgesichtshypoplasie vor, das Gesicht ist im Profil stark abgeflacht, die Augen treten aus den flachen Orbitae hervor.

Auffällig ist auch der ausgeprägte Hypertelorismus.

Ein wesentliches Merkmal sind die an Händen und Füßen vorkommenden schweren Syndaktylien, mit der Tendenz zu knöcherner Verschmelzung (APERT 1906).

Auch bei den Syndaktilien sind unterschiedliche Ausprägungen bekannt.

Immer betroffen sind der 2.-4.Strahl (UPTON 1991).

Sind alle Finger vollständig miteinander verbunden spricht man von einer so genannten "Löffelhand" (APERT 1906).

Fusionen der Halswirbel (v. a. im Bereich C5-C6) fanden KREIBORG et al. (1992) bei 68% der von Ihnen untersuchten Patienten. Häufig werden auch abnorme Schulter-, Ellenbogen-, Hüft- und Kniegelenke beobachtet.

Unterschiedliche Grade an mentaler Retardierung sind bekannt, aber auch Patienten mit normaler Intelligenz wurden beschrieben (PATTON et al 1988).

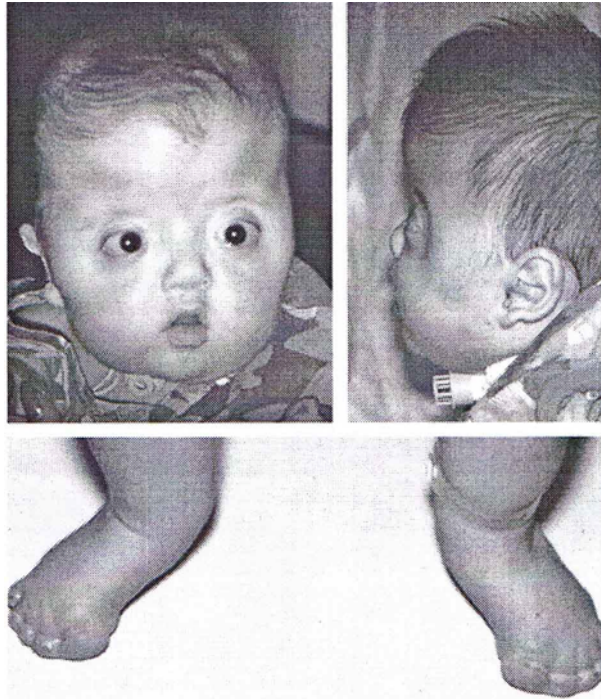


Abb. 4: Apert-Syndrom, aus Cunningham et al. 2007 – Syndromic craniosynostosis – from history to hydrogen bonds

2.5.2 Crouzon-Syndrom

Erstmalig wurde diese Fehlbildung von dem Pariser Neurologen CROUZON (1912) beschrieben. Die Inzidenz, der auch Dysostosis craniofacialis Crouzon genannten Fehlbildung liegt bei 16,5: 1 Mio Geburten (COHEN und KREIBORG 1992), dies entspricht ungefähr 4,8 % aller Kraniosynostosen.

Das Crouzon-Syndrom wird autosomal-dominant vererbt, wie schon von CROUZON im Jahre 1912 bei seinen ersten Beschreibungen erkannt, und von vielen weiteren Autoren später ebenfalls beschrieben (z. B.: SHILLER 1959, FOGH-ANDERSON 1943, FLIPPEN 1950 und DODGE et al. 1959).

Ungefähr 44% - 67% sind familiär bedingt, während Spontanmutationen in 30% - 60% der Fälle auftreten (KREIBORG 1981).

Ursächlich ist wie beim Apert-Syndrom eine Mutation des FGFR2-Gens (REARDON et al. 1994), welches auf dem langen Arm des Chromosoms 10 lokalisiert ist (MATTEI et al. 1991).

Klinisch zeichnet sich das Crouzon-Syndrom ebenfalls durch eine hohe phänotypische Variabilität aus. Deutlich wird dies vor allem durch die unterschiedlichen Schädelformen. Am häufigsten beobachtet man eine brachyzephale Form, seltener einen Trigonocephalus, Skaphocephalus oder einen sogenannten Kleeblattschädel (KREIBORG 1981).

Meist sind Koronar-, Sagittal- und Lamdanähte von der Synostierung betroffen.

Charakteristische klinische Befunde sind außerdem ein stark ausgeprägter Exophthalmus, Strabismus, Hypertelorismus und eine schnabelförmige Nase sowie eine maxilläre Hypoplasie bei jedoch normal großem Unterkiefer, was zu einer Pseudoprognathie führt.

Desweiteren kommt es bei der Mehrzahl der Patienten zu Hörverlusten, und sie erkranken häufiger an einer Otitis media (ORVIDAS et al. 1999).

Optikusatrophie bis hin zur völligen Erblindung können Folge einer Verengung des Canalis Opticus sein (WOOD-SMITH et al. 1976).

Wie auch beim Apert-Syndrom leiden viele Patienten aufgrund der Mittelgesichtshypoplasie an einer Obstruktion der oberen Atemwege.

Als Folge dessen beobachtet man viele so genannte „Mundatmer“.

Anders als beim Apert-Syndrom sind Syndaktilien an Händen und Füßen selten (M. Siegel 2002 - Understanding Craniofacial Anomalies).



Abb. 5: Crouzon-Syndrom, aus Cunningham et al. 2007 – Syndromic craniosynostosis – from history to hydrogen bonds

2.5.3 Muenke-Syndrom

Ende der Neunziger Jahre definierte der Humangenetiker Muenke das nach ihm benannte Syndrom, welches auch FGFR3-Koronarnahtsynostose-Syndrom genannt wird (MUNKE et al. 1997, BELLUS 1996).

Bei dieser genetisch determinierten Fehlbildung mit sehr variablen Phänotypen handelt es sich um eine einzelne Mutation des FGFR3-Gens.

Die Mutation bewirkt einen Aminosäureaustausch in der extrazellulären Domäne des FGFR3-Proteins. Die dadurch entstehende Konfigurationsänderung der Ligandenbindestelle bewirkt eine Veränderung der Affinität der Liganden (die Wachstumsfaktoren FGFs) zum Rezeptor (BELLUS et al. 1996).

Das Muenke-Syndrom wird autosomal-dominant vererbt, es tritt jedoch häufiger als Neumutation auf.

MOLONEY et al. (1997) stellten fest, dass diese Mutation zu den am häufigsten beschriebenen Mutationen im menschlichen Genom gehört.

Es handelt sich um ein stark variierendes klinisches Erscheinungsbild.

GOLLA et al. (1997) beschrieben unterschiedliche Phänotypen innerhalb einer Familie mit identischer Mutation. In den meisten Fällen ist der Schädel mitbetroffen.

Zweidrittel der Syndromträger weisen eine uni-, oder bilaterale Koronarnahtsynostose auf, aber auch Makrozephalie ohne begleitende Synostose, oder eine Hervorwölbung des Temporallbereichs können beobachtet werden. Selten kommt sogar ein Kleeblattsschädel vor (SABATINO et al. 2004).

Anomalien des Gesichtsschädels treten in ungefähr 50% der Fälle auf. Dies können Gesichtasymmetrien, Mittelgesichtshypoplasien, ein hohes Gaumendach, antimongoloide Lidspalten, Ptosis und Hypertelorismus sein (MUNKE et al. 1997).

Auch extrakranial können in 26% - 42% Fehlbildungen beobachtet werden.

MUNKE et al. beschrieben 1997 das Auftreten von fingerhutähnlichen Phalangen, kegelförmigen Epiphysen, karpale und tarsale Fusionen und Brachydaktylien.

Allerdings wies die Hälfte der Patienten keine Anomalien an den Extremitäten auf. In keinem der von MUNKE et al. (1997) und SABATINO et al. (2004) beschriebenen Fälle konnten klinisch relevante Syndaktylien gefunden werden.

Die meisten Patienten weisen eine normale Intelligenz auf (MUNKE et al. 1997), bei einigen ist jedoch eine mentale Retardierung zu beobachten. Diese ist allerdings nicht als Folge der Synostose zu sehen, sondern vielmehr als ein primäres Symptom des Syndroms (REARDON et al. 1997).

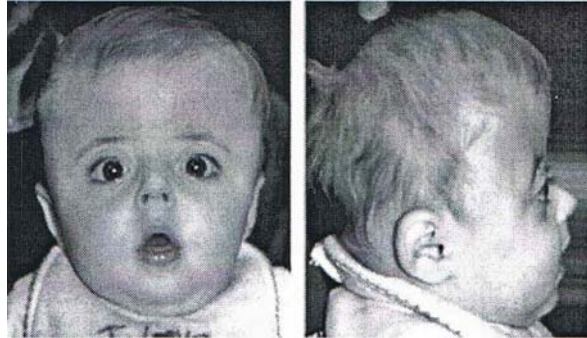


Abb. 6: Muenke-Syndrom, aus Cunningham et al. 2007 – Syndromic craniosynostosis – from history to hydrogen bonds

2.5.4 Pfeiffer-Syndrom

1964 beschrieb der Humangenetiker Pfeiffer erstmals das später nach ihm benannte Pfeiffer-Syndrom (PFEIFFER 1964).

Bei der von Pfeiffer beschriebenen Familie waren neben einer bestehenden Kraniosynostose die besonderen klinischen Merkmale die breiten, kurzen Daumen in Varus-Stellung und die breiten und kurzen Zehen, die dieses neue Syndrom als eigene Entität kennzeichnen.

Wie auch beim Apert-Syndrom beobachtet man eine deutliche Brachyzehalie, eine maxiläre Hypoplasie, einen Hypertelorismus und eine ausgeprägte Proptosis.

Anders als beim Apert-Syndrom bestehen jedoch keine ausgeprägten Syndaktylien, lediglich leichte Weichteilfusionen können, bevorzugt zwischen dem 2. und 3. Zeh, auftreten (COHEN 1993; VOGELS et al. 2006).

Das Pfeiffer-Syndrom ist sowohl autosomal-dominant vererbbar, tritt allerdings auch als Spontanmutation auf.

COHEN (1993) unterschied 3 Subtypen des Pfeiffer-Syndroms.

Die Zuordnung zu der jeweiligen Gruppe dient hauptsächlich zur Einschätzung des Krankheitsverlaufs und der Prognose.

So entspricht der Typ 1 dem klassischen Bild des Pfeiffer-Syndroms mit Brachycephalie und Synostose der Koronarnaht. Eine Beeinträchtigung der geistigen Entwicklung ist normalerweise nicht der Fall.

Weitaus schwerwiegender ist die Symptomatik des Zweiten Typs. Die Schädelform entspricht der eines Kleeblattschädels, auch das ZNS ist meist mitbetroffen. Es findet sich eine ausgeprägte Proptosis und Mittelgesichtshypoplasie. Desweiteren treten Ankylosen/Synostosen der Ellbogen und Anomalien der Finger und Zehen auf.

Typ 3 entspricht großteils dem klinischen Bild von Typ 2. Wesentlicher Unterschied ist hierbei das Fehlen des Kleeblattschädels.

Diese 3 Subtypen stellen keine separaten Entitäten dar, eine Zuordnung ist allerdings aus prognostischer Sicht sehr wichtig, da die Typen 2/3 mit einer wesentlich schlechteren Prognose einhergehen, sowohl hinsichtlich der neurologischen Defizite als auch einer kürzeren Lebenszeit.

Die Subtypen 2 und 3 treten vorwiegend sporadisch auf, im Gegensatz zu dem vor allem autosomal-dominant vererbten Subtyp 1 (COHEN 1993; VOGELS et al. 2006).

Dem Pfeiffer-Syndrom kann sowohl eine Mutation des FGFR1-Gens zugrunde liegen, wie MÜENKE et al. 1994 anhand von 5 untersuchten Familien nachweisen konnten, als auch eine Mutation des FGFR2-Gens (SCHELL et al. 1995; LAJEUNIE et al. 1995; RUTLAND et al. 1995).

ROBIN et al. wiesen 1994 nach, dass das ursächliche Gen auf dem Chromosom 8 lokalisiert ist.

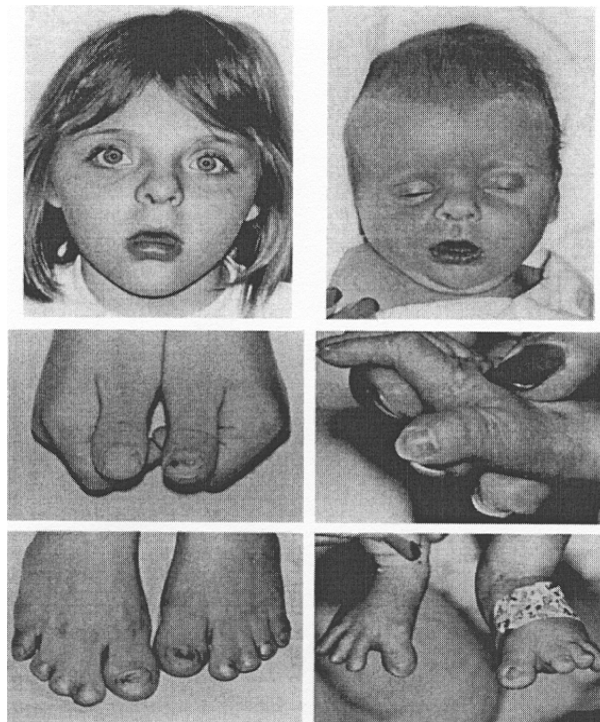


Abb. 7: Pfeiffer-Syndrom, aus Muenke et al. 1994 – A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome

2.5.5 Saethre-Chotzen-Syndrom

Haakon SAETHRE, ein norwegischer Psychiater, beschrieb im Jahre 1931 eine Familie mit milder Akrocephalie, asymmetrischem Schädel und kutanen Syndaktylien des zweiten und dritten Fingers, sowie der dritten und vierten Zehe.

Ein Jahr später beschrieb auch der deutsche Psychiater F. CHOTZEN (1932) eine Familie mit der gleichen Fehlbildung.

Das nach den beiden Ärzten benannte Saethre-Chotzen-Syndrom wird klinisch durch craniofaziale Anomalien und Fehlbildungen der Extremitäten charakterisiert. Hierzu gehören eine uni-, oder bilaterale Synostose, eine Asymmetrie des Schädels, ein tiefsitzender, frontaler Haaransatz, eine Ptosis der Augenlider, eine Papageienschnabel-ähnliche Nase mit verschobenem Septum sowie kleine, tiefstehende Ohren. Die Anomalien der Extremitäten betreffen typischerweise den zweiten und dritten Finger. Zu beobachten sind Brachydaktylien und kutane Syndaktylien (SIEGEL 2002, PANTKE et al. 1999).

2006 postulierten KRESS et al., dass eine rein klinische Unterscheidung zwischen den sehr

ähnlichen Saethre-Cotzen- und Muenke-Syndromen anhand charakteristischer phänotypischer Merkmale möglich ist. So definieren folgende klinischen Merkmale das Saethre-Chatzen-Syndrom:“ ... tiefsitzender, frontaler Haaransatz, Ptosis der Augenlider, abnormale Ohrlänge, dilatierte parietale Foramina, interdigitale Fusionen, Hallux Valgus oder breite Großzehen mit zweigeteilten distalen Phalangen.“ (KRESS et al. 2006)

Wichtiger zur Differenzierung sind allerdings die funktionellen Unterschiede.

Ein erhöhter intrakranieller Druck, bedingt durch die frühzeitige Verknöcherung der Schädelnähte tritt nur beim Saethre-Chatzen-Syndrom auf. Eine verzögerte geistige Entwicklung und ein sensorischer Hörverlust sind Kennzeichen des Muenke-Syndroms (KRESS et al. 2006).

Das Saethre-Chatzen-Syndrom wird autosomal-dominant vererbt (EL GHOUZZI et al.1999). Der Gendefekt wurde von BOURGEOIS et al. (1996) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 (7p21) lokalisiert. HOWARD et al. (1997) und EL GHOUZZI et al. (1997) konnten zeigen, dass dem Syndrom Mutationen im TWIST1-Gens zu Grunde liegen. Desweiteren konnten sie nachweisen, dass viele verschiedene Arten von Mutationen vorliegen können, wie z.B. Nonsense-, Missense-Mutationen, Insertionen und Deletionen.

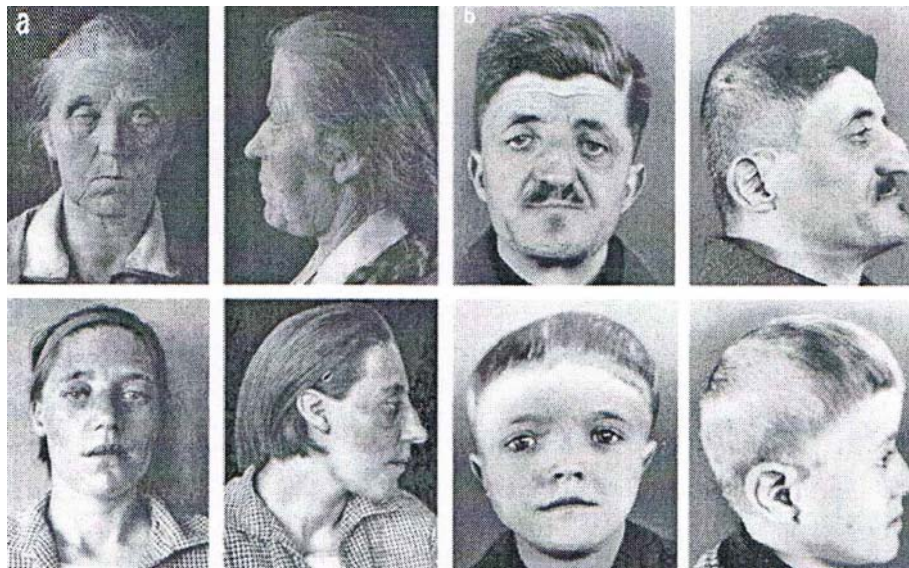


Abb. 8: Saethre-Chatzen-Syndrom, aus Cunningham et al. 2007 – Syndromic craniosynostosis – from history to hydrogen bonds

2.5.6 Achondroplasie

Die Achondroplasie, auch Chondrodysplasie genannt, ist mit einer Inzidenz von 2-3/100.000 Geburten die häufigste Form des kurzgliedrigen Kleinwuchses.

Schon im alten Ägypten sind Fälle beschrieben worden (KOZMA 2008).

Sie beruht auf einer autosomal-dominanten Mutation des FGFR3-Gens, der Großteil besteht jedoch aus Neumutationen. Die Mutation verursacht eine Störung der endochondralen Ossifikation.

Klinisch fallen die Patienten schon bei Geburt durch einen Minderwuchs, eine Makrozephalie mit vorgewölbter Stirn, Mittelgesichtshyperplasie, einer so genannten Dreizackhand (es besteht ein vergrößerter Abstand zwischen dem dritten und vierten Finger) sowie einer thorakolumbalen Kyphose und einer verstärkten Lendenlordose auf (RICHETTE et al. 2008; SITZMANN 2007).

Die Betroffenen weisen in der Regel eine normale Intelligenz auf (HECHT et al. 1991).

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens steigt mit dem Alter des biologischen Vaters (PENROSE 1955; STOLL et al. 1982).

1994 konnten VELINOV et al. und LE MERRER et al. das verantwortliche Gen am distalen Ende des kurzen Arms des Chromosoms 4 lokalisieren. SHIANG et al. (1994) und ROUSSEAU et al. (1994) fanden unabhängig voneinander die Mutation des FGFR-3 Gens, bei welcher es sich um einen Austausch von Glycin durch Arginin in Position 380 handelt. In wenigen Fällen liegt eine so genannte G-C_Mutation vor, hierbei wird Glycin durch Glutamin ersetzt.

2006 gelang es HORTON et al. den Mechanismus der Knorpelschädigung durch die FGFR3-Mutation zu identifizieren. So zeigte sich, dass der FGF-3-Rezeptor ein negativer Regulator für die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten ist. Durch die Mutation kommt es zu einer Aktivierung des Rezeptors, im Sinne einer gain-of-function-Mutation.

Die Diagnose wird sowohl klinisch als auch radiologisch gestellt.

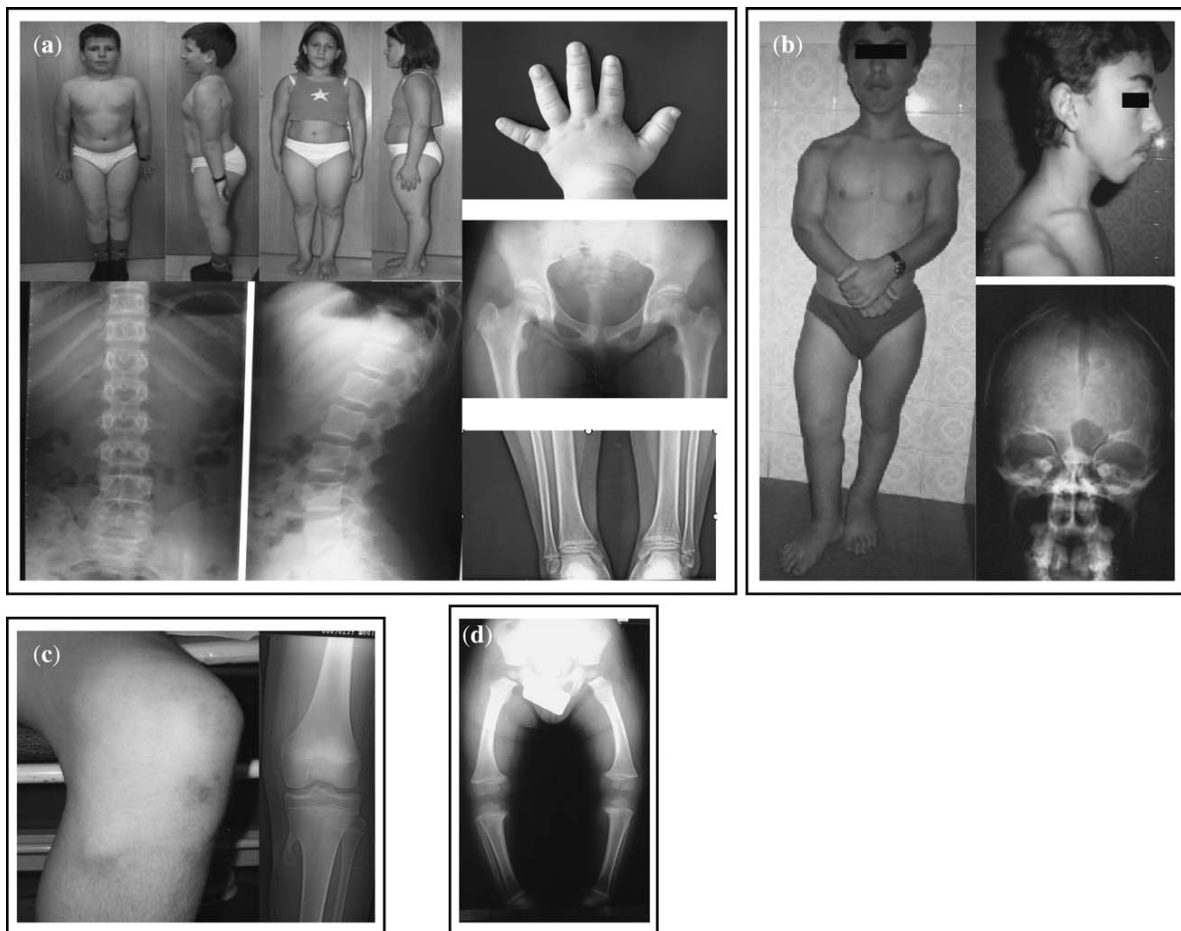


Abb. 9: Achondroplasie, aus Almeida et al. 2009 – Clinical and Molecular diagnosis of the skeletal dysplasias associated with mutations in the gene encoding Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) in Portugal

2.5.7 Hypochondroplasie

Auch die Hypochondroplasie gehört zu der Gruppe der Chondrodysplasien und ist wie auch die Achondroplasie auf eine autosomal-dominant vererbte Mutation des FGFR3-Gens zurückzuführen (BONAVENTURE et al. 1996, PRINOS et al. 1995).

Die Prävalenz beträgt 4-10/10.000.

Die Hypochondroplasie hat sowohl klinisch als auch radiologisch viele Ähnlichkeiten mit der Achondroplasie. Es handelt es sich dabei ebenfalls um einen kurzgliedrigen Kleinwuchs, jedoch in milderer Ausprägung, und im Gegensatz zur Achondroplasie, ohne die Beteiligung des Beckens oder des Schädelknochens (GLASGOW et al. 1978, BELLUS et al. 1995).

Allgemeine Grundlagen

1978 berichteten GLASGOW et al. über drei Patienten mit Hypochondroplasie, die stark verkürzte Extremitäten, einen langen Rumpf und eine verstärkte Lumballordose aufwiesen. Die Gesichtsschädel waren jedoch nicht mit betroffen. Bei Patienten mit Hypochondroplasie beobachtet man zwar stark verkürzte Finger, die für die Achondroplasie so typische Dreizackhand tritt jedoch nicht auf. Im Gegensatz zur Achondroplasie erscheinen die Kinder mit Hypochondroplasie bei der Geburt noch unauffällig. Häufiger als bei der Achondroplasie kommt es bei der Hypochondroplasie zu einer mentalen Retardierung (NEWMAN et al. 1975).

Das verantwortliche Gen wurde 1994 von LE MERRER et al. (1994) auf dem Chromosom 4p16.3 lokalisiert.

PRINOS et al. (1995) und BELLUS et al. (1995) konnten zeigen, dass es sich bei der Hypochondroplasie ebenfalls um eine Mutation des FGFR3-Gens handelt.

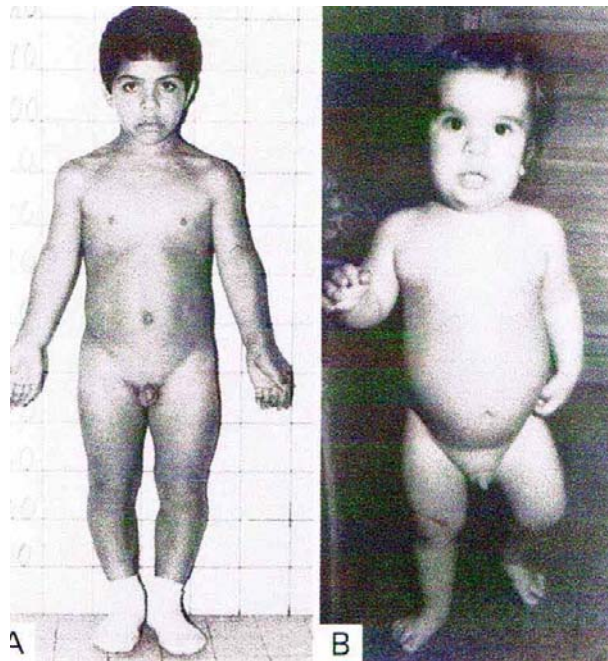


Abb. 10: Hypochondroplasie, aus Rousseau et al. 1996 – Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia

3. Material und Methoden

3.1 Patientengut

Das untersuchte Patientengut aus dem Zeitraum 2000 - 2004 bestand aus insgesamt 714 Patienten, die dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg zur Differentialdiagnostik hinsichtlich einer syndromalen Kraniosynostose (Apert-, Muenke-, Pfeiffer-, Crouzon-, oder Saethre-Chatzen-Syndrom) bzw. Achondroplasie/ Hypochondroplasie zugewiesen wurden.

Das vorgestellte Patientenkollektiv setzte sich aus 48 Patienten die auf Achondroplasie getestet wurden, 36 auf Apert-Syndrom untersuchte Patienten, 152 auf Crouzon- und Pfeiffer-Syndrom untersuchte Patienten, 43 auf Hypochondroplasie, 219 auf Muenke-Syndrom und 180 auf Saethre-Chatzen-Syndrom untersuchte Patienten zusammen.

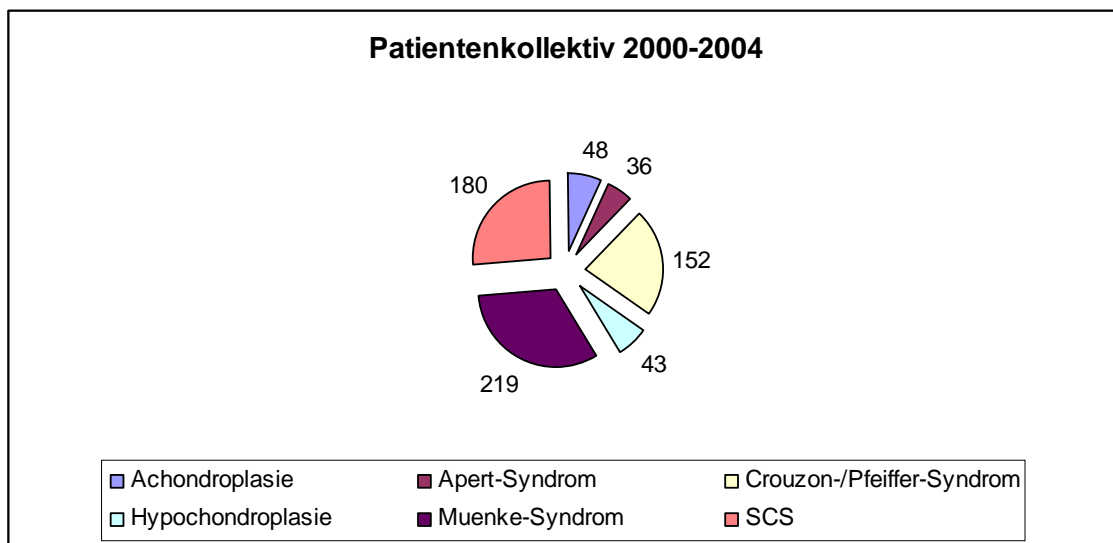


Abb. 11: Patientenkollektiv 2000-2004 Gesamtübersicht der untersuchten Patienten
SCS= Saethre-Chatzen-Syndrom

3.2 Methoden der molekulargenetischen Diagnostik von Kraniosynostosen

3.2.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde 1985 von Kary Mullis erfunden, der 1993 hierfür den Nobelpreis für Chemie verliehen bekam.

Bei der PCR-Methode (polymerase chain reaction) handelt es sich um eine in vitro-Technik, mit der man bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigen kann.

Angewandt wird diese Technik in der Diagnostik von Erbkrankheiten und Virusinfektionen, sowie für das Erstellen so genannter genetischer Fingerabdrücke.

Die Polymerase-Kettenreaktion besteht aus 12 - 50 Zyklen, jeder Zyklus wiederum setzt sich aus 3 grundlegenden Schritten zusammen:

1. Die Denaturierung (Melting) - Als erstes wird die DNA auf 94° - 96° C erhitzt, um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen aufzubrechen.
2. Die Primerhybridisierung (primer annealing) - Zwei so genannte Oligonukleotidprimer, kurze einzelsträngige DNA-Abschnitte, dienen als Starthilfe für die Amplifikation.

Die Primer sind komplementär zu den Enden einer definierten DNA-Sequenz.

Diese lagern sich bei einer bestimmten Temperatur (meist zwischen 55° - 65° C) an die zu amplifizierende DNA-Sequenz an, was man als Annealing bezeichnet.

3. Die Elongation - Im letzten Schritt verlängern hitzestabile Enzyme (DNA-Polymerasen) aus thermophilen Bakterien (zum Beispiel die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) mit Hilfe von Desoxynukleotiden (dNTPs) die Primer entlang der DNA-Matrize und synthetisieren so die jeweiligen komplementären DNA-Abschnitte. Dies geschieht bei einer Temperatur von 68° - 72° C.

Die gesamte Reaktion findet in einem Thermocycler statt, ein Gerät, das die jeweils benötigten Temperaturen sicherstellt.

3.2.2 SSC – Analyse

Bei der SSC-Analyse (single strand conformation analysis) wird eine durch PCR-Amplifikation entstandene Gensequenz auf eine Punktmutation hin überprüft. Die PCR-Produkte werden in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Einzelstrangfragmente, die eine Mutation aufweisen werden durch ihre abweichenden Laufeigenschaften im elektrischen Feld erkannt, da sie im Vergleich zur Normalsequenz eine veränderte Sekundärstruktur aufweisen.

Um welche Art von Genmutation bzw. Punktmutation es sich handelt, muss mittels sich anschließender Sequenzieretechniken (siehe unten) ermittelt werden (W. BRÖCKER, Repetitorium Pathologie).

3.2.3 Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse ist eine automatisierte Bestimmung von Nukleinsäuresequenzen. Man erhält dadurch Informationen über die Abfolge und Position der Basenpaare.

Wie bei der PCR erfolgt zunächst eine DNA-Synthese mit Hilfe eines Primers. Zusätzlich zu den normalen vier Nukleotiden Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin werden dem Reaktionsansatz so genannte Dideoxynukleotide (ddNTPs) zugesetzt. Da diesen die zur Ausbildung einer Esterbindung zum nächsten Nukleotid benötigte 3'-OH-Gruppe fehlt kommt es zum Kettenabbruch.

Die Sequenzierungsreaktion wird parallel in vier verschiedenen Reaktionsansätzen durchgeführt. In jedem Ansatz befindet sich allerdings jeweils nur eines der vier Dideoxynukleotide, somit ist eine Sequenzbestimmung möglich.

Die so entstandenen PCR-Produkte werden im Anschluss nebeneinander mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, so lässt sich nachweisen, wo welches Nukleotid zum Abbruch geführt hat. Die Dideoxynukleotide sind entweder radioaktiv markiert, oder bei neueren Methoden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. So kann man auf die Sequenz rückschließen.

3.2.4 Southern-Blot-Hybridisierung

Das Prinzip der Southern-Blot-Hybridisierung beruht auf einer so genannten DNA-Sonde, ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment einer bekannten Sequenz, die sich an komplementären genomischen DNA-Abschnitten anlagert und diese somit nachgewiesen werden können.

Als erstes wird die DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen in Fragmente gespalten. Diese DNA-Fragmente werden dann per Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Als nächstes wird die aufgetrennte DNA auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Diesen Vorgang nennt man „Blotting“. Erst jetzt findet die eigentliche Hybridisierungsreaktion statt. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wird zugesetzt und die komplementären Stränge können mittels Röntgenfilter detektiert werden.

3.3 Graphische Darstellung der Patientendaten

Die Patientendaten wurden mittels einer Excel-Tabelle erfasst (Microsoft Office Excel 2003).

Von jedem Patienten wurde das Alter, das Geschlecht, die Verdachtsdiagnose, die Methode der genetischen Diagnostik, das untersuchte Material, die Anzahl der Untersuchungen, das Ergebnis der Untersuchungen sowie die daraus resultierende Diagnose erfasst.

Anschließend wurden diese Daten zu einfachen Tabellen, Häufigkeitstabellen und Graphiken weiterverarbeitet.

3.4 MapInfo Professional

Für die geographische Darstellung der Einsender wurde die Software MapInfo Professional verwendet. Es handelt sich dabei um eine Software zur Präsentation raumbezogener Daten. Die Darstellung erfolgt anhand der ersten zwei Stellen der Postleitzahlen, es entstehen dadurch so genannte PLZ-2-Grenzen.

4. Fallbeispiele

4.1 Fall 1: Crouzon-Syndrom

Im Januar 2001 wurde eine Blutprobe eines zwei Monate alten Patienten mit der Verdachtsdiagnose Crouzon-Syndrom zur molekulargenetischen Diagnostik in das Institut für Humangenetik der Universität Würzburg eingesandt.

Zunächst wurden die relevanten Genabschnitte (Exon 5 des FGFR1-Gens, Exon 8 und 10 des FGFR2-Gens) mittels Polymeraseketten-Reaktion vervielfältigt. Danach wurden die entstandenen DNA-Fragmente mit Hilfe der SSC-Analyse untersucht. Bei Exon 10 des FGFR2-Gens zeigte sich ein auffälliges Bandenmuster, weshalb es direkt sequenziert wurde. Es konnte der Aminosäureaustausch Cys342Arg festgestellt werden, bei dem es sich um eine für das Crouzon-Syndrom bekannte Mutation handelt. Der Verdacht des Crouzon-Syndroms wurde bei dem Patienten molekulargenetisch bestätigt. Daraufhin entschieden sich die beiden, phänotypisch unauffälligen, Eltern des Patienten sich ebenfalls auf die Mutation untersuchen zu lassen. Auch hier wurden zunächst das Exon 10 des FGFR2-Gens mittels PCR vervielfältigt und danach per SSC-Analyse untersucht. Es konnten jedoch keine auffälligen Banden dargestellt werden, sodass es sich bei den Eltern nicht um Überträger der Mutation Cys342Arg handelt und die Mutation des Patienten eine Neumutation darstellt. Im März 2002 wurden dem Institut Amnionzellen eines Feten der Familie zugesandt, auch diese Zellen sollten auf die Mutation Cys342Arg im Exon 10 des FGFR2-gens untersucht werden. Es erfolgte mittels PCR eine Vervielfältigung des Exon 10 des FGFR2-Gens und eine anschließende Sequenzierung. Die Mutation Cys342Arg konnte ausgeschlossen werden, somit war der Fet nicht Träger der Crouzon-Mutation.

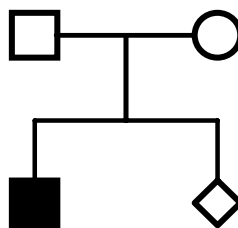


Abb. 12: Stammbaum Fallbeispiel 1

Cys342Arg

4.2 Fall 2: Muenke-Syndrom

Im Juni 2000 wurde dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg eine Blutprobe einer sieben Jahre alten Patientin zugesandt zur molekulargenetischen Diagnostik bei Verdacht auf Muenke-Syndrom bzw. Saethre-Chotzen-Syndrom.

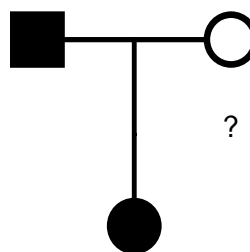
Zuerst wurde der relevante Genabschnitt (Exon 7 des FGFR3-Gens) mittels Polymeraseketten-Reaktion vervielfältigt und anschließend mit dem Restriktionsenzym Nci I gespalten. In der folgenden Auftrennung im Agarosegel zeigte sich das typische Fragmentmuster der Muenke-Mutation Pro250Arg.

Somit konnte die Diagnose Muenke-Syndrom molekulargenetisch bestätigt werden.

Es wurde den Eltern geraten bei weiterem Kinderwunsch sich ebenfalls molekulargenetisch untersuchen zu lassen.

Die daraufhin vom Vater der Patientin zugesandte Blutprobe ergab in der molekulargenetischen Untersuchung ebenfalls das typische Fragmentmuster der Muenke-Mutation Pro250Arg, sodass auch bei dem Vater die Diagnose Muenke-Syndrom gestellt werden konnte.

Die mit „?“ gekennzeichneten Familienangehörigen wurden nicht untersucht.



Pro250Arg

Abb. 13: Stammbaum Fallbeispiel 2

4.3 Fall 3: Saethre-Chotzen-Syndrom

Im Dezember 2000 wurde dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg Blutproben eines Ehepaars zugesandt, dessen Sohn ein nachgewiesenes Saethre-Chotzen-Syndrom mit der Mutation Glu 119 STOP im TWIST-Gen hat, mit der Fragestellung ob die Eltern Überträger dieser Mutation sind.

Zunächst wurde das 3`-Fragment des Exon 1 des TWIST 1-Gens mittels Polymeraseketten-Reaktion vervielfältigt und anschließend direkt sequenziert.

Die Mutation konnte weder bei dem Vater noch bei der Mutter nachgewiesen werden.

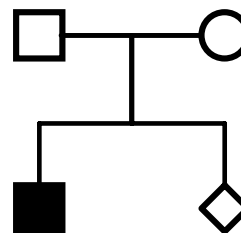
Somit handelt es sich bei dem Saethre-Chotzen-Syndroms des Sohnes um eine Neumutation.

Im April 2004 wurde dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg Chorionzottenmaterial einer erneuten Schwangerschaft des oben genannten Paares zur molekulargenetischen Diagnostik auf das Saethre-Chotzen-Syndrom zugeschickt.

Zuerst erfolgte die Präparation von DNA aus den Chorionzotten, anschließend wurde das 2. Fragment des codierenden Exon 1 des TWSIT-Gens per PCR vervielfältigt und eine automatische Sequenzierung beider Stränge durchgeführt.

Die bekannte Mutation Glu 119 STOP im TWIST 1-Gen des ersten Sohnes konnte in der DNA des Zottenmaterials nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Fet kein Risiko für ein Saethre-Chotzen-Syndrom hat.



Glu199 STOP

Abb. 14: Stammbaum Fallbeispiel 3

5. Ergebnisse

5.1 Überblick aller untersuchter Krankheitsgruppen des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg im Zeitraum 2000-2004

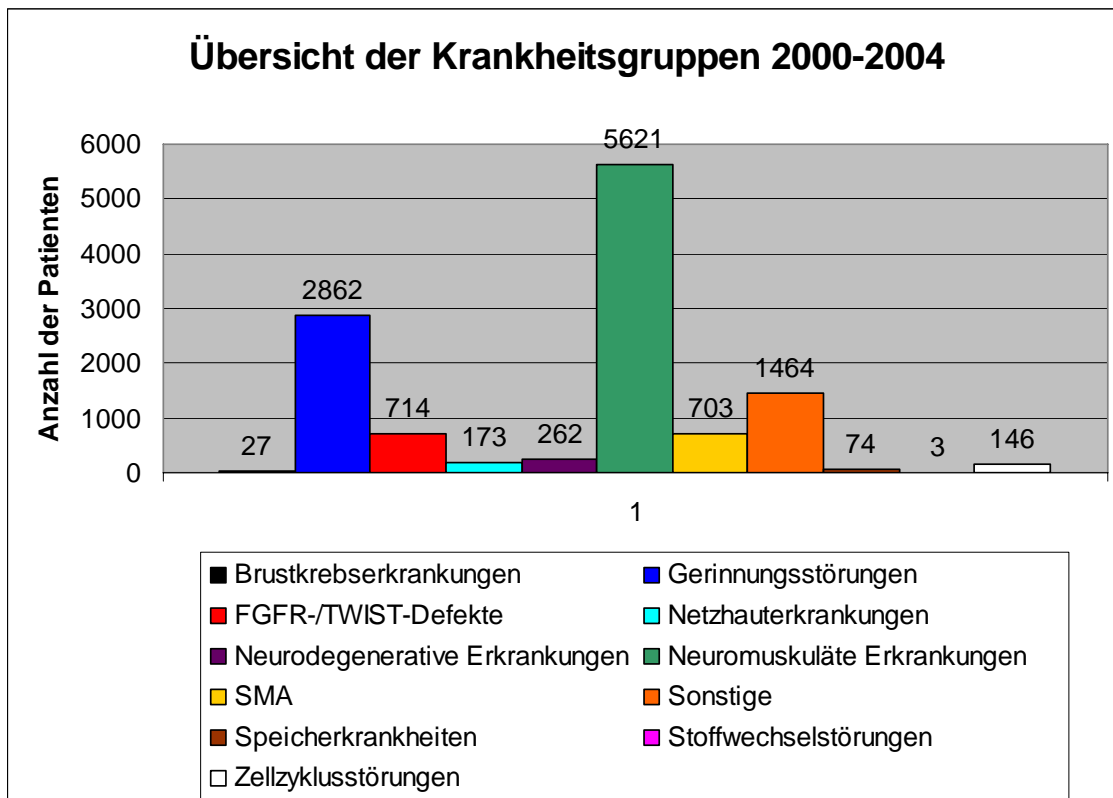


Abb. 15: Übersicht der Krankheitsgruppen 2000-2004

Abbildung Nr. 15 zeigt einen Überblick über alle Krankheitsgruppen, die im Zeitraum 2000 - 2004 im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg untersucht wurden.

Im Vordergrund stehen hierbei die Diagnostik von neuromuskulären Erkrankungen mit 5621 Patienten innerhalb des Zeitraums 2000 - 2004, die Diagnostik von Gerinnungsstörungen mit 2862 Patienten innerhalb des Zeitraums 2000 - 2004 sowie die Diagnostik von FGFR/TWIST-Defekte mit 714 Patienten.

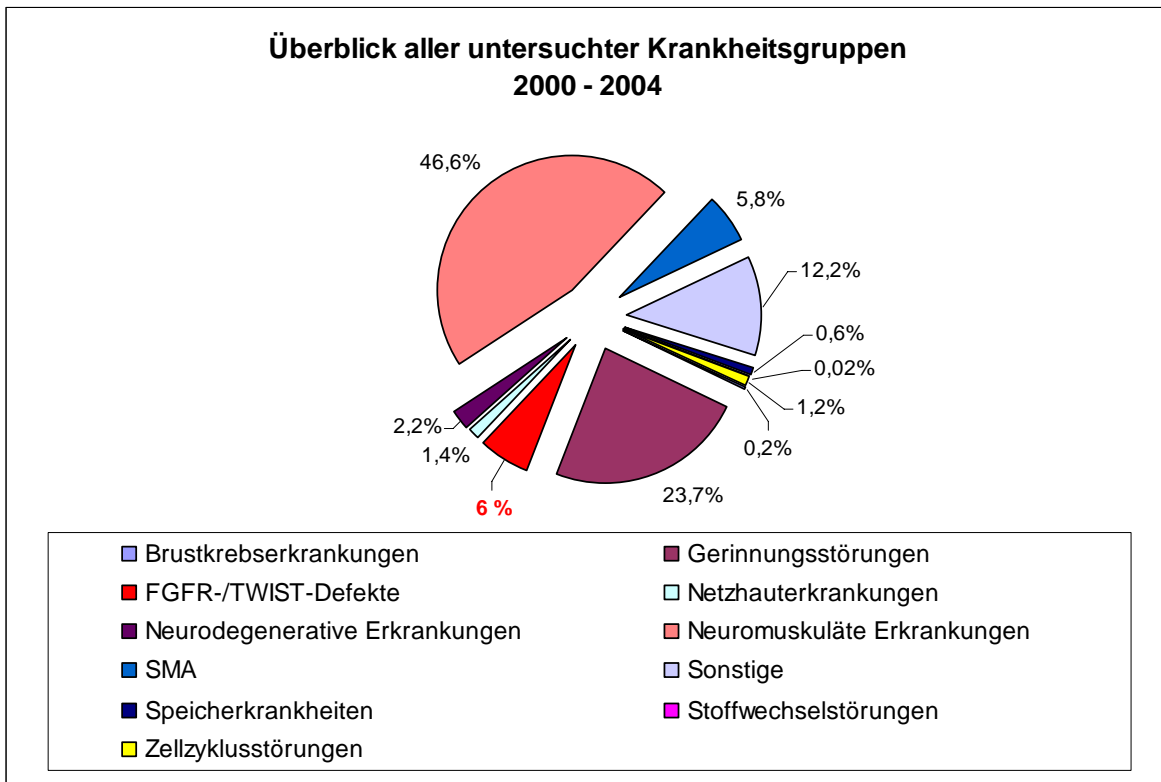


Abb. 16: Prozentuale Verteilung aller untersuchten Krankheitsgruppen im Zeitraum 2000-2004

In Abbildung Nr. 16 wird die prozentuale Verteilung aller untersuchter Krankheitsgruppen dargestellt. Die Anzahl an FGFR-/TWIST-Defekte entsprechen 6 % des gesamten Patientenguts.

Ergebnisse

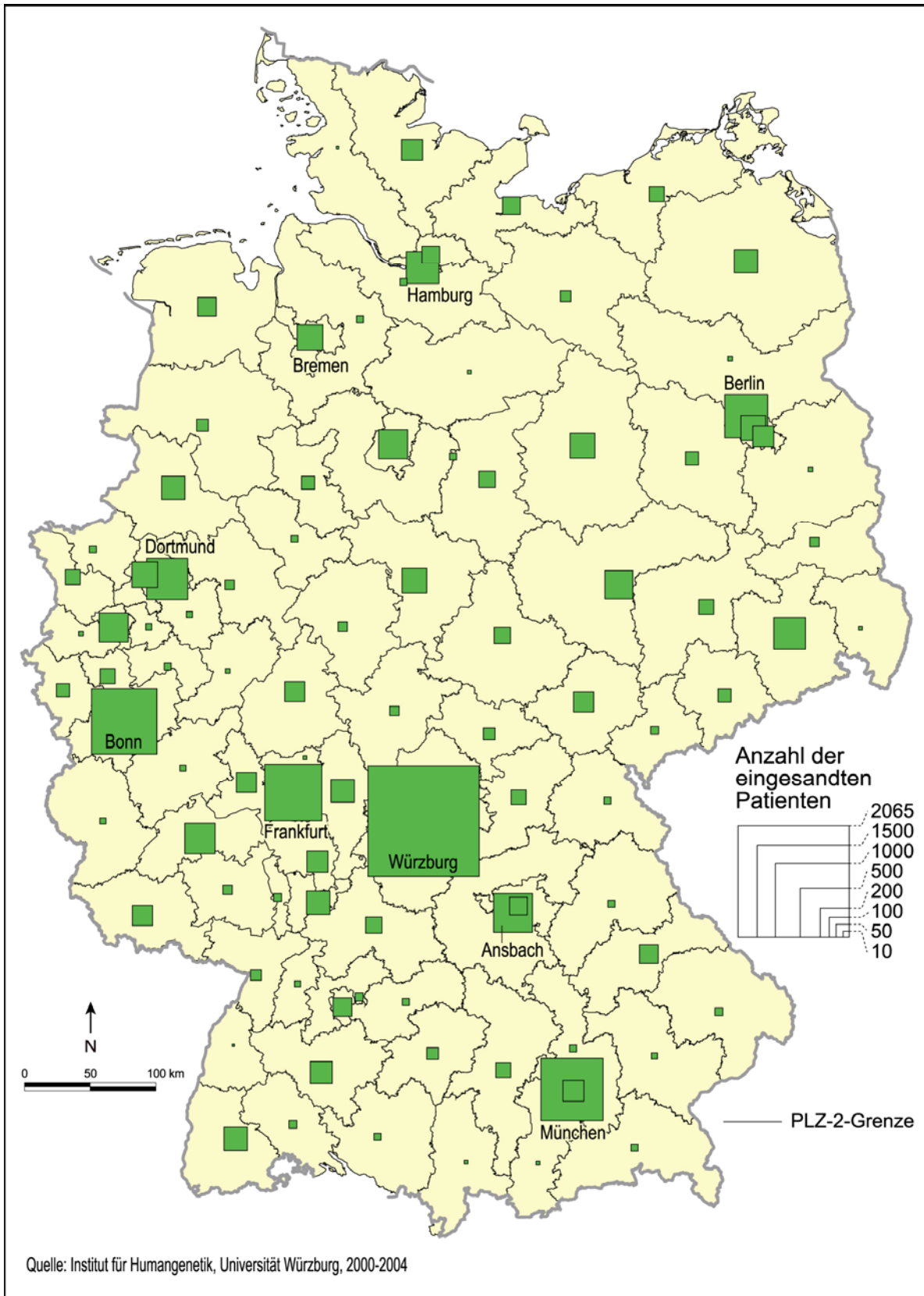


Abb. 17: Überblick über die geographische Verteilung der einweisenden Ärzte aller Krankheitsgruppen

Ergebnisse

In Abbildung 17 wird die geographische Verteilung der einweisenden Ärzte aller Krankheitsgruppen im Zeitraum 2000 - 2004 dargestellt. Die Aufteilung erfolgt anhand der ersten zwei Stellen der Postleitzahlen so genannter PLZ-2-Grenzen.

Die nächste Abbildung (Abb. 18) liefert einen Überblick über die prozentuale Verteilung der fünf wichtigsten Einsendegebiete.

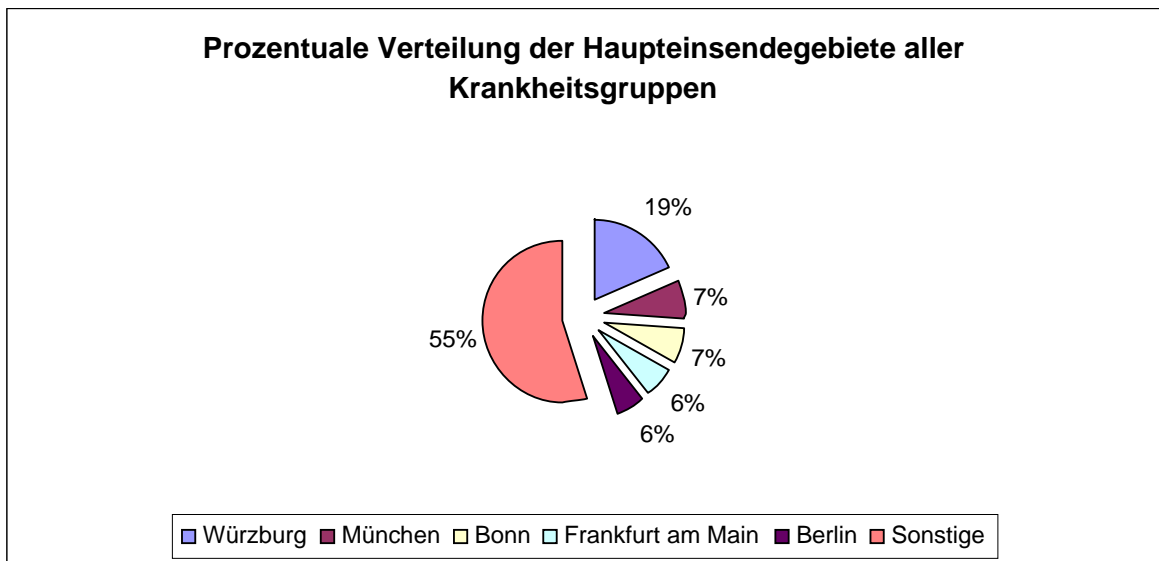


Abb. 18: Überblick über die prozentuale Verteilung der Haupteinsendegebiete aller Krankheitsgruppen

5.2 Überblick über die FGFR-/TWIST-Defekte 2000-2004

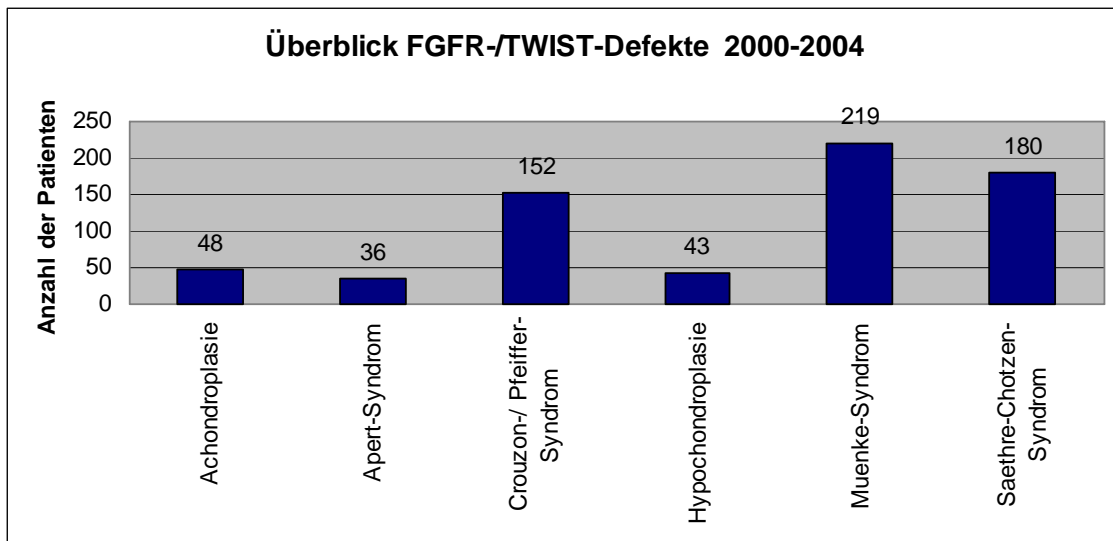


Abb. 19: Überblick über die FGFR-/TWIST-Defekte 2000-2004

Insgesamt wurden im Zeitraum 2000-2004 714 Patienten auf eine syndromale Kraniosynostose bzw. auf Achondroplasie/Hypochondroplasie im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg untersucht.

36 Patienten wurden auf das Apert-Syndrom untersucht.

Auf Achondroplasie wurden 7 Patienten getestet sowie 43 auf Hypochondroplasie.

Weitere 152 Patienten wurden auf das Crouzon- und das Pfeiffer-Syndrom untersucht.

219 Patienten wurden in diesem Zeitraum auf das Muenke-Syndrom hin getestet.

Mit der Fragestellung auf das Saethre-Choitzen-Syndrom wurden 180 Patienten untersucht.

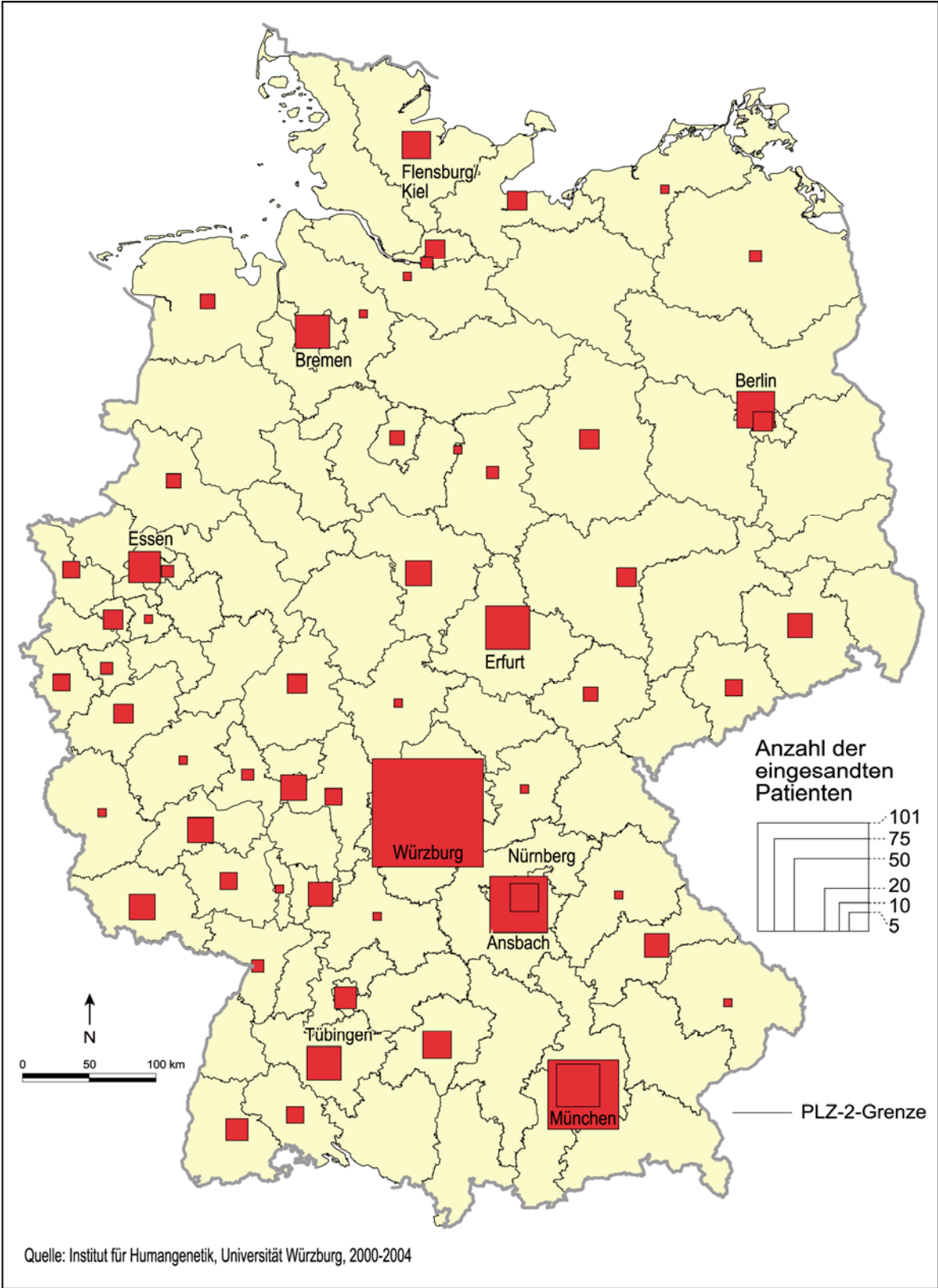


Abb. 20: Überblick über die geographische Verteilung der einweisenden Ärzte der FGFR-/TWIST Defekte

Ergebnisse

In Abbildung 20 wird die geographische Verteilung der einweisenden Ärzte der FGFR-/TWIST-Defekte im Zeitraum 2000 - 2004 dargestellt. Die Aufteilung erfolgt ebenfalls anhand der ersten zwei Stellen der Postleitzahlen, so genannter PLZ-2-Grenzen.

Die nächste Abbildung (Abb. 21) liefert einen Überblick über die prozentualen Anteile der fünf wichtigsten Einsendegebiete für FGFR-/TWIST-Defekte.

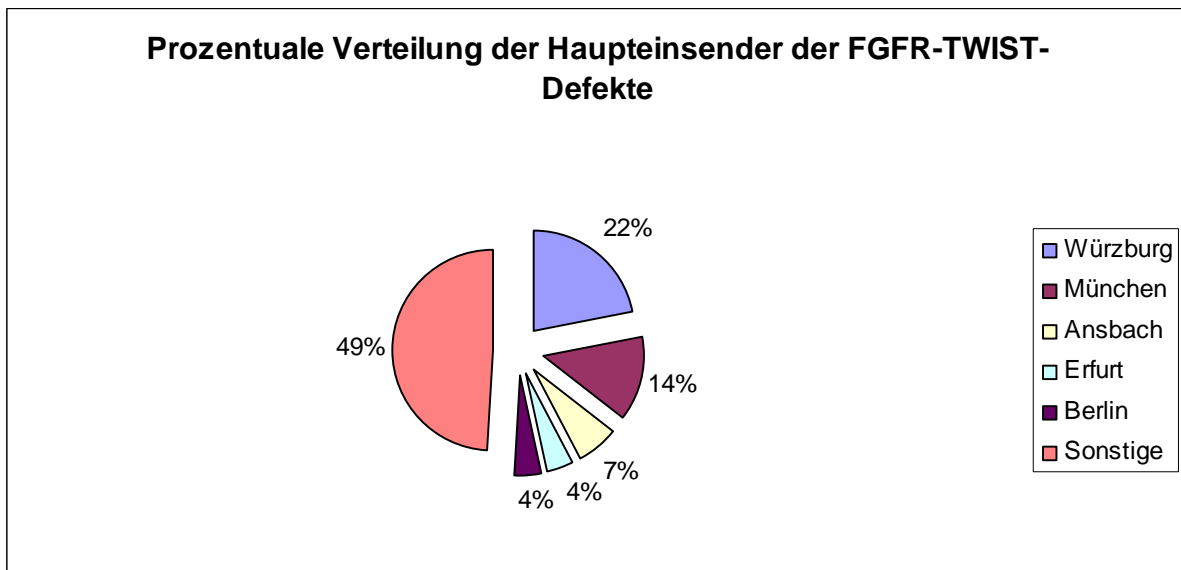


Abb. 21: Überblick über die prozentuale Verteilung der Haupteinsendegebiete der FGFR-/TWIST-Defekte

5.3.1 Apert-Syndrom

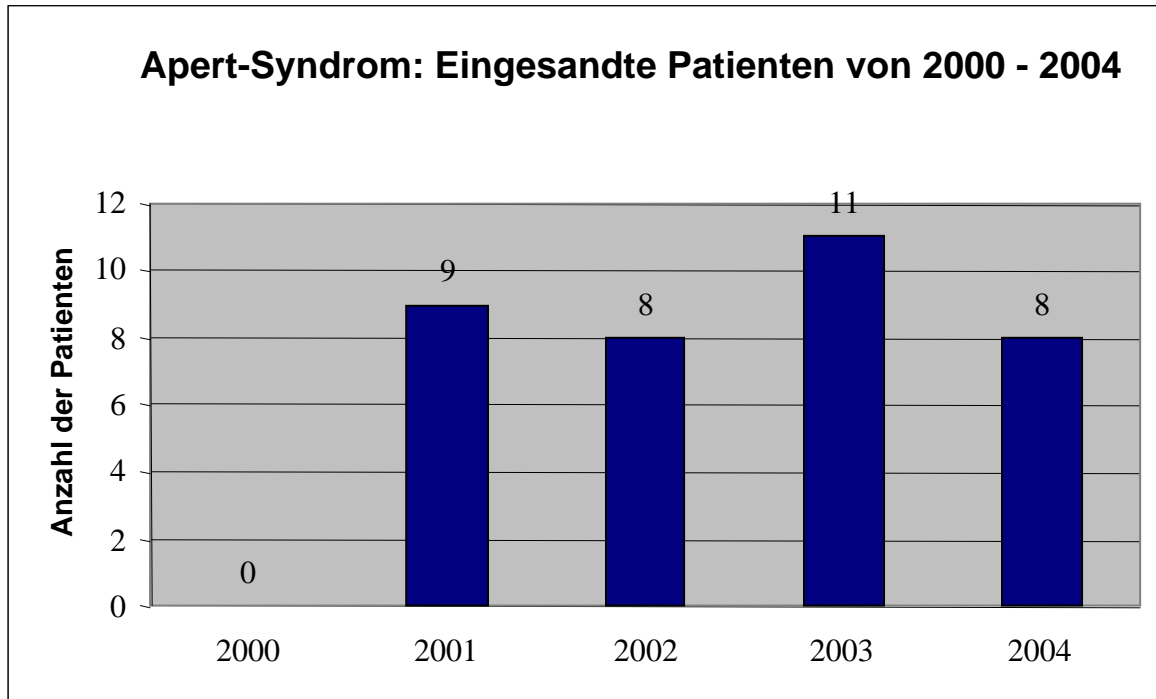


Abb. 22: Apert-Syndrom: Anzahl aller eingesandter Patienten vom Zeitraum 2000-2004

Die Abbildung 22 zeigt den Überblick über alle eingesandten Patienten im Zeitraum 2000 - 2004 die im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, auf das Apert-Syndrom untersucht wurden.

Im Jahr 2000 wurde kein Patient zur molekulargenetischen Diagnostik auf das Apert-Syndrom zugewiesen. 2001 waren es 9 Patienten, 2002 8 Patienten, 2003 11 Patienten und 2004 waren es 8 Patienten, die zur Diagnostik überwiesen wurden.

Es wurden alle 36 Patienten untersucht, das bedeutet, dass jeder klinischen Zuweisung auch eine molekulargenetische Diagnostik folgte.

Insgesamt wurden im Zeitraum 2000 - 2004 36 Patienten auf das Apert-Syndrom hin untersucht.

Die nächste Abbildung (Nr. 23) stellt die prozentualen Anteile der positiv, negativ bzw. unklar getesteten Patienten dar. Bei ungefähr zweidrittel der Patienten konnte sich die klinische Verdachtsdiagnose des Apert-Syndroms bestätigen.

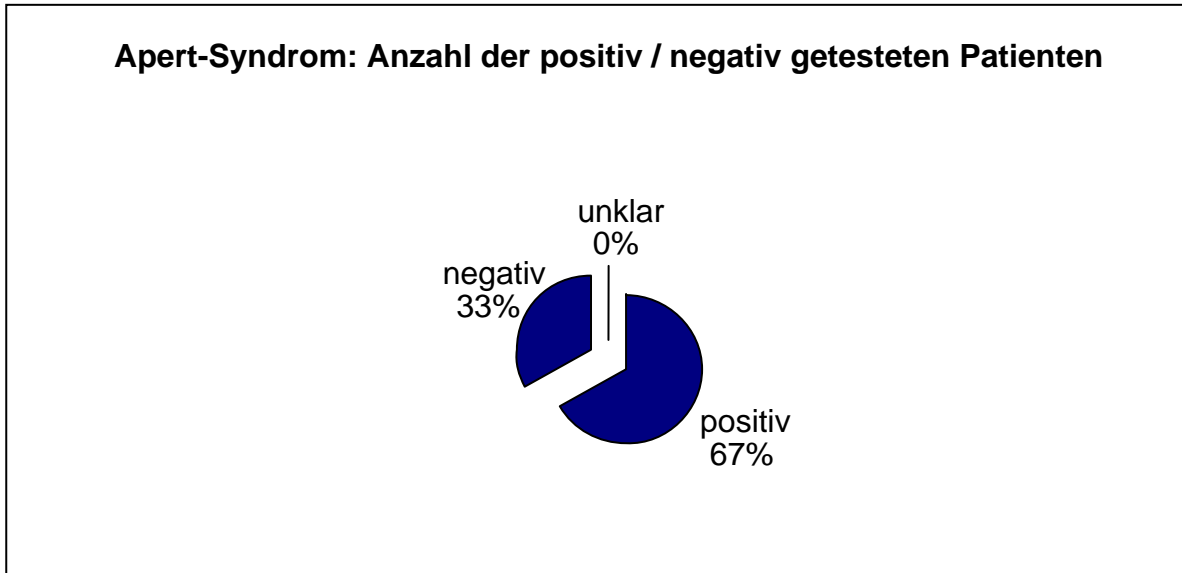


Abb. 23: Darstellung der Ergebnisse der molekulargenetischen Diagnostik aller auf das Apert-Syndrom getesteter Patienten von 2000-2004

5.3.2 Crouzon-/Pfeiffer-Syndrom

Die Abbildung 24 zeigt den Überblick über alle Patienten, die im Zeitraum 2000 - 2004 im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg auf das Crouzon-/bzw. Pfeiffer-Syndrom untersucht worden sind. Im Jahr 2000 wurden 33 Patienten untersucht, 2001 40 Patienten, 2002 26 Patienten, 2003 27 Patienten und 2004 erneut 26 Patienten.

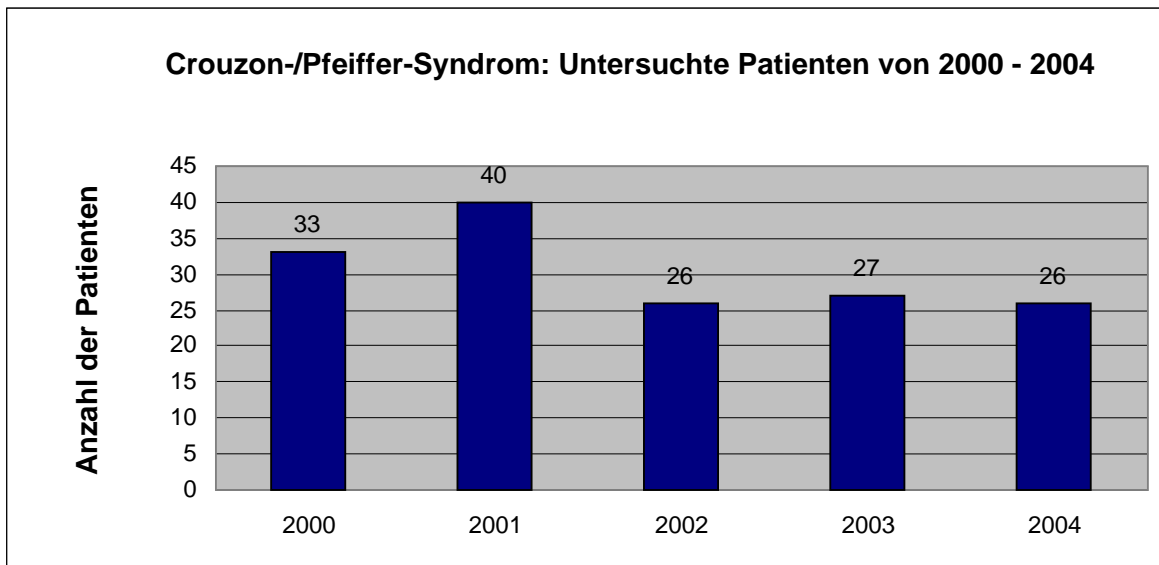


Abb. 24: Crouzon-/Pfeiffer-Syndrom: Anzahl aller untersuchter Patienten vom Zeitraum 2000-2004

Abbildung Nr. 25 veranschaulicht die prozentualen Anteile der positiven/negativen bzw. unklaren Testergebnisse bei der molekulargenetischen Diagnostik bei Verdacht auf Crouzon- bzw. Pfeiffer-Syndrom. In einfüntel der Fälle konnte die klinische Verdachtsdiagnose bestätigt werden.

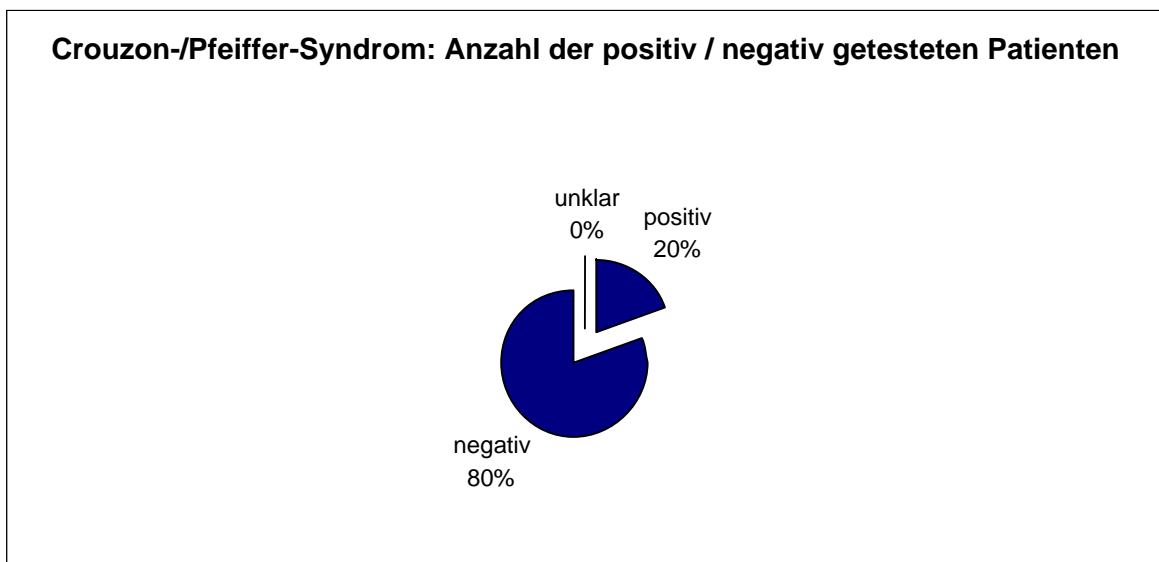


Abb. 25: Darstellung der Ergebnisse der molekulargenetischen Diagnostik aller auf das Crouzon-/Pfeiffer-Syndrom getesteter Patienten von 2000-2004

5.3.3 Muenke-Syndrom

Die Abbildung 26 zeigt den Überblick über alle Patienten, die im Zeitraum 2000 - 2004 im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg auf das Muenke-Syndrom untersucht worden sind. Im Jahr 2000 wurden 34 Patienten auf das Muenke-Syndrom untersucht, 2001 56 Patienten, 2002 46 Patienten, 2003 42 Patienten und im Jahr 2004 41 Patienten. Insgesamt wurden im Zeitraum 2000 - 2004 219 Patienten auf das Muenke-Syndrom getestet.

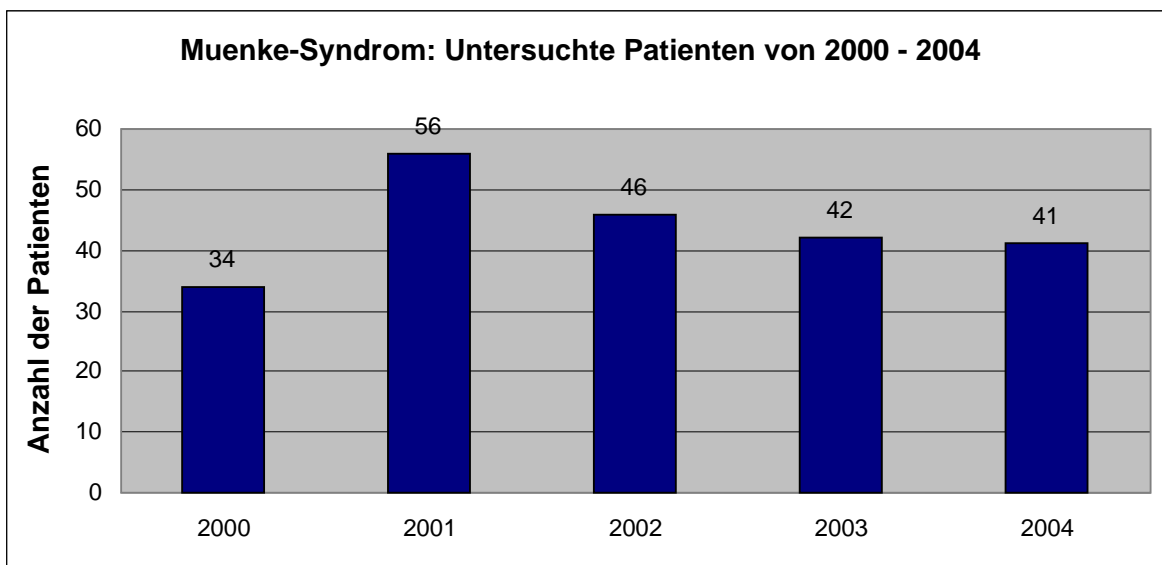


Abb. 26: Muenke-Syndrom: Anzahl aller untersuchter Patienten vom Zeitraum 2000-2004

Abbildung 27 zeigt die prozentualen Anteile der Untersuchungsergebnisse (positiv/negativ/unklar) bei der molekulargenetischen Diagnostik bei Verdacht auf ein Muenke-Syndrom. So konnte in 9% der Fälle die klinische Verdachtsdiagnose bestätigt werden.

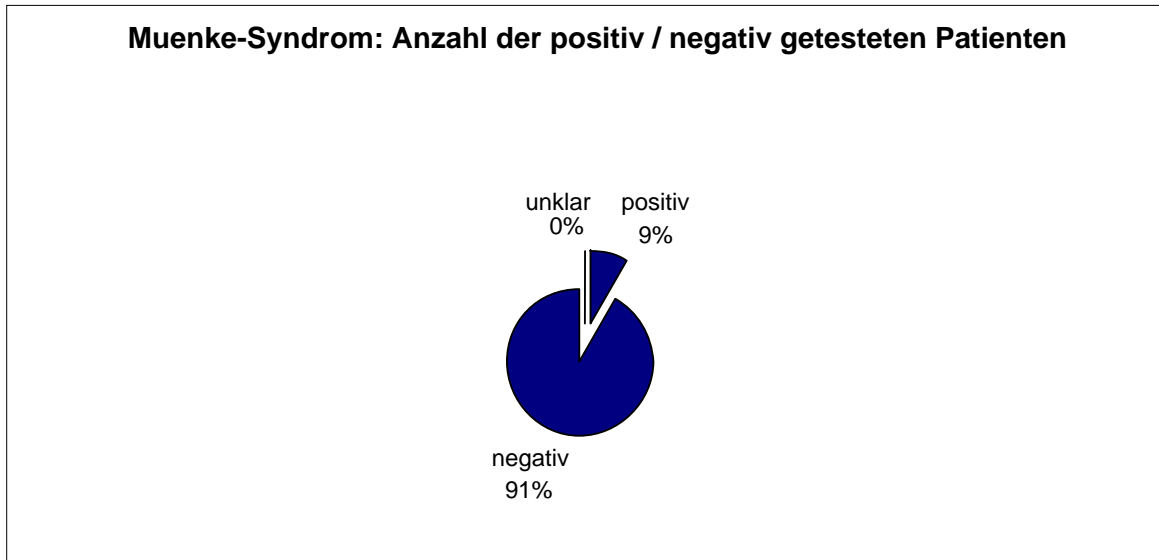


Abb. 27: Darstellung der Ergebnisse der molekulargenetischen Diagnostik aller auf das Muenke-Syndrom getesteter Patienten von 2000-2004

5.3.4 Saethre-Chatzen-Syndrom

Die Abbildung 28 zeigt den Überblick über alle Patienten, die im Zeitraum 2000 - 2004 im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, auf das Saethre-Chatzen-Syndrom untersucht worden sind.

Im Jahr 2000 wurden 25 Patienten auf das Saethre-Chatzen-Syndrom untersucht, 2001 46 Patienten, 2002 43 Patienten, 2003 43 Patienten und im Jahr 2004 waren es 23 Patienten. Insgesamt wurden im Zeitraum 2000 - 2004 180 Patienten auf das Saethre-Chatzen-Syndrom getestet.

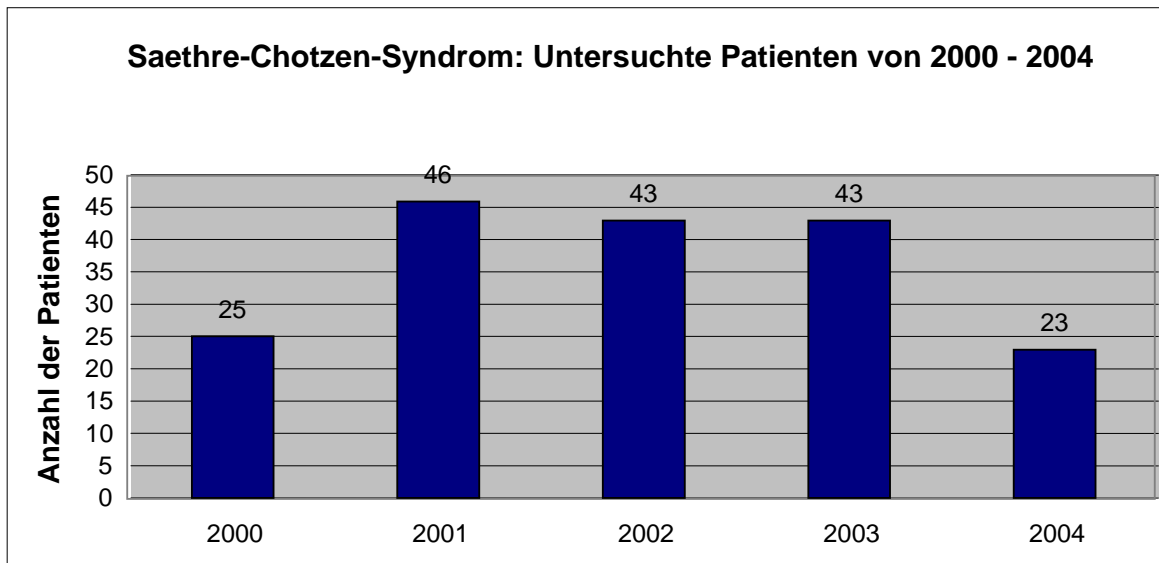


Abb. 28: Saethre-Chatzen-Syndrom: Anzahl aller untersuchter Patienten vom Zeitraum 2000-2004

Abbildung 29 zeigt die prozentualen Anteile der Untersuchungsergebnisse (positiv/negativ/unklar) bei der molekulargenetischen Diagnostik bei Verdacht auf ein Saethre-Chatzen-Syndrom.

In weniger als einfüntel der Fälle konnte die klinische Verdachtsdiagnose per Genanalyse bestätigt werden.

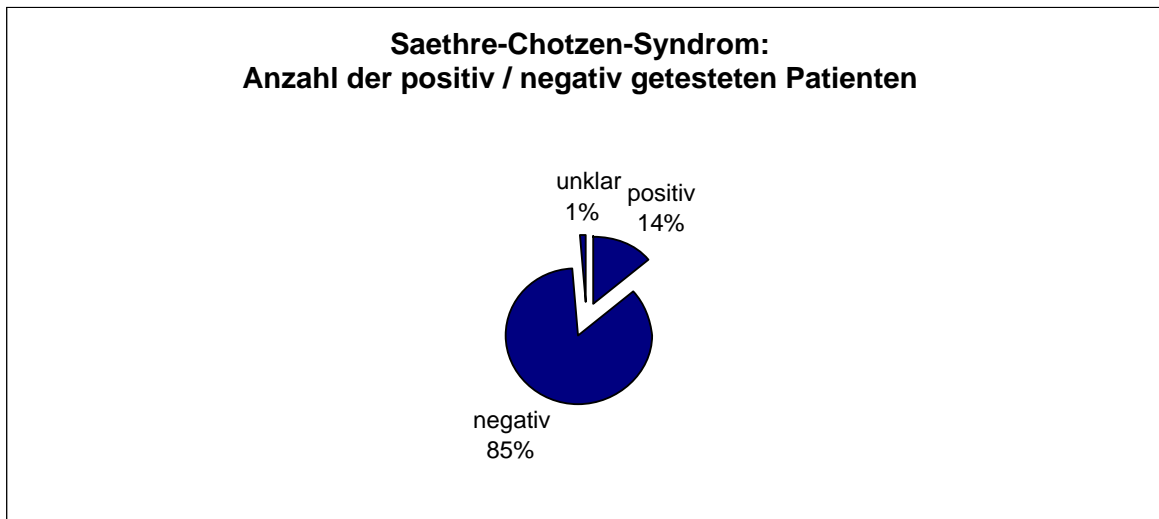


Abb. 29: Darstellung der Ergebnisse der molekulargenetischen Diagnostik aller auf das Saethre-Chatzen-Syndrom getesteter Patienten von 2000-2004

5.3.5 Achondroplasie

Die Abbildung 30 zeigt den Überblick über alle Patienten, die im Zeitraum 2000 - 2004 im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg auf Achondroplasie untersucht worden sind.

Im Jahr 2000 wurden 7 Patienten auf das Achondroplasie untersucht, 2001 4 Patienten, 2002 14 Patienten, 2003 15 Patienten und im Jahr 2004 waren es 8 Patienten. Insgesamt wurden im Zeitraum 2000 - 2004 48 Patienten auf das Achondroplasie getestet.

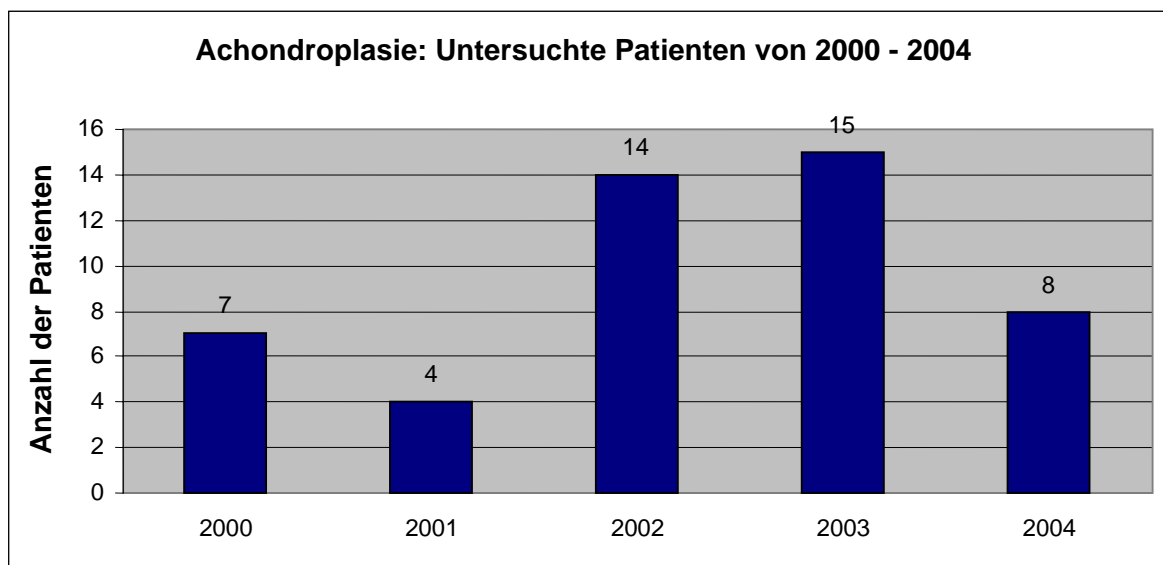


Abb. 30: Achondroplasie: Anzahl aller untersuchter Patienten vom Zeitraum 2000-2004

Ergebnisse

Abbildung 31 zeigt die prozentualen Anteile der Untersuchungsergebnisse (positiv/negativ/unklar) bei der molekulargenetischen Diagnostik bei Verdacht auf Achondroplasie.

In ein Drittel der Fälle konnte die klinische Verdachtsdiagnose per Genanalyse bestätigt werden.

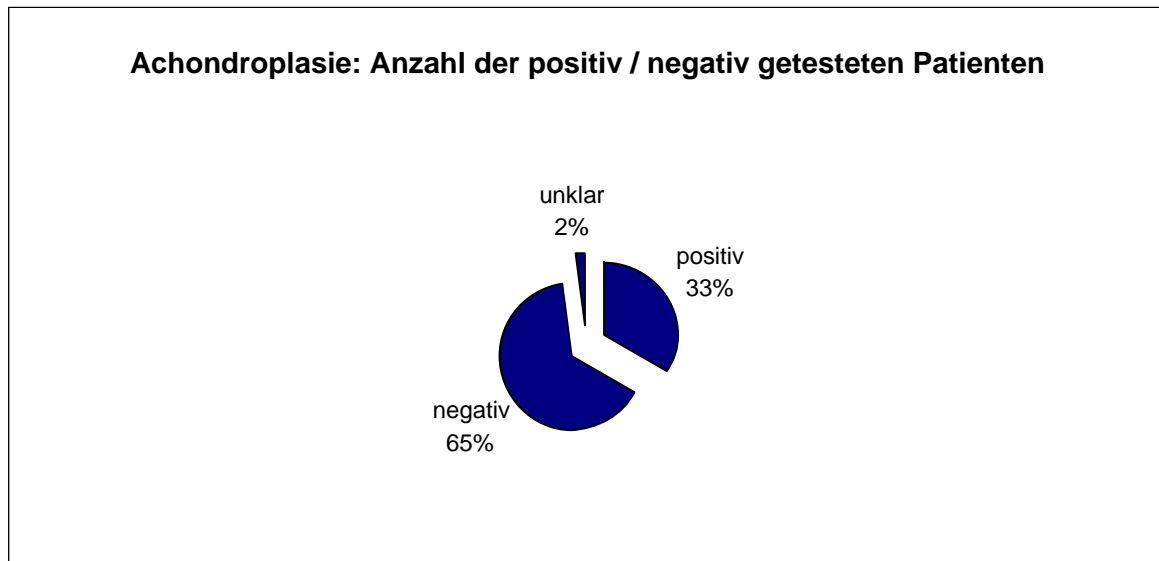


Abb. 31: Darstellung der Ergebnisse der molekulargenetischen Diagnostik aller auf Achondroplasie getesteter Patienten von 2000 -2004

5.3.6 Hypochondroplasie

Die Abbildung 32 zeigt den Überblick über alle Patienten, die im Zeitraum 2000 - 2004 im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg auf Hypochondroplasie untersucht worden sind.

Im Jahr 2000 wurden 9 Patienten auf das Hypochondroplasie untersucht, 2001 6 Patienten, 2002 11 Patienten, 2003 9 Patienten und im Jahr 2004 waren es 8 Patienten. Insgesamt wurden im Zeitraum 2000-2004 43 Patienten auf Hypochondroplasie getestet.

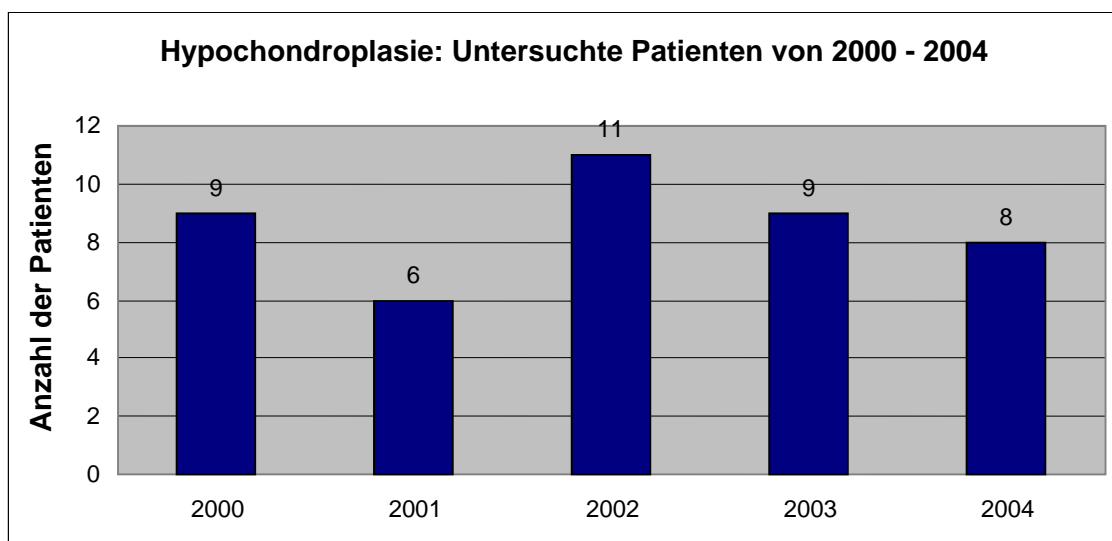


Abb. 32: Hypochondroplasie: Anzahl aller untersuchter Patienten vom Zeitraum 2000 - 2004

Ergebnisse

Abbildung 33 zeigt die prozentualen Anteile der Untersuchungsergebnisse (positiv/negativ/unklar) bei der molekulargenetischen Diagnostik bei Verdacht auf Hypochondropasie.

In weniger als einfüntel der Fälle konnte die klinische Verdachtsdiagnose per Genanalyse bestätigt werden.

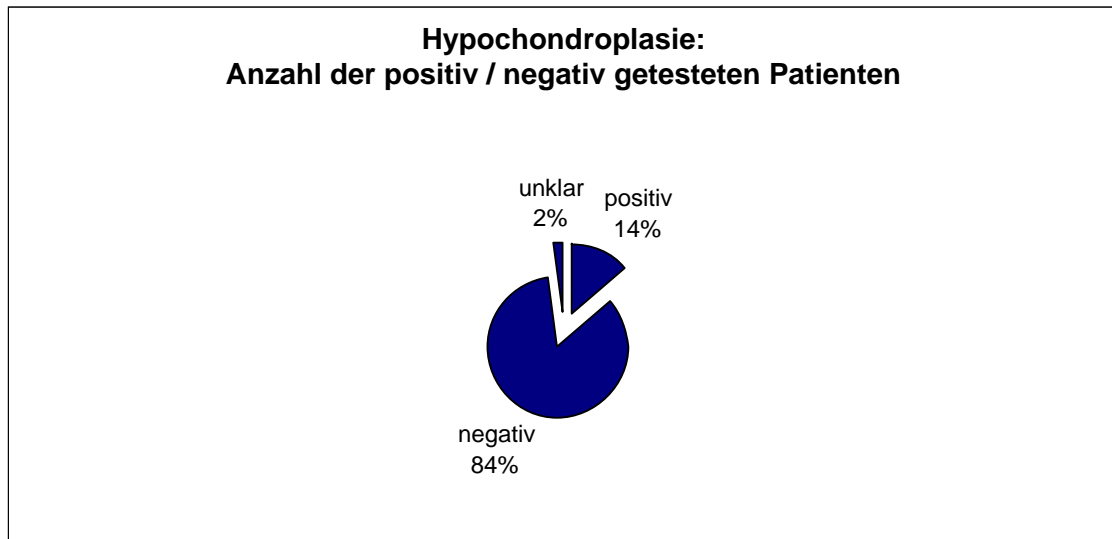


Abb. 33: Darstellung der Ergebnisse der molekulargenetischen Diagnostik aller auf Hypochondropasie getesteter Patienten von 2000 - 2004

5.4 Fünfjahresverlauf

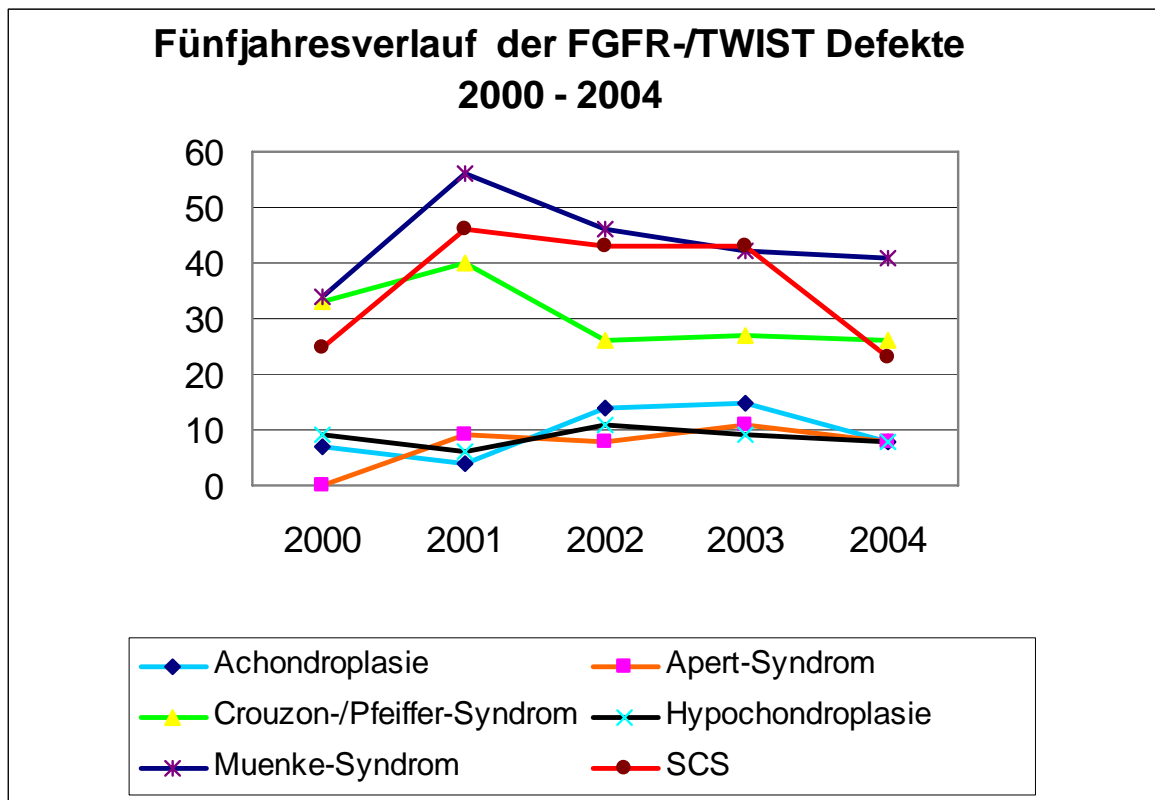


Abb. 34: Fünfjahresverlauf der FGFR-/TWIST-Defekte
SCS= Saethre-Chatzen-Syndrom

Abbildung 34 zeigt den Fünfjahresverlauf aller FGFR-/TWIST-Defekte die im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg molekulargenetisch untersucht werden.

Wie in Abbildung 34 erkennbar stieg die Anzahl der auf das Muenke-Syndrom getesteter Patienten von 2000 auf 2001 auf den Höchstwert von 56 Patienten/Jahr.

Danach hielt sich die Anzahl der untersuchten Patienten konstant bei um die 40 Patienten/Jahr.

Auch die Anzahl der Genanalysen auf das Saethre-Chatzen-Syndrom nahm von 2000 zu 2001 von 25 auf 46 Patienten/Jahr zu, blieb dann konstant bei Werten um die 43 - 46 Patienten/Jahr und sank 2004 wieder auf 23 Patienten/Jahr ab.

Die Anfragen zur Genanalytik hinsichtlich eines Crouzon-/Pfeiffer-Syndroms nahmen von 2000 zu 2001 zu.

Ergebnisse

Waren es im Jahr 2000 noch 33 Patienten/Jahr so wurden 2001 40 Patienten/ Jahr untersucht. In den darauf folgenden drei Jahren sank die Anzahl der Anfragen auf 26 bzw. 27 Patienten/Jahr ab.

Relativ konstant blieb die Anzahl der Anfragen nach molekulargenetischer Diagnostik hinsichtlich eines Apert-Syndroms sowie der Hypo-/Achondroplasie.

6. Diskussion

6.1 Eigene Daten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine retrospektive Analyse der zur molekulargenetischen Diagnostik zugewiesenen Indikationen im Fünfjahres-Zeitraum von 2000 bis 2004 am Institut für Humangenetik durchgeführt. Die Gesamtzahl der Zuweisungen wurde nach Indikationsstellung gruppiert und hinsichtlich der geographischen Verteilung der Einsender, der zeitlichen Fluktuationen sowie der positiven bzw. negativen Ergebnisse aufgeschlüsselt.

Der Fokus dieser Arbeit lag dabei auf der Krankheitsgruppe der durch FGFR-/TWIST-Defekte bedingten syndromalen Wachstumsstörungen. Mit einer Gesamtzahl von 714 untersuchten Patienten entspricht diese Gruppe einem Anteil von 6% der gesamten Zuweisungen in diesem Fünfjahreszeitraum.

Innerhalb dieser Krankheitsgruppe präsentiert sich das Muenke-Syndrom mit 33% das am häufigsten untersuchte Syndrom. An zweiter Stelle steht das Saethre-Chotzen-Syndrom, welches 27% des Patientenguts ausmacht. Am dritthäufigsten wurden mit 22% Patienten zur molekulargenetischen Abklärung eines Crouzon- bzw. Pfeiffer-Syndroms zugewiesen. Die genetische Abklärung eines Apert-Syndroms sowie einer Achondroplasie oder Hypochondroplasie machen zusammen lediglich ein Drittel der Zuweisungen unter der Indikationsstellung FGFR- bzw. TWIST-Defekte aus (vgl. Abb. 35)

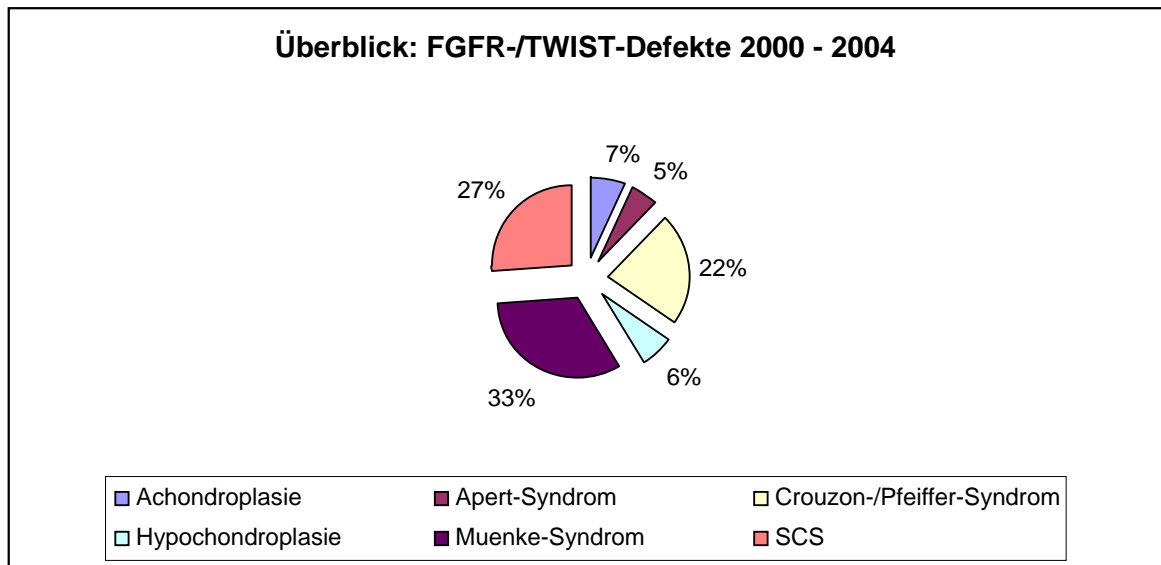


Abb. 35 : Prozentuale Verteilung der FGFR-/TWIST-Defekte

SCS = Saethre-Chatzen-Syndrom

Im Fünfjahresverlauf sind in Bezug auf die Anzahl der untersuchten Patienten kleinere Fluktuationen, jedoch keine exzeptionellen Anstiege oder Abfälle festzustellen. Die relativ stärkste Fluktuation zeigte sich bei der Indikation zur Bestätigung oder zum Ausschluss der Verdachtsdiagnose „Muenke-Syndrom“. Die Anzahl an untersuchten Patienten nahm von 34 Patienten im Jahr 2000 auf den Höchstwert von 56 Patienten im Jahr 2001 zu. In den darauf folgenden drei Jahren blieben die Anfragen auf eine Genanalyse hinsichtlich eines Muenke-Syndroms auf einem etwas niedrigeren Niveau relativ konstant (41 - 46 Patienten/Jahr).

Die zweitstärkste Schwankung an Patientenzahlen war beim Saethre-Chatzen-Syndrom zu beobachten. Auch hier stieg zunächst die Anzahl an untersuchten Patienten von 25 Patienten im Jahr 2000 auf 46 Patienten im Jahr 2001, verblieben dann konstant auf Werten zwischen 43 und 46 Patienten/Jahr, um dann im Jahr 2004 auf einen Tiefstwert von 23 Patienten/Jahr abzufallen.

Auch die Anfragen auf eine Genanalyse bei Verdacht auf ein Crouzon- bzw. Pfeiffer-Syndrom wiesen eine geringfügige Fluktuation auf. So stieg zunächst ebenfalls die Anzahl an untersuchten Patienten von 33 Patienten im Jahr 2000 auf 40 Patienten im Jahr 2001. Ab dem Jahre 2002 sank dann allerdings die Patientenzahl auf einen Wert von 26 Patienten/Jahr und blieb die folgenden zwei Jahre konstant auf diesem Niveau.

Sehr deutliche Unterschiede fanden sich hinsichtlich der Präzision der klinischen Verdachtsdiagnosen. Am häufigsten, nämlich in 67% der Zuweisungen, konnte die klinische Verdachtsdiagnose bei dem Apert-Syndrom durch eine molekulargenetische Untersuchung bestätigt werden. Bei den Genanalysen auf Achondroplasie bestätigte sich die klinische Verdachtsdiagnose in 33% der Fälle. Bei Verdacht auf ein Crouzon- bzw. Pfeiffer-Syndrom konnte der klinische Verdacht lediglich in 20% der Zuweisungen bestätigt werden.

Beim Muenke-Syndrom sowie dem Saethre-Chotzen-Syndrom und der Hypochondroplasie erwies sich die klinische Verdachtsdiagnose in weniger als 15% der Fälle als zutreffend. Diese Ergebnisse verdeutlichen die ausgeprägte phänotypische Variabilität die bei den einzelnen Erkrankungen besteht. Sie reflektieren vermutlich z. T. auch die unterschiedlichen Erfahrungswerte der überweisenden Ärzte, bzw. die klinischen Schwerpunktbildungen für die Gruppe der FGFR- und TWIST-Defekte.

Bei der geographischen Verteilung der einweisenden Ärzte aller Krankheitsgruppen steht Würzburg mit 19% aller zugewiesenen Patienten an erster Stelle, gefolgt von Bonn und München mit jeweils 7% und Frankfurt am Main und Berlin mit jeweils 6% aller zugewiesenen Patienten. Bei den einzelnen FGFR-/TWIST-Defekten stammen insgesamt 22% der zugewiesenen Patienten aus Würzburg selbst. Zweitwichtigstes Einsendegebiet mit 14% aller zugewiesenen Patienten ist der Großraum München. An dritter Stelle mit 7% steht das Klinikum Ansbach, gefolgt von Kliniken in Erfurt und Berlin mit jeweils 4% aller zugewiesenen Patienten.

6.2 Mutationsraten als Funktion des Alters – Der „paternal-age-effect“ beim Apert-Syndrom

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Häufigkeit von Punktmutationen mit dem zunehmenden Alter des Vaters ansteigt. Erklärt wird dies durch die Tatsache, dass sich männliche Keimbahnzellen auch bei zunehmendem Alter weiterhin teilen. Jede dieser Teilungen stellt ein geringfügiges Risiko zur Entstehung einer Fehlreplikation dar. Das Risiko eines Replikationsfehlers, der bei der Sequenzanalyse als Mutation erfasst wird, bewegt sich generell in den Größenordnungen von 10^7 bis 10^9 .

(NACHMAN et al. 2000; KONDRASHOV 2003). In einer kürzlichen Arbeit, in der die Veränderungen von Y-chromosomalen Sequenzen im Verläufe von 13 Generationen durch Direkt-Sequenzierung untersucht wurden, bewegte sich die Mutationsrate in der erwarteten Größenordnung von 10^8 (KONDRASHOV 2003).

Das Apert-Syndrom ist eine genetische Erkrankung der eine Spontanmutation speziell des paternalen FGFR2-Gens zugrunde liegt (Übersicht bei YOON et al. 2009).

MOLONEY und Mitarbeiter konnten den ausschließlich paternalen Ursprung der Apert-Mutationen bereits im Jahre 1996 anhand der Analyse von 57 Neumutationen in Apert-Familien nachweisen (MOLONEY et al. 1996). Eine überraschende Ergänzung der paternalen Mutationshypothese stellten GORIELY und Mitarbeiter im Jahre 2003 vor. Diese Autoren konnten experimentell zeigen, dass Mutationen des FGFR 2-Gens zwar geringfügig mit dem väterlichen Alter zunehmen, die mit dem paternalen Alter stark ansteigende Häufigkeit von Apert-Geburten jedoch offenbar auch dadurch zu erklären sind, dass die mutationstragenden Spermien bevorzugt zur Befruchtung kommen, also einen offensichtlichen Selektionsvorteil haben (GORIELY et al. 2003). In einer Folgearbeit konnte die Gruppe um GORIELY et al. im Jahre 2005 die wahrscheinliche Ursache des Selektionsvorteils plausibel machen. FGFR 2-Mutationen führen offenbar zu funktionellen Veränderungen der kodierten Genprodukte („gain of function“), welche die klonale Vermehrung der mutationstragenden Spermatogonien begünstigen (GORIELY et al. 2005).

In einer überaus interessanten Arbeit untersuchten CHOI und Mitarbeiter im Jahr 2008 Hodengewebe von älteren und jüngeren Spendern. Sie konnten zeigen, dass bei den älteren Spendern die Spontanmutationen nicht gleichmäßig verteilt im Hodengewebe vorkommen, sondern dass es bestimmte Foci gibt in denen die Mutationsrate drei- bis viermal höher ist als im restlichen Gewebe. Sie fanden heraus, dass bei den jüngeren Spendern die Mutationsrate geringer und die Foci kleiner waren als bei den älteren Spendern. Diese Ergebnisse bestätigen zwar die Beobachtung, dass die Häufigkeit der Mutationen mit zunehmendem Alter ansteigt. Gleichzeitig weisen diese Ergebnisse auf eine überraschende Heterogenität der Mutationsereignisse hin. CHOI et al. gehen davon aus, dass es sich bei diesen Foci nicht um so genannte „Mutations-Hot-Spots“ handelt, sondern dass vielmehr

ein Selektionsvorteil für premeiotische, mutationstragende Zellen die Focus-Bildung erklärt (CHOI et al. 2008).

Letztlich untersuchten YOON und Mitarbeiter im Jahr 2009 mittels PCR einzelne Spermien von über 300 nicht betroffenen Spendern unterschiedlichen Alters auf die zwei ursächlichen FGFR2-Mutationen des Apert-Syndroms. Sie konnten ebenfalls bestätigen, dass die Häufigkeit der Mutationen mit dem Alter des Spenders ansteigt, und dass dieser Anstieg mit der ansteigenden Inzidenz des Apert-Syndroms korreliert ist (siehe Abbildung 35). Der Anstieg der von YOON et al. beobachteten Mutationen war jedoch höher als er durch die Teilungsraten der männlichen Keimbahnzellen zu erwarten wäre. Auch dieses jüngste Ergebnis deutet daraufhin, dass die mutationstragenden, premeiotischen Zellen der männlichen Keimbahn einen Selektionsvorteil gegenüber den nicht mutierten Zellen haben (YOON et al. 2009).

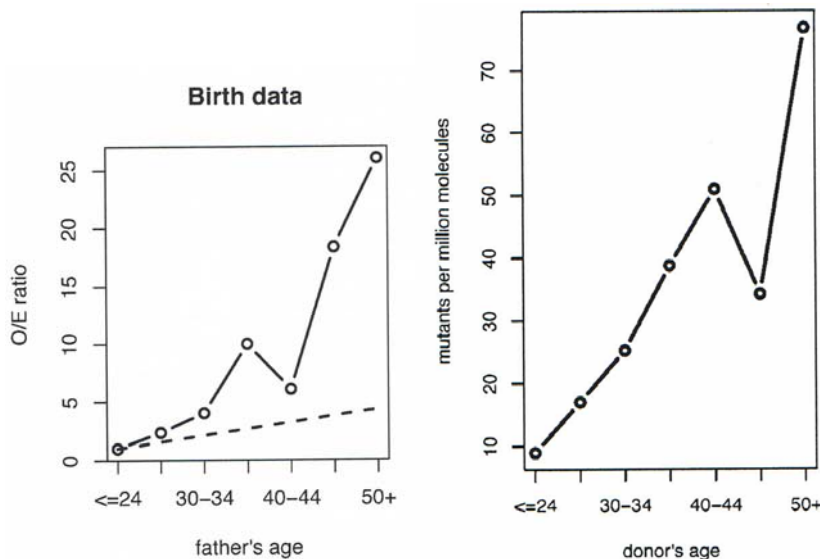


Abb. 36: Aus YOON et al. 2009 – The Ups and Downs of Mutation Frequencies during Aging Can Account for the Apert Syndrome Paternal Age Effect

Die Abbildung 36 aus der Arbeit von Yoon et al. zeigt im linken Teil den erwarteten Anstieg der mutationstragenden Spermien aufgrund der altersabhängigen Zahl der Keimbahnteilungen (gestrichelte Linie). Die durchgezogene Linie der linken Abbildung entspricht der Anzahl an beobachteten Geburten von Kindern mit Apert-Syndrom als Funktion des väterlichen Alters. Wie man deutlich sehen kann, verläuft diese Kurve sehr viel steiler.

In Übereinstimmung mit den früheren Arbeiten von GORIELY et al. (2003; 2005) interpretieren YOON et al. diesen steileren Anstieg als Folge des Selektionsvorteils der mutationstragenden premeiotischen Zellen der männlichen Keimbahn.

Der rechte Teil der Abbildung 35 zeigt die Anzahl der tatsächlich beobachteten Mutationen pro Millionen Moleküle als Funktion des paternalen Alters. Diese Ergebnisse belegen definitiv den aufgrund von theoretischen Überlegungen erwarteten Anstieg der Punktmutationen als Funktion des väterlichen Alters. (YOON et al. 2009). Somit ist davon auszugehen, dass der sogenannte „paternale Alterseffekt“ bezüglich Punktmutationen, welche sich als autosomal-dominante Fehlbildungen bzw. Entwicklungsstörungen manifestieren, auf eine Kombination von alterskorrelierter Mutationshäufigkeit und Selektionsvorteil mutationstragender Spermien zurückgehen.

6.3 Therapeutische Aspekte der FGFR-/TWIST-Defekte

Durch den frühzeitigen Verschluss einer oder mehrerer Schädelnähte können nicht nur ästhetische Probleme auftreten, sondern auch schwerwiegende funktionelle Schädigungen wie ein erhöhter Hirndruck, Seh- und Hörverluste. Deswegen ist eine rechtzeitige chirurgische Korrektur der prämaturnen Synostosen von großer Bedeutung. Sie sollte zwischen dem 4. und 6. Lebensmonat erfolgen. An der neurochirurgischen Universitätsklinik in Würzburg wird ein standardisiertes Osteotomieschema angewandt welches auf der Tongue-in-groove-Technik von TESSIER (1967) beruht und Teilaspekte des bilateralen frontoorbitalen Advancement von MARCHAC (1978) einschließt.

FLAPPER und Mitarbeiter publizierten im Jahre 2009 eine umfassende retrospektive Studie über die intellektuelle Entwicklung von Patienten mit Crouzon-, Pfeiffer- und Muenke-Syndrom. Über einen Zeitraum von 35 Jahren wurden in einem australischen Zentrum für kraniofaziale Fehlbildungen Patienten mit Crouzon-, Pfeiffer- und Muenke-Syndrom von der Geburt bis zur skelettalen Reife in regelmäßigen Abschnitten untersucht. Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag hierbei auf psychologischen und sozialen Aspekten.

FLAPPER et al. konnten zeigen, dass die chirurgisch behandelten Patienten generell gut entwickeln und auch einen höheren Bildungsweg einschlagen können.

Der Artikel verdeutlicht, wie wichtig regelmäßige Kontrollen sind um neu aufgetretene Probleme frühzeitig erkennen und rezidivierende Synostosen rechtzeitig behandeln zu können (FLAPPER et al. 2009).

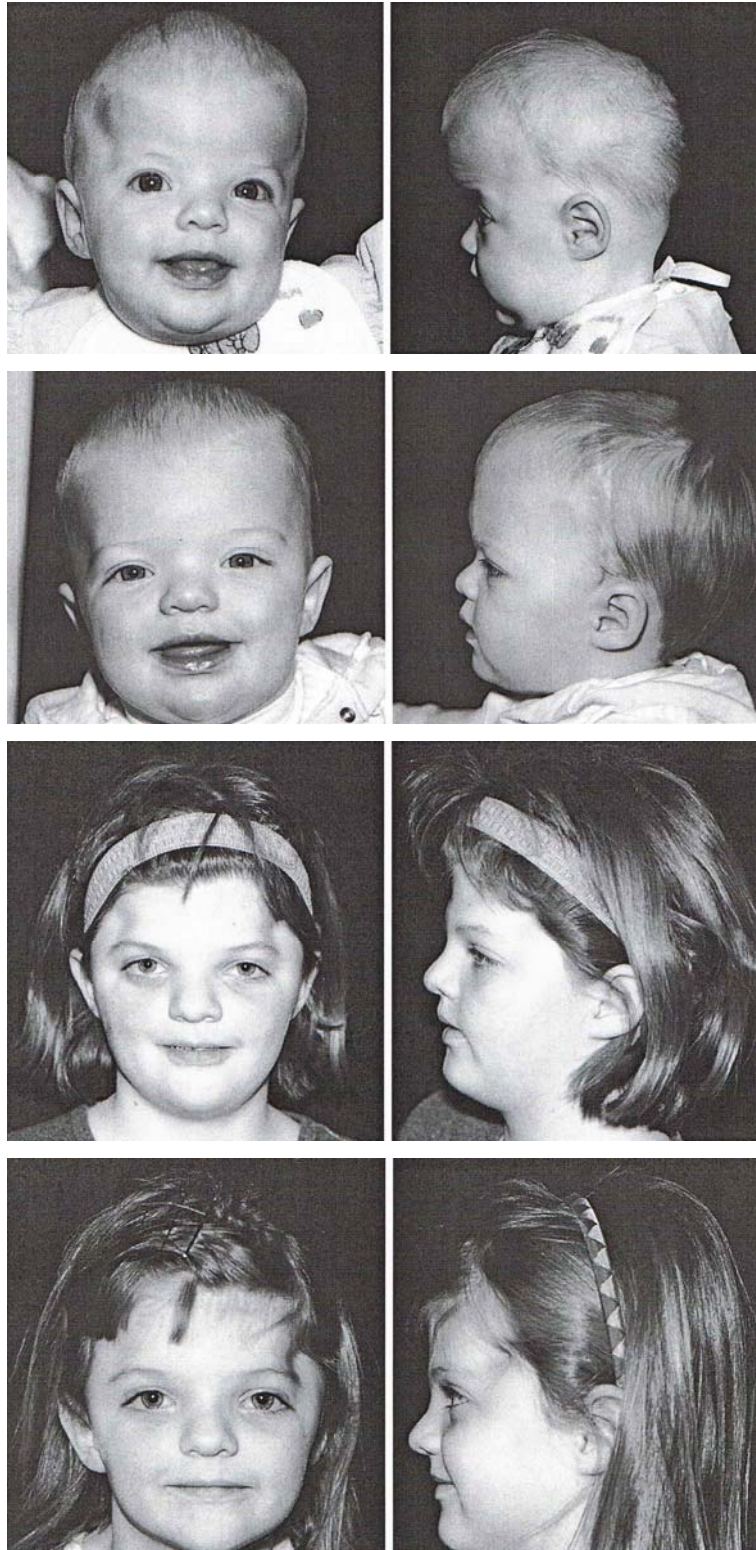
Speziell zum Muenke-Syndrom veröffentlichten HONNEBIER et al. im Jahre 2008 eine Studie, in der die natürliche Entwicklung und das kraniofaziale Wachstum bei Patienten die in der Kindheit operiert wurden, über einen langen Zeitraum beobachtet wurden.

Besondere Aufmerksamkeit galt dabei den postoperativen, funktionellen und ästhetischen Ergebnissen. In dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass u. a. auch geschlechtsabhängige Unterschiede in der Merkmalsausprägung bestehen, die sich vor allem bei männlichen Patienten mit uniconarer Synostose manifestieren.

Des Weiteren stellten HONNEBIER et al. fest, dass bei 43% der Patienten ein zweiter intrakranieller Eingriff nötig war um die rezidivierende supraorbitale Retrusion zu beseitigen. Es ist davon auszugehen, dass voraussichtlich alle Patienten schon aus ästhetischen Gründen im Laufe ihres Lebens einen zweiten oder sogar dritten extrakraniellen Eingriff benötigen, um die Kontur des Stirnbereiches zu verbessern. Bei keinem der entsprechend operierten und überwachten Patienten kam es zu einem erhöhten Hirndruck, trotz initial schwerwiegender Klinik. Signifikante Mittelgesichtshypoplasien konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Allerdings wiesen alle Patienten einen charakteristischen bilateralen, symmetrischen sensorischen Hörverlust der tiefen und mittleren Frequenzen auf.

Diskussion

Die folgende Abbildung 37 aus der Arbeit von HONNEBIER et al. zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf der Entwicklung des kraniofazialen Wachstums bei einem Kind mit bicoronarer Synostose, das in der frühen Kindheit operiert wurde.



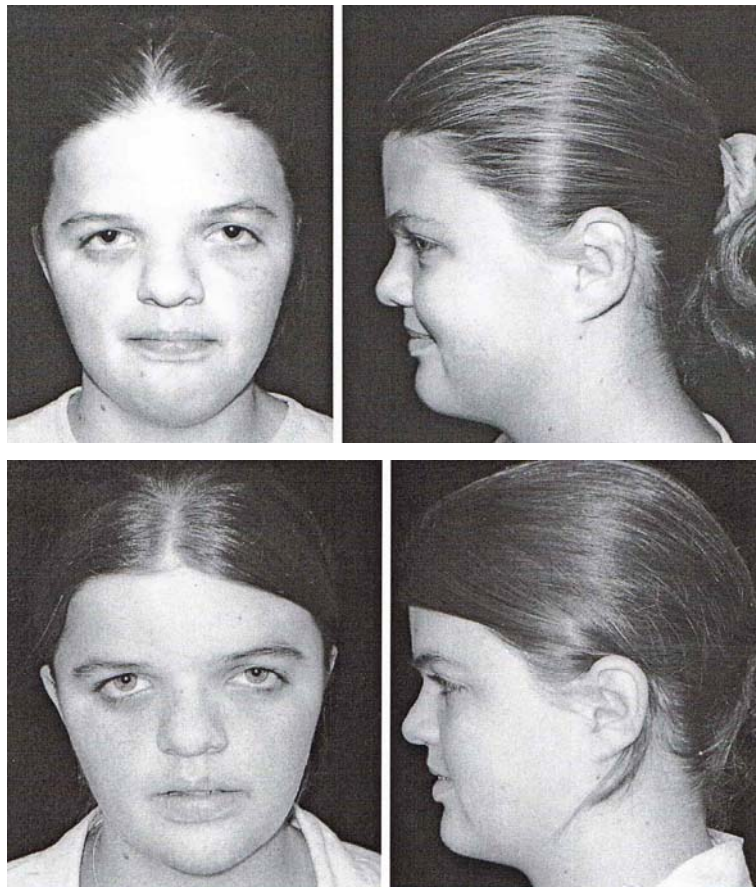


Abb. 37: Aus HONNEBIER e al. 2008 – The Natural History of Patients Treated for FGFR3-Associated (Muenke-Type) Craniosynostosis

Wegen der Hirndruckproblematik kommt der chirurgischen Behandlung beim Saethre-Chotzen Syndrom eine über die kosmetischen Aspekte hinausgehende Bedeutung zu. WOODS et al. publizierten 2009 eine Studie, in der Sie die chirurgischen Eingriffe bei Patienten mit Saethre-Chotzen-Syndrom evaluieren. Im Vordergrund stand dabei die Rate an Zweitoperationen bei erhöhtem Hirndruck. Das Patientengut bestand aus allen Patienten mit Auffälligkeiten im TWIST 1-Gen, die im kraniofazialen Zentrum in Oxford im Zeitraum von 15 Jahren untersucht wurden. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei den chirurgischen Interventionen und den Spätfolgen. WOODS et al. konnten feststellen, dass Patienten mit Saethre-Chotzen-Syndrom trotz der primär durchgeführten chirurgischen Korrektur eine hohe Rate (35-42%) an Zweitoperationen aufweisen, der Notwendigkeit durch rezidivierende Anstiege der intrakraniellen Druckverhältnisse gegeben war.

In diesem Zusammenhang betonen die Autoren, dass alle Patienten mit Synostosen und Merkmalen eines Syndroms auf TWIST 1-Mutationen gescreent werden sollten, da TWIST-1 positive Patienten ein höheres Hirndruck-Risiko als Patienten mit nicht-syndromalen Synostosen haben. Regelmäßige Kontrollen während der Kindheit seien unbedingt erforderlich (WOODS et al. 2009).

6.4 Differentialdiagnostische Aspekte - das Muenke-Syndrom und das Saethre-Chatzen-Syndrom im Vergleich

Wegen der ausgeprägten phänotypischen Variabilität der Kraniosynostose-Syndrome setzt die optimale Versorgung dieser Patienten eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit voraus. In Würzburg waren an dieser engen Zusammenarbeit unter Leitung der Abteilung für pädiatrische Neurochirurgie der Neurochirurgischen Klinik insbesondere die Klinik für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie, die Kinderklinik, die Augenklinik, das Institut für Röntgendiagnostik sowie das Institut für Humangenetik beteiligt. Eine Vielzahl von Publikationen auf dem Gebiet der Wachstumsstörungen im Kopf-Schädelbereich sind aus dieser interdisziplinären Zusammenarbeit hervorgegangen. Beispielfhaft seien hier nur einige dieser interdisziplinären Arbeiten genannt: über die Trigonozehalie (COLLMANN et al, 1996), über eine ungewöhnliche FGFR1 Mutation bei einer Patientin mit nicht-syndromaler Trigonozehalie (KRESS et al, 2000a) über das Mutationsspektrum bei FGFR2-assoziierten Kraniosynostosen (KRESS et al, 2000b), über die standardisierte Evaluation und Dokumentation der klinischen Befunde bei Kraniosynostose-Patienten (JÜNGER et al, 2001), über die Skelettanomalien bei Patienten mit Saethre-Chatzen- und Muenke-Syndromen (TRUSEN et al, 2003), über Hydrozehalie-Bildung und Therapie bei Kraniosynostose-Syndromen (COLLMANN et al, 2005).

Eine weitere exemplarische Arbeit, welche nur auf dem Hintergrund enger interdisziplinärer Zusammenarbeit entstehen konnte, wurde im Jahre 2006 von der Würzburger Arbeitsgruppe veröffentlicht (Kress et al, 2006). Es handelt sich um eine Studie, die zum Ziel hatte, verschiedene phänotypische und funktionelle Merkmale bei Patienten mit Saethre-Chatzen-Syndrom und Muenke-Syndrom herauszuarbeiten, um diese

anhand der unterschiedlichen Merkmale klinisch voneinander abgrenzen zu können (KRESS et al. 2006). Es gelang den Autoren, spezifische Merkmale für das jeweilige Syndrom herauszuarbeiten. So konnten das klassische Saethre-Chatzen-Syndrom, basierend auf einer TWIST 1-Mutation, phänotypisch anhand folgender Merkmale vom Muenke-Syndrom abgegrenzt werden:“ tief liegender frontaler Haaransatz, Ptosis, auffällige Ohrlänge, erweiterte Parietalforamina, interdigitale Weichteilfusionen, Hallux valgus oder breite Großzehen mit gespaltenen distalen Phalangen.“ Noch deutlicher zeigten sich jedoch die funktionellen Unterschiede zwischen den beiden, klinisch sehr ähnlichen Syndromen. Charakteristisch für das Saethre-Chatzen-Syndrom ist ein erhöhter Hirndruck, hervorgerufen durch eine früh fortschreitende Verknöcherung der Suturen, während mit dem Muenke-Syndrom eine primäre mentale Retardierung und ein sensorischer Hörverlust assoziiert sind (KRESS et al. 2006).

Die folgende Tabelle (Tab. 2) aus der Arbeit von KRESS et al. (2006) fasst die wesentlichen Unterschiede zwischen dem Saethre-Chatzen Syndrom (TWIST-1 Mutation) und dem Muenke-Syndrom (FGFR3-Mutation) zusammen.

	<i>TWIST mutation</i> (n = 71)	<i>FGFR3, Pro250Arg</i> (n = 42)
<i>Progressive synostosis</i>	82 (51)	20 (30)
<i>Intracranial hypertension confirmed</i>	35 (68)	0 (39)
Mental retardation (age > 4 yrs)	5 (58)	35 (34)
Subnormal ear length	43 (63)	0 (37)
Sensorineural hearing deficit	0 (60)	34 (32)
Enlarged parietal foramina	55 (58)	0 (37)
Cutaneous syndactyly dig. 2/3	52 (69)	0 (42)
Bifid great toe (X-ray)	44 (43)	0 (20)

Tab. 2: Aus KRESS et al. 2006 – Saethre-Chatzen syndrome caused by TWIST1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome

6.5 Aspekte der pränatalen Diagnostik der Achondroplasie

Die Achondroplasie gehört mit zu den häufigsten Formen des kurzgliedrigen Kleinwuchses beim Menschen. Umso wichtiger ist eine frühzeitige Erkennung dieser Entwicklungsstörung, welche bereits pränatal durch die Sonographie erkannt werden kann. BOULET und Mitarbeiter veröffentlichten im April 2009 eine Studie, in der Sie zwei neue sonographische Merkmale für die pränatale Diagnostik der Achondroplasie beschreiben. Normalerweise fallen die Feten bei dem Routine-Ultraschall im dritten Trimenon der Schwangerschaft durch sehr kurze Röhrenknochen auf. Bei betroffenen Feten liegen die Messwerte der langen Röhrenknochen meist unterhalb der dritten Perzentile für das jeweilige Schwangerschaftsalter. Kopf- und Abdomenwerte können normal sein, sind jedoch häufig vergrößert. Bei diesen Merkmalen handelt es sich jedoch um relativ unspezifische Zeichen, („soft markers“) sodass der Goldstandard der Diagnostik weiterhin die DNA-Analyse darstellt. Bei den von BOULET et al. beschriebenen neuen sonographischen Merkmalen handelt es sich um Auffälligkeiten des proximalen Femurs.

Die Autoren konnten beobachten, dass bei betroffenen Feten

1. die Grenzfläche zwischen Metaphyse und Epiphyse, die normalerweise leicht konvex ist, sich viel abgerundeter darstellt, und dass
2. der Winkel zur Diaphyse viel größer ist als normal.

Bei 653 gesunden Feten erschien die proximale Femurmetaphyse unauffällig, was auf eine hohe Spezifität der zwei Merkmale hindeutet (BOULET et al. 2009).

6.6 Bedeutung der molekulargenetischen Bestätigung / Ausschluss der klinischen Verdachtsdiagnose bei FGFR- bzw- TWIST-Defekten

Auch wenn, wie an den vorhergehenden Beispielen gezeigt, die bildgebenden Verfahren einschließlich vorgeburtlicher Sonographie zur klinischen Verdachtsdiagnose einer isolierten oder syndromalen Wachstumsstörung beitragen können, beruht die Bestätigung der Art und Ursache einer Störung auf dem Ergebnis der Mutationsanalyse. Eine definitive Bestätigung ist jedoch nur beim positiven Nachweis einer Genveränderung möglich. Ist das Ergebnis der molekulargenetischen Untersuchung negativ, d. h. lässt sich in dem untersuchten Gen keine krankheitsbedingende Genveränderung nachweisen, so bleibt die Möglichkeit einer ursächlichen, jedoch mit den gegenwärtigen Analyse-Methoden nicht erfassbaren Genveränderung bestehen. Darüberhinaus besteht bei den phänotypisch zumeist sehr variablen Entwicklungsstörungen im Bereich der FGFR- bzw. TWIST-1 Defekte jedoch auch die Möglichkeit von sogenannten „Phänokopien“, deren Entstehung nicht zwangsläufig mit genetischen, sondern ebenso mit externe Faktoren (z.B. intrauterine Exposition gegenüber infektiösen bzw. teratogenen Substanzen und Agenzien) zusammenhängen können.

Als behandelnder Arzt sollte man sich daher der Limitationen der molekulargenetischen Analyse bewusst sein und gegebenenfalls externe Faktoren in seine differentialdiagnostischen Erwägungen einbeziehen.

7. Zusammenfassung

Im Zeitraum 2000 - 2004 wurden dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg insgesamt 12.049 Patienten zur molekulargenetischen Diagnostik zugewiesen.

Anforderungen zum Ausschluss von FGFR-/TWIST-Defekten machen hierbei 6% des gesamten Patientenguts aus (714 untersuchte Patienten).

Innerhalb der Krankheitsgruppe der FGFR-/TWIST-Defekte steht die molekulargenetische Bestätigung bzw. der Ausschluss eines Muenke-Syndroms mit 219 Patienten im Zeitraum 2000-2004 an erster Stelle.

An zweiter Stelle folgt das Saethre-Chatzen-Syndrom mit 180 untersuchten Patienten.

Am dritthäufigsten wurden Anfragen zur molekulargenetischen Diagnostik bei Verdacht auf ein Crouzon-/bzw. Pfeiffer-Syndrom (152 Patienten) gestellt.

Die Zahl der Anforderungen blieb im Fünfjahresverlauf relativ konstant, d. h. es gab in Bezug auf die Anzahl der untersuchten Patienten/Jahr nur geringfügige Fluktuationen. Die Anforderungen einer molekulargenetischen Diagnostik bei klinischem Verdacht auf FGFR-/TWIST- Defekte kamen schwerpunktmäßig aus Würzburg, München, Ansbach, Erfurt und Berlin.

Am häufigsten konnte die klinische Verdachtsdiagnose beim Apert-Syndrom durch den Mutationsnachweis im FGFR2-Gen bestätigt werden (in 67% der Fälle).

An zweiter Stelle, d. h. in 33% der Fälle, konnte durch die molekulargenetische Diagnostik des FGFR3-Gens die Verdachtsdiagnose der Achondroplasie bestätigt werden.

Am dritthäufigsten, d.h. in 20% der Fälle konnten die Genanalysen die Verdachtsdiagnose Crouzon-/bzw. Pfeiffer-Syndrom bestätigen.

Die größten differentialdiagnostischen Schwierigkeiten bestehen klinischerseits offenbar beim Muenke-Syndrom (FGFR3) sowie beim Saethre-Chatzen-Syndrom (TWIST1) und der Hypochondroplasie (FGFR3). Bei diesen Entitäten konnte die klinische Verdachtsdiagnose lediglich in weniger als 15% der Fälle auf der molekulargenetischen Ebene bestätigt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die ausgeprägte phänotypische

Variabilität die bei den einzelnen Erkrankungen besteht. Die molekulargenetische Bestätigung bzw. der Ausschluss der klinischen Verdachtsdiagnose bildet die Grundlage für Prognose und Therapie der Patienten. Dies wird insbesondere hinsichtlich der Implikationen der molekulargenetischen Differenzierung zwischen den phänotypisch ähnlichen Kraniosynostose-Syndromen (Saethre-Chotzen vs. Muenke) deutlich.

Z. B. kennzeichnen progressive multisuturale Fusionen das Saethre-Chotzen-, nicht jedoch das Muenke-Syndrom. Wegen des hohen Risikos einer rekurrenten intrakraniellen Hypertension benötigen SCS-Patienten im Kindesalter eine regelmäßige Kontrolle.

8. Summary

During a five year time period (2000 - 2004) the Department of Human and Medical Genetics at the University of Wurzburg School of Medicine received a total of 12.049 requests for molecular genetic investigations of a variety of inherited conditions. The group of patients requiring exclusion and/or confirmation of defects in the FGFR- and TWIST genes amounted to 6% of the total requests (714 patients). The most frequent requests for mutation analysis involved patients with the clinical suspicion of Muenke-syndrome (219 patients), followed by patients thought to be affected by the Saethre-Chotzen syndrome (180 patients). Third in frequency were patients in whom the clinicians requested the exclusion and/or confirmation of the Crouzon and Pfeiffer syndromes (152 patients). The number of requests remained quite constant throughout the five year period, with only minor fluctuations. Most of the requests originated from clinical centres in Wurzburg, Munich, Ansbach, Erfurt and Berlin. In terms of the molecular confirmation of the clinical diagnosis, the Apert-syndrome ranked first with 67% of cases confirmed by mutation analysis. In contrast, the growth disorder achondroplasia could be confirmed at the molecular level in only 33% of the referrals. This figure was even lower (around 20%) for the clinical suspicion of the Crouzon and/or Pfeiffer syndromes. With only 15% positive results of the mutation analysis Muenke and Saethre-Chotzen syndromes ranked last. These relative low yields of patients who proved positive for the respective mutations reflect the difficulties with regard to differential diagnosis of phenotypically overlapping and highly variable clinical conditions. Exclusion and/or confirmation of a molecular defect in one of the disease causing genes therefore is the starting point for the optimal clinical management of these patients. This is illustrated by the comparison between syndromes with overlapping clinical features, such as the Saethre-Chotzen and the Muenke syndromes: whereas progressive multisutural fusions (with a high risk of recurrence after surgical intervention) characterize the variable TWIST1 mutations causing Saethre-Chotzen syndrome, the Pro250Arg substitution in FGFR3 underlying the Muenke syndrome leads to mental delay and sensorineural hearing loss rather than intracranial hypertension. Because of the high risk of recurrent intracranial hypertension, Saethre-Chotzen patients require close follow-ups during their childhood years.

9. Literaturverzeichnis

Apert, E. (1906): De l'acrocéphalosyndactylie. Bull Mem Soc Med Hop Paris 23: 1310 - 1330

Almeida, M. R.; Campos-Xavier, A. B.; Medeira, A.; Cordeiro, I.; Sousa, A. B.; Lima, M. et al. (2009): Clinical and molecular diagnosis of the skeletal dysplasias associated with mutations in the gene encoding Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) in Portugal. In: Clinical genetics, Jg. 75, H. 2, S. 150–156.

Bellus, G. A.; Gaudenz, K.; Zackai, E. H.; Clarke, L. A.; Szabo, J.; Francomano, C. A.; Muenke, M. (1996): Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. In: Nature genetics, Jg. 14, H. 2, S. 174–176.

Bellus, G. A.; McIntosh, I.; Smith, E. A.; Aylsworth, A. S.; Kaitila, I.; Horton, W. A. et al. (1995): A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. In: Nature genetics, Jg. 10, H. 3, S. 357–359.

Blank, C. E. (1960): Apert's syndrome (a type of acrocephalosyndactyly)-observations on a British series of thirty-nine cases. In: Annals of human genetics, Jg. 24, S. 151–164.

Böcker, Werner (Hg.) (2008): Repetitorium Pathologie. Mit 184 Tabellen. 2., vollst. überarb. Aufl. München, Jena: Elsevier Urban & Fischer.

Bonaventure, J.; Rousseau, F.; Legeai-Mallet, L.; Le, Merrer M.; Munnich, A.; Maroteaux, P. (1996): Common mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3) gene account for achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dwarfism. In: American journal of medical genetics, Jg. 63, H. 1, S. 148–154.

Boulet, S.; Althuser, M.; Nugues, F.; Schaal, J. P.; Jouk, P. S. (2009): Prenatal diagnosis of achondroplasia: new specific signs. In: Prenatal diagnosis, Jg. 29, H. 7, S. 697–702.

Brueton, L. A.; van, Herwerden L.; Chotai, K. A.; Winter, R. M. (1992): The mapping of a gene for craniosynostosis: evidence for linkage of the Saethre-Chotzen syndrome to distal chromosome 7p. In: Journal of medical genetics, Jg. 29, H. 10, S. 681–685.

Cai, J.; Goodman, B. K.; Patel, A. S.; Mulliken, J. B.; Van, Maldergem L.; Hoganson, G. E. et al. (2003): Increased risk for developmental delay in Saethre-Chotzen syndrome is associated with TWIST deletions: an improved strategy for TWIST mutation screening. In: Human genetics, Jg. 114, H. 1, S. 68–76.

Choi, S. K.; Yoon, S. R.; Calabrese, P.; Arnheim, N. (2008): A germ-line-selective advantage rather than an increased mutation rate can explain some unexpectedly common human disease mutations. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 105, H. 29, S. 10143–10148.

Chotzen, F. (1932): Eine eigenartige familiaere Entwicklungsstoerung (Akrocephalosyndaktilie, Dysostosis craniofacialis und Hypertelorismus). Mschr Kinderheilk 55, 270

- Cohen, M. M., JR (1993): Pfeiffer syndrome update, clinical subtypes, and guidelines for differential diagnosis. In: American journal of medical genetics, Jg. 45, H. 3, S. 300–307.
- Cohen, M. M., JR (2005): Editorial: perspectives on craniosynostosis. In: American journal of medical genetics, Jg. 136A, H. 4, S. 313–326.
- Cohen, M. M., JR; Kreiborg, S. (1992): Birth prevalence studies of the Crouzon syndrome: comparison of direct and indirect methods. In: Clinical genetics, Jg. 41, H. 1, S. 12–15.
- Cohen, M. M., JR; Kreiborg, S.; Lammer, E. J.; Cordero, J. F.; Mastroiacovo, P.; Erickson, J. D. et al. (1992): Birth prevalence study of the Apert syndrome. In: American journal of medical genetics, Jg. 42, H. 5, S. 655–659.
- Collmann H, Sörensen N, Krauss J: Consensus trigonocephaly (1996) Childs Nerv Syst 12: 664-8
- Collmann H, Sörensen N, Krauss J (2005) Hydrocephalus in craniosynostosis: a review. Childs Nerv Syst 21:902-12
- Connerney, J.; Andreeva, V.; Leshem, Y.; Muentener, C.; Mercado, M. A.; Spicer, D. B. (2006): Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. In: Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, Jg. 235, H. 5, S. 1345–1357.
- Crouzon, O. (1912): Dysostose cranio-faciale hereditaire. Bull Mem Soc Med Hop Paris 33, 545
- Cunningham, M. L.; Seto, M. L.; Ratisoontorn, C.; Heike, C. L.; Hing, A. V. (2007): Syndromic craniosynostosis: from history to hydrogen bonds. In: Orthodontics & craniofacial research, Jg. 10, H. 2, S. 67–81.
- Deng, C.; Wynshaw-Boris, A.; Zhou, F.; Kuo, A.; Leder, P. (1996): Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. In: Cell, Jg. 84, H. 6, S. 911–921.
- Denk, H.; Heitz, Philipp Ulrich (1997): Pathologie. Mit 154 zweifarb. Tabellen. Böcker, Werner (Hg.). München: Urban & Schwarzenberg.
- Dodge, H. W., JR; Wood, M. W.; Kennedy, R. L. (1959): Craniofacial dysostosis: Crouzon's disease. In: Pediatrics, Jg. 23, H. 1 Part 1, S. 98–106.
- El, Ghouzzi V.; Lajeunie, E.; Le, Merrer M.; Cormier-Daire, V.; Renier, D.; Munnich, A.; Bonaventure, J. (1999): Mutations within or upstream of the basic helix-loop-helix domain of the TWIST gene are specific to Saethre-Chatzen syndrome. In: European journal of human genetics: EJHG, Jg. 7, H. 1, S. 27–33.
- El, Ghouzzi V.; Le, Merrer M.; Perrin-Schmitt, F.; Lajeunie, E.; Benit, P.; Renier, D. et al. (1997): Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chatzen syndrome. In: Nature genetics, Jg. 15, H. 1, S. 42–46.
- Flapper, W. J.; Anderson, P. J.; Roberts, R. M.; David, D. J. (2009): Intellectual outcomes following protocol management in Crouzon, Pfeiffer, and Muenke syndromes. In: The Journal of craniofacial surgery, Jg. 20, H. 4, S. 1252–1255.
- Flippen, J. H., JR (1950): Cranio-facial dysostosis of Crouzon; report of a case in which the malformation occurred in four generations. In: Pediatrics, Jg. 5, H. 1, S. 90-6, illust.

- Glasgow, J. F.; Nevin, N. C.; Thomas, P. S. (1978): Hypochondroplasia. In: Archives of disease in childhood, Jg. 53, H. 11, S. 868–872.
- Golla, A.; Lichmer, P.; von, Gernet S.; Winterpacht, A.; Fairley, J.; Murken, J.; Schuffenhauer, S. (1997): Phenotypic expression of the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation P250R in a large craniosynostosis family. In: Journal of medical genetics, Jg. 34, H. 8, S. 683–684.
- Goriely, A.; McVean, G. A.; Am van, Pelt; O'Rourke, A. W.; Wall, S. A.; de, Rooij D. G.; Wilkie, A. O. (2005): Gain-of-function amino acid substitutions drive positive selection of FGFR2 mutations in human spermatogonia. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 102, H. 17, S. 6051–6056.
- Goriely, A.; McVean, G. A.; Am van, Pelt; O'Rourke, A. W.; Wall, S. A.; de, Rooij D. G.; Wilkie, A. O. (2005): Gain-of-function amino acid substitutions drive positive selection of FGFR2 mutations in human spermatogonia. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 102, H. 17, S. 6051–6056.
- Goriely, A.; McVean, G. A.; Rojmyr, M.; Ingemarsson, B.; Wilkie, A. O. (2003): Evidence for selective advantage of pathogenic FGFR2 mutations in the male germ line. In: Science (New York, N, Jg. 301, H. 5633, S. 643–646.
- Graham, J. M., JR; Braddock, S. R.; Mortier, G. R.; Lachman, R.; Van, Dop C.; Jabs, E. W. (1998): Syndrome of coronal craniosynostosis with brachydactyly and carpal/tarsal coalition due to Pro250Arg mutation in FGFR3 gene. In: American journal of medical genetics, Jg. 77, H. 4, S. 322–329.
- Grimm, T.; Kress, W. (1996): Zur Genetik der Kraniosynostosen. Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir 20, 174 - 177
- Hecht, J. T.; Thompson, N. M.; Weir, T.; Patchell, L.; Horton, W. A. (1991): Cognitive and motor skills in achondroplastic infants: neurologic and respiratory correlates. In: American journal of medical genetics, Jg. 41, H. 2, S. 208–211.
- Hehr, U.; Muenke, M. (1999): Craniosynostosis syndromes: from genes to premature fusion of skull bones. In: Molecular genetics and metabolism, Jg. 68, H. 2, S. 139–151.
- Heldin, C. H. (1995): Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. In: Cell, Jg. 80, H. 2, S. 213–223.
- Honnebier, M. B.; Cabling, D. S.; Hetlinger, M.; McDonald-McGinn, D. M.; Zackai, E. H.; Bartlett, S. P. (2008): The natural history of patients treated for FGFR3-associated (Muenke-type) craniosynostosis. In: Plastic and reconstructive surgery, Jg. 121, H. 3, S. 919–931.
- Horton, W. A. (2006): Recent milestones in achondroplasia research. In: American journal of medical genetics, Jg. 140, H. 2, S. 166–169.
- Howard, T. D.; Paznekas, W. A.; Green, E. D.; Chiang, L. C.; Ma, N.; Ortiz, de Luna RI et al. (1997): Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. In: Nature genetics, Jg. 15, H. 1, S. 36–41.

- Jünger TH, Reicherts, M, Steinberger D, Collmann H, Kotrikova B, Zöller J, Howaldt HP (2001) Standardized evaluation and documentation of findings with craniosynostosis. *J Craniomaxillofac Surg* 29:25-3
- Kondrashov, Alexey S. (2003): Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases. In: *Human mutation*, Jg. 21, H. 1, S. 12–27.
- Kozma, C. (2008): Skeletal dysplasia in ancient Egypt. In: *American journal of medical genetics*, Jg. 146A, H. 23, S. 3104–3112.
- Kreiborg, S. (1981): Craniofacial growth in plagiocephaly and Crouzon syndrome. In: *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery*, Jg. 15, H. 3, S. 187–197.
- Kreiborg, S.; Barr, M., JR; Cohen, M. M., JR (1992): Cervical spine in the Apert syndrome. In: *American journal of medical genetics*, Jg. 43, H. 4, S. 704–708.
- Kress W, Petersen B, Collmann H, Grimm T (2000a) An unusual FGFR1 mutation in a girl with non-syndromic trigonocephaly. *Cytogenet Cell Genet* 91:138-40
- Kress W, Collmann H, Büsse M, Halliger-Keller B, Mueller CR (2000b) Clustering of FGFR2 gene mutations in patients with Pfeiffer and Crouzon syndromes. *Cytogenet Cell Genet* 91:134-7
- Kress, W.; Schropp, C.; Lieb, G.; Petersen, B.; Busse-Ratzka, M.; Kunz, J. et al. (2006): Saethre-Chotzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. In: *European journal of human genetics* : *EJHG*, Jg. 14, H. 1, S. 39–48.
- Lajeunie, E.; Ma, H. W.; Bonaventure, J.; Munnich, A.; Le, Merrer M.; Renier, D. (1995): FGFR2 mutations in Pfeiffer syndrome. In: *Nature genetics*, Jg. 9, H. 2, S. 108.
- Le, Merrer M.; Rousseau, F.; Legeai-Mallet, L.; Landais, J. C.; Pelet, A.; Bonaventure, J. et al. (1994): A gene for achondroplasia-hypochondroplasia maps to chromosome 4p. In: *Nature genetics*, Jg. 6, H. 3, S. 318–321.
- Marchac, D. (1978): Radical forehead remodeling for craniostenosis. In: *Plastic and reconstructive surgery*, Jg. 61, H. 6, S. 823–835.
- Mattei, M. G.; Moreau, A.; Gesnel, M. C.; Houssaint, E.; Breathnach, R. (1991): Assignment by in situ hybridization of a fibroblast growth factor receptor gene to human chromosome band 10q26. In: *Human genetics*, Jg. 87, H. 1, S. 84–86.
- Meyers, G. A.; Day, D.; Goldberg, R.; Daentl, D. L.; Przylepa, K. A.; Abrams, L. J. et al. (1996): FGFR2 exon IIIa and IIIc mutations in Crouzon, Jackson-Weiss, and Pfeiffer syndromes: evidence for missense changes, insertions, and a deletion due to alternative RNA splicing. In: *American journal of human genetics*, Jg. 58, H. 3, S. 491–498.
- Moloney, D. M.; Slaney, S. F.; Oldridge, M.; Wall, S. A.; Sahlin, P.; Stenman, G.; Wilkie, A. O. (1996): Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome. In: *Nature genetics*, Jg. 13, H. 1, S. 48–53.
- Moloney, D. M.; Wall, S. A.; Ashworth, G. J.; Oldridge, M.; Glass, I. A.; Francomano, C. A. et al. (1997): Prevalence of Pro250Arg mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in coronal craniosynostosis. In: *Lancet*, Jg. 349, H. 9058, S. 1059–1062.

- Muenke, M.; Gripp, K. W.; McDonald-McGinn, D. M.; Gaudenz, K.; Whitaker, L. A.; Bartlett, S. P. et al. (1997): A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. In: *American journal of human genetics*, Jg. 60, H. 3, S. 555–564.
- Muenke, M.; Schell, U. (1995): Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. In: *Trends in genetics : TIG*, Jg. 11, H. 8, S. 308–313.
- Muenke, M.; Schell, U.; Hehr, A.; Robin, N. H.; Losken, H. W.; Schinzel, A. et al. (1994): A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. In: *Nature genetics*, Jg. 8, H. 3, S. 269–274.
- Nachman, M. W.; Crowell, S. L. (2000): Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. In: *Genetics*, Jg. 156, H. 1, S. 297–304.
- Newman, D. E.; Dunbar, J. C. (1975): Hypochondroplasia. In: *Journal of the Canadian Association of Radiologists*, Jg. 26, H. 2, S. 95–103.
- Nie, X.; Luukko, K.; Kettunen, P. (2006): FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders. In: *Oral diseases*, Jg. 12, H. 2, S. 102–111.
- Oldridge, M.; Lunt, P. W.; Zackai, E. H.; McDonald-McGinn, D. M.; Muenke, M.; Moloney, D. M. et al. (1997): Genotype-phenotype correlation for nucleotide substitutions in the IgII-IgIII linker of FGFR2. In: *Human molecular genetics*, Jg. 6, H. 1, S. 137–143.
- Oldridge, M.; Wilkie, A. O.; Slaney, S. F.; Poole, M. D.; Pulleyn, L. J.; Rutland, P. et al. (1995): Mutations in the third immunoglobulin domain of the fibroblast growth factor receptor-2 gene in Crouzon syndrome. In: *Human molecular genetics*, Jg. 4, H. 6, S. 1077–1082.
- Ornitz, D. M. (2001): Regulation of chondrocyte growth and differentiation by fibroblast growth factor receptor 3. In: *Novartis Foundation symposium*, Jg. 232, S. 63-76; discussion 76-80, 272-82.
- Orvidas, L. J.; Fabry, L. B.; Diacova, S.; McDonald, T. J. (1999): Hearing and otopathology in Crouzon syndrome. In: *The Laryngoscope*, Jg. 109, H. 9, S. 1372–1375.
- Pantke, O. A.; Cohen, M. M., JR; Witkop, C. J., JR; Feingold, M.; Schaumann, B.; Pantke, H. C.; Gorlin, R. J. (1975): The Saethre-Chotzen syndrome. In: *Birth defects original article series*, Jg. 11, H. 2, S. 190–225.
- Patton, M. A.; Goodship, J.; Hayward, R.; Lansdown, R. (1988): Intellectual development in Apert's syndrome: a long term follow up of 29 patients. In: *Journal of medical genetics*, Jg. 25, H. 3, S. 164–167.
- Penrose, L. S. (1955): Parental age and mutation. In: *Lancet*, Jg. 269, H. 6885, S. 312–313.
- Pfeiffer, R. A. (1964): [DOMINANT HEREDITARY ACROCEPHALOSYNDACTYLIA.]. In: *Zeitschrift für Kinderheilkunde*, Jg. 90, S. 301–320.
- Plotnikov, A. N.; Schlessinger, J.; Hubbard, S. R.; Mohammadi, M. (1999): Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. In: *Cell*, Jg. 98, H. 5, S. 641–650.

- Prinos, P.; Costa, T.; Sommer, A.; Kilpatrick, M. W.; Tsipouras, P. (1995): A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. In: *Human molecular genetics*, Jg. 4, H. 11, S. 2097–2101.
- Reardon, W.; Wilkes, D.; Rutland, P.; Pulleyn, L. J.; Malcolm, S.; Dean, J. C. et al. (1997): Craniosynostosis associated with FGFR3 pro250arg mutation results in a range of clinical presentations including unisutural sporadic craniosynostosis. In: *Journal of medical genetics*, Jg. 34, H. 8, S. 632–636.
- Reardon, W.; Winter, R. M.; Rutland, P.; Pulleyn, L. J.; Jones, B. M.; Malcolm, S. (1994): Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. In: *Nature genetics*, Jg. 8, H. 1, S. 98–103.
- Richette, P.; Bardin, T.; Stheneur, C. (2008): Achondroplasia: from genotype to phenotype. In: *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*, Jg. 75, H. 2, S. 125–130.
- Robin, N. H.; Feldman, G. J.; Mitchell, H. F.; Lorenz, P.; Wilroy, R. S.; Zackai, E. H. et al. (1994): Linkage of Pfeiffer syndrome to chromosome 8 centromere and evidence for genetic heterogeneity. In: *Human molecular genetics*, Jg. 3, H. 12, S. 2153–2158.
- Rousseau, F.; Bonaventure, J.; Legeai-Mallet, L.; Pelet, A.; Rozet, J. M.; Maroteaux, P. et al. (1994): Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. In: *Nature*, Jg. 371, H. 6494, S. 252–254.
- Rousseau, F.; Bonaventure, J.; Legeai-Mallet, L.; Schmidt, H.; Weissenbach, J.; Maroteaux, P. et al. (1996): Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia. In: *Journal of medical genetics*, Jg. 33, H. 9, S. 749–752.
- Rutland, P.; Pulleyn, L. J.; Reardon, W.; Baraitser, M.; Hayward, R.; Jones, B. et al. (1995): Identical mutations in the FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes. In: *Nature genetics*, Jg. 9, H. 2, S. 173–176.
- Sabatino, G.; Di, Rocco F.; Zampino, G.; Tamburrini, G.; Caldarelli, M.; Di, Rocco C. (2004): Muenke syndrome. In: *Child's nervous system: ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, Jg. 20, H. 5, S. 297–301.
- Saethre, M. (1931): Ein Beitrag zum Turmschaedelproblem (Pathogenese, Erbllichkeit und Symptomatologie). *Dtsch Z Nervenheilk* 119, 533
- Schell, U.; Hehr, A.; Feldman, G. J.; Robin, N. H.; Zackai, E. H.; de, Die-Smulders C. et al. (1995): Mutations in FGFR1 and FGFR2 cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. In: *Human molecular genetics*, Jg. 4, H. 3, S. 323–328.
- Schwertfeger, K. L. (2009): Fibroblast growth factors in development and cancer: insights from the mammary and prostate glands. In: *Current drug targets*, Jg. 10, H. 7, S. 632–644.
- Shiang, R.; Thompson, L. M.; Zhu, Y. Z.; Church, D. M.; Fielder, T. J.; Bocian, M. et al. (1994): Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. In: *Cell*, Jg. 78, H. 2, S. 335–342.
- Shiller, J. G. (1959): Craniofacial dysostosis of Crouzon; a case report and pedigree with emphasis on heredity. In: *Pediatrics*, Jg. 23, H. 1 Part 1, S. 107–112.

- Shishido, E.; Higashijima, S.; Emori, Y.; Saigo, K. (1993): Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. In: *Development* (Cambridge, England), Jg. 117, H. 2, S. 751–761.
- Siegel, Michael I. (2002): *Understanding craniofacial anomalies. The etiopathogenesis of craniosynostoses and facial clefting.* Mooney, Mark P. (Hg.). New York: Wiley-Liss.
- Sitzmann, Friedrich C. (Hg.) (2006): *Duale Reihe Pädiatrie. 3. Aufl.* Stuttgart: Thieme.
- Sosic, D.; Richardson, J. A.; Yu, K.; Ornitz, D. M.; Olson, E. N. (2003): Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. In: *Cell*, Jg. 112, H. 2, S. 169–180.
- Stoll, C.; Roth, M. P.; Bigel, P. (1982): A reexamination on parental age effect on the occurrence of new mutations for achondroplasia. In: *Progress in clinical and biological research*, Jg. 104, S. 419–426.
- Tartaglia, M.; Valeri, S.; Velardi, F.; Di, Rocco C.; Battaglia, P. A. (1997): Trp290Cys mutation in exon IIIa of the fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) gene is associated with Pfeiffer syndrome. In: *Human genetics*, Jg. 99, H. 5, S. 602–606.
- Tessier, P. (1967): [Total facial osteotomy. Crouzon's syndrome, Apert's syndrome: oxycephaly, scaphocephaly, turriccephaly]. In: *Annales de chirurgie plastique*, Jg. 12, H. 4, S. 273–286.
- Trusen A, Beissert M, Collmann H, Darge K (2003) The pattern of skeletal anomalies in the cervical spine, hands and feet in patients with Saethre-Chatzen syndrome and Muenke-type mutation. *Pediatr Radiol* 33:168-72
- Upton, J. (1991): Apert syndrome. Classification and pathologic anatomy of limb anomalies. In: *Clinics in plastic surgery*, Jg. 18, H. 2, S. 321–355.
- Velinov, M.; Slaugenhaupt, S. A.; Stoilov, I.; Scott, C. I., JR; Gusella, J. F.; Tsipouras, P. (1994): The gene for achondroplasia maps to the telomeric region of chromosome 4p. In: *Nature genetics*, Jg. 6, H. 3, S. 314–317.
- Virchow, R. (1851): Über den Kretinismus, namentlich in Franken und über pathologische Schaedelformen. *Verhandl Phys Med Ges Würzburg* 2: 230 - 270
- Vogels, A.; Fryns, J. P. (2006): Pfeiffer syndrome. In: *Orphanet journal of rare diseases*, Jg. 1, S. 19. Online verfügbar unter doi: 10.1186/1750-1172-1-19.
- Webster, M. K.; Donoghue, D. J. (1997): Enhanced signaling and morphological transformation by a membrane-localized derivative of the fibroblast growth factor receptor 3 kinase domain. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 17, H. 10, S. 5739–5747.
- Webster, M. K.; Donoghue, D. J. (1997): FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. In: *Trends in genetics: TIG*, Jg. 13, H. 5, S. 178–182.
- Wilkie, A. O. (1997): Craniosynostosis: genes and mechanisms. In: *Human molecular genetics*, Jg. 6, H. 10, S. 1647–1656.
- Wilkie, A. O.; Morriss-Kay, G. M.; Jones, E. Y.; Heath, J. K. (1995): Functions of fibroblast growth factors and their receptors. In: *Current biology: CB*, Jg. 5, H. 5, S. 500–507.

Wilkie, A. O.; Slaney, S. F.; Oldridge, M.; Poole, M. D.; Ashworth, G. J.; Hockley, A. D. et al. (1995): Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. In: *Nature genetics*, Jg. 9, H. 2, S. 165–172.

Wilkie, A. O.; Yang, S. P.; Summers, D.; Poole, M. D.; Reardon, W.; Winter, R. M. (1995): Saethre-Chotzen syndrome associated with balanced translocations involving 7p21: three further families. In: *Journal of medical genetics*, Jg. 32, H. 3, S. 174–180.

Woods, R. H.; Ul-Haq, E.; Wilkie, A. O.; Jayamohan, J.; Richards, P. G.; Johnson, D. et al. (2009): Reoperation for intracranial hypertension in TWIST1-confirmed Saethre-Chotzen syndrome: a 15-year review. In: *Plastic and reconstructive surgery*, Jg. 123, H. 6, S. 1801–1810.

Wood-Smith, D.; Epstein, F.; Morello, D. (1976): Transcranial decompression of the optic nerve in the osseous canal in Crouzon's disease. In: *Clinics in plastic surgery*, Jg. 3, H. 4, S. 621–623.

Yoon, S. R.; Qin, J.; Glaser, R. L.; Wang, Jabs E.; Wexler, N. S.; Sokol, R. et al. (2009): The ups and downs of mutation frequencies during aging can account for the apert syndrome paternal age effect. In: *PLoS genetics*, Jg. 5, H. 7, S. e1000558.

Zhou, Y. X.; Xu, X.; Chen, L.; Li, C.; Brodie, S. G.; Deng, C. X. (2000): A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures. In: *Human molecular genetics*, Jg. 9, H. 13, S. 2001–2008.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Holger Höhn für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die immerzu motivierende und geduldige Unterstützung.

Weiterhin möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Timo Grimm für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. med. Astrid Bechtold, die immer ein offenes Ohr und einen guten Ratschlag für mich hatte.

Zusätzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Simone Hasenmüller für die ausführliche Erklärung der Laborverfahren bedanken.

Vielen Dank auch an Dr. Wolfgang Feichtinger für die interessante Erläuterung des Sequenzierungslabors.

Des Weiteren möchte ich mich auch ganz besonders bei Herrn Winfried Weber für die schnelle und einzigartige Hilfe bei der Erstellung der geographischen Karten bedanken.

Ein herzliches Dankeschön auch an Claudia Junius und Frieder Gauß für die gute Zusammenarbeit bei der Datenerhebung.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während des ganzen Studiums und bei dieser Arbeit unterstützend, aufmunternd und sehr geduldig begleitet haben.
