

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin
Institut für Humangenetik

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

Molekularzytogenetische Eingrenzung der Bruchpunkte von sieben krankheitsassoziierten chromosomalen Rearrangements

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Bettina Chilian
aus Hamburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.11.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. K. Kutsche

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. R. Santer

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. R. Schneppenheim

Inhaltsverzeichnis

I.	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	1
II.	Einleitung.....	2
1.	Arten von Mutationen.....	2
2.	Chromosomenmutationen.....	2
3.	Array-basierte komparative Genomhybridisierung zur Identifizierung lichtmikroskopisch nicht sichtbarer Chromosomenaberrationen	6
4.	Identifizierung neuer Krankheitsgene mit Hilfe von chromosomalen Rearrangements	7
4.1	Bruchpunktkartierung durch serielle Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierungen.....	8
4.2	Suche nach Kandidatengenen mittels Datenbankrecherche	9
4.3	Positionseffekte	9
4.4	Bestätigung des Kandidatengens mittels einer Mutationsanalyse	12
III.	Material und Methoden.....	13
1.	BAC-Klone.....	13
1.1	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 1.....	13
1.2	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 3.....	13
1.3	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 5.....	14
1.4	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 6.....	14
1.5	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 8.....	15
1.6	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 9.....	15
1.7	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 11.....	16
1.8	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 13.....	16
1.9	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 17.....	16
1.10	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 18.....	16
1.11	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 20.....	17
2.	Fosmid-Klone.....	17
2.1	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 3.....	17
2.2	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 5.....	17
2.3	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 9.....	18
2.4	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 11.....	18
2.5	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 13.....	18
2.6.	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 18.....	18
2.7	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 20.....	19
3.	PAC-Klone.....	19
3.1	Verwendeter PAC-Klon für das Chromosom 5.....	19
3.2	Verwendete PAC-Klone für das Chromosom 20.....	19
4.	Chemikalien und Lösungsmittel.....	19

5.	Medien und Zusätze	20
6.	Puffer und Lösungen	20
6.1	Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	20
6.2	Puffer und Lösungen für die Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	21
7.	Sonstige Puffer	21
8.	Kits, Enzyme und Nukleinsäuren.....	21
9.	Verbrauchsmaterial und Gerätschaften.....	22
10.	Datenbanken und Computerprogramme.....	23
10.1	Datenbanken.....	23
10.2	Computerprogramme	23
11.	Molekularbiologische Methoden	24
11.1	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E.coli</i> durch Midi-Präparation.....	24
11.2	Restriktionsanalyse der isolierten DNA	25
11.3	Agarosegelelektrophorese.....	25
11.4	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	26
IV.	Ergebnisse	29
1.	Beschreibung der experimentellen Vorgehensweise	29
2.	Isolierung und restriktionsenzymatische Spaltung von verschiedenen BAC-, PAC- und Fosmid-DNAs zur Herstellung von Sonden für die Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	29
3.	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 5;9-Translokation bei Patient 1 ...	30
3.1	Patientenbeschreibung.....	30
3.2	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 5q23.2	31
3.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 9p22.1	33
4.	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 8;18-Translokation bei Patient 2..	35
4.1	Patientenbeschreibung.....	35
4.2	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 8q12.1	37
4.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 18q23	39
5.	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 11;17-Translokation bei Patient 3	41
5.1	Patientenbeschreibung.....	41
5.2	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 11q13.3.....	42
5.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 17q25.1	45
6.	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 1;5-Translokation bei Patient 4 ...	46
6.1	Patientenbeschreibung.....	46
6.2	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 1q41.....	47
6.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 5q31.1	49
7.	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 5;13-Translokation bei Patient 5..	51
7.1	Patientenbeschreibung.....	51
7.2	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 5q21.1	53

7.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 13q14.12.....	55
8.	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 3;5;6-Translokation bei Patientin 6	57
8.1	Patientenbeschreibung.....	57
8.2	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 3q26.31	58
8.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 5p14.3	60
8.4	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 6q23.2	62
9.	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer paracentrischen 20q-Inversion bei Patientin 7.....	64
9.1	Patientenbeschreibung.....	64
9.2	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 20q11.23.....	65
9.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 20q13.33.....	67
V.	Diskussion	70
1.	Allgemeine Vorgehensweise bei der Suche nach Kandidatengenen	70
2.	Beide Translokationsbruchpunkte des Patienten 1 konnten auf 10 bis 20 Kb eingegrenzt werden	71
2.1	In der Bruchpunktregion 9p22.1 kommt es zu einer direkten Unterbrechung des <i>ADAMTSL1</i> -Gens	71
2.2	In der 5q23.2-Bruchpunktregion ist das <i>SNCAIP</i> -Gen ein Kandidatengen für den Phänotyp des Patienten 1.....	71
3.	Die Translokationsbruchpunkte des Patienten 2 konnten auf 10 bis 15 Kb und auf etwa 100 Kb eingegrenzt werden	74
3.1	Das <i>CA8</i> -Gen in der Bruchpunktregion 8q12.1 könnte unterbrochen sein.....	74
3.2	Das <i>SALL3</i> -Gen in 18q23 kristallisiert sich als Kandidatengen für den Phänotyp des Patienten 2 heraus	75
4.	Höchstwahrscheinlich ist die Unterbrechung des <i>SHANK2</i> -Gens mit der mentalen Retardierung des Patienten 3 assoziiert.....	77
4.1	In der Bruchpunktregion 17q25.1 liegen die Gene <i>SPHK1</i> und <i>UBE2O</i>	77
4.2	In der Bruchpunktregion 11q13.3 ist das <i>SHANK2</i> -Gen disruptiert.....	78
5.	Bei dem Patienten 4 konnte der Bruchpunkt auf Chromosom 1 auf etwa 100 Kb und der auf Chromosom 5 auf 10 bis 15 Kb eingegrenzt werden.....	79
5.1	In der Bruchpunktregion 1q41 liegen die Gene <i>EPRS</i> , <i>BPNT1</i> , <i>IARS2</i> und <i>RAB3GAP2</i>	79
5.2	In der Bruchpunktregion 5q31.1 kommen <i>CDKL3</i> und <i>NEUROG1</i> als Kandidatengene für den Phänotyp des Patienten 4 in Frage	80
6.	Bei dem Patienten 5 konnte kein Zusammenhang zwischen der Translokation und dem Krankheitsbild hergestellt werden.....	83
6.1	In der Bruchpunktregion 5q21.1 wird kein Gen unterbrochen	83
6.2	Die Bruchpunktregion 13q14.12 ist vermutlich nicht mit dem Phänotyp des Patienten 5 assoziiert	84
7.	Alle Bruchpunkte der 3;5;6-Translokation der Patientin 6 wurden auf 10 bis 50 Kb eingegrenzt.....	84
7.1	In der Bruchpunktregion 5p14.3 kommt es nicht zu einer Genunterbrechung.....	84

7.2	Durch die Translokation kommt es zu einer direkten Unterbrechung von <i>EYA4</i> in 6q23.2	85
7.3	Möglicherweise sind <i>FNDC3B</i> und <i>GHSR</i> in der Bruchpunktregion 3q26.31 mit dem Phänotyp der Patientin 6 assoziiert.....	86
8.	Beide Inversionsbruchpunkte der Patientin 7 konnten auf 10 bis 20 Kb eingegrenzt werden	88
8.1	In der Bruchpunktregion 20q11.23 könnte es zu einer Unterbrechung von <i>SAMHD1</i> gekommen sein	88
8.2	<i>KCNQ2</i> ist das attraktivste Kandidatengen für den Phänotyp der Patientin 7	89
VI.	Zusammenfassung	92
VII.	Literaturverzeichnis.....	95
VIII.	Danksagung.....	104
IX.	Eidesstattliche Versicherung.....	106

I. Arbeitshypothese und Fragestellung

Bis heute wurden 2993 Mendel'sche Erkrankungen auf molekularer Ebene aufgeklärt, wohingegen die genetische Ursache von 1771 Mendel'schen Krankheitsbildern und weiteren 1963 Phänotypen mit putativer Mendel'scher Vererbung unklar ist (OMIM, Stand: April 2011). Für die Erforschung der molekularen Grundlagen Mendel'scher Erkrankungen gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie die Kopplungsanalyse in einer Familie mit mehreren von einer Erkrankung betroffenen Personen und gesunden Familienmitgliedern sowie die Feinkartierung krankheitsassoziierter chromosomaler Rearrangements. Letztere können als „Werkzeug“ zur Identifizierung von Kandidatengenen für monogene Erkrankungen herangezogen werden, da bei einem Patienten mit einer *de novo* vorliegenden Chromosomenaberration vermutet wird, dass ein Gen im Bereich der Bruchpunkte in seiner Expression verändert ist und mit dem Krankheitsbild des Patienten in Zusammenhang steht. Weiterführende Untersuchungen sind für die Bestätigung bzw. Widerlegung eines Kandidatengens als Krankheitsgen notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Bruchpunkte von sieben krankheitsassozierten chromosomalen Rearrangements mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung feinkartiert werden. Die jeweilige Chromosomenaberration lag bei den Patienten konstitutionell, also in allen Körperzellen, vor. Sechs Patienten hatten eine reziproke Translokation und eine Patientin eine parazentrische Inversion; die Phänotypen der Patienten waren sehr unterschiedlich und reichten von Entwicklungsverzögerung und milder mentaler Retardierung bis hin zu einem komplexen skelettalen Krankheitsbild. Mittels umfassender Datenbankrecherchen sollten Kandidatengene in den eingegrenzten Bruchregionen identifiziert werden, die möglicherweise mit dem Krankheitsphänotyp des jeweiligen Patienten assoziiert sind.

II. Einleitung

1. Arten von Mutationen

In der Regel wird das genetische Material von einer Generation auf die nächste Generation unverändert weitergegeben. Dennoch sind spontane Mutationen ein wichtiges Instrument zur Anpassung des Individuums an die Umwelt und bilden daher eine zentrale Voraussetzung für die Evolution. Mutationen können entweder konstitutionell oder somatisch vorliegen. Konstitutionelle Mutationen liegen in allen Körperzellen inklusive der Keimzellen vor. Somatische Veränderungen entstehen hingegen postzygotisch und können abhängig vom Furchungsstadium unterschiedliche Arten von Zellen und Organen betreffen. Dieser Zustand wird als Mosaik bezeichnet. In der Regel lassen sich drei Arten von Mutationen unterscheiden, die Genom-, Chromosomen- und Genmutation.

Genommutationen sind Veränderungen der Chromosomenzahl (numerische Chromosomenaberrationen). Es kann entweder ein einzelnes Chromosom zuviel oder zuwenig vorliegen oder der gesamte Chromosomensatz ist vervielfacht. Ein klassisches Beispiel für eine Genommutation ist die Trisomie 21, die dem Down-Syndrom zugrunde liegt.

Genmutationen sind molekulare Veränderungen auf Nukleotidebene. Dabei sind Punktmutationen die häufigsten Mutationen und betreffen nur ein einziges Basenpaar. Bei einer Genmutation können aber auch mehrere Basen verändert sein. Die Auswirkungen von Genmutationen sind sehr unterschiedlich, so kann die Aminosäureabfolge eines Proteins verändert werden, oder es tritt ein vorzeitiges Stopp-Codon auf.

Der dritte Mutationstyp ist die Chromosomenmutation, mit der sich diese Arbeit befasst. Aus diesem Grund wird auf diesen Mutationstyp im nächsten Kapitel näher eingegangen.

2. Chromosomenmutationen

Bei Chromosomenmutationen, auch chromosomale Rearrangements genannt, kommt es zu einer Veränderung der Chromosomenstruktur (strukturelle Chromosomenaberration), die in zwei Schritten abläuft. Zunächst muss es zu einem oder mehreren Brüchen in der doppelsträngigen DNA kommen. Danach folgt in einem zweiten Schritt das Zusammenführen der freien Enden, so dass ein neues chromosomales Arrangement der Gene entsteht, welches sich von der Anordnung der Gene im Chromosom vor dem Bruch unterscheidet. Chromosomale Rearrangements werden eingeteilt in Deletion, Duplikation, Translokation und Inversion.

Deletion

Bei einer Deletion kommt es zu einem Verlust eines Chromosomenstücks, welches kein Centromer enthält und daher keine Ansatzstelle für die Spindelfaser hat. Die Folge ist, dass es bei der nächsten Zellteilung verloren geht. Bei Deletionen unterscheidet man terminale, bei denen Endfragmente und ein verkürztes Chromosom entstehen, von interstitiellen, die zwei Chromosomenbrüche voraussetzen. Kommt es zu zwei Chromosomenbrüchen innerhalb eines Chromosomenarms, so entsteht ein verkürztes Chromosom. Bei zwei terminalen Brüchen hingegen kann ein Ringchromosom entstehen (Abb. 1) (Buselmaier W 2007).

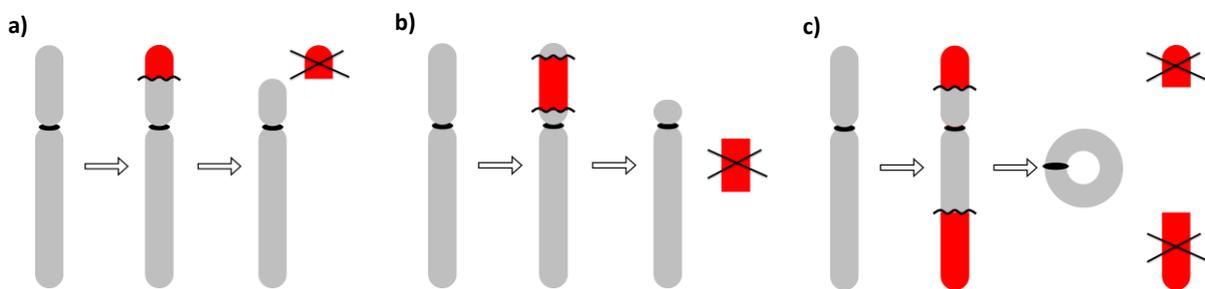


Abb. 1: Schema zur Entstehung von Deletionen

Schematisch dargestellt sind die Chromosomen in grau und die deletierten Chromosomenstücke in rot. Die Schlangenlinie gibt den Bruchpunkt wieder, und das schwarze Kreuz verdeutlicht, welches Chromosomenstück in der Zelle verloren geht. In a) ist eine terminale Deletion, in b) eine interstitielle Deletion und in c) ein Ringchromosom dargestellt.

Deletionen entstehen spontan in den Keimzellen gesunder Eltern, bei denen die Mutation in somatischen Zellen nicht nachweisbar ist (Griffiths AJF 1999). Das erste beschriebene Deletionssyndrom war das Cri-du-Chat-Syndrom, bei dem es zu einem Verlust eines terminalen Stücks des p-Arms von Chromosom 5 kommt (Lejeune J 1963).

Duplikation

Bei der Duplikation kommt es zu einer Verdopplung eines Chromosomenstücks. Entweder liegen die duplizierten Regionen nebeneinander (Tandem-Duplikation), oder das duplizierte Stück ist an einer anderen Position auf dem gleichen oder auf einem anderen Chromosom lokalisiert (Abb. 2) (Griffiths AJF 1999).

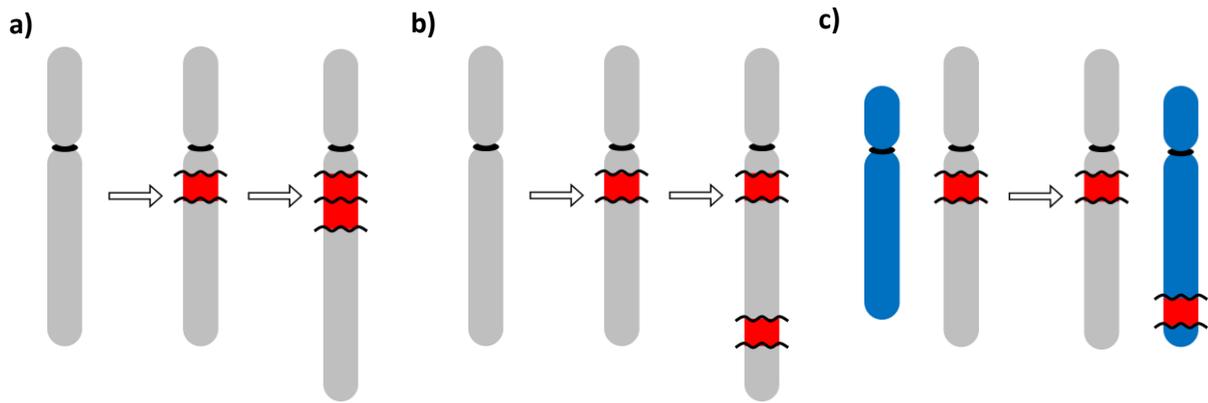


Abb. 2: Schema zur Entstehung von Duplikationen

Schematisch dargestellt sind die Chromosomen in grau bzw. blau und die duplizierten Chromosomenstücke in rot. In a) ist eine Tandem-Duplikation zu sehen, in b) findet sich das duplizierte Chromosomenstück an einer anderen Position am gleichen Chromosomen und in c) wurde das duplizierte Chromosomenstück in ein anderes Chromosom integriert.

Translokation

Im Allgemeinen ist die Translokation charakterisiert durch die Verlagerung von Chromosomenstücken an eine neue Position, entweder auf dem gleichen Chromosom oder auf einem anderen Chromosom. Dabei können mehrere Segmente zwischen homologen und nicht-homologen Chromosomen beteiligt sein, die zu einem wechselseitigen Austausch führen (Buselmaier W 2007). Kommt es zu einem Bruch von nur einem Chromosomenstück und anschließender Anlagerung an ein anderes Chromosom, handelt es sich um eine nicht-reziproke Translokation. Bei der reziproken Translokation liegt ein wechselseitiger Austausch von mindestens zwei Chromosomenstücken zwischen homologen oder nicht-homologen Chromosomen vor. Eine Besonderheit stellt die Robertson-Translokation dar. Es handelt sich dabei um eine zentrische Fusion zweier q-Arme von akrozentrischen Chromosomen, wobei die kurzen p-Arme in der Regel verloren gehen (Abb. 3) (Buselmaier W 2007).

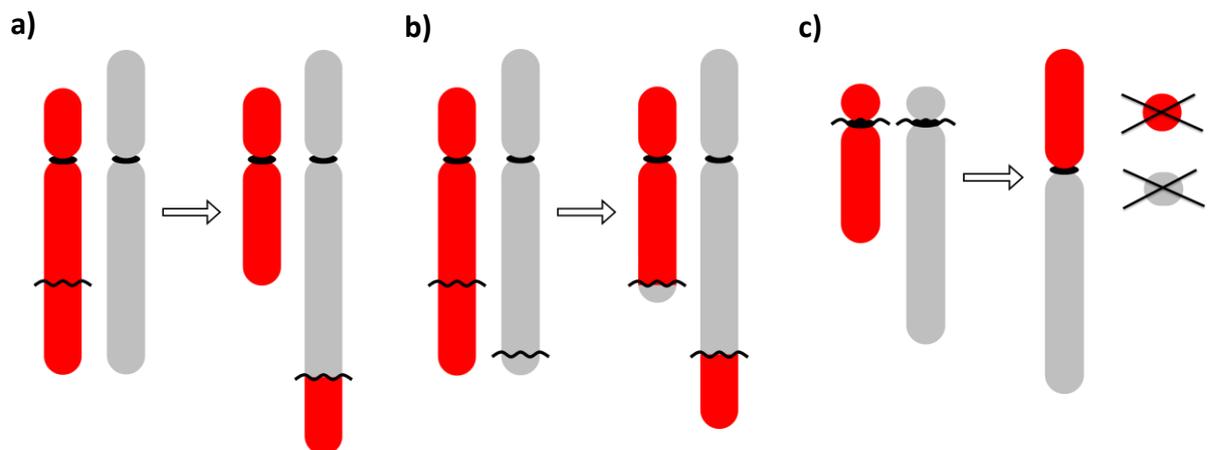


Abb. 3: Schema zur Entstehung von Translokationen

Schematisch dargestellt sind die Chromosomen in grau und rot. Die Schlangenlinie gibt den Bruchpunkt wieder und das schwarze Kreuz verdeutlicht, welches Chromosomenstück in der Zelle verloren geht. In a) ist eine nicht-reziproke Translokation, in b) eine reziproke Translokation und in c) eine Robertson-Translokation dargestellt.

Inversion

Bei der Inversion kommt es zu zwei Brüchen innerhalb eines Chromosoms und anschließender 180°-Drehung des Chromosomenstücks. Eingeteilt wird die Inversion in parazentrisch, bei der das Centromer an der Drehung nicht beteiligt ist, und perizentrisch, bei der das Centromer beteiligt ist (Abb. 4).

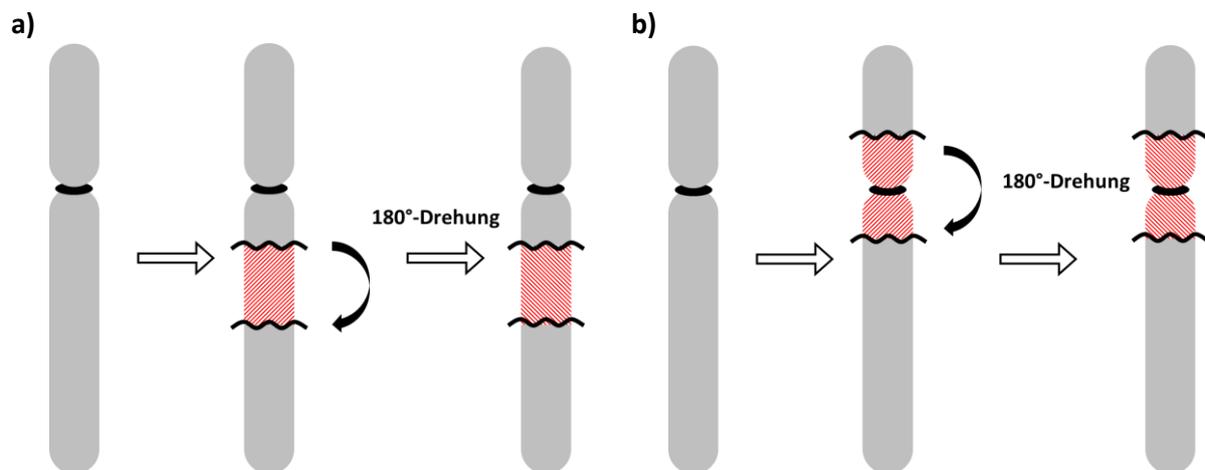


Abb. 4: Schema zur Entstehung von Inversionen

Schematisch dargestellt sind die Chromosomen in grau. Die Schlangenlinie gibt den Bruchpunkt wieder. Das invertierte Chromosomenstück ist rot-schraffiert dargestellt. In a) ist eine parazentrische Inversion und in b) eine perizentrische Inversion dargestellt.

Chromosomale Rearrangements werden in balanciert und unbalanciert eingeteilt. Dabei geht bei einem balancierten Rearrangement kein genetisches Material verloren. Ein Beispiel hierfür ist eine reziproke Translokation. Bei einem unbalancierten Rearrangement hingegen geht genetisches Material verloren, wie z.B. bei einer Deletion. Nicht selten ist es jedoch so, dass durch das Rearrangement genetisches Material verloren geht oder hinzugewonnen wird und damit nicht-balanciert ist, obwohl das Ergebnis einer konventionellen Chromosomenanalyse ein anscheinend balanciertes Rearrangement ergab. Diese Veränderungen ereignen sich häufig am Bruchpunkt (Borg I 2002) oder in der Nähe der Bruchpunkte (Page DC 1990) und werden bei der zytogenetischen Untersuchung oft nicht detektiert, da die Chromosomenanalyse nur eine begrenzte Auflösung hat. Sie kann Imbalancen (Duplikationen und Deletionen) detektieren, die mindestens 5 bis 10 Megabasen (Mb) umfassen (De Ravel TJ 2007).

Etwa 6% der pränatal durchgeführten Chromosomenanalysen, deren Ergebnis ein balanciertes *de novo* erscheinendes chromosomales Rearrangements war, werden mit einem Krankheitsbild in Zusammenhang gebracht (Warburton 1991). Ursachen hierfür können einerseits disruptierte Gene im Bruchpunkt, andererseits kleine Duplikationen oder Deletionen, die lichtmikroskopisch nicht sichtbar waren, sein (Gribble SM 2005). Aus diesem Grund sollte ein in der Chromosomenanalyse balanciert erscheinendes Rearrangement weiter untersucht werden, um kleinere Imbalancen zu detektieren. Eine Möglichkeit hierfür ist die Array-basierte komparative Genomhybridisierung (Array-CGH).

3. Array-basierte komparative Genomhybridisierung zur Identifizierung licht-mikroskopisch nicht sichtbarer Chromosomenaberrationen

Die Array-CGH ist eine Möglichkeit zur genomweiten Detektion von Imbalancen. Dabei können Deletionen, Duplikationen, Aneuploidien oder Amplifikationen auf einem Chromosom detektiert werden, die durch eine Chromosomenanalyse nicht erfasst wurden. Das Prinzip der Methode ist der Vergleich von Patienten-DNA, welche aus Blutlymphozyten oder Hautfibroblasten gewonnen wird, mit einer Referenz-DNA, wobei die DNAs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Die vorher denaturierten Patienten- und Referenz-DNAs werden zusammen auf einen Chip, welcher immobilisierte, genomische DNA-Fragmente enthält, kohybridisiert. Anschließend werden die Fluoreszenzsignale der Patienten- und Referenz-DNA gemessen und miteinander verglichen. Numerische Veränderungen im Genom führen dabei zu einer Farbverschiebung des Fluoreszenzsignals, welche automatisch mit Hilfe eines Scanners erfasst und mit Imaging-Programmen ausgewertet wird (Abb. 5).

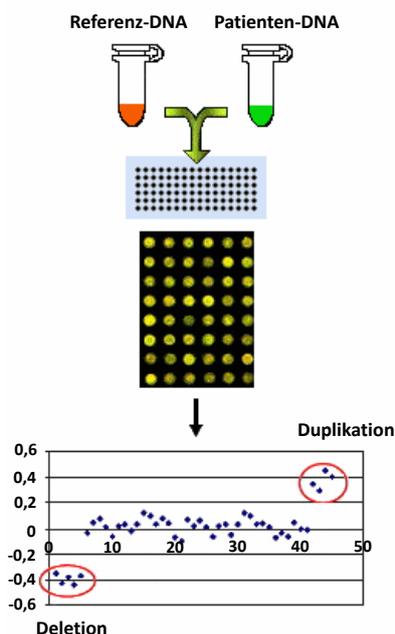


Abb. 5: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Array-CGH

Die Referenz-DNA ist mit rot-fluoreszierendem und die Patienten-DNA mit grün-fluoreszierendem Farbstoff markiert. Der Chip mit den definierten DNA-Fragmenten (schwarze Punkte) ist blau dargestellt. Direkt darunter ist ein Beispiel für eine Computerdarstellung nach Einscannen der Fluoreszenz. Das Fluoreszenzverhältnis wird mit Hilfe einer Software gemessen und grafisch dargestellt (ganz unten), wobei bei einer Deletion (links) das rote Signal der Referenz-DNA detektiert wird. Bei einer Duplikation (rechts) hingegen wird eher ein grünes Signal detektiert (Abbildung aus Sanlaville D 2005).

Die definierten DNA-Fragmente stammen entweder von BAC-(„bacterial artificial chromosome“), PAC-(„P1-derived artificial chromosome“) oder Fosmid-(F-Faktor basierende Cosmide) Klonen oder sind Oligonukleotide (Sanlaville D 2005). Der große Vorteil der Array-CGH ist ihre relativ hohe Auflösung. Je nach Größe der DNA-Fragmente liegt die genomische Auflösung für BAC-Klone bei 80 bis 200 Kilobasen (Kb) (Bejjani BA 2005) und für Oligonukleotide bei 25 bis 85 Basenpaaren (Bp) (Lucito R 2003). Dadurch wird in manchen Studien eine mindestens doppelt so hohe Detektionsrate für Imbalancen im Vergleich zur Chromosomenanalyse erreicht (Shevell M 2003). Es werden auch sogenannte „copy number variations“ (CNVs) detektiert, die nicht mit dem Phänotyp des Patienten in Zusammenhang stehen (Sanlaville D 2005). CNVs sind große DNA-Abschnitte im Genom, die sich in ihrer Kopienzahl aufgrund von Deletionen oder Duplikationen zwischen zwei Individuen innerhalb einer Spezies unterscheiden (Schridder DR 2010). Es wird angenommen, dass sich das menschliche Genom von zwei Individuen um 0,2% (~6 Mb) aufgrund von CNVs unterscheidet (McCarroll SA 2006). Durch die Array-CGH werden keine Chromosomenumbauten detektiert, weswegen diese Methode für diese Art der Mutation nur eine ergänzende Untersuchungsmethode darstellt, um Imbalancen im Bereich der Bruchpunkte oder auf anderen Chromosomen zu detektieren, die eventuell für den klinischen Phänotyp des Patienten verantwortlich sind. Sollte bei einem chromosomalen Rearrangement mit auffälligem Phänotyp das Ergebnis der Array-CGH unauffällig sein, liegt die Vermutung nahe, dass das Rearrangement ursächlich ist. Aus diesem Grund können balancierte chromosomale Rearrangements für die Identifizierung von Krankheitsgenen herangezogen werden.

4. Identifizierung neuer Krankheitsgene mit Hilfe von chromosomalen Rearrangements

Bei Patienten, die ein *de novo* vorliegendes chromosomales Rearrangement mit unauffälligem Ergebnis der Array-CGH und einen Mendel'schen Krankheitsphänotyp aufweisen, wird angenommen, dass die chromosomale Aberration mit der Erkrankung zusammenhängt. Es wird am ehesten eine „Loss-of-function“-Mutation vermutet, d.h., es kommt zu einem Funktionsverlust eines Gens. Somit liegt eine Haploinsuffizienz vor, das bedeutet, dass die Expression des einen Wildtyp-Allels zur Aufrechterhaltung der Normalfunktion nicht mehr ausreicht (Buselmaier W 2007). In der Literatur werden mehrere Fälle von balancierten Translokationen beschrieben, die zu einer Unterbrechung eines Gens führten und ursächlich für den jeweiligen Phänotyp sind (Giacalone JP 1992, van Bakel I 1995). Durch die molekulare Charakterisierung einer X;5-Translokation wurde das *DMD*-Gen

entdeckt und in Zusammenhang mit der Muskeldystrophie Typ Duchenne gebracht (Jacobs PA 1981). Um heraus zu finden, ob Gene im Bereich der Bruchpunkte liegen, müssen die Bruchpunktregionen eingegrenzt werden. Die Bruchpunkte werden zunächst durch eine Chromosomenanalyse grob bestimmt, und anschließend wird mittels einer Array-CGH nach Imbalancen im Genom gesucht, die für den Phänotyp der jeweiligen Patienten verantwortlich sein könnten. Wird keine krankheitsrelevante Deletion oder Duplikation detektiert, erfolgt die Bruchpunktkartierung mit Hilfe serieller Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH).

4.1 Bruchpunktkartierung durch serielle Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen

Bei der molekularzytogenetischen Methode FISH werden denaturierte und mit Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Sonden auf ebenfalls denaturierte Metaphase- oder Interphase-Chromosomen des jeweiligen Patienten hybridisiert (Abb. 6).

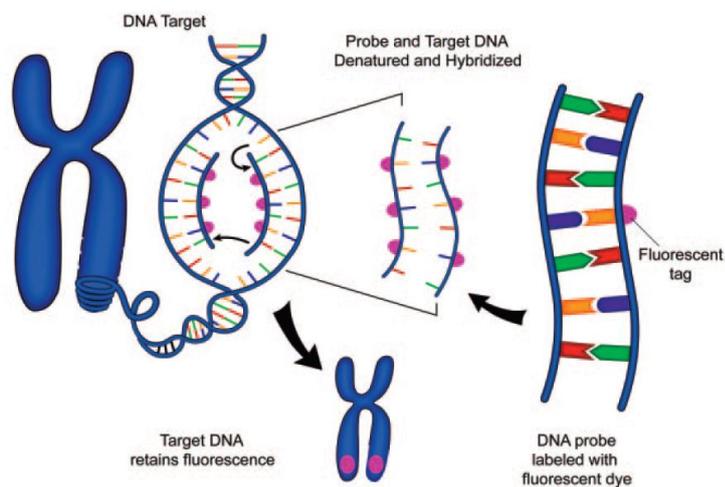


Abb. 6: Schematische Darstellung der FISH-Technik

Ganz rechts ist eine DNA-Sonde dargestellt, die mit Fluoreszenzfarbstoff (rosa) markiert wurde. Die Sonde und das Chromosom (blau) werden denaturiert, so dass die Sonde mit der entsprechenden Sequenz des Chromosoms hybridisieren kann (Mitte) (Abbildung aus Wippold FJ 2nd 2007).

BAC-, PAC- und Fosmid-Klone werden als DNA-Sonden verwendet. Die Sondenlänge bestimmt das Auflösungsvermögen der FISH, die im Allgemeinen zwischen der Auflösung der DNA- und Chromosomenanalyse liegt (Volpi EV 2008). Ein Nachteil von FISH ist, dass sie nur Veränderungen eines Chromosomabschnitts detektieren kann, für die die Sonde spezifisch ist. Veränderungen, die außerhalb der Reichweite der eingesetzten DNA-Sonden liegen, können somit nicht sichtbar gemacht werden (Shaffer LG 2006). Ein weiterer Nachteil ist die relativ hohe Rate an falsch kartierten bzw. unspezifischen genomischen Klonen. Nach Bejjani und Mitarbeitern (2005) beträgt die Rate der unspezifischen Klone bis zu 35% (Bejjani BA 2005). In dieser Arbeit erfolgte die Bruchpunktkartierung mittels serieller FISH-Analyse, wodurch es zu einer sukzessiven Annäherung an den Bruchpunkt kam. Gesucht wurde ein Klon, dessen Insert bruchpunktüberspannend war und somit ein sog. „Split-Signal“ ergab. Nach der Eingrenzung der Bruchpunktregion erfolgte eine ausführliche

Datenbankrecherche zur Suche nach möglichen Kandidatengenenen für den jeweiligen Krankheitsphänotyp des Patienten.

4.2 Suche nach Kandidatengenenen mittels Datenbankrecherche

Kriterien für die Suche nach Kandidatengenenen sind unter anderem, ob ein Gen durch das Rearrangement direkt unterbrochen wurde, wie das Expressionsmuster des Gens aussieht, welche Funktion das von dem Gen kodierte Protein hat und ob bereits mit dem Gen assoziierte Erkrankungen in der Literatur beschrieben wurden. Kommt es durch das Rearrangement nicht zu einer direkten Unterbrechung eines Gens, so muss ein Positionseffekt in Betracht gezogen werden.

4.3 Positionseffekte

Auch Positionseffekte können einen Einfluss auf das Entstehen von phänotypischen Merkmalen haben, da nicht nur direkte Genbrüche bei balancierten Rearrangements zum Funktionsverlust eines oder mehrerer Gene führen. Nach Kleinjan und Mitarbeiter (1998) ist ein Positionseffekt eine nachteilige Veränderung der Genexpression aufgrund einer Änderung der chromosomalen Umgebung. Letztere ist nicht auf eine intragenische Mutation oder Deletion zurückzuführen, so dass die Struktur des Gens und die der regulatorischen Einheit unverändert bleibt (Kleinjan DJ 1998). Chromosomale Rearrangements, wie z.B. balancierte Translokationen, können zu einem Positionseffekt führen. Im Wesentlichen werden nach Kleinjan und Mitarbeitern (1998) vier Mechanismen unterschieden, wie sich ein Positionseffekt auswirken kann (Abb. 7):

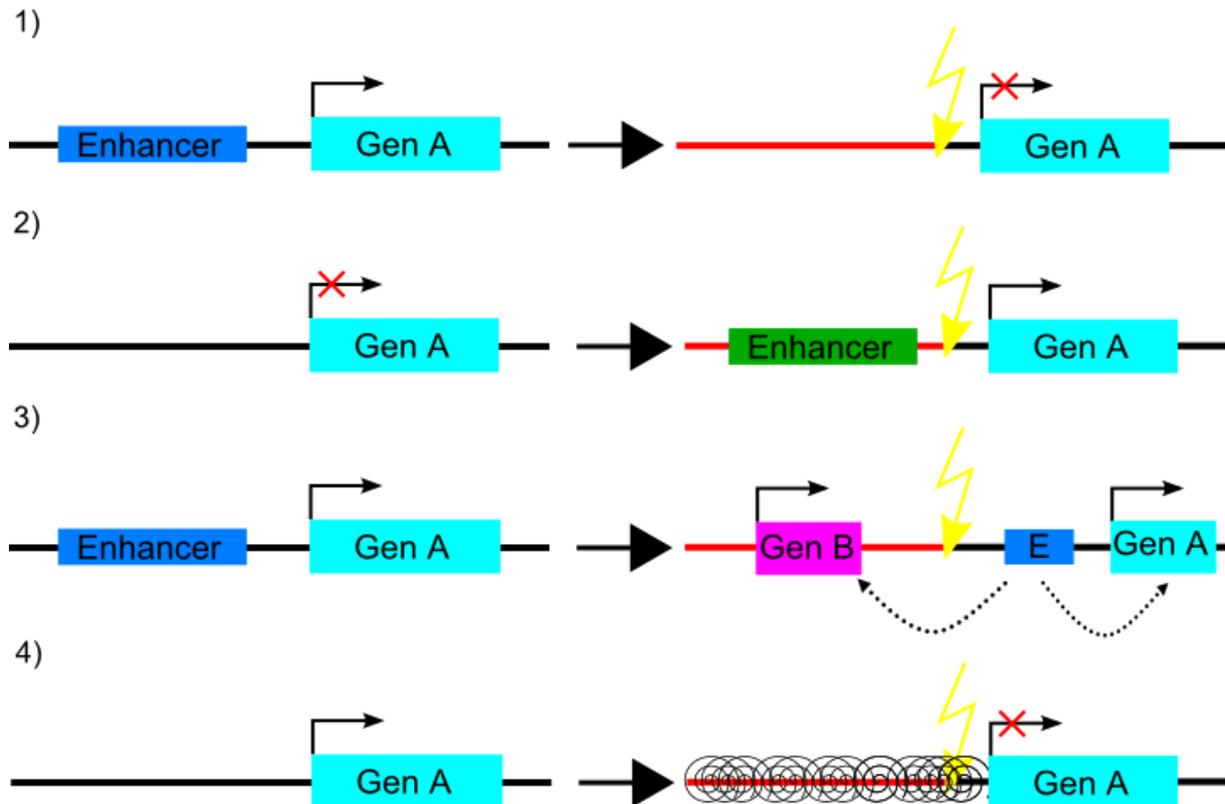


Abb. 7: Mögliche Mechanismen, die zu einem Positionseffekt führen können

Der DNA-Abschnitt ist rot bzw. schwarz dargestellt, wobei die Gene als Balken (türkis und pink) dargestellt sind. Der kleine schwarze Pfeil gibt an, ob das Gen transkribiert wird oder nicht (Pfeil mit rotem Kreuz durchgestrichen). Die Enhancer-Elemente sind jeweils blau und grün. Der chromosomale Bruchpunkt wird durch einen gelben Blitz deutlich. Die Beschreibung der Abbildung in 1) bis 4) ist dem nachfolgenden Text zu entnehmen (Abbildung modifiziert nach Kleinjan DJ 1998).

1. Eine Translokation führt dazu, dass die regulatorische Einheit von dem zu regulierenden Gen getrennt wird. Dieses kann dazu führen, dass bei einem Wegfall eines Enhancers das Gen vermindert oder gar nicht exprimiert wird. Die Auswirkungen sind mit einer direkten Unterbrechung des Gens vergleichbar. Ist hingegen ein Silencer transloziert, kann es zu einer vermehrten Expression des Gens führen.
2. Eine Translokation führt dazu, dass ein Gen vor eine regulatorische Einheit transloziert wird. Handelt es sich dabei um einen Enhancer, kommt es zu einer vermehrten Expression des Gens, ein Silencer führt zu einer verminderten Expression.
3. Eine Translokation führt dazu, dass ein Gen (türkis) mit seiner regulatorischen Einheit in die Nähe eines anderen Gens (pink) transloziert wird, so dass die regulatorische Einheit dieses Gen (pink) in seiner Expression beeinflusst, was entweder zu einer Fehlregulation von beiden Genen oder von nur einem Gen führen kann.

4. Eine Translokation führt zu einer klassischen Positioneffekt-Variegation. Dieses Phänomen wurde erstmals bei *Drosophila melanogaster* beobachtet: Nach Röntgenbestrahlung kam es zu einer Verlagerung des euchromatischen *white*-Gens in die Nähe von perizentrischem Heterochromatin. Dieses führte dazu, dass die Expression des *white*-Gens inhibiert wurde. Variegationseffekte wurden bei Menschen bisher noch nicht beschrieben, obwohl sie in transgenen Mäusen bereits beobachtet wurden (Muller 1930).

Wie in Abbildung 7 deutlich wird, kann die Trennung eines Gens von seiner regulatorischen Einheit zu einer veränderten Genexpression führen. Es wird angenommen, dass regulatorische Einheiten eine charakteristische Chromatinstruktur aufweisen und nicht-kodierende, hochkonservierte DNA-Sequenzen (HCNEs) sind, die sich im Laufe der Evolution kaum verändert haben und bei unterschiedlichen Wirbeltierklassen wiederzufinden sind (Kleinjan DA 2005, Bulger M 2011). Der Vergleich von DNA-Sequenzen unterschiedlicher Spezies ist somit eine Möglichkeit, Enhancer im Genom zu finden. Enhancer können bis zu 1,5 Mb (*SOX9*) distal oder proximal von der Transkriptionseinheit entfernt liegen (Benko S 2009), wobei sie in genfreien Abschnitten, aber auch in Introns der von ihnen regulierten Gene oder in Introns benachbarter Gene zu finden sind (Bulger M 2011). Es werden jedoch nicht alle Gene über regulatorische Einheiten reguliert. Nach Kleinjan und Mitarbeitern (2005) lassen sich aus regulatorischer Sicht drei Klassen von Genen grob unterscheiden (Kleinjan DA 2005):

1. Haushaltsgene: Die vom ihnen kodierten Proteinen werden in fast allen Zellen benötigt, und daher werden Haushaltsgene ubiquitär exprimiert. Aus diesem Grund sind ihre Promotoren ständig aktiv und müssen deswegen nicht über regulatorische Einheiten reguliert werden.
2. Gewebespezifische Gene: Die von diesen Genen kodierten Proteine haben eine wichtige Funktion in differenzierten Zelltypen. Daher werden sie in der Regel über eine oder wenige spezifische regulatorische Einheiten reguliert.
3. Wachstumsregulierende Gene: Die von diesen Genen kodierten Proteine werden nur in bestimmten Geweben zu definierten Zeitpunkten der Entwicklung benötigt. Aus diesem Grund erfolgt die Regulierung dieser Gene besonders streng und häufig über mehrere regulatorische Einheiten.

Interessanterweise spielen Gene, die bereits in Zusammenhang mit Positionseffekten beschrieben worden sind [z.B. *RET* (Emison ES 2005) und *PAX6* (Fantès J 1995)], eine Schlüsselrolle bei der Determination und Differenzierung von Geweben und Organen (Kleinjan DA 2005). Diese Tatsache kann daher als Kriterium bei der Suche nach Kandidatengen berücksichtigt werden.

4.4 Bestätigung des Kandidatengens mittels einer Mutationsanalyse

Ausführliche Datenbankrecherchen führen unter Berücksichtigung der oben genannten Suchkriterien schließlich zur Identifizierung eines Kandidatengens, das möglicherweise mit dem Phänotyp der jeweiligen Patienten in Zusammenhang steht. Als nächster Schritt erfolgt eine Mutationsanalyse in dem entsprechenden Gen in einer Kohorte von Patienten mit gleichem Phänotyp, jedoch unauffälligem Karyotyp. Werden Punktmutationen in dem Kandidatengen bei Patienten ohne strukturelle Chromosomenaberration gefunden, kann davon ausgegangen werden, dass sie mit dem Phänotyp in Zusammenhang stehen. Auf diese Weise kann das Kandidatengen als Krankheitsgen bestätigt werden. Die hier beschriebene Strategie führte bereits zur Identifizierung von verschiedenen Krankheitsgenen (Tommerup 1993). Beispielsweise führte die X;2-Translokation bei einer Patientin mit mentaler Retardierung zur Identifizierung des Krankheitsgen *TM4SF2* für X-gekoppelte mentale Retardierung (Zemni R 2000). Auch das *ARHGEF6*-Gen, das bei einer Patientin mit X;21-Translokation unterbrochen war (Kutsche K 2000), wurde über diese Strategie als Krankheitsgen bestätigt. Beispiele für Positionseffekte auf die Expression von Krankheitsgenen, die durch ein chromosomales Rearrangement verursacht werden, sind *PAX6* (Fantes J 1995), was zur Aniridie führt, und *PITX2* (Trembath DG 2004), das zum Rieger-Syndrom führt.

III. Material und Methoden

1. BAC-Klone

BAC („bacterial artificial chromosome“) ist ein auf dem F-Plasmid von *E.coli* basierender Vektor, in dem sehr große Genomabschnitte (von 100 bis 300 Kb) kloniert werden können. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt 178 Kb (Osoegawa K 2001). Die in dieser Doktorarbeit verwendeten BAC-Klone stammen aus der Bibliothek „RPCI-11“ (Roswell Park Cancer Institute), für die der Vektor pBACe3.6 verwendet wurde, und werden mit „RP11“ abgekürzt. Die klonierte genomische DNA stammt aus Lymphozyten eines Mannes. Bezogen wurden die BAC-Klone vom BACPAC Resources Center (CHORI) in Oakland, Kalifornien, USA. Der CTC-BAC-Klon stammt aus der Bibliothek „CalTech human BAC library C“. Die Inserts haben eine Größe von 129 bis 202 Kb und wurden in den Vektor pBeloBACII kloniert. Die klonierte genomische DNA stammt aus männlichem Sperma. Bezogen wurde der Klon von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland.

1.1 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 1

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
RP11-554K11	1q32.3
RP11-553F10	1q41
RP11-816K22	1q41
CTC-784C12	1q41
RP11-664E5	1q41
RP11-675M15	1q41
RP11-690H3	1q41
RP11-231P2	1q41
RP11-975N3	1q41
RP11-302I18	1q41
RP11-295M18	1q41
RP11-92H11	1q41
RP11-458C5	1q41
RP11-328N1	1q42.12
RP11-115P16	1q42.12
RP11-284L19	1q42.2

1.2 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 3

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
RP11-115B16	3q26.2
RP11-543D10	3q26.2
RP11-185E8	3q26.31
RP11-1142D2	3q26.31
RP11-151A21	3q26.31
RP11-946K8	3q26.31
RP11-1127J5	3q26.31
RP11-1K20	3q26.31

1.3 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 5

BAC-Klone (p → q)	Chromosomale Region
RP11-270H9	5p14.3
RP11-414I19	5p14.3
RP11-212H17	5p14.3
RP11-210I16	5p14.3
RP11-1104E16	5p14.3
RP11-1308L4	5p14.3
RP11-259G23	5p14.3
RP11-197O8	5p14.2
RP11-350H19	5p13.3
RP11-356D23	5q14.1-q14.2
RP11-336F20	5q14.3
RP11-265O6	5q14.3
RP11-116A1	5q14.3
RP11-65F13	5q15
RP11-995J21	5q21.1
RP11-395N10	5q21.1
RP11-475J5	5q21.1
RP11-467C9	5q21.1
RP11-626P15	5q21.1
RP11-460A14	5q21.1
RP11-188G19	5q21.1
RP11-188G8	5q21.1
RP11-357A6	5q21.1
RP11-1122O14	5q21.1
RP11-26N10	5q21.1
RP11-20L22	5q21.1
RP11-221N1	5q21.3
RP11-124B7	5q22.1
RP11-396G22	5q22.3
RP11-68K1	5q23.1
RP11-492L8	5q23.1
RP11-950K24	5q23.1
RP11-47L19	5q23.1
RP11-90G5	5q23.2
RP11-17M7	5q23.2
RP11-638D13	5q23.2
RP11-266F10	5q23.2
RP11-359P5	5q23.2
RP11-395C3	5q23.2
RP11-114H7	5q31.1
RP11-21C10	5q31.1
RP11-484B2	5q31.1
RP11-351F7	5q31.1
RP11-1067D23	5q31.1
RP11-1085B10	5q31.1
RP11-21J3	5q31.1
RP11-39H4	5q31.2
RP11-149E17	5q31.2
RP11-381K20	5q31.2
RP11-48L3	5q31.3

1.4 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 6

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
RP11-428B11	6q22.31
RP11-73O6	6q23.1

RP11-692C10	6q23.2
RP11-69I8	6q23.2
RP11-268K4	6q23.2
RP11-628E6	6q23.2
RP11-116B11	6q23.2
RP11-585I24	6q23.2
RP11-113P15	6q23.2
RP11-195M10	6q23.2
RP11-426L17	6q23.2
RP11-124K13	6q23.3

1.5 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 8

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
RP11-102D24	8q11.23
RP11-386G21	8q12.1
RP11-140I16	8q12.1
RP11-342K10	8q12.1
RP11-756K15	8q12.1
RP11-1058E13	8q12.1
RP11-636J3	8q12.1
RP11-99J23	8q12.1
RP11-614J15	8q12.1
RP11-1075B8	8q12.1
RP11-207I20	8q12.1
RP11-262K19	8q12.1
RP11-679O1	8q12.1
RP11-114M5	8q12.1
RP11-1128F17	8q12.1
RP11-430K7	8q12.1
RP11-924A24	8q12.1
RP11-359G13	8q12.1
RP11-39P8	8q12.1
RP11-27P7	8q12.1
RP11-99F5	8q12.2

1.6 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 9

BAC-Klone (tel → cen)	Chromosomale Region
RP11-664D14	9p23
RP11-778P13	9p22.3
RP11-492A12	9p22.2
RP11-435K18	9p22.2
RP11-298A17	9p22.2
RP11-927D10	9p22.2
RP11-269F13	9p22.1
RP11-196M19	9p22.1
RP11-924K14	9p22.1
RP11-933F3	9p22.1
RP11-471J7	9p22.1-p21.3
RP11-113D19	9p21.3
RP11-315I14	9p21.3
RP11-291J9	9p21.1

1.7 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 11

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
RP11-715N9	11q13.2
RP11-805J14	11q13.3
RP11-186D19	11q13.3
RP11-113L16	11q13.3
RP11-1146L22	11q13.3
RP11-598K3	11q13.3
RP11-826F13	11q13.3
RP11-361G24	11q13.3-q13.4
RP11-916J3	11q13.4
RP11-21D20	11q13.4
RP11-660L16	11q13.4
RP11-7N14	11q13.4

1.8 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 13

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
RP11-349O10	13q13.3
RP11-154C3	13q14.12
RP11-1085J24	13q14.12
RP11-484B12	13q14.12
RP11-947E4	13q14.12
RP11-828J10	13q14.13
RP11-939G7	13q14.13
RP11-100L4	13q14.13
RP11-147L20	13q14.2

1.9 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 17

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
RP11-166M16	17q24.3
RP11-16C1	17q25.1
RP11-449L23	17q25.1
RP11-685I11	17q25.1
RP11-449J21	17q25.1
RP11-20D1	17q25.1
RP11-794C22	17q25.1
RP11-89B11	17q25.1
RP11-61B11	17q25.1
RP11-666A8	17q25.1
RP11-951C22	17q25.1-q25.2
RP11-358E11	17q25.1
RP11-13K12	17q25.3
RP11-353N14	17q25.3
RP11-559N14	17q25.3
RP11-765O14	17q25.3

1.10 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 18

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
RP11-543H23	18q22.2
RP11-862L9	18q23
RP11-707P24	18q23
RP11-1150B1	18q23

RP11-671C19	18q23
RP11-100K18	18q23
RP11-640M23	18q23
RP11-669B13	18q23
RP11-958C14	18q23
RP11-62G9	18q23
RP11-1057F2	18q23
RP11-1058J9	18q23
RP11-152I15	18q23

1.11 Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 20

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
RP11-381P2	20q11.22
RP11-231F10	20q11.23
RP11-298O1	20q11.23
RP11-1152L20	20q11.23
RP11-451G10	20q11.23
RP11-122O1	20q11.23
RP11-164D18	20q13.32
RP11-93B14	20q13.33
RP11-157P1	20q13.33
RP11-358D14	20q13.33
RP11-238J15	20q13.33
RP11-299N6	20q13.33

2. Fosmid-Klone

Fosmide sind ein auf dem F-Plasmid von *E.coli* basierende Vektoren, in denen Genomabschnitte von 10 bis 50 Kb kloniert werden können. Ihre durchschnittliche Insertgröße beträgt 40 Kb. Zusammengefasst werden sie in der Bibliothek „WIBR-2“, für die der Vektor pEpiFOS-5 verwendet wurde. Die klonierte genomische DNA stammt aus Lymphozyten einer Frau. Bestellt wurden die Klone ebenfalls über das BACPAC Resources Center (CHORI) in Oakland, Kalifornien, USA.

2.1 Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 3

Fosmid-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
G248P85845F12	3q26.31
G248P86894D3	3q26.31
G248P86542C9	3q26.31
G248P8061C8	3q26.31
G248P88516E9	3q26.31

2.2 Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 5

Fosmid-Klone (p → q)	Chromosomale Region
G248P87015C5	5p14.3
G248P85642F10	5p14.3
G248P80766E11	5p14.3
G248P86627C12	5p14.3

G248P86259F9	5q21.1
G248P88773A8	5q21.1
G248P80927C5	5q21.1
G248P8858D3	5q21.1
G248P80288H8	5q21.1
G248P85483E6	5q21.1
G248P82428B11	5q23.2
G248P8768A9	5q23.2
G248P89575F8	5q23.2
G248P85764B7	5q23.2
G248P89823F2	5q31.1
G248P82041C9	5q31.1
G248P85475C2	5q31.1
G248P87860C6	5q31.1
G248P86998H1	5q31.1
G248P8548F6	5q31.1
G248P85089E8	5q31.1

2.3 Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 9

Fosmid-Klone (tel → cen)	Chromosomale Region
G248P8687F2	9p22.1
G248P81679H6	9p22.1
G248P800769G12	9p22.1

2.4 Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 11

Fosmid-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
G248P87325A9	11q13.3
G248P83654H5	11q13.3
G248P89482C11	11q13.3
G248P87040D2	11q13.3

2.5 Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 13

Fosmid-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
G248P83459B5	13q14.12
G248P87165B6	13q14.12
G248P8199B10	13q14.12
G248P87318B10	13q14.12

2.6. Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 18

Fosmid-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
G248P87669C9	18q23
G248P8665C9	18q23
G248P80448H4	18q23
G248P87318B10	18q23
G248P82196F1	18q23
G248P82549H8	18q23
G248P81803E8	18q23

2.7 Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 20

Fosmid-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
G248P89785C12	20q11.23
G248P8257H2	20q11.23
G248P81370C6	20q11.23
G248P87410A9	20q11.23
G248P86057E1	20q13.33
G248P85335H7	20q13.33
G248P83874G5	20q13.33
G248P82228F2	20q13.33
G248P83214E3	20q13.33
G248P88403H1	20q13.33
G248P84486D9	20q13.33
G248P87848E4	20q13.33
G248P85792B9	20q13.33

3. PAC-Klone

PAC („P1-derived artificial chromosome“) ist ein auf dem Phagen P1 von *E.coli* basierender Vektor, in dem große Genomabschnitte (von 100 bis 150 Kb) kloniert werden können. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt 100 bis 125 Kb (Ioannou PA 1994). Die hier verwendeten PAC-Klone stammen aus der Bibliothek „RPCI-1“, „RCPI-2“, „RCPI-3“, „RCPI-4“ und „RCPI-5“, für die der Vektor pCYPAC2 verwendet wurde, und werden mit „RP1“ bis „RP5“ abgekürzt. Die klonierte genomische DNA stammt aus Lymphozyten eines Mannes. Bezogen wurden die PAC-Klone vom BACPAC Resources Center (CHORI) in Oakland, Kalifornien, USA.

3.1 Verwendeter PAC-Klon für das Chromosom 5

PAC-Klon	Chromosomale Region
RP3-508I20	5p15.2

3.2 Verwendete PAC-Klone für das Chromosom 20

PAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region
RP4-6330O20	20q11.23
RP1-94E24	20q12
RP4-583P15	20q13.33

4. Chemikalien und Lösungsmittel

Agar (Select)

Agarose

Borsäure

Bovines Serumalbumin (BSA)

Invitrogen (Karlsruhe)

Invitrogen (Karlsruhe)

Merck (Darmstadt)

New England Biolabs (Frankfurt a. M.)

Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dextransulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fixogum	Marabuwerke (Tamm)
Formamid, deionisiert	Qbiogene (Heidelberg)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Oxoide (Wesel)
HPLC	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	J.T. Baker (Deventer, NL)
Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypton	BD (Heidelberg)
2-Propanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Serva (Heidelberg)

5. Medien und Zusätze

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g Natriumchlorid ad 1000 ml Aqua dest. pH 7,0
Agar für Festmedien	5 g/l Agar
Chloramphenicol	1 ml pro 1000 ml Stammlösung: 50 mg/ml (in 100% Ethanol)
Kanamycin	1 ml pro 1000 ml Stammlösung: 25 mg/ml (in Aqua dest.)

6. Puffer und Lösungen

6.1 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

10x TBE	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0
---------	--

10x Ladepuffer für DNA	25 ml Glycerin (100%) 25 ml 1xTBE 20 mg Orange-G
Ethidiumbromid	0,05% (in Aqua dest.)

6.2 Puffer und Lösungen für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 7,0
Denaturierungslösung	70% Formamid in 2x SSC pH 7,0
Hybridisierungspuffer (Master-Mix)	5 ml 50% Formamid 1 ml 10% Dextransulfat in 2x SSC 100 µg/ml Lachssperma-DNA Typ III pH 7,0
Waschlösung	50% Formamid in 2x SSC pH 7,0
DAPI-Stammlösung	5 mg/ml 4',6-Diamidino-2-phenyl- indole/HCl
DAPI-Färbe-Lösung	0,01% DAPI Stammlösung in 2x SSC

7. Sonstige Puffer

10x Nick Translationpuffer	500 mM Tris-HCl (pH 7,2) 100 mM MgSO ₄ 1 mM DTT
Restriktionspuffer Multi-Core™	Promega (Mannheim)

8. Kits, Enzyme und Nukleinsäuren

CGH Nick Translation Kit	Abbott Molecular, Inc. (Illinois, USA)
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel (Düren)
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
Nick Translation Enzymmix (DNAse I, DNA Pol I)	Abbott Molecular, Inc. (Illinois, USA)
DNA-Standard (1 Kb-Leiter)	Invitrogen (Karlsruhe)
Humane Cot-1 DNA (1 mg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
Lachssperma-DNA Typ III	Sigma (Taufkirchen)
Nukleotidmix (dNTPs) (je 10 mM)	Abbott Molecular, Inc. (Illinois, USA)

9. Verbrauchsmaterial und Gerätschaften

Deckgläser	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Kunststoff-Tubes (Falcon)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Objekträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Agarplatten	Sarstedt (Nümbrecht)
Autoklav	Tecnomara (Fernwald)
Brutschrank	Heraeus (Hannover)
Digitalkamera	OLYMPUS (Hamburg)
Drucker <i>Digital Graphic Printer</i>	SONY (Tokio, Japan)
Eismaschine Scotsman AF-10	Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, Illinois, USA)
Eismaschine HOSHIZAKI FM-1200E	Hoshizaki Europe (Amsterdam, Niederlande)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (München)
Heizblock (Typ: 52526101)	Liebisch (Bielefeld)
Heizblock (Typ: 50126101)	Liebisch (Bielefeld)
Inkubator Shaker Model G25	New Brunswick Scientific (Edison, NJ)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg)
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf AG (Hamburg)
Leica DMRA Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems (Wetzlar)
Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)
Photometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten <i>Finnpipetten</i>	Thermo Labsystems (Mannheim)
Spannungsgeber <i>Electrophoresis power supply ST305</i>	Life Technologies (Karlsruhe)
Spannungsgeber <i>Power Pac 300</i>	BioRad (München)
Sterilwerkbank <i>Heraeus LaminAir Instruments HB 2448K</i>	Heraeus (Hannover)
Sterilwerkbank <i>HERA safe Typ12/2, 1995</i>	Heraeus (Hannover)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge <i>Biofuge Pico</i>	Heraeus (Hannover)
UV-Transilluminator <i>UVT-28M</i>	Herolab (Wiesloch)
Vortex-Gerät <i>Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000</i>	Scientific Industries, INC. (Bohemia, NY, USA)
Waage <i>Sartorius ISO 9001</i>	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad <i>GFL 1083</i>	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Zentrifuge <i>Megafuge 1.0</i>	Heraeus (Hannover)

10. Datenbanken und Computerprogramme

10.1 Datenbanken

NCBI (National Center for Biotechnology Information)	Mit Hilfe der Funktion <i>Map Viewer</i> wurden die BAC-Klone für die FISH-Untersuchungen ausgewählt. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
UCSC Genome Browser (University of California, Santa Cruz)	Mit der Option <i>Genome Browser</i> wurden die BAC-, PAC- und Fosmid-Klone für die FISH-Untersuchungen ausgewählt. Desweiteren konnte damit die Konservierung und das regulatorischen Potential von nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen dargestellt werden. Mit <i>BLAT</i> konnte die Exon-Intron-Struktur in der genomischen DNA-Sequenz über eine Einspeisung der mRNA-Sequenz dargestellt werden. http://genome.ucsc.edu/
Ancora	Mit dieser Datenbank konnte nach nicht-kodierenden, hochkonservierten DNA-Sequenzen in genomischen DNA-Regionen gesucht werden. http://ancora.genereg.net/
VISTA Enhancer Browser	Mit dieser Datenbank wurde nach möglichen regulatorischen DNA-Elementen gesucht. http://enhancer.lbl.gov/
Database of Genomic Variants	Mit dieser Datenbank konnten „copy number variations“ recherchiert werden. http://projects.tcag.ca/variation/
Decipher	Mit dieser Datenbank konnten Imbalancen, die mit Krankheitsphänotypen assoziiert sind, recherchiert werden. http://decipher.sanger.ac.uk/
PubMed	Mit dieser Datenbank erfolgte die Literaturrecherche. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

10.2 Computerprogramme

Cytovision (Applied Imaging)	Hiermit erfolgte die Dokumentation und Bearbeitung der FISH-Bilder.
DIGI CAM Digital Camera Control	Damit wurden Agarosegele dokumentiert.
Corel Paint Shop ProX	Mit Hilfe dieses Programms konnten Bilder bearbeitet und erstellt werden.

Inkscape

Damit wurden u. a. physikalische Karten gezeichnet.

11. Molekularbiologische Methoden

11.1 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E.coli* durch Midi-Präparation

Die Midi-Präparation ermöglicht eine sehr reine Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*. Verwendet wurde hierfür das Präparationskit *NucleoBond Xtra Midi*. Bevor mit der Isolierung begonnen werden konnte, musste eine ausreichende Menge an Bakterienvolumen angezüchtet werden. Dafür wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Nach Eingang der Klone erfolgte der Einzelkoloniausstrich auf Chloramphenicol-Agar-Platten, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Bei PAC-Klonen wurde anstatt Chloramphenicol Kanamycin verwendet.
- Herstellung der Vorkultur: Eine Einzelkolonie wurde in einer Lösung mit 2 ml LB-Medium und 2 µl Chloramphenicol (Endkonzentration: 0,05 mg/ml) in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37°C für mindestens 6 Stunden inkubiert.
- Herstellung der Übernachtskultur: Die gesamte Vorkultur wurde in 200 ml LB-Medium mit 200 µl Chloramphenicol (Endkonzentration: 0,05 mg/ml) überführt und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37°C inkubiert.
- Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur in einer Zentrifuge für 20 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, um das Pellet zu erhalten.

Die darauf folgende DNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es erfolgte zunächst eine Lyse der Bakterien und dann die Immobilisierung der DNA an einen Anionenaustauscher. Durch mehrfaches Waschen mit unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen wurden Proteine und RNA entfernt. Anschließend wurde die immobilisierte DNA bei einem hohen pH-Wert eluiert. Mit Hilfe von reinem Isopropanol und einer Zentrifugation erfolgte die Präzipitation der in Lösung befindlichen DNA. Danach wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Nach Trocknung der DNA wurde sie in 150 µl HPLC-Wasser für BAC- und PAC-Klone und 200 µl für Fosmide resuspendiert. Die DNA-Lösungen wurden bei -20°C gelagert, um eine Degradation der DNA zu verhindern.

11.2 Restriktionsanalyse der isolierten DNA

Die Restriktionsanalyse nach Smith und Birnstiel (1976) diente der qualitativen, aber auch der quantitativen Überprüfung der isolierten DNA. Benutzt wurde *EcoRI*, eine Typ-II-Endonuklease, die eine palindromische Sequenz erkennt und schneidet, so dass sog. „sticky ends“ entstehen. Für den Restriktionsverdau wurden folgende Substanzen pipettiert:

- 3 µl Plasmid-DNA
- 2 µl BSA (10x)
- 2 µl Multi-Core™ (10x)
- 1 µl *EcoRI* (6 U)
- 12 µl steriles HPLC-Wasser

Der Ansatz wurde für 90 Minuten bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. Danach wurden 5 µl Orange G-Ladepuffer hinzugefügt und zusammen auf ein Agarosegel aufgetragen.

11.3 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese konnten die nach *EcoRI*-Restriktion entstandenen DNA-Fragmente aufgetrennt werden. Dabei ist die Laufstrecke eines Fragments im Gel dem Logarithmus seines Molekulargewichts umgekehrt proportional. Das bedeutet, kleine Fragmente wandern schneller durch die Poren des Gels als große Fragmente. Für die Auftrennung der Plasmid-DNA wurde ein niedrig-prozentiges Gel (0,8%) verwendet. Da die DNA aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen ist, laufen die Fragmente in der Gelkammer von der Kathode zur Anode. Für die Herstellung eines 0,8%-igen Gels wurden 1,04 g Agarose und 130 ml 1x TBE benötigt, was zusammen aufgeköcht und anschließend auf etwa 50°C abgekühlt wurde. Danach wurde die Agaroselösung in einen Gelschlitten, welcher vorher mit einem Gelkamm versehen wurde, überführt. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in eine Gelkammer eingesetzt und mit 1x TBE vollständig bedeckt. Nach Entfernung des Gelkamms wurden die Geltaschen mit 17 µl des Restriktionsansatzes, welcher vorher mit 5 µl Orange G-Ladepuffer versehen worden war, und einer 1 Kb-Leiter als Positivkontrolle und Referenz beladen. Danach wurde für 2,5 Stunden eine Spannung von 120 V angelegt. Nach der Auftrennung der Fragmente wurde das Gel in einer 0,05%-igen Ethidiumbromid-Lösung für mindestens 20 Minuten gefärbt. Hier kam es zu einer Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA, wodurch die DNA mit Hilfe von UV-Licht (Wellenlänge von 254 nm) auf einem Transilluminator-Tisch sichtbar gemacht wurde.

11.4 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Herstellung der Chromosomenpräparate

Die Herstellung der Chromosomenpräparate erfolgte nach dem Protokoll aus *Current Protocols in Human Genetics* (Unit 4.1.1-4.1.4, Dracopoli 2000). Sie wurden mir von den Kollegen aus der Zytogenetik-Abteilung zur Verfügung gestellt. Das hierfür verwendete Material stammte aus kultivierten Blutlymphozyten der untersuchten Patienten.

Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Das Ziel der Vorbehandlung ist die Denaturierung der doppelsträngigen DNA, um eine Hybridisierung der DNA-Sonden zu ermöglichen. Die Objektträger (OT) mit den darauf vorliegenden Metaphase-Chromosomen wurden für 5 Minuten (Min) bei Raumtemperatur (RT) in 2x SSC gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Dehydrierung der Chromosomenpräparate mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol 5 Min, 80% Ethanol 2 Min, 95% Ethanol 2 Min). Im Anschluss wurden die getrockneten Präparate in 70% Formamid (in 2x SSC) bei 68°-72°C für exakt 3 Minuten zur Denaturierung der chromosomalen DNA inkubiert. Nach einem zweiten Waschen mit eiskaltem 2x SSC erfolgte eine erneute Dehydrierung mit einer ebenfalls eiskalten, aufsteigenden Ethanolreihe (je 2 Min für 70%, 80% und 95%). Nach diesem letzten Schritt konnten die Präparate nach dem Trocknen für die Hybridisierung verwendet werden.

Fluoreszenzmarkierung der DNA-Sonden

Die Fluoreszenzmarkierung der DNA-Sonden erfolgte mit dem *CGH Nick Translation Kit*. Bei der „Nick-Translation“-Methode erzeugt die DNase I, welche im Enzymmix enthalten ist, in der doppelsträngigen DNA an statistisch verteilten Stellen Einzelstrangbrüche, die als „nick“ bezeichnet werden. Dabei wird die Phosphodiesterbindung aufgebrochen, so dass freie 3'-OH-Gruppen entstehen. Diese freien OH-Gruppen werden nun von der ebenfalls im Enzymmix vorhandenen DNA-Polymerase I als Primer für die 5'→3'-DNA-Synthese benutzt. Als Bausteine für die DNA-Synthese sind neben dCTP, dGTP, dTTP und dATP auch der mit dem Fluoreszenzfarbstoff SpectrumRED markierte RNA-Baustein dUTP enthalten, der im Reaktionsmix zur Hälfte durch dTTP ersetzt wurde. Dieses führte zwar zu einem verminderten Einbau von markiertem dUTP, jedoch wurde dadurch die Effizienz der prokaryontischen DNA-Polymerase I erhöht. Während der DNA-Synthese war die DNA-Polymerase I aufgrund ihrer 5'→3'-Exonuklease-Aktivität in der Lage, Nukleotide in Syntheserichtung zu entfernen mit dem Ergebnis, dass unmarkierte DNA durch neu synthetisierte markierte DNA ersetzt wurde. Diese DNA-Synthese dauerte 2 bis 4 Stunden und benötigte eine Temperatur von 15°C. Der Markierungsansatz enthielt folgende Substanzen:

- 4,75-8,75 µl Nuklease-freies Wasser
- 2,0-6,0 µl BAC-, PAC- oder Fosmid-DNA
- 1,25 µl SpectrumRED dUTP (0,2 mM)
- 5 µl dNTP Mix (0,1 mM)
- 2,5 µl dTTP (0,1 mM)
- 2,5 µl 10x Nick Translation Puffer
- 3 µl Nick Translation Enzymmix

Nach der Inkubation wurden die Enzyme bei 70°C für 10 Min inaktiviert, danach erfolgte eine Abkühlung des Markierungsansatzes für 2 bis 3 Min auf Eis. Im Anschluss erfolgte die Ethanolfällung des Markierungsansatzes, um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Der Ansatz sah wie folgt aus:

- 3 µl NaAc (3M) (pH 5,2): setzt die Löslichkeit der DNA herab
- 4 µl humane Cot-1-DNA: dient zur späteren Absättigung der repetitiven Sequenzen
- 0,5 µl Lachssperma-DNA: bewirkt eine beschleunigte Fällung, da die im Markierungsansatz vorhandene DNA eine sehr geringe Masse hat
- 75,0 µl reines Ethanol: führt zur Überschreitung des Löslichkeitsproduktes der DNA und damit zu ihrer Ausfällung

Nachdem der Fällungsansatz gut gevortext wurde, erfolgte die Fällung bei -20°C für mindestens 1 Stunde. Anschließend wurde der Mix für 20 Min bei 4°C und für 14.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Überstand dekantiert wurde, wurde das Pellet zweimal mit 250 µl 70% Ethanol für 5 Min bei gleicher Umdrehung gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Pellet für etwa 10 Min bei 37°C in einem Heizblock getrocknet.

Hybridisierung der Chromosomenpräparate

Für die Hybridisierung der DNA-Sonden auf die Chromosomenpräparate wurde zunächst das Pellet aus dem vorigen Schritt in 12 µl Hybridisierungspuffer gelöst und bei 95°C für 10 Min denaturiert. Daraufhin erfolgte eine Absättigung der repetitiven Sequenzen der DNA-Sonden mit der im vorigen Schritt hinzugefügter humanen Cot-1-DNA bei 37°C für 90 Min, was als „Pre-Annealing“ bezeichnet wird. Nach dem „Pre-Annealing“ wurde der Hybridisierungsansatz auf die vorbehandelten Chromosomenpräparate aufgetropft und mit einem Deckgläschen (20x20 mm) und Fixogum versiegelt. In einer Feuchtkammer wurden dann die Objektträger bei 37°C über Nacht aufbewahrt und inkubiert.

Färben und Eindeckeln der Chromosomenpräparate

Die Chromosomenpräparate wurden nach Entfernung der Deckgläschen mit 2x SSC für 5 Min gewaschen. Danach erfolgte die Entfernung unspezifischer Bindungen, indem die Objektträger in 50% Formamid (in 2x SSC) kurz geschwenkt wurden. Dabei betrug die

Temperatur des Formamids zwischen 42°C und 45°C. Anschließend folgte ein zweites Waschen mit 2x SSC als Vorbereitung für die Färbung mit einer 0,05%-DAPI-Lösung für 5 Min. Bevor die Chromosomenpräparate eingedeckelt werden konnten, mussten sie noch in einfach destilliertem Wasser gewaschen werden. Daraufhin wurden die Präparate mit 20 µl Vectashield Mounting Medium eingedeckelt, um einerseits die Hybridisierung zu verstärken und andererseits eine Konservierung der Präparate zu bewirken. Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Leica-Fluoreszenzmikroskop. Die DAPI-Färbung konnte mit einem BGR-Filter dargestellt werden. Der BGR-Filter hat drei Anregungsstufen (405-435 nm, 487-502 nm und 560-580 nm), so dass durchscheinendes Licht weiß erscheint. Das vom SpectrumRED generierte Fluoreszenzsignal konnte mit einem TXR-Filter (586 nm) sichtbar gemacht werden. Zur Dokumentation der FISH-Untersuchungen wurde das Computerprogramm *Cytovision* verwendet.

IV. Ergebnisse

1. Beschreibung der experimentellen Vorgehensweise

Die Vorgehensweise bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten erfolgte in gleicher Weise. Aus diesem Grund wird der experimentelle Vorgang an dieser Stelle für alle Patienten erläutert.

Zu Beginn wurden mittels einer konventionellen Chromosomenanalyse die Bruchpunkte der jeweiligen Translokation bzw. Inversion bestimmt. Für eine Feinkartierung und Eingrenzung der Bruchpunkte aller chromosomalen Rearrangements wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) genutzt. Hierfür wurden BAC-, PAC- und Fosmid-Klone als DNA-Sonden gewählt, die auf Metaphase-Chromosomen des jeweiligen Patienten hybridisiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet wurden. Zunächst wurden Klone verwendet, die in der durch die zytogenetische Analyse bestimmten chromosomalen Bande kartierten. Ausgewählt wurden die BACs, PACs und Fosmide mit Hilfe der NCBI- und UCSC-Datenbanken. Gesucht wurden dabei zunächst distal und proximal zum Bruchpunkt hybridisierende Klone, um so die Bruchpunktregion grob zu definieren. War dieses geschehen, wurden in der grob definierten Bruchpunktregion kartierende BACs/PACs verwendet mit dem Ziel, einen BAC/PAC zu finden, dessen Insert bruchpunktüberspannend ist und somit ein sog. „Split-Signal“ ergibt. Das heißt, dass das Insert auf dem Wildtyp-Chromosom und auf beiden derivativen Chromosomen hybridisiert. Das zweite Signal erscheint also „aufgespalten“. Nachdem die Bruchpunktregion mit Hilfe von BACs/PACs auf etwa 100 Kb eingegrenzt wurde, wurden für die Feinkartierung in einigen Fällen Fosmide benutzt, deren Inserts etwa 40 Kb umfassen, so dass die Bruchpunktregionen auf etwa 10 bis 20 Kb eingegrenzt werden konnten. Danach erfolgte mittels einer Datenbankrecherche die Suche nach möglichen Kandidatengenen, die für den jeweiligen Phänotyp der Patienten mit chromosomalen Rearrangements verantwortlich sein könnten.

2. Isolierung und restriktionsenzymatische Spaltung von verschiedenen BAC-, PAC- und Fosmid-DNAs zur Herstellung von Sonden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Bevor mit der eigentlichen FISH-Untersuchung begonnen werden konnte, musste die DNA der BACs, PACs und Fosmide aus den zugeschickten *E.coli*-Klonen isoliert werden. Hierfür erfolgten die Kultivierung der *E.coli*-Bakterien und die Plasmid-DNA-Isolierung nach dem Protokoll für Midi-Kits der Firma Macherey-Nagel. Nach Isolierung der DNA wurde zur

qualitativen und quantitativen Überprüfung eine restriktionsenzymatische Spaltung mit *EcoRI* durchgeführt. Die dabei entstandenen Spaltfragmente wurden einer Agarosegelelektrophorese unterzogen, wobei ein 0,8%-Gel verwendet wurde. Nach der Auftrennung der Fragmente wurde das Gel gefärbt und fotografiert (Abb. 8).

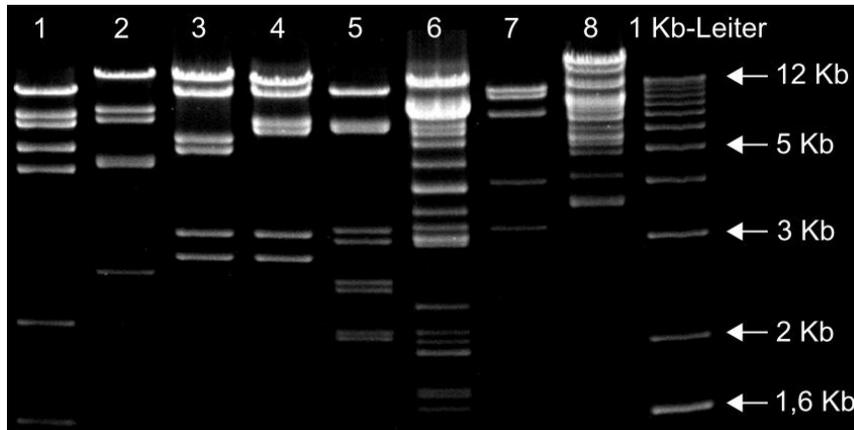


Abb. 8: Darstellung eines beispielhaften Agarosegels mit Restriktionsfragmenten einer *EcoRI*-Spaltung von verschiedenen BAC- und Fosmid-Klonen

Dieses Bild zeigt ein 0,8%-Agarosegel, auf dem verschiedene, mit *EcoRI* verdaute BACs und Fosmide (1-8), aufgetragen wurden. Als DNA-Größenstandard wurde zusätzlich eine 1 Kb-Leiter (rechts) aufgetragen. Rechts sind Größen einiger Banden der 1 Kb-Leiter angegeben. In der Reihenfolge von 1-8 sind folgende BAC- und Fosmid-Klone zu finden: G248P88516E9, G248P87015C5, G248P85642F10, G248P80766E11, G248P86627C12, RP11-585I24, G248P82041C9, RP11-1085B10.

Durch den Vergleich der entstandenen Banden mit der 1 Kb-Leiter ließ sich die Qualität und Menge der isolierten DNAs abschätzen. Die Mengenabschätzung war für die nachfolgende Sondenmarkierung für die FISH wichtig. Nach diesem Schritt erfolgten die Sondenmarkierung und anschließende Hybridisierung der DNA-Sonden auf Metaphase-Chromosomen der Patienten.

3. Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 5;9-Translokation bei Patient 1

3.1 Patientenbeschreibung

Der heute 6-jährige Patient 1 wurde als ehemaliges Frühgeborenes einer Zwillingsschwangerschaft in der 34+5 SSW geboren. Seine Eltern sind gesund. Sein Geburtsgewicht betrug 2125 g, die Geburtslänge 41 cm und der Kopfumfang 31 cm.

Relativ früh nach der Geburt zeigte Patient 1 eine Trinkschwäche und wurde schließlich mit 4 Monaten aufgrund zentraler Koordinationsstörungen und psychomotorischer Entwicklungsverzögerung stationär aufgenommen. Damalige MRT-Untersuchungen ergaben eine Aplasie des Corpus callosum. Mit 4 Jahren betrug sein Kopfumfang 48 cm und lag

damit unterhalb der 3. Perzentile (-2,5 SD). Im Alter von 6 Jahren wurden bei ihm eine psychomotorische und sprachliche Entwicklungsverzögerung, ein sekundärer Mikrocephalus und eine Harninkontinenz diagnostiziert. Er zeigt keine fazialen Dysmorphien. Sein zweieiiger Zwillingsbruder ist gesund.

Eine Chromosomenanalyse in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin in Neubrandenburg ergab eine *de novo* vorliegende, balanciert erscheinende Translokation zwischen den Chromosomen 5 und 9 [46,XY,t(5;9)(q22;p12)dn]. Um mögliche submikroskopische Deletionen und Duplikationen aufzudecken, wurde eine Array-CGH-Analyse durchgeführt. Das Ergebnis ergab eine Mikroduplikation von ca. 300 Kb in Xp11.22. Diese Mikroduplikation wurde auch bei seinem gesunden Großvater mütterlicherseits nachgewiesen, so dass davon ausgegangen wird, dass diese Aberration nicht für seinen Phänotyp verantwortlich ist.

Eine erneute Chromosomenanalyse erfolgte am Institut für Humangenetik in Hamburg; sie ergab den Karyotyp 46,XY,t(5;9)(q22;p21) (Abb. 9).

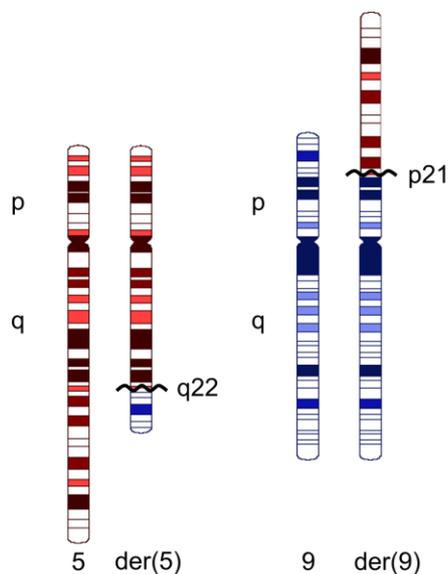


Abb. 9: Schematische Darstellung der Wildtyp- und derivativen Chromosomen des Patienten 1 mit 5;9-Translokation

Die Abbildung zeigt die beiden Wildtyp-Chromosomen 5 (rot) und 9 (blau) und die rearrangierten Chromosomen 5 [der(5)] und 9 [der(9)]. Mit Hilfe einer Schlangenlinie sind die zytogenetisch bestimmten Bruchpunkte 5q22 und 9p21 hervorgehoben.

3.2 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 5q23.2

Für die Eingrenzung des zytogenetisch bestimmten Bruchpunktes in 5q22 wurden serielle FISH-Analysen mit insgesamt zwölf BAC-Klonen durchgeführt. Sechs der BAC-Klone hybridisierten proximal und drei distal vom Bruchpunkt (Tab. 1). Zwei BAC-Klone (RP11-68K1 und RP11-17M7) ergaben unspezifische Signale. Diese Klone hybridisierten nicht in der bei UCSC angegebenen chromosomalen Region. Aus diesem Grund sind sie nicht in der Tabelle 1 aufgelistet. Ein BAC-Klon, RP11-638D13, ergab ein „Split-Signal“ (Abb. 10).

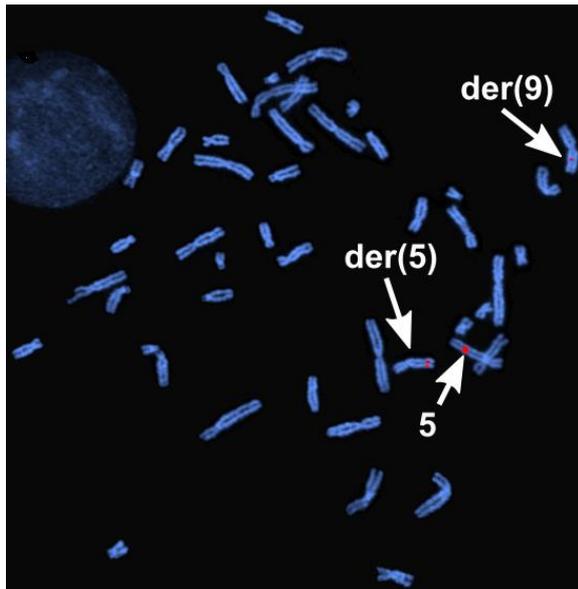


Abb. 10: FISH mit dem BAC-Klon RP11-638D13 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patient 1

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde RP11-638D13 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 5 und auf den derivativen Chromosomen 5 und 9. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Die Signalintensität des bruchpunktüberspannenden Klon RP11-638D13 war dabei symmetrisch auf beide derivativen Chromosomen 5 und 9 verteilt. Da der BAC RP11-638D13 in der Bande 5q23.2 kartiert, wurde der zytogenetisch bestimmte Bruchpunkt 5q22 nach 5q23.2 korrigiert. Für die Feinkartierung des Bruchpunktes dieser Region wurden vier Fosmide eingesetzt. Dabei hybridisierten die Fosmide G248P8768A9 und G248P89575F8 proximal zum Bruchpunkt und G248P85764B7 distal davon. G248P82428B11 stellte sich bei der Auswertung als unspezifisch heraus. Die Überlappung der Inserts der beiden Fosmide G248P89575F8 und G248P85764B7 betrug etwa 10 bis 15 Kb. Dieses entsprach der Größe der 5q23.2-Bruchpunktregion (Abb. 11).

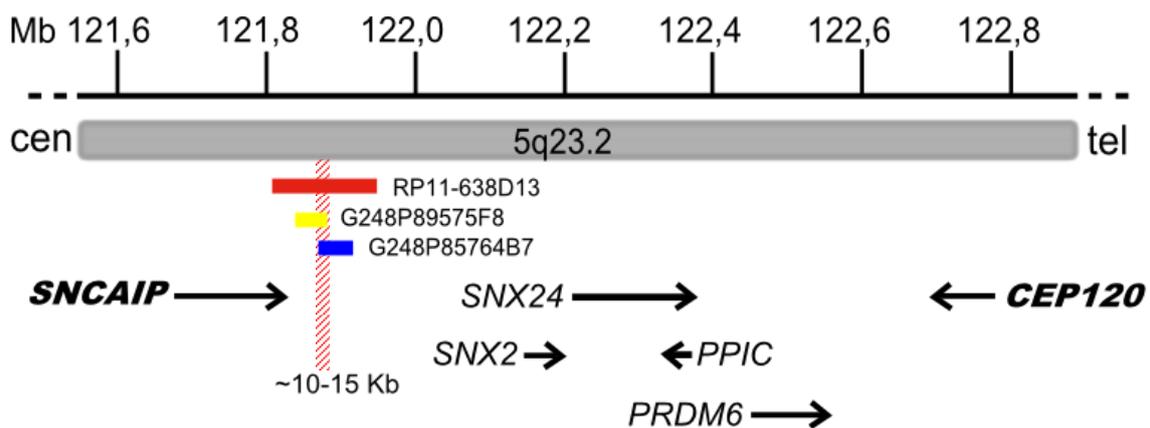


Abb. 11: Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 5q23.2 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 5q23.2. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Der bruchpunktüberspannende BAC ist rot markiert. Das Fosmid, das distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und das Fosmid, das proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben sind die Kandidatengene für Patient 1.

Die rot schraffierte Fläche zeigt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Datenbankrecherchen ergaben, dass durch diesen Bruch kein Gen direkt disruptiert wurde. Aufgrund der Expression sind mögliche Kandidatengene das *SNCAIP*-Gen, das für das Synphilin-1-Protein kodiert und vor allem im Nervengewebe exprimiert wird (Ribeiro CS 2002), und das *CEP120*-Gen, das für ein centrosomales Protein kodiert und im Wesentlichen im Gehirn exprimiert wird (De Anda FC 2010). Ausführliche Erläuterungen zu den Genen finden sich in der Diskussion unter 2.2.

Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-221N1	5q21.3	WT 5, der(5)
RP11-396G22	5q22.3	WT 5, der(5)
RP11-492L8	5q23.1	WT 5, der(5)
RP11-950K24	5q23.1	WT 5, der(5)
RP11-47L19	5q23.1	WT 5, der(5)
RP11-90G5	5q23.2	WT 5, der(5)
G248P8768A9	5q23.2	WT 5, der(5)
G248P89575F8	5q23.2	WT 5, der(5)
RP11-638D13	5q23.2	WT 5, der(5), der(9)
G248P85764B7	5q23.2	WT 5, der(9)
RP11-266F10	5q23.2	WT 5, der(9)
RP11-359P5	5q23.2	WT 5, der(9)
RP11-395C3	5q23.2	WT 5, der(9)

Tab. 1: Eingesetzte BAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 5q23.2 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. Fett hervorgehoben ist der bruchpunktüberspannende BAC.

3.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 9p22.1

Analog zu Chromosom 5 konnte mit den seriellen FISH-Untersuchungen unter Verwendung von 14 BAC-Klonen der andere Bruchpunkt in 9p22.1 eingegrenzt werden. Von den 14 BAC-Klonen hybridisierten sechs distal und fünf proximal vom Bruchpunkt und weitere drei BAC-Klone (RP11-298A17, RP11-933F3 und RP11-113D19) gaben unspezifische Signale, weswegen sie in der Tabelle 2 nicht aufgelistet sind.

Für diesen Bruchpunkt wurde im Vergleich zum 5q23.2-Bruchpunkt kein bruchpunktüberspannender Klon gefunden. Stattdessen fanden sich zwei überlappende Fosmide mit distinkten Signalen. Das Fosmid G248P8687F2 hybridisierte auf Chromosom 9

und dem derivativen Chromosom 5, das Fosmid G248P81679H6 hingegen auf Chromosom 9 und dem derivativen Chromosom 9 (Abb. 12).

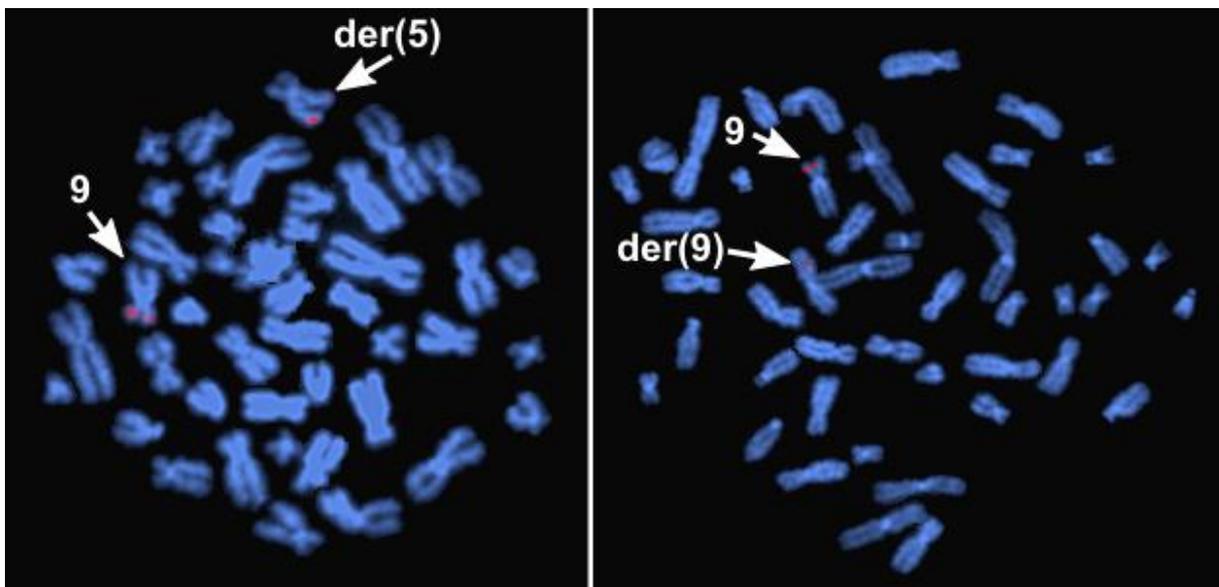


Abb. 12: FISH mit den Fosmid-Klonen G248P8687F2 (links) und G248P81679H6 (rechts) als DNA-Sonden an Metaphase-Chromosomen von Patient 1

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde G248P8687F2 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 9 und auf dem derivativen Chromosom 5 (links). Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde G248P81679H6 befindet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 9 und dem derivativen Chromosom 9 (rechts). Die Chromosomen wurden jeweils mit DAPI gefärbt.

Die Überlappung der beiden Fosmid-Inserts beträgt etwa 10 bis 20 Kb, was gleichzeitig der Bruchpunktregion in 9p22.1 entspricht (Abb. 13).

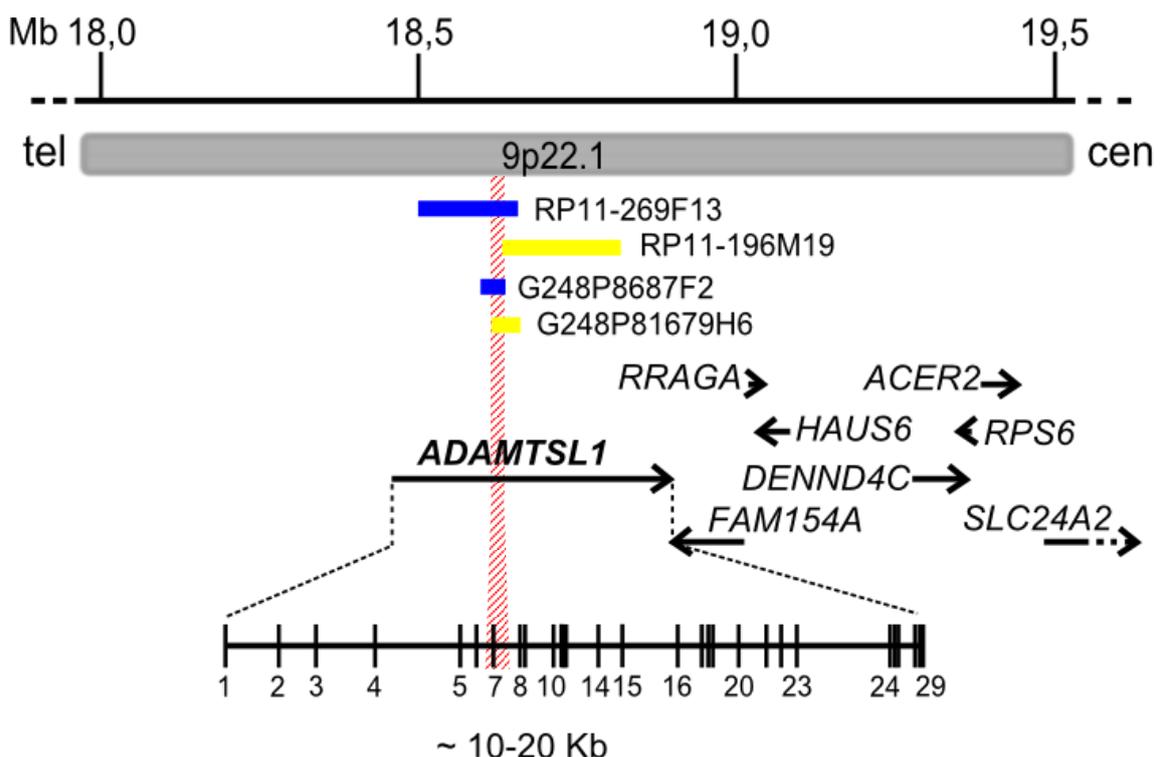


Abb. 13: Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 9p22.1 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 9p22.1. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Rechts vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und links das Telomer (tel). Klone, die distal vom Bruchpunkt hybridisierten, sind blau und Klone, die proximal hybridisierten, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben ist das unterbrochene Gen, welches vergrößert dargestellt ist. Dabei stellen die senkrechten schwarzen Striche Exons dar. Zwischen den einzelnen Exons befinden sich die Introns, die durch eine horizontale Linie wiedergegeben werden. Die rot schraffierte Fläche zeigt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Datenbankrecherchen ergaben, dass sich der Bruch im Bereich von Intron 6, Exon 7 und Intron 7 des *ADAMTSL1*-Gens befindet (Abb. 13). Das unterbrochene Gen kodiert für das Glykoprotein Punctin (Hirohata S 2002).

Klone (tel → cen)	chromosomale Region	Signale
RP11-664D14	9p23	WT 9, der(5)
RP11-778P13	9p22.3	WT 9, der(5)
RP11-492A12	9p22.2	WT 9, der(5)
RP11-435K18	9p22.2	WT 9, der(5)
RP11-927D10	9p22.2	WT 9, der(5)
RP11-269F13	9p22.1	WT 9, der(5)
G248P8687F2	9p22.1	WT 9, der(5)
G248P81679H6	9p22.1	WT 9, der(9)
RP11-196M19	9p22.1	WT 9, der(9)
G248P800769G12	9p22.1	WT 9, der(9)
RP11-924K14	9p22.1	WT 9, der(9)
RP11-471J7	9p22.1-p21.3	WT 9, der(9)
RP11-315I14	9p21.3	WT 9, der(9)
RP11-291J9	9p21.3	WT 9, der(9)

Tab. 2: Eingesetzte BAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 9p22.1 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet.

4. Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 8;18-Translokation bei Patient 2

4.1 Patientenbeschreibung

Der heute 2-jährige Patient 2 kam nach einer komplikationslos verlaufenden Schwangerschaft durch eine spontane Entbindung in der 37+4 SSW auf die Welt, wobei die

Schwangerschaft nach einer intrazytoplasmatischen Spermieninjektion bei primärem Tubenverschluss eintrat. Die Geburtsmaße betragen 2200 g, 45 cm, und der Kopfumfang war 32 cm. Im Alter von 9 Monaten wurde der Junge erstmals aufgrund einer psychomotorischen Entwicklungsverzögerung in der Humangenetik des Medizinischen Versorgungszentrums in Frankfurt vorstellig. Damalige körperliche Untersuchungen ergaben eine große Fontanelle, eine breite Stirn und bläuliche Skleren. Die Hände und Füße zeigten breite Endphalangen, die auch bei der Mutter nachweisbar sind, und tiefe Handfurchen. Die Muskulatur erschien hyperten, und die Extremitäten waren überwiegend in einer Beugehaltung. Weiterhin wurde eine leichte Reizbarkeit des Jungen durch die Mutter beschrieben. Ansonsten zeigte der Patient einen guten Blickkontakt. Mit etwa 17 Monaten wurde sowohl eine motorische als auch eine sprachliche Entwicklungsverzögerung festgestellt sowie eine körperliche Wachstumsretardierung (74 cm \approx -2,7 SD). Der Patient 2 konnte noch nicht frei Laufen und zeigte auch keine Wortbildung. Hinzu kamen rezidivierende generalisierte Krampfanfälle, wobei das EEG keine Auffälligkeiten aufwies. Zurzeit werden die cerebralen Anfälle mit Phenobarbital behandelt.

Eine zytogenetische Untersuchung im Zentrum für Humangenetik in Mannheim ergab eine *de novo* vorliegende balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 8 und 18, wobei die Bruchpunkte in den Banden 8q12 und 18q23 bestimmt wurden. Weiterhin ergab das Ergebnis einer Array-CGH eine ca. 100 Kb große Deletion in 5q21.1, die auch bei der Mutter nachweisbar war, und eine etwa 300 Kb große Duplikation in 14q31.1, die nicht weiter abgeklärt wurde. Nach Eingang der Blutproben im Institut für Humangenetik in Hamburg wurde eine erneute zytogenetische Untersuchung durchgeführt, die folgende Karyotypformel ergab: 46,XY,t(8;18)(q11.23-q12.1;q22.3-q23) (Abb. 14).

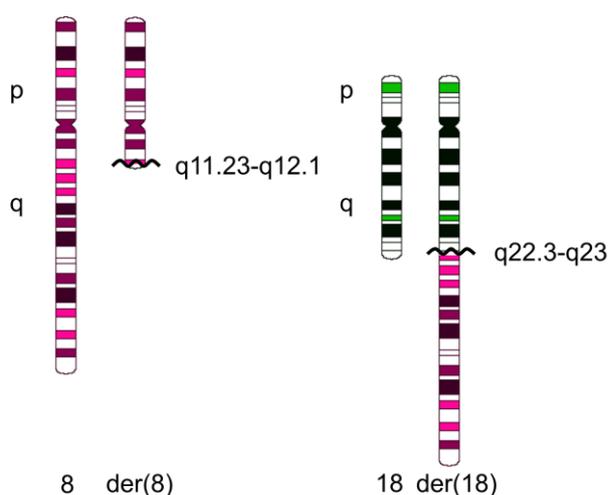


Abb. 14: Schematische Darstellung der Wildtyp- und derivativen Chromosomen des Patienten 2 mit 8;18-Translokation

Die Abbildung zeigt die beiden Wildtyp-Chromosomen 8 (rot) und 18 (grün) und die rearrangierten Chromosomen 8 [der(8)] und 18 [der(18)]. Mit Hilfe einer Schlangenlinie sind die zytogenetisch bestimmten Bruchpunkte in 8q11.23-q12.1 und 18q22.3-q23 hervorgehoben.

4.2 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 8q12.1

Nach erfolgreicher Isolierung der BAC-DNAs wurden serielle FISH-Analysen durchgeführt. Insgesamt wurden für die Eingrenzung des zytogenetisch bestimmten Bruchpunktes in 8q11.23-q12.1 21 BAC-Klone verwendet (Tab. 3), wobei drei Klone (RP11-102D24, RP11-1058E13 und RP11-114M5) unspezifische Signale gaben. 13 BACs hybridisierten proximal zum Bruchpunkt und vier BACs distal davon. Der BAC-Klon RP11-924A24 in 8q12.1 ergab schließlich ein „Split-Signal“. Er hybridisierte sowohl auf dem derivativen Chromosom 8 als auch auf dem derivativen Chromosom 18. In Abbildung 15 ist das dazugehörige FISH-Bild dargestellt.

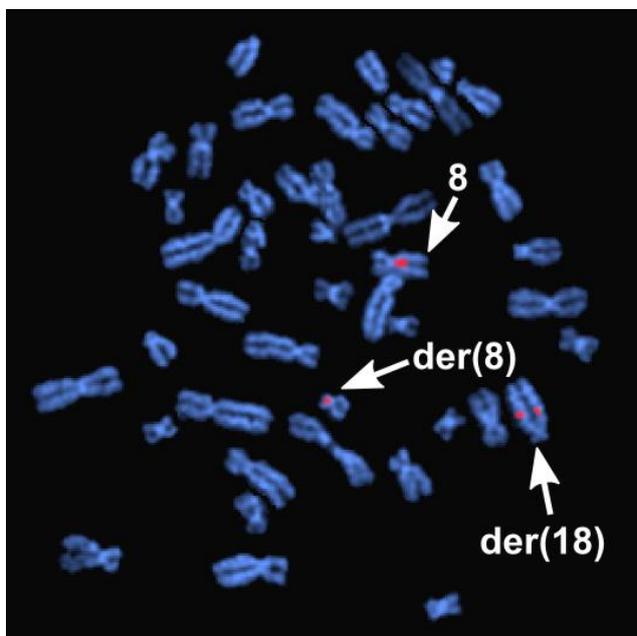


Abb. 15: FISH mit dem BAC-Klon RP11-924A24 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patient 2

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde RP11-924A24 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 8 und auf den derivativen Chromosomen 8 und 18, wobei die Intensität der Fluoreszenzsignale auf den derivativen Chromosomen gleich stark ist. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Dabei sind die Signale auf den derivativen Chromosomen gleich stark ausgeprägt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich der Bruchpunkt in etwa in der Mitte des BAC-Inserts befindet. Proximal wird der Bruchpunkt vom Klon RP11-430K7 und distal vom Klon RP11-359G13 begrenzt. Daraus ergibt sich eine etwa 100 Kb große Bruchpunktregion in 8q12.1 (Abb. 16).

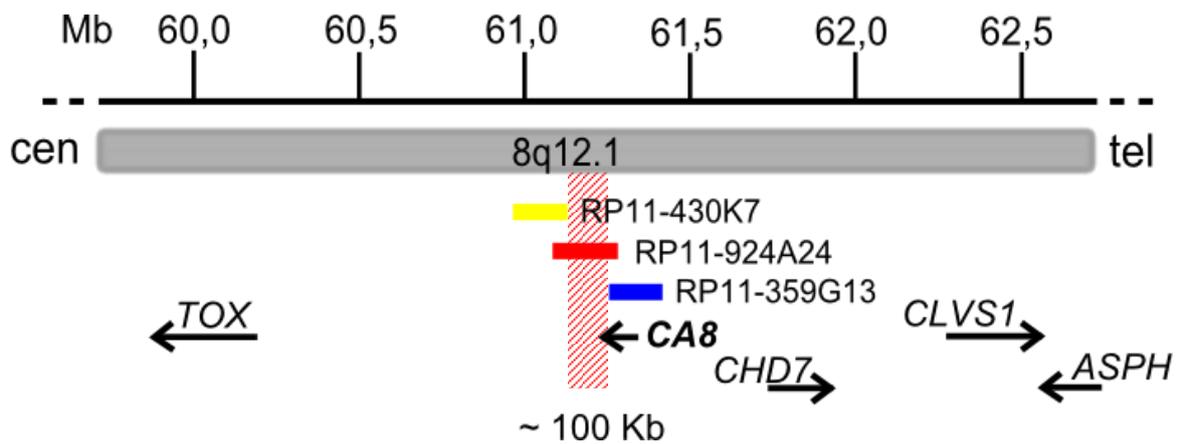


Abb. 16: Schematische Darstellung ausgewählter BAC-Klone und der in der Bruchpunktregion 8q12.1 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 8q12.1. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Der bruchpunktüberspannende BAC-Klon ist rot markiert. Der BAC, der distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und der BAC, der proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben ist das Gen, welches möglicherweise unterbrochen sein könnte. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Verschiedene Datenbankrecherchen ergaben, dass in der Bruchpunktregion das Gen *CA8* liegt und eventuell zwischen Intron 8 und Exon 9 unterbrochen sein könnte. Das von *CA8* kodierte Protein ist vor allem in Purkinje-Zellen exprimiert (Taniuchi K 2002).

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-386G21	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-140I16	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-342K10	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-756K15	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-636J3	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-99J23	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-614J15	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-1075B8	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-207I20	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-262K19	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-679O1	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-1128F17	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-430K7	8q12.1	WT 8, der(8)
RP11-924A24	8q12.1	WT 8, der(8), der(18)
RP11-359G13	8q12.1	WT 8, der(18)
RP11-39P8	8q12.1	WT 8, der(18)
RP11-27P7	8q12.1	WT 8, der(18)
RP11-99F5	8q12.2	WT 8, der(18)

Tab. 3: Eingesetzte BAC-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 8q12.1 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige BAC stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. Fett hervorgehoben ist der bruchpunktüberspannende BAC.

4.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 18q23

Durch die serielle FISH-Untersuchung mit 13 BAC-Klonen (Tab. 4) konnten zehn proximal vom Bruchpunkt gelegene BACs gefunden werden und zwei BACs, die distal zum Bruchpunkt hybridisierten. Der BAC-Klon RP11-62G9 stellte sich als unspezifisch heraus und wird daher in der Tabelle 4 nicht aufgelistet. Bei der Auswertung fielen RP11-1057F2 und RP11-1058J9 auf: RP11-1057F2 hybridisierte proximal und RP11-1058J9 distal zum Bruchpunkt. Beide BACs zeigten zwei distinkte Signale, obwohl deren Inserts eine Überlappung von 150 Kb aufweisen, so dass der Verdacht einer Mikrodeletion aufkam (Abb. 17).

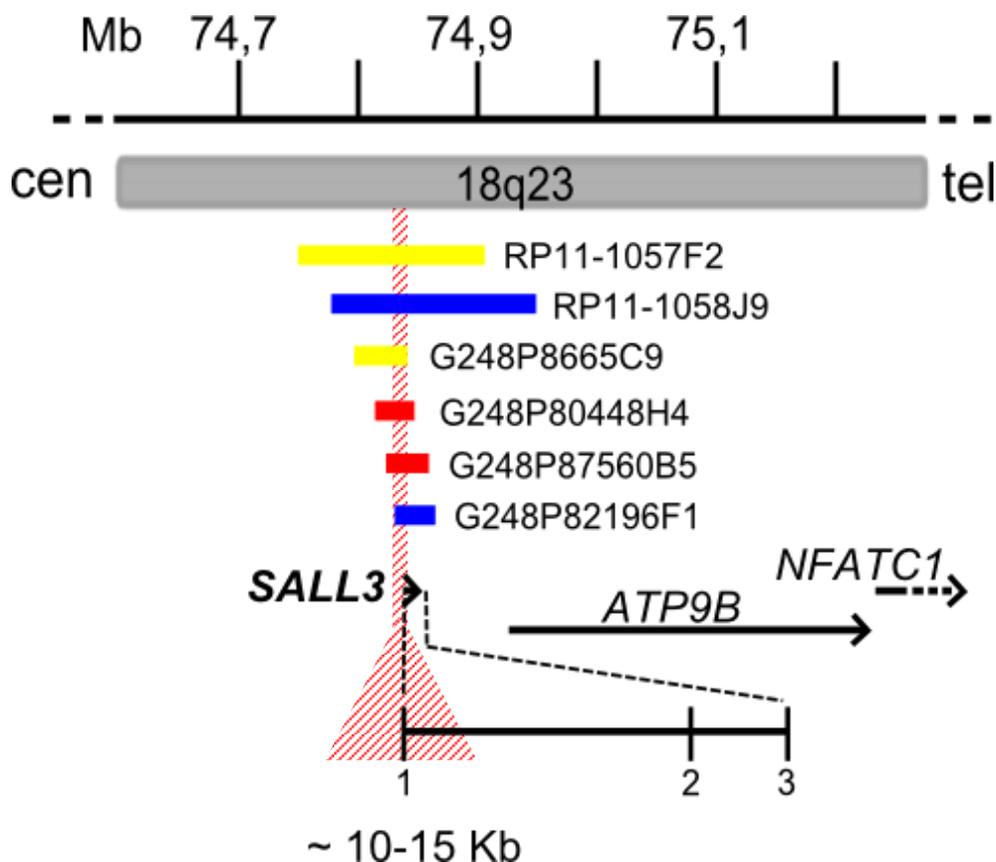


Abb. 17: Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 18q23 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 18q23. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Die bruchpunktüberspannenden Fosmide sind rot markiert. Klone, die distal vom Bruchpunkt hybridisierten, sind blau und Klone, die proximal hybridisierten, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die

Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben ist das Gen, welches möglicherweise unterbrochen sein könnte. Daher ist es vergrößert dargestellt. Dabei stellen die senkrechten schwarzen Striche Exons dar. Zwischen den einzelnen Exons befinden sich die Introns, die durch eine horizontale Linie wiedergegeben werden. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Aus diesem Grund wurden sieben Fosmid-Klone bestellt, die eine höhere Auflösung ermöglichen. Die Fosmide wurden so gewählt, dass sich die Inserts der Fosmide in der 150 Kb-Region überlappen, um eine mögliche Deletion auszuschließen. Es stellte sich heraus, dass zwei Fosmide proximal vom Bruchpunkt hybridisierten und drei distal davon. Die Fosmide G248P80448H4 und G248P87560B5 waren bruchpunktüberspannend. Hierbei fanden sich für G248P87560B5 keine Metaphasen mit drei Signalen, sondern Metaphasen mit je zwei Signalen. In etwa 80% der untersuchten Metaphasen wurde das Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 18 und auf dem derivativen Chromosom 18 gefunden, und in 20% der untersuchten Metaphasen fand sich das zweite Signal auf dem derivativen Chromosom 8. Dargestellt ist diese Signalkonstellation in Abbildung 18.

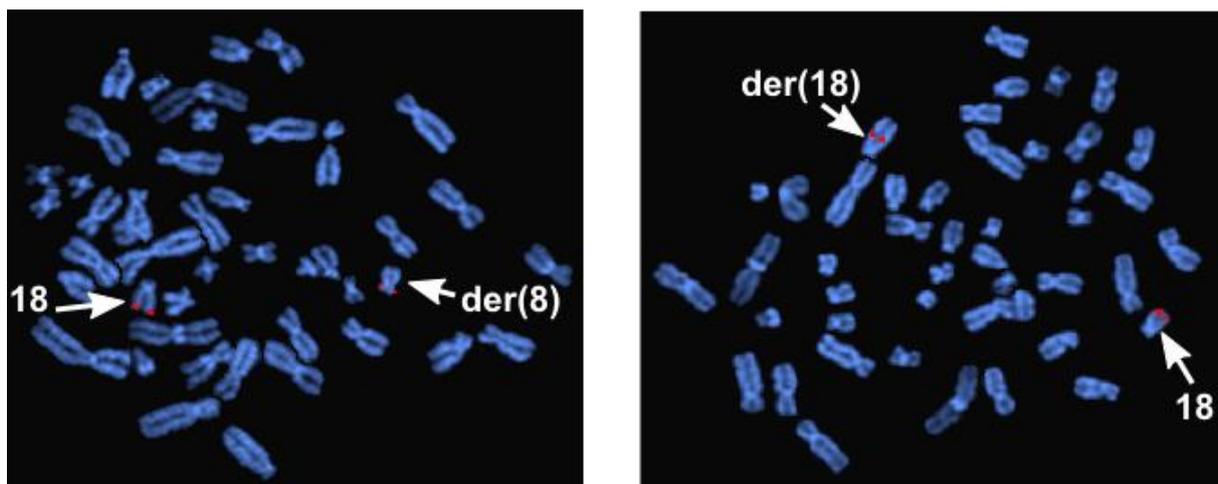


Abb. 18: FISH mit dem Fosmid-Klon G248P87560B5 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patient 2

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde G248P87560B5 findet sich auf dem linken Bild auf dem Wildtyp-Chromosom 18 und dem derivativen Chromosom 8 und auf dem rechten Bild auf dem Wildtyp-Chromosom 18 und dem derivativen Chromosom 18. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Beim Fosmid G248P80448H4 hingegen waren die Signale bei den untersuchten Metaphasen auf beiden derivativen Chromosomen 8 und 18 zu finden. Da alle Fosmide zwei regelrechte Signale bzw. „Split-Signals“ gaben, kann davon ausgegangen werden, dass entweder keine Deletion vorhanden ist oder sie so klein ist, dass sie aufgrund der begrenzten Auflösung der FISH-Methode nicht detektiert werden konnte. Durch die Auswertung aller Fosmide konnten wir die Bruchpunktregion in 18q23 schließlich auf etwa 10 bis 15 Kb eingrenzen. In dieser Region liegt das *SALL3*-Gen, das unterbrochen sein könnte (Abb. 17). Das von *SALL3* kodierte Protein gehört zur Spalt-Familie und spielt eine wichtige

Rolle in der Embryonalentwicklung (Sweetman D 2006). Weitere Erläuterungen dazu sind in der Diskussion unter 3.2 zu finden.

Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-543H23	18q22.2	WT 18, der(18)
RP11-862L9	18q23	WT 18, der(18)
RP11-707P24	18q23	WT 18, der(18)
RP11-1150B1	18q23	WT 18, der(18)
RP11-671C19	18q23	WT 18, der(18)
RP11-100K18	18q23	WT 18, der(18)
RP11-640M23	18q23	WT 18, der(18)
RP11-669B13	18q23	WT 18, der(18)
RP11-958C14	18q23	WT 18, der(18)
RP11-1057F2	18q23	WT 18, der(18)
G248P87669C9	18q23	WT 18, der(18)
G248P8665C9	18q23	WT 18, der(18)
G248P80448H4	18q23	WT 18, der(8), der(18)
G248P87560B5	18q23	WT 18, der(8); WT 18, der(18)
G248P82196F1	18q23	WT 18, der(8)
RP11-1058J9	18q23	WT 18, der(8)
G248P82549H8	18q23	WT 18, der(8)
G248P81803E8	18q23	WT 18, der(8)
RP11-152I15	18q23	WT 18, der(8)

Tab. 4: Eingesetzte BAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 18q23 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. Fett hervorgehoben sind die bruchpunktüberspannenden Fosmide.

5. Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 11;17-Translokation bei Patient 3

5.1 Patientenbeschreibung

Der heute 4-jährige Patient 3 kam in der 38. SSW durch einen Kaiserschnitt auf die Welt. Die Geburtsmaße betragen 3050 g und 49 cm. Während der Schwangerschaft erkrankte die Mutter an einem Cervix-Carcinom, das direkt nach der Geburt operiert wurde. Seine Eltern

sind nicht miteinander verwandt. Desweiteren hat Patient 3 einen gesunden, 1½ Jahre älteren Bruder.

Mit etwa einem Jahr bemerkten die Eltern eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung. Davor fiel er bereits durch eine Gedeihstörung und einen Ventrikelseptumdefekt auf. Mit 1½ Jahren konnte er noch nicht sprechen und nur mit Hilfe an der Hand gehen. Er zeigte kraniofaziale Dysmorphien, wie eine kurze, nach oben gerichtete Nase, einen flachen Nasenrücken, abstehende Ohren, einen hohen, bogenförmigen Gaumen, ein breites Philtrum, weit auseinander stehende Zähne und einen breiten Thorax. Der mentale und psychomotorische Entwicklungsstand entsprach mit 18 Monaten einem 9 Monate alten Kind. Der damals bestimmte Intelligenzquotient lag bei 48. Aufgrund des Phänotyps erfolgte eine Chromosomenanalyse in Ungarn, die eine Translokation zwischen den Chromosomen 11 und 17 feststellte. Eine zweite zytogenetische Untersuchung am Institut für Humangenetik in Hamburg bestätigte die Translokation. Sie ergab eine *de novo* vorliegende balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 11 und 17 mit dem Karyotyp 46,XY,t(11;17)(q13.3;q25.3) (Abb. 19).

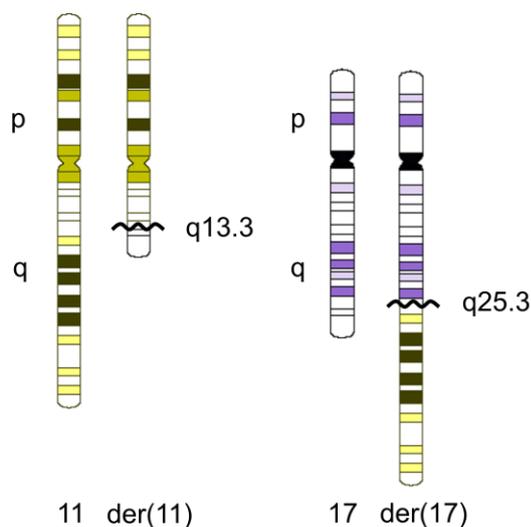


Abb. 19: Schematische Darstellung der Wildtyp- und derivativen Chromosomen des Patienten 3 mit 11;17-Translokation

Die Abbildung zeigt die beiden Wildtyp-Chromosomen 11 (oliv-grün) und 17 (violett) und die rearrangierten Chromosomen 11 [der(11)] und 17 [der(17)]. Mit Hilfe einer Schlangenlinie sind die zytogenetisch bestimmten Bruchpunkte in 11q13.3 und 17q25.3 hervorgehoben.

Eine im Anschluss durchgeführte Array-CGH-Untersuchung ergab keine krankheitsrelevanten Duplikation oder Deletionen, so dass mit der FISH-Analyse begonnen werden konnte.

5.2 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 11q13.3

Die serielle FISH-Analyse mit zwölf BAC-Klonen (Tab. 5) ergab sechs proximal vom Bruchpunkt hybridisierende und vier distal davon hybridisierende BACs. Für die BAC-Klone RP11-826F13 und RP11-361G24 fanden sich je ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 11

und auf den beiden derivativen Chromosomen 11 und 17. Das bedeutet, dass die Inserts der beiden BACs bruchpunktüberspannend sind. Die Signalintensität des BAC-Klons RP11-826F13 war dabei gleichmäßig auf beide derivativen Chromosomen verteilt. Im Gegensatz dazu zeigte der BAC RP11-361G24 auf dem derivativen Chromosom 17 ein stärkeres und auf dem derivativen Chromosom 11 ein schwächeres Signal (Abb. 20).

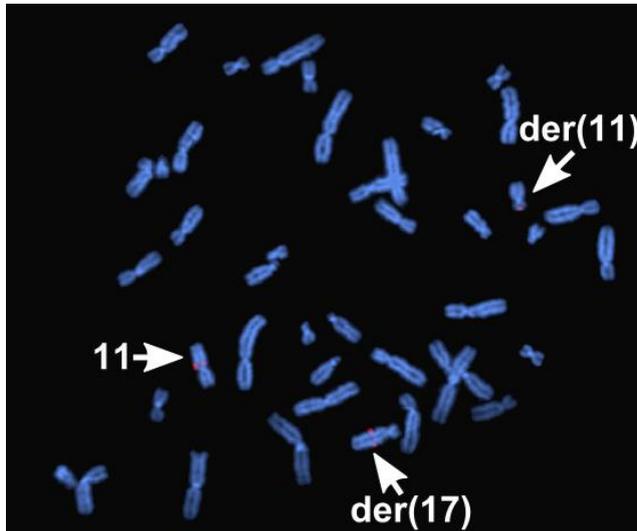


Abb. 20: FISH mit dem BAC-Klon RP11-361G24 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patient 3

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde RP11-361G24 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 11 und auf den derivativen Chromosomen 11 und 17, wobei das Signal auf dem derivativen Chromosom 11 schwächer ist. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Zurückzuführen ist diese Signalkonstellation auf die Tatsache, dass das Insert von RP11-361G24 nicht symmetrisch über dem Bruchpunkt liegt. Wie aus Abbildung 21 zu entnehmen ist, befindet sich der Bruchpunkt im ersten proximalen Drittel des BAC-Inserts.

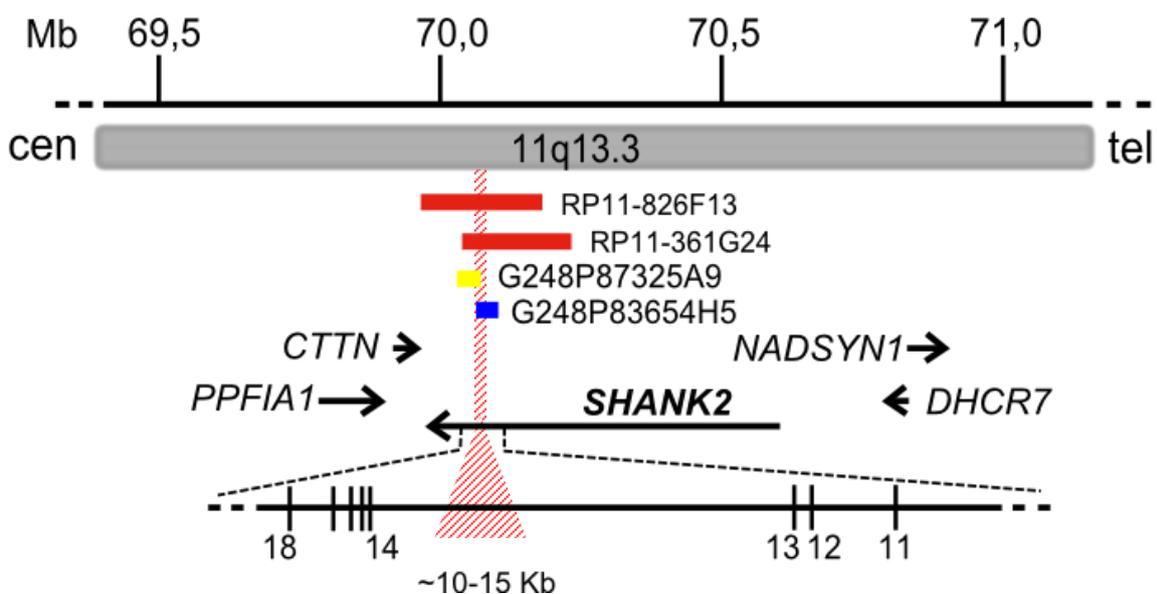


Abb. 21: Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 11q13.3 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 11q13.3. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Die

bruchpunktüberspannenden BACs sind rot markiert. Das Fosmid, das distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und das Fosmid, das proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben ist das unterbrochene Gen, welches vergrößert dargestellt ist. Dabei stellen die senkrechten schwarzen Striche Exons dar. Zwischen den einzelnen Exons befinden sich die Introns, die durch eine horizontale Linie wiedergegeben werden. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Für die Feinkartierung wurden vier Fosmide eingesetzt. Eins hybridisierte proximal und drei distal zum Bruchpunkt. Durch die Auswertung der Fosmide G248P87325A9 (proximal) und G248P83654H5 (distal) konnte die Bruchpunktregion schließlich auf etwa 10 bis 15 Kb eingegrenzt werden (Abb. 21).

Anschließende Datenbankrecherchen ergaben, dass in dieser Bruchpunktregion das Gen *SHANK2* im Intron 13 direkt unterbrochen ist (Abb. 21). SHANK2 gehört zur Familie der SHANK-Proteine, welche als Gerüstproteine eine wichtige Rolle in der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen spielen (Sheng M 2000).

Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-715N9	11q13.2	WT 11, der(11)
RP11-805J14	11q13.3	WT 11, der(11)
RP11-186D19	11q13.3	WT 11, der(11)
RP11-113L16	11q13.3	WT 11, der(11)
RP11-1146L22	11q13.3	WT 11, der(11)
RP11-598K3	11q13.3	WT 11, der(11)
G248P87325A9	11q13.3	WT 11, der(11)
RP11-826F13	11q13.3	WT 11, der(11), der(17)
RP11-361G24	11q13.3	WT 11, der(11), der(17)
G248P83654H5	11q13.3	WT 11, der(17)
G248P89482C11	11q13.3	WT 11, der(17)
G248P87040D2	11q13.3	WT 11, der(17)
RP11-916J3	11q13.4	WT 11, der(17)
RP11-21D20	11q13.4	WT 11, der(17)
RP11-660L16	11q13.4	WT 11, der(17)
RP11-7N14	11q13.4	WT 11, der(17)

Tab. 5: Eingesetzte BAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 11q13.3 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. Fett hervorgehoben sind die bruchpunktüberspannenden BACs.

5.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 17q25.1

Auf Chromosom 17 ergab die serielle FISH-Untersuchung mit insgesamt 16 BAC-Klonen fünf proximal vom Bruchpunkt hybridisierende und sechs distal davon hybridisierende BACs (Tab. 6). Vier BAC-Klone (RP11-685I11, RP11-794C22, RP11-559N14 und RP11-765O14) stellten sich dabei als unspezifisch heraus und sind nicht in Tabelle 6 aufgelistet. Der BAC-Klon RP11-89B11 gab schließlich ein „Split-Signal“ in q25.1 (Abb. 22).

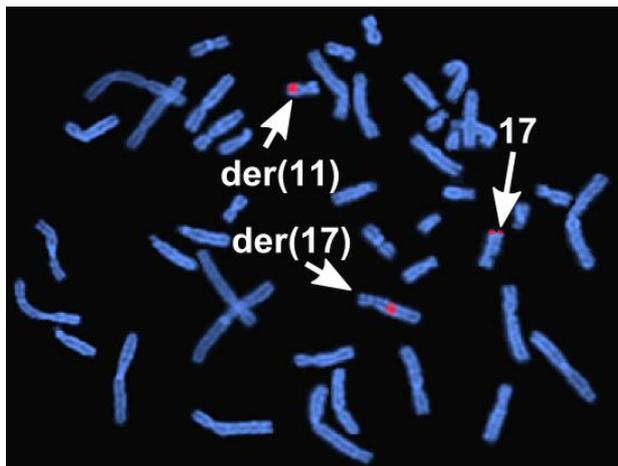


Abb. 22: FISH mit dem BAC-Klon RP11-89B11 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patient 3

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde RP11-89B11 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 17 und auf den derivativen Chromosomen 11 und 17, wobei die Intensität der Signale gleich stark ausgeprägt ist. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Dabei war die Signalintensität auf den beiden derivativen Chromosomen 11 und 17 gleich stark, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass der Bruchpunkt sich etwa in der Mitte des Inserts befindet. Dieses Ergebnis wurde durch den BAC RP11-20D1, welcher proximal vom Bruchpunkt hybridisierte, und RP11-61B11, der distal vom Bruchpunkt hybridisierte, bestätigt. Mit Hilfe dieser drei BACs konnte die Bruchpunktregion somit auf etwa 40 bis 45 Kb eingrenzt werden (Abb. 23).

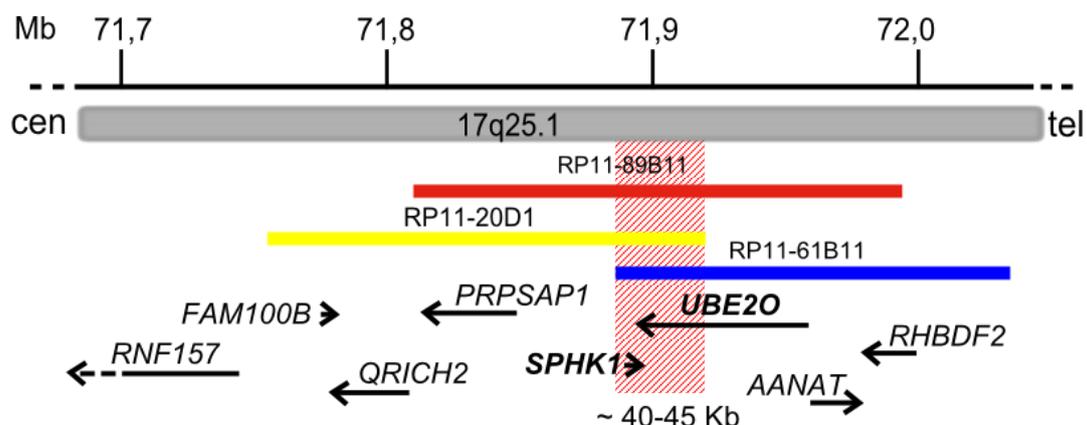


Abb. 23: Schematische Darstellung ausgewählter BAC-Klone und der in der Bruchpunktregion 17q25.1 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 17q25.1. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Der bruchpunktüberspannende BAC-Klon ist rot markiert. Der BAC, der distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und der BAC, der proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben sind die in der Bruchpunktregion

liegenden Gene. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Hier wurde die Bruchpunktregion nicht näher durch Fosmide eingegrenzt. In dieser 40 bis 45 Kb großen Bruchpunktregion liegen die Gene *SPHK1* und *UBE2O*. Eins der beiden Gene könnte durch die Translokation unterbrochen sein. *SPHK1* kodiert für eine Sphingosin-Kinase, die in der Lage ist, Sphingosin-1-Phosphat (S1P) zu phosphorylieren. S1P selbst hat sowohl intra- als auch extrazelluläre Funktionen (Shida D 2008). *UBE2O* kodiert für ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (Wefes I 1995).

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-166M16	17q24.3	WT 17, der(17)
RP11-16C1	17q25.1	WT 17, der(17)
RP11-449L23	17q25.1	WT 17, der(17)
RP11-449J21	17q25.1	WT 17, der(17)
RP11-20D1	17q25.1	WT 17, der(17)
RP11-89B11	17q25.1	WT 17, der(11), der(17)
RP11-61B11	17q25.1	WT 17, der(11)
RP11-666A8	17q25.1	WT 17, der(11)
RP11-951C22	17q25.1-q25.2	WT 17, der(11)
RP11-358E11	17q25.1	WT 17, der(11)
RP11-13K12	17q25.3	WT 17, der(11)
RP11-353N14	17q25.3	WT 17, der(11)

Tab. 6: Eingesetzte BAC-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 17q25.1 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige BAC stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. Fett hervorgehoben ist der bruchpunktüberspannende BAC.

6. Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 1;5-Translokation bei Patient 4

6.1 Patientenbeschreibung

Patient 4 ist ein 5 Jahre alter Junge mit Entwicklungsverzögerung und Autismus. Es liegen keine weiteren klinischen Daten von ihm vor. Eine in Belgien durchgeführte zytogenetische Untersuchung ergab bei diesem Jungen eine Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 5. Dabei lag in diesem Fall die Translokation nicht *de novo* vor, sondern wurde von der gesunden Mutter weiter vererbt. Die Mutter ist normal intelligent. Auffällig sind bei ihr jedoch eine Brachydaktylie und invertierte Brustwarzen. Eine Array-CGH-Untersuchung detektierte eine Mikrodeletion in der Region 5p15.2 sowohl beim Jungen als auch bei seiner Mutter. Da

genetische Veränderungen in bereits bekannten Genen für Autismus mit unvollständiger Penetranz einhergehen können (Toro R 2010), kann das Rearrangement verantwortlich für den Phänotyp des Patienten 4 sein. Aus diesem Grund wurde am Institut für Humangenetik in Hamburg eine erneute Chromosomenanalyse durchgeführt, die den Karyotyp 46,XY,t(1;5)(q41-q42;q31) ergab (Abb. 24).

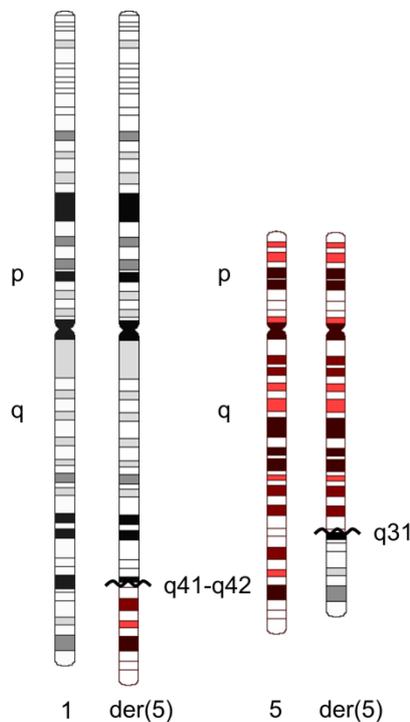


Abb. 24: Schematische Darstellung der Wildtyp- und derivativen Chromosomen des Patienten 4 mit 1;5-Translokation

Die Abbildung zeigt die beiden Wildtyp-Chromosomen 1 (grau) und 5 (rot) und die rearrangierten Chromosomen 1 [der(1)] und 5 [der(5)]. Mit Hilfe einer Schlangenlinie sind die zytogenetisch bestimmten Bruchpunkte 1q41-q42 und 5q31 hervorgehoben.

6.2 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 1q41

Die serielle FISH-Untersuchung erfolgte in der zytogenetisch bestimmten Region 1q41-q42 mit insgesamt 16 BAC-Klonen, wobei fünf BACs proximal zum Bruchpunkt und neun BACs distal zum Bruchpunkt hybridisierten (Tab. 7). Zwei der 16 BAC-Klone (RP11-664E5 und RP11-675M15) sind in der Tabelle 7 nicht aufgelistet, da sie unspezifische Signale gaben. Auf diesem Chromosom konnte kein bruchpunktüberspannender BAC gefunden werden, dennoch konnte mit Hilfe der BAC-Klone RP11-690H3, welcher proximal hybridisierte, und RP11-231P2, der distal zum Bruchpunkt hybridisierte, die Bruchpunktregion auf etwa 100 Kb eingegrenzt werden. Diese Größe entsprach dabei der Überlappung der beiden BAC-Inserts (Abb. 25).

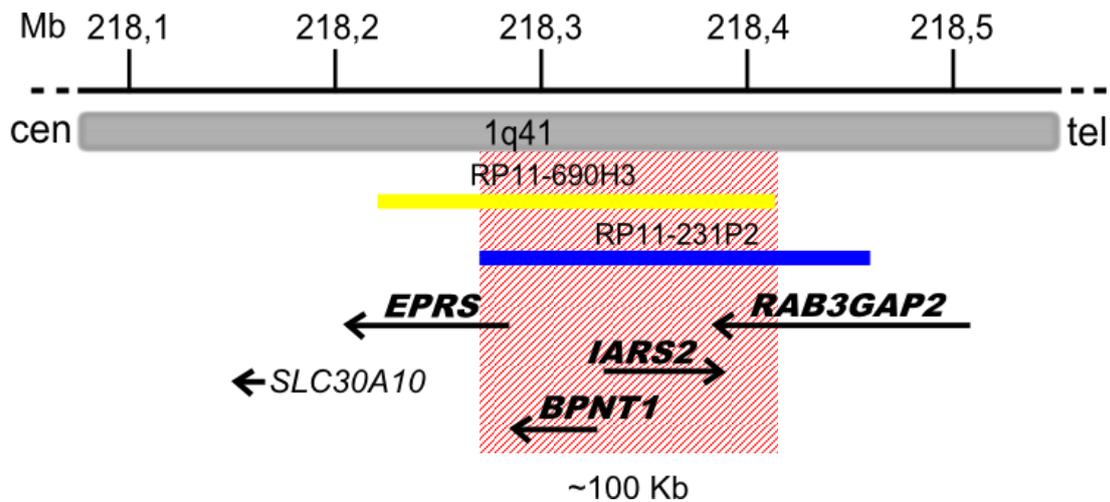


Abb. 25: Schematische Darstellung ausgewählter BAC-Klone und der in der Bruchpunktregion 1q41 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 1q41. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Der BAC, der distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und der BAC, der proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben sind die in der Bruchpunktregion liegenden Gene. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Obwohl die Überlappung etwa 100 Kb betrug, gaben die BACs distinkte Signale. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Deletion in dieser Region sein, die so klein ist, dass sie sowohl mit der FISH-Technik als auch mit der Array-CGH nicht detektiert werden konnte. Da in diesem Fall kein bruchpunktüberspannender BAC gefunden worden ist, sind in Abbildung 26 die die Bruchpunktregion eingrenzenden BACs dargestellt.

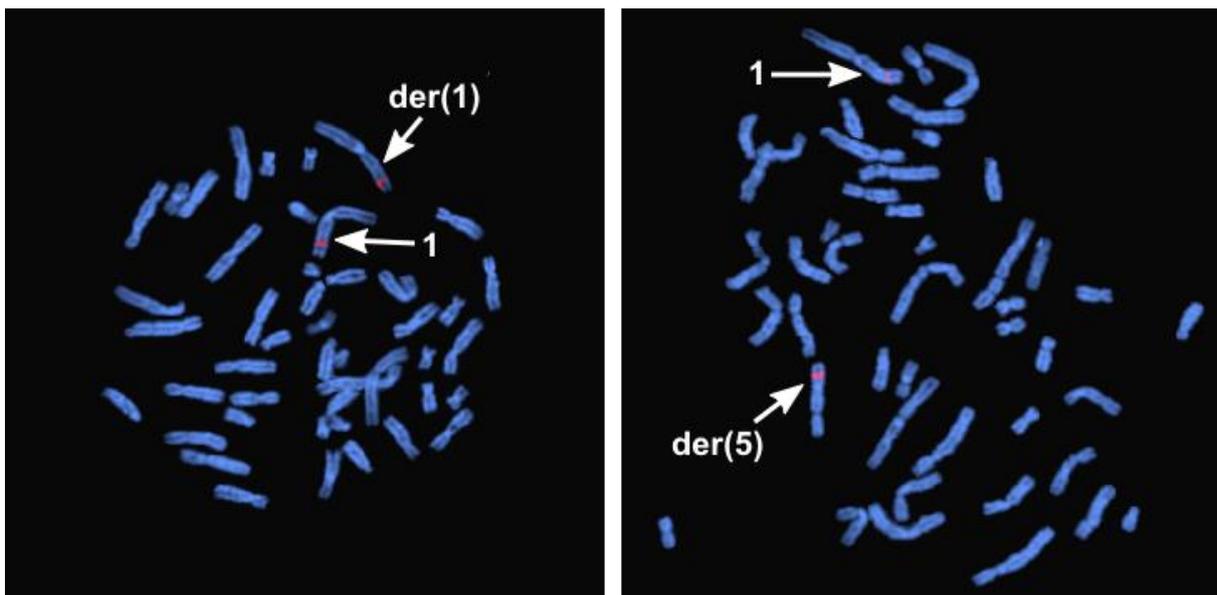


Abb. 26: FISH mit den BAC-Klonen RP11-690H3 (links) und RP11-231P2 (rechts) als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patient 4

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde RP11-690H3 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 1 und auf dem derivativen Chromosom 1 (links). Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde RP11-231P2 befindet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 1 und auf dem derivativen Chromosom 5 (rechts). Die Chromosomen wurden jeweils mit DAPI gefärbt.

In der Bruchpunktregion liegen vier Gene *EPRS*, *BPNT1*, *IARS2* und *RAB3GAP2* (Abb. 25).

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-554K11	1q32.3	WT 1, der(1)
RP11-553F10	1q41	WT 1, der(1)
RP11-816K22	1q41	WT 1, der(1)
CTC-784C12	1q41	WT 1, der(1)
RP11-690H3	1q41	WT 1, der(1)
RP11-231P2	1q41	WT 1, der(5)
RP11-975N3	1q41	WT 1, der(5)
RP11-302I18	1q41	WT 1, der(5)
RP11-295M18	1q41	WT 1, der(5)
RP11-92H11	1q41	WT 1, der(5)
RP11-458C5	1q41	WT 1, der(5)
RP11-328N1	1q42.12	WT 1, der(5)
RP11-115P16	1q42.12	WT 1, der(5)
RP11-284L19	1q42.2	WT 1, der(5)

Tab. 7: Eingesetzte BAC-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 1q41 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige BAC stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet.

6.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 5q31.1

Für die Kartierung des Bruchpunktes auf Chromosom 5 mittels serieller FISH-Analyse wurden elf BAC-Klone benötigt. Drei davon hybridisierten proximal und sechs distal vom Bruchpunkt (Tab. 8). Die in der Tabelle 8 nicht aufgeführten BACs RP11-351F7 und RP11-1067D23 gaben unspezifische Signale. Für eine Feinkartierung wurden insgesamt sieben Fosmide eingesetzt, wobei vier davon proximal und zwei davon distal vom Bruchpunkt hybridisierten. Schließlich gab das Fosmid G248P86998H1 ein „Split-Signal“ (Abb. 27).

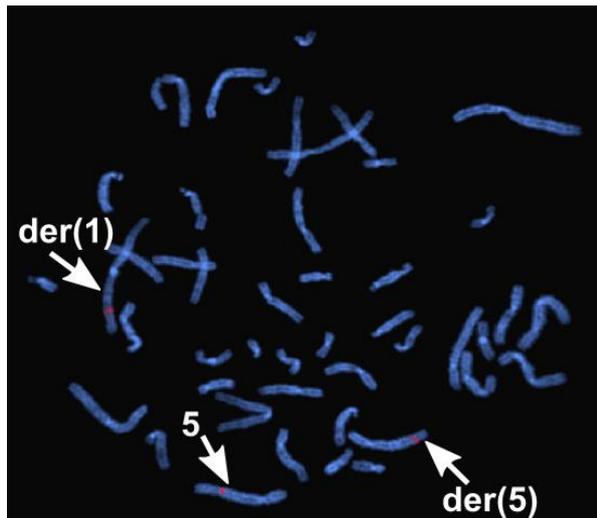


Abb. 27: FISH mit dem Fosmid G248P86998H1 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patient 4

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde G248P86998H1 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 5 und auf den derivativen Chromosomen 1 und 5, wobei die Intensität der Signale gleich stark ausgeprägt ist. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Es hybridisierte auf dem Wildtyp-Chromosom 5 und auf beiden derivativen Chromosomen 1 und 5, wobei die Signalintensität auf den derivativen Chromosomen gleich stark ausgeprägt war. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Fosmid-Insert ungefähr symmetrisch über dem Bruchpunkt liegt (Abb. 28).

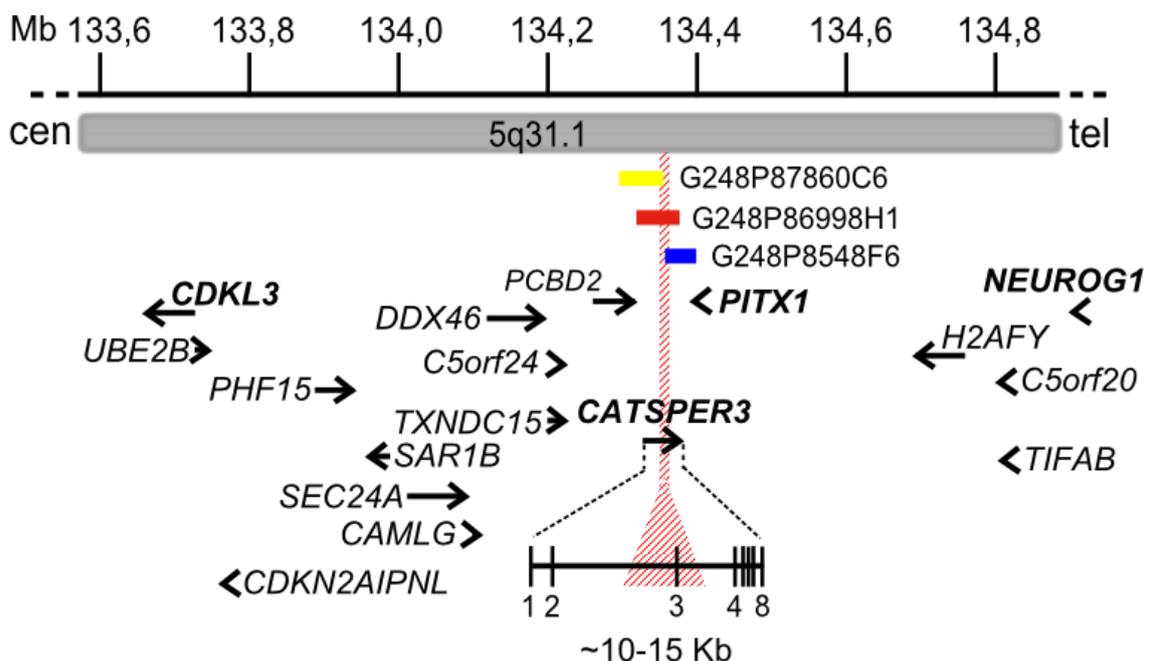


Abb. 28: Schematische Darstellung ausgewählter Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 5q31.1 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 5q31.1. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Das bruchpunktüberspannende Fosmid ist rot markiert. Das Fosmid, das distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und das Fosmid, das proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben sind die Kandidatengene für den Phänotyp des Patienten 4 und das unterbrochene Gen, welches vergrößert dargestellt ist. Dabei stellen die senkrechten schwarzen Striche Exons dar. Zwischen den einzelnen Exons befinden sich die Introns, die durch eine horizontale Linie wiedergegeben werden. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Mit Hilfe der eingrenzenden Fosmide G248P87860C6 (proximal) und G248P81085B10 (distal) und dem bruchpunktüberspannenden Fosmid konnte schließlich die Bruchpunktregion auf etwa 10 bis 15 Kb minimiert werden. Anhand der Abbildung 28 lässt sich entnehmen, dass es durch die Translokation zu einer direkten Unterbrechung des Gens *CATSPER3* kommt. Das von diesem Gen kodierte Protein wird sowohl im Hoden als auch im Gehirn von Mäusen exprimiert (Kim CW 2010). Weitere interessante Gene sind *CDKL3*, *PITX1* und *NEUROG1*. Nähere Erläuterungen dazu finden sich in der Diskussion unter 5.2.

Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-114H7	5q23.3	WT 5, der(5)
RP11-21C10	5q31.1	WT 5, der(5)
RP11-484B2	5q31.1	WT 5, der(5)
G248P89823F2	5q31.1	WT 5, der(5)
G248P82041C9	5q31.1	WT 5, der(5)
G248P85475C2	5q31.1	WT 5, der(5)
G248P87860C6	5q31.1	WT 5, der(5)
G248P86998H1	5q31.1	WT 5, der(1), der(5)
RP11-1085B10	5q31.1	WT 5, der(1)
G248P8548F6	5q31.1	WT 5, der(1)
G248P85089	5q31.1	WT 5, der(1)
RP11-21J3	5q31.1	WT 5, der(1)
RP11-39H4	5q31.1	WT 5, der(1)
RP11-149E17	5q31.2	WT 5, der(1)
RP11-381K20	5q31.2	WT 5, der(1)
RP11-48L3	5q31.3	WT 5, der(1)

Tab. 8: Eingesetzte BAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 5q31.1 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. Fett hervorgehoben ist das bruchpunktüberspannende Fosmid.

7. Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 5;13-Translokation bei Patient 5

7.1 Patientenbeschreibung

Patient 5 kam nach einer komplikationslos verlaufenden Schwangerschaft durch einen Kaiserschnitt zur Welt. Seine Geburtsmaße waren 4000 g und 54 cm. Seine körperliche

Entwicklung verlief bis zum 7. Lebensjahr normal. Danach begann er sehr stark an Gewicht zuzunehmen. Mit 14 Jahren wurde er erstmals in der Humangenetik in Budapest, Ungarn aufgrund eines Verdachts auf ein Klinefelter-Syndrom vorstellig. Zu diesem Zeitpunkt wog er 126 kg bei einer Körpergröße von 1,85 m. Besonders auffallend war seine Gynäkomastie. Abgesehen von den typisch weiblichen Körperrundungen hatte er für einen Jungen eine ungewöhnlich hohe Stimme, seine Hoden waren im Vergleich zu seinem Körper relativ klein, und er hatte vor allem am Bauch sehr stark ausgeprägte Dehnungstreifen, sog. Striae. Weiterhin auffällig war sein hoher Blutdruck, der bei 160/90 mmHg lag. Seine geistige Entwicklung war normal. Aufgrund des auffälligen Phänotyps wurde eine Chromosomenanalyse in Budapest durchgeführt, die eine *de novo* vorliegende, balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 5 und 13 ergab. Das Ergebnis einer Array-CGH gab ebenfalls keinen Hinweis auf krankheitsrelevante Deletionen oder Duplikationen.

Mit 15 Jahren wurde Patient 5 wegen seiner Gynäkomastie operiert. Der heute 16-jährige Patient hat eine Körpergröße von 1,92 m erreicht und ist trotz des Sports, den er regelmäßig betreibt, übergewichtig. Seine gesunden Eltern und Großeltern sind normal groß und schwer. Da ein Klinefelter-Syndrom als Ursache für seine Gynäkomastie ausgeschlossen werden konnte, wird vermutet, dass die Translokation für seinen Phänotyp verantwortlich ist. Aus diesem Grund erfolgte am Institut für Humangenetik in Hamburg eine zweite Chromosomenanalyse, die folgenden Karyotyp ergab: 46,XY,t(5;13)(q14.2;q14.1). Schematisch dargestellt sind die Chromosomen in Abbildung 29.

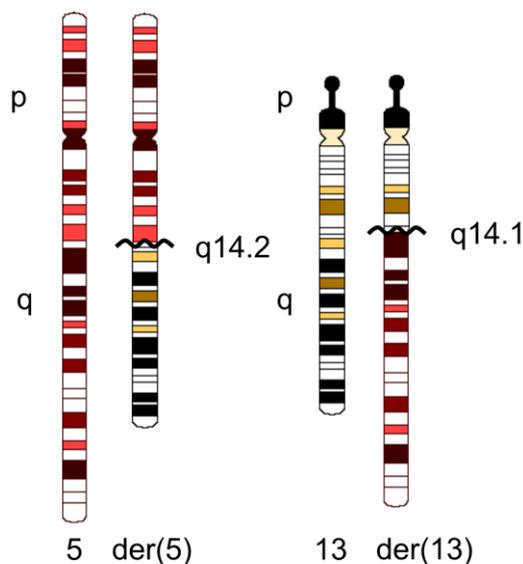


Abb. 29: Schematische Darstellung der Wildtyp- und derivativen Chromosomen des Patienten 5 mit 5;13-Translokation

Die Abbildung zeigt die beiden Wildtyp-Chromosomen 5 (rot) und 13 (orange) und die rearrangierten Chromosomen 5 [der(5)] und 13 [der(13)]. Mit Hilfe einer Schlangenlinie sind die zytogenetisch bestimmten Bruchpunkte 5q14.2 und 13q14.1 hervorgehoben.

7.2 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 5q21.1

Durch die Auswertung von 18 BAC-Klonen mittels serieller FISH-Analyse konnten schließlich 13 BACs gefunden werden, die proximal zum Bruchpunkt hybridisierten. Weitere fünf BACs hybridisierten distal davon (Tab. 9). Nachdem die BACs RP11-188G8, welcher proximal hybridisierte, und RP11-357A6, der distal hybridisierte, ausgewertet wurden, konnte die Bruchpunktregion in 5q21.1 auf etwa 50 Kb eingegrenzt werden. Daraufhin wurde eine Feinkartierung mit sechs Fosmiden durchgeführt. Dabei hybridisierte eins proximal und vier hybridisierten distal vom Bruchpunkt. Das Fosmid G248P86259F9 gab hierbei unspezifische Signale. Für diese Bruchpunktkartierung auf Chromosom 5 wurde kein bruchpunktüberspannender Klon gefunden. Daher sind in Abbildung 30 die Signale des distal zum Bruchpunkt hybridisierenden Fosmids G248P80927C5 dargestellt.

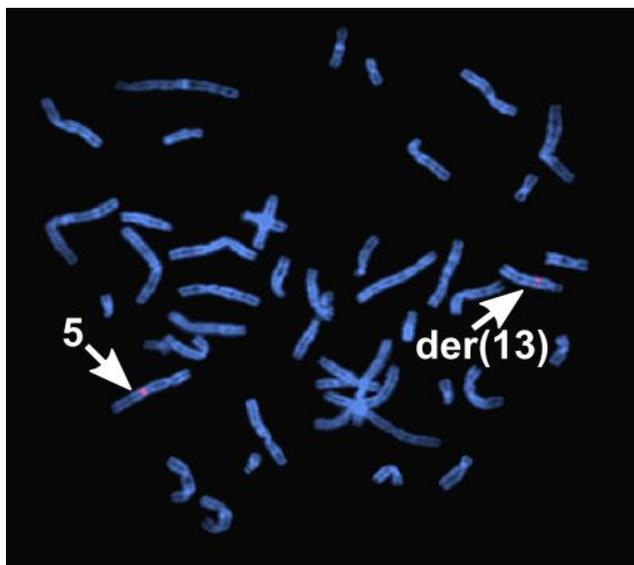


Abb. 30: FISH mit dem Fosmid G248P80927C5 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patient 5

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde G248P80927C5 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 5 und auf den derivativen Chromosom 13. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt

Proximal wird der Bruchpunkt durch das Fosmid G248P88773A8 eingegrenzt, so dass sich schließlich eine Bruchpunktregion von etwa 15 bis 20 Kb in 5q21.1 ergab, die der Überlappung der beiden eingrenzenden Fosmid-Inserts entspricht (Abb. 31).

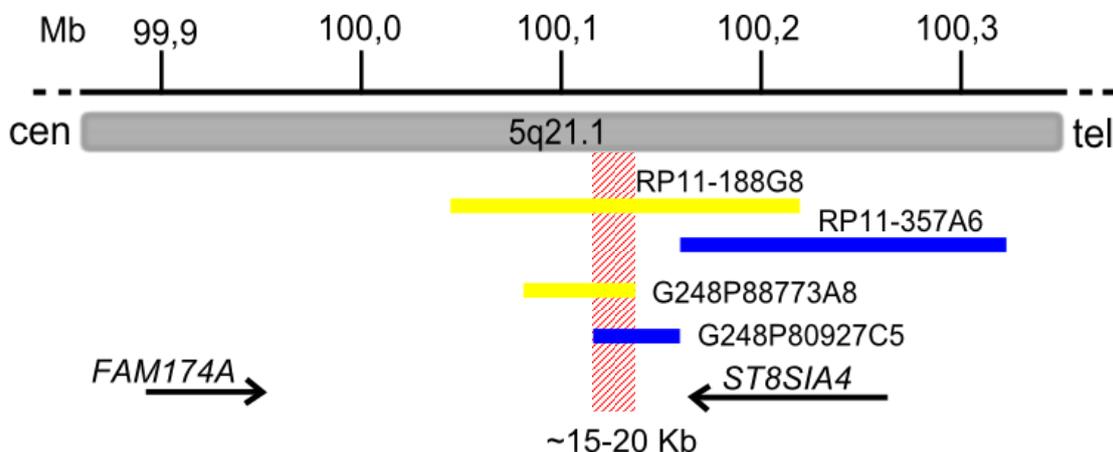


Abb. 31: Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 5q21.1 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 5q21.1. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Die Klone, die distal vom Bruchpunkt hybridisierten, sind blau, und die Klone, die proximal hybridisierten, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Wie in Abbildung 31 zu erkennen ist, liegt die 15 bis 20 Kb große Bruchpunktregion nicht wie erwartet in dem überlappenden Bereich der beiden BAC-Klone RP11-188G8 und RP11-357A6, sondern proximal davon. Weiterhin ist der Abbildung 31 zu entnehmen, dass durch die Translokation kein Gen direkt disruptiert ist. Datenbankrecherchen ergaben, dass das Gen *FAM174A* proximal vom Bruchpunkt lokalisiert ist, wobei die Funktion des von ihm kodierten Proteins noch unbekannt ist. Distal vom Bruchpunkt liegt das Gen *ST8SIA4*, das für eine Glykosyltransferase kodiert (Rieger S 2008).

Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-356D23	5q14.1-q14.2	WT 5, der(5)
RP11-336F20	5q14.3	WT 5, der(5)
RP11-265O6	5q14.3	WT 5, der(5)
RP11-116A1	5q14.3	WT 5, der(5)
RP11-65F13	5q15	WT 5, der(5)
RP11-995J21	5q21.1	WT 5, der(5)
RP11-395N10	5q21.1	WT 5, der(5)
RP11-475J5	5q21.1	WT 5, der(5)
RP11-467C9	5q21.1	WT 5, der(5)
RP11-626P15	5q21.1	WT 5, der(5)
RP11-460A14	5q21.1	WT 5, der(5)
RP11-188G19	5q21.1	WT 5, der(5)
RP11-188G8	5q21.1	WT 5, der(5)
G248P88773A8	5q21.1	WT 5, der(5)
G248P80927C5	5q21.1	WT 5, der(13)
G248P8858D3	5q21.1	WT 5, der(13)
RP11-357A6	5q21.1	WT 5, der(13)
G248P80288H8	5q21.1	WT 5, der(13)
G248P85483E6	5q21.1	WT 5, der(13)
RP11-1122O14	5q21.1	WT 5, der(13)
RP11-26N10	5q21.1	WT 5, der(13)
RP11-20L22	5q21.1	WT 5, der(13)
RP11-124B7	5q22.1	WT 5, der(13)

Tab. 9: Eingesetzte BAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 5q21.1 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet.

7.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 13q14.12

Durch die serielle FISH-Analyse mit neun BAC-Klonen konnten drei proximal zum Bruchpunkt hybridisierende und fünf distal zum Bruchpunkt hybridisierende BACs gefunden werden. Für den BAC RP11-484B12 wurde ein „Split-Signal“ gefunden (Abb. 32).

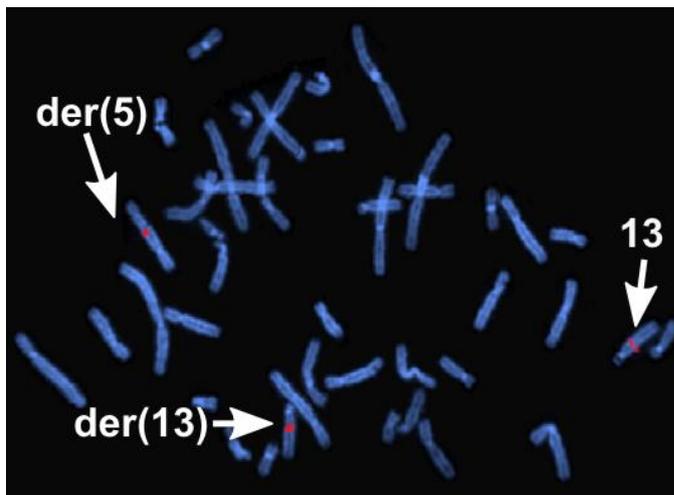


Abb. 32: FISH mit dem BAC-Klon RP11-484B12 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patient 5

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde RP11-484B12 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 13 und auf den derivativen Chromosomen 5 und 13, wobei die Signalintensität auf dem derivativen Chromosom 13 etwas stärker war als auf dem derivativen Chromosom 5. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Es stellte sich heraus, dass beim Klon RP11-484B12 das Signal auf dem derivativen Chromosom 13 etwas stärker ausgeprägt war als auf dem derivativen Chromosom 5. Um eine weitere Feinkartierung durchzuführen, wurden vier Fosmide bestellt, wobei drei Fosmide proximal zum Bruchpunkt hybridisierten. Das Fosmid G248P87318B10 ergab ein „Split-Signal“ in 13q14.12, wobei das Insert nicht symmetrisch über dem Bruchpunkt lag. In 80% der untersuchten Metaphasen fand sich das zweite Signal auf dem derivativen Chromosom 13 und in 20% auf dem derivativen Chromosom 5. Somit konnte die Bruchpunktregion auf etwa 10 bis 15 Kb eingegrenzt werden (Abb. 33).

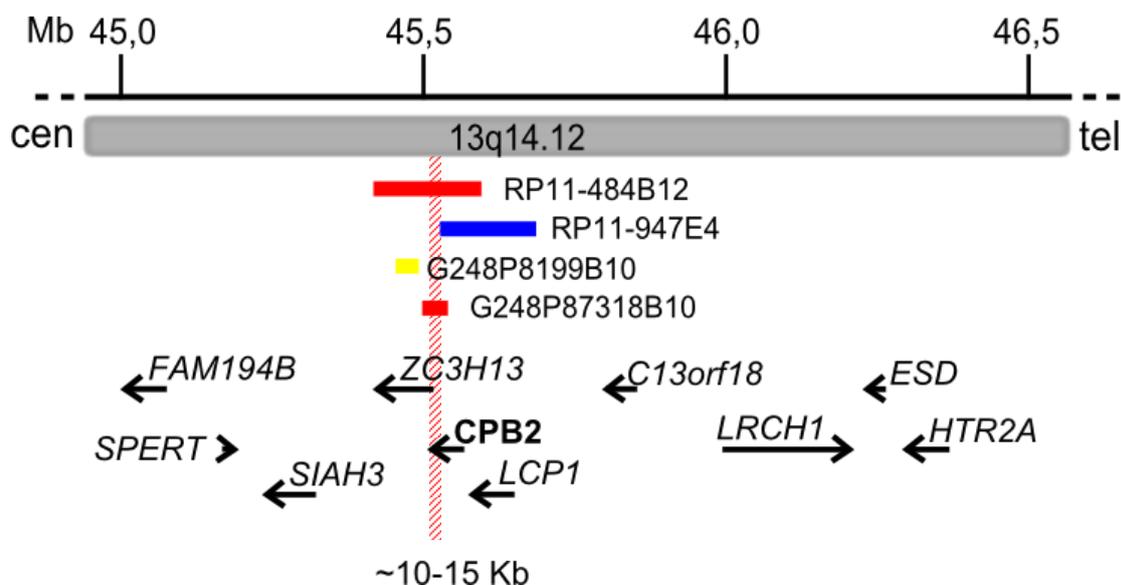


Abb. 33: Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 13q14.12 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 13q14.12. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Die bruchpunktüberspannenden BAC- und Fosmid-Klone sind rot dargestellt. Der BAC, der distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und das Fosmid, das proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben ist das möglicherweise unterbrochene Gen. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Aus der Abbildung 33 lässt sich entnehmen, dass in der Bruchpunktregion das Gen *CPB2* liegt, welches ggf. direkt unterbrochen wurde.

Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-349O10	13q13.3	WT 13, der(13)
RP11-154C3	13q14.12	WT 13, der(13)
RP11-1085J24	13q14.12	WT 13, der(13)
G248P83459B5	13q14.12	WT 13, der(13)
G248P87165B6	13q14.12	WT 13, der(13)
G248P8199B10	13q14.12	WT 13, der(13)
RP11-484B12	13q14.12	WT 13, der(5), der(13)
G248P87318B10	13q14.12	WT 13, der(5), der(13)
RP11-947E4	13q14.12	WT 13, der(5)
RP11-828J10	13q14.13	WT 13, der(5)
RP11-939G7	13q14.13	WT 13, der(5)
RP11-100L4	13q14.13	WT 13, der(5)
RP11-147L20	13q14.2	WT 13, der(5)

Tab. 10: Eingesetzte BAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 13q14.12 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. Fett hervorgehoben sind die bruchpunktüberspannenden BAC- und Fosmid-Klone.

8. Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 3;5;6-Translokation bei Patientin 6

8.1 Patientenbeschreibung

Bei Patientin 6 handelt es sich um eine 33 Jahre alte Frau mit einigen, auch beim Marfan-Syndrom vorkommenden Symptomen. Sie hat im Verhältnis zu ihrem Rumpf sehr lange Gliedmaßen (Dolichomelie) und sehr lange dünne Finger (Arachnodaktylie), außerdem einen disproportionierten Kleinwuchs, die u. a. auf eine Kyphoskoliose und einer progressiven Destruktion beider Hüften zurückzuführen ist. Sie zeigt keine fazialen Dysmorphien. Sie ist normal intelligent. Es wurde eine Chromosomenanalyse in Belgien durchgeführt, die eine *de novo* erscheinende Translokation zwischen den Chromosomen 3, 5 und 6 ergab. Die Eltern tragen diese Translokation nicht. Das Ergebnis der Array-CGH ergab eine Mikroduplikation auf dem langen Arm des Chromosoms 17, die auch bei der gesunden Mutter der Patientin nachweisbar war. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die Mikroduplikation wahrscheinlich nicht ursächlich für ihren Phänotyp ist. Die in Hamburg durchgeführte Chromosomenanalyse ergab schließlich den Karyotyp 46,XX,t(3;5;6)(q26.2;p14.2-p13.3;q23.1-q22.3) (Abb. 34).

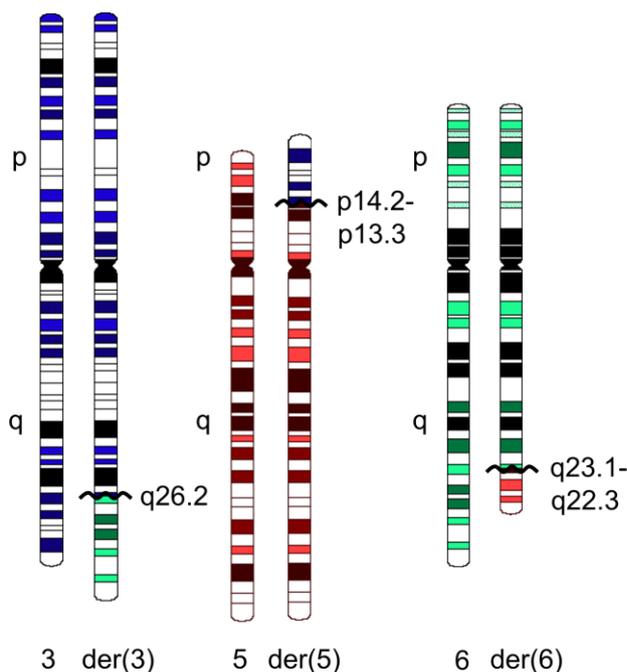


Abb. 34: Schematische Darstellung der Wildtyp- und derivativen Chromosomen der Patientin 6 mit 3;5;6-Translokation

Die Abbildung zeigt die drei Wildtyp-Chromosomen 3 (blau), 5 (rot) und 6 (grün) und die rearrangierten Chromosomen 3 [der(3)], 5 [der(5)] und 6 [der(6)]. Mit Hilfe einer Schlangenlinie sind die zytogenetisch bestimmten Bruchpunkte 3q26.2, 5p14.2-p13.3 und 6q23.1-q22.3 hervorgehoben.

8.2 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 3q26.31

Nachdem mit serieller FISH-Technik acht BAC-Klone untersucht worden sind, konnten fünf proximal zum Bruchpunkt hybridisierende und drei distal zum Bruchpunkt hybridisierende BACs identifiziert werden. Keiner der untersuchten BAC-Klone war dabei bruchpunktüberspannend. Durch die Auswertung der BACs RP11-151A21, welcher proximal hybridisierte, und RP11-946K8, welcher distal hybridisierte, konnte die Bruchpunktregion in 3q26.31 auf etwa 250 Kb eingegrenzt werden. Da in dieser Region der Bruchpunkt vermutet wurde, wurden für die Feinkartierung fünf Fosmide verwendet. Die FISH-Auswertung zeigte, dass zwei Fosmide proximal und ein Fosmid distal vom Bruchpunkt hybridisierten und G248P8061C8 unspezifische Signale gab. Das Fosmid G248P86542C9 gab schließlich ein „Split-Signal“ in q26.31 (Abb. 35).

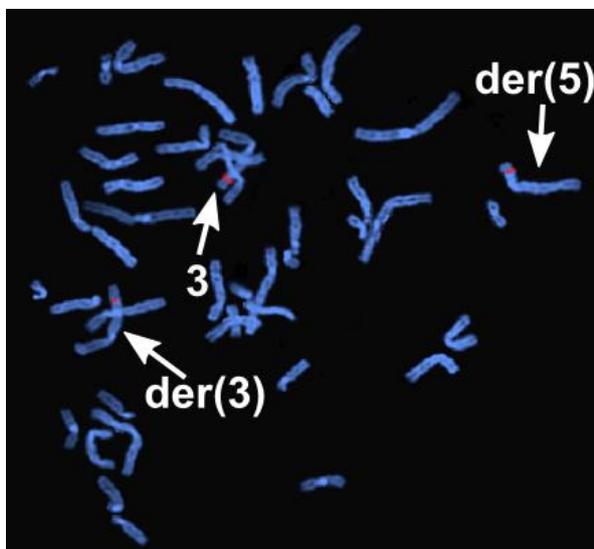


Abb. 35: FISH mit dem Fosmid-Klon G248P86542C9 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patientin 6

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde G248P86542C9 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 3 und auf den derivativen Chromosomen 3 und 5, wobei die Signalintensität auf den derivativen Chromosomen gleich stark ausgeprägt ist. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Dabei lag das Fosmid-Insert etwa symmetrisch über dem Bruchpunkt, da die Signale auf den derivativen Chromosomen 3 und 5 gleich stark ausgeprägt waren. Zusammen mit den proximal und distal angrenzenden Fosmiden G248P86894D3 und G248P88516E9 konnte die Bruchpunktregion in 3q26.31 schließlich auf 10 bis 15 Kb eingegrenzt werden (Abb. 36).

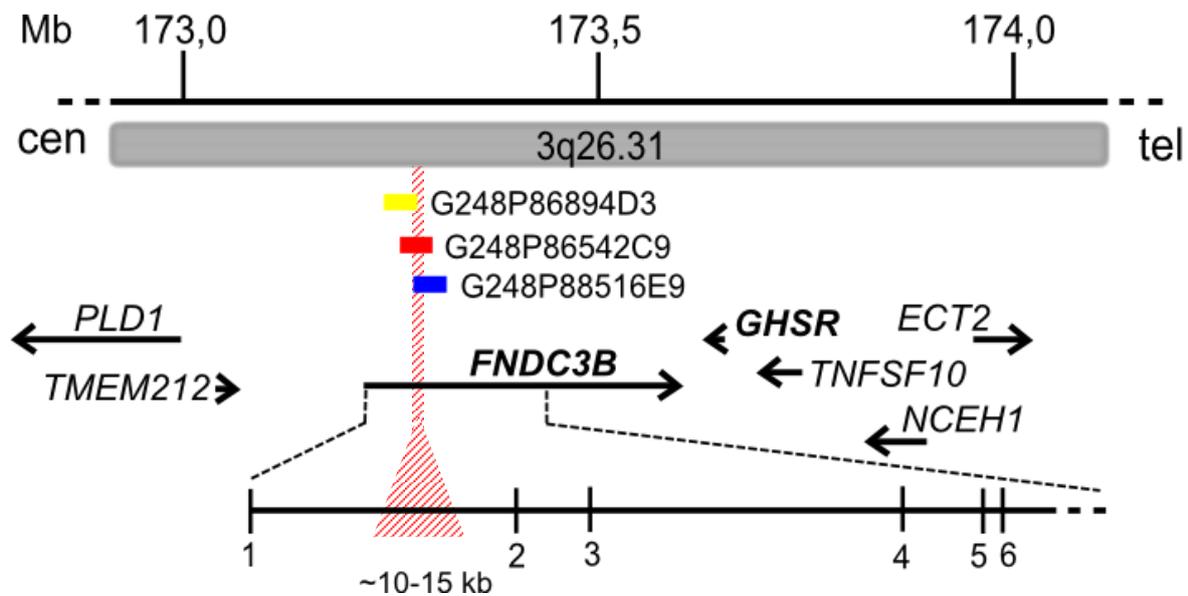


Abb. 36: Schematische Darstellung ausgewählter Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 3q26.31 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 3q26.31. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Das bruchpunktüberspannende Fosmid ist rot markiert. Das Fosmid, das distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und das Fosmid, das proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben sind mögliche Kandidatengene für den Phänotyp der Patientin 6. Die senkrechten schwarzen Striche stellen Exons dar. Zwischen den einzelnen Exons befinden sich die Introns, die durch eine horizontale Linie wiedergegeben werden. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Ausführliche Datenbankrecherchen ergaben, dass die Translokation zu einer direkten Unterbrechung des Gens *FNDC3B* im Intron 1 führt. Das von *FNDC3B* kodierte Protein spielt bei der Differenzierung von Osteoblasten eine Rolle (Kishimoto K 2010). Das distal zum Bruchpunkt gelegene Gen *GHSR* kodiert für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Howard AD 1996). In der Diskussion unter 7.3 finden sich dazu genauere Erklärungen.

Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-115B16	3q26.2	WT 3, der(3)
RP11-543D10	3q26.2	WT 3, der(3)
RP11-185E8	3q26.31	WT 3, der(3)
RP11-1142D2	3q26.31	WT 3, der(3)
RP11-151A21	3q26.31	WT 3, der(3)
G248P85845F12	3q26.31	WT 3, der(3)
G248P86894D3	3q26.31	WT 3, der(3)
G248P86542C9	3q26.31	WT 3, der(3), der(5)
RP11-946K8	3q26.31	WT 3, der(5)
G248P88516E9	3q26.31	WT 3, der(5)
RP11-1127J5	3q26.31	WT 3, der(5)

RP11-1K20

3q26.31

WT 3, der(5)

Tab. 11: Eingesetzte BAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 3q26.31 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. Fett hervorgehoben ist das bruchpunktüberspannende Fosmid.

8.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 5p14.3

Auf dem p-Arm des Chromosoms 5 ergab die Auswertung von zehn BAC- bzw. PAC-Klonen mittels serieller FISH-Untersuchung drei distal und vier proximal zum Bruchpunkt hybridisierende Klone. Zwei BAC-Klone (RP11-210I16 und RP11-1104E16) stellten sich bei der FISH-Untersuchung als unspezifisch heraus, die daher nicht in Tabelle 12 aufgelistet sind. Der BAC RP11-212H17 gab ein „Split-Signal“ (Abb. 37).

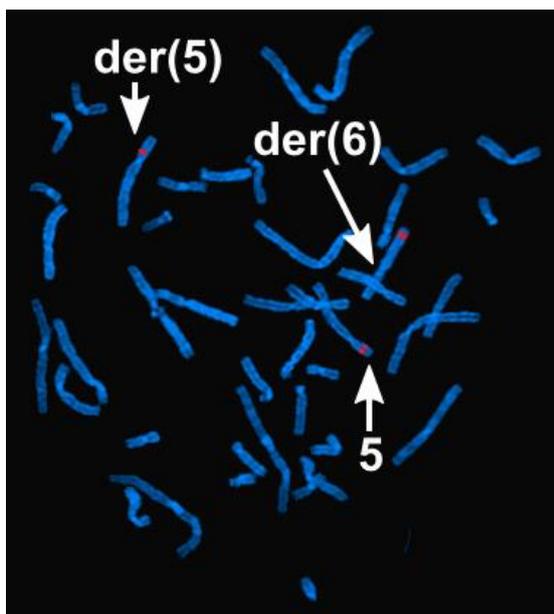


Abb. 37: FISH mit dem BAC-Klon RP11-212H17 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patientin 6

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde RP11-212H17 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 5 und auf den derivativen Chromosomen 5 und 6, wobei die Signalintensität auf den derivativen Chromosomen gleich stark ausgeprägt ist. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Der bruchpunktüberspannende BAC-Klon hybridisierte auf dem Wildtyp-Chromosom 5 und auf den beiden derivativen Chromosomen 5 und 6. Dabei lag das Insert ungefähr symmetrisch über dem Bruchpunkt. Für eine weitere Feinkartierung der Bruchpunktregion wurden vier Fosmide ausgewertet. Es stellte sich heraus, dass ein Fosmid distal und ein anderes proximal vom Bruchpunkt hybridisierten. Die zwei anderen untersuchten Fosmide G248P85642F10 und G248P80766E11 waren bruchpunktüberspannend. Dabei war die Signalintensität des Fosmids G248P85642F10 auf den derivativen Chromosomen 5 und 6 gleich stark. Im Gegensatz dazu war die Signalintensität des Fosmids G248P80766E11 auf dem derivativen Chromosom 5 deutlich stärker als auf dem derivativen Chromosom 6, so

dass sich folgende Signalverteilung für den Klon ergab: 80% der(5) und 20% der(6). Somit konnte der Bruchpunkt schließlich in 5p14.3 auf etwa 10 bis 15 Kb eingegrenzt werden, was in Abbildung 38 deutlich wird.

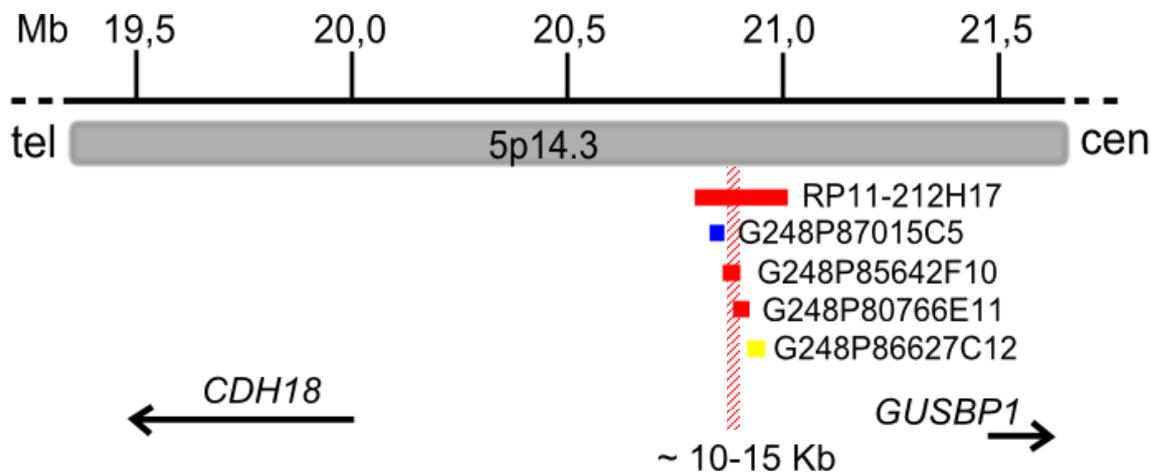


Abb. 38: Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 5p14.3 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 5p14.3. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Rechts vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und links das Telomer (tel). Die bruchpunktüberspannenden Klone sind rot markiert. Das Fosmid, das distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und das Fosmid, das proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Außerdem wird aus Abbildung 38 deutlich, dass es durch den 5p14.3-Bruchpunkt kein Gen direkt unterbrochen wird. Etwa 1 Mb distal vom Bruchpunkt befindet sich das Gen *CDH18*, welches zur Cadherin-Gen-Familie gehört (Chalmers IJ 1999), und proximal vom Bruchpunkt das Pseudogen *GUSBP1*.

Klone (tel → cen)	Chromosomale Region	Signale
RP3-508I20	5p15.2	WT 5, der(6)
RP11-270H9	5p14.3	WT 5, der(6)
RP11-414I19	5p14.3	WT 5, der(6)
G248P87015C5	5p14.3	WT 5, der(6)
RP11-212H17	5p14.3	WT 5, der(5), der(6)
G248P85642F10	5p14.3	WT 5, der(5), der(6)
G248P80766E11	5p14.3	WT 5, der(5), der(6)
G248P86627C12	5p14.3	WT 5, der(5)
RP11-1308L4	5p14.3	WT 5, der(5)
RP11-259G23	5p14.3	WT 5, der(5)
RP11-197O8	5p14.2	WT 5, der(5)
RP11-350H19	5p13.3	WT 5, der(5)

Tab. 12: Eingesetzte BAC-, PAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 5p14.3 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC-, PAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. Fett hervorgehoben sind die bruchpunktüberspannende BAC und Fosmide.

8.4 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 6q23.2

Nach der Auswertung von zwölf BAC-Klonen mittels serieller FISH-Analyse auf dem langen Arm des Chromosoms 6, konnten sechs proximal und drei distal vom Bruchpunkt hybridisierende BACs identifiziert werden. Zwei BACs stellten sich als unspezifisch heraus (RP11-69I8 und RP11-124K13). Schließlich konnte ein „Split-Signal“-gebender BAC-Klon (RP11-585I24) gefunden werden (Abb.39).

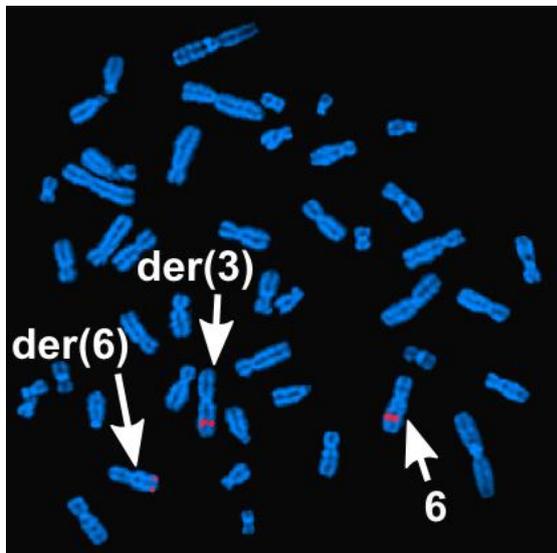


Abb. 39: FISH mit dem BAC-Klon RP11-585I24 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patientin 6

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde RP11-585I24 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 6 und auf den derivativen Chromosomen 3 und 6, wobei die Signalintensität auf den derivativen Chromosomen gleich stark ausgeprägt ist. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Dabei lag der Bruchpunkt ungefähr in der Mitte des Inserts des Klons RP11-585I24, da die Signalintensität auf den beiden derivativen Chromosomen gleich stark war. Mit Hilfe dieses BACs und der eingrenzenden Klone RP11-116B11 (proximal) und RP11-113P15 (distal) konnte die Bruchpunktregion in 6q23.2 schließlich auf etwa 45 bis 50 Kb eingegrenzt werden (Abb. 40).

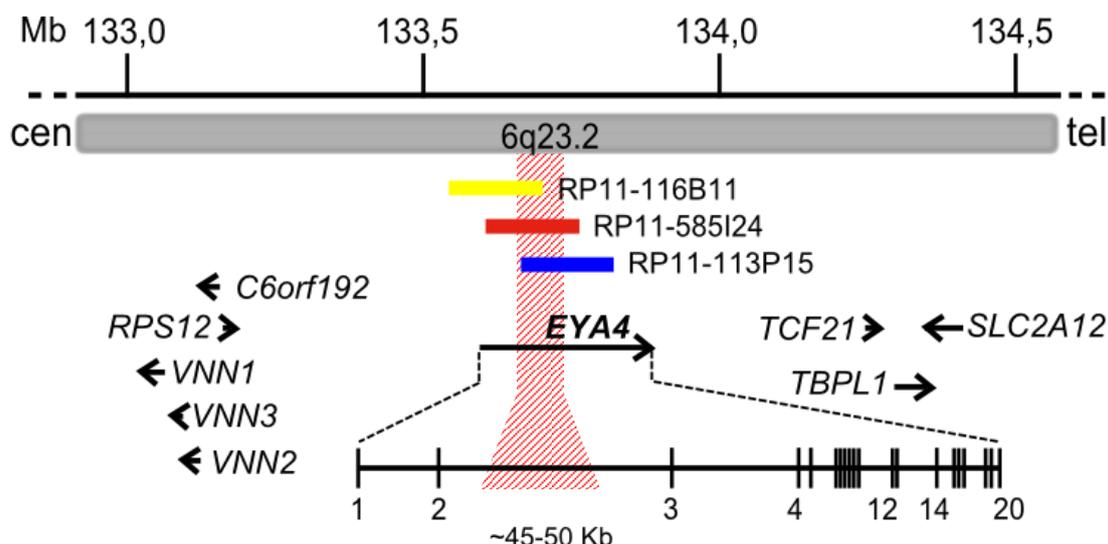


Abb. 40: Schematische Darstellung ausgewählter BAC-Klone und der in der Bruchpunktregion 6q23.2 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 6q23.2. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Der bruchpunktüberspannende BAC ist rot markiert. Der BAC, der distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und der BAC, der proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben ist das unterbrochene Gen, welches vergrößert dargestellt ist. Dabei stellen die senkrechten schwarzen Striche Exons dar. Zwischen den einzelnen Exons befinden sich die Introns, die durch eine horizontale Linie wiedergegeben werden. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Auf eine Feinkartierung mit Fosmiden wurde für diesen Bruchpunkt verzichtet, da Datenbankrecherchen ergaben, dass die Translokation zu einer direkten Unterbrechung des Gens *EYA4* führt (Abb. 40). Mutationen in diesem Gen werden mit sensorineuralem Hörverlust entweder mit oder ohne Kardiomyopathie in Zusammenhang gebracht (Schönberger J 2005).

BAC-Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-428B11	6q22.31	WT 6, der(6)
RP11-73O6	6q23.1	WT 6, der(6)
RP11-692C10	6q23.2	WT 6, der(6)
RP11-268K4	6q23.2	WT 6, der(6)
RP11-628E6	6q23.2	WT 6, der(6)
RP11-116B11	6q23.2	WT 6, der(6)
RP11-585I24	6q23.2	WT 6, der(3), der(6)
RP11-113P15	6q23.2	WT 6, der(3)
RP11-195M10	6q23.2	WT 6, der(3)
RP11-426L17	6q23.2	WT 6, der(3)

Tab. 13: Eingesetzte BAC-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 6q23.2 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige BAC stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. Fett hervorgehoben ist der Bruchpunktüberspannende BAC.

9. Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer parazentrischen 20q-Inversion bei Patientin 7

9.1 Patientenbeschreibung

Die heute 6-jährige Patientin kaukasischer Herkunft fiel bereits während der Schwangerschaft durch eine erhöhte Nackentransparenz in der 11. SSW auf. Aus diesem Grund wurde eine Amniozentese in Belgien durchgeführt, die einen normalen Karyotyp (46,XX) ergab. Weiterhin auffällig in der Schwangerschaft war die enorme Gewichtszunahme (28 kg) der Mutter. Die Patientin wurde schließlich nach der 38. SSW mit einem Geburtsgewicht von 3510 g, einer Länge von 52 cm und einem Kopfumfang von 36 cm geboren. Bereits 15 Tage nach Geburt kam die Patientin wegen rezidivierenden Brechanfällen und daraus resultierendem hypotonen Zustand ins Krankenhaus. Mit etwa 6 Monaten konnte sie selbstständig sitzen und mit 14 Monaten ohne Hilfe laufen. Als sie 2,5 Jahre alt war, kam sie in den Kindergarten, wo erstmals eine sprachliche Entwicklungsverzögerung auffiel. Sie hatte Schwierigkeiten andere zu verstehen und konnte selbst kaum sprechen. Aus diesem Grund nahm die Patientin an einer Sprachtherapie teil. Mit 4 Jahren wurde sie zum ersten Mal einem Humangenetiker vorgestellt, wobei eine mentale Retardierung im Vordergrund stand. Desweiteren zeigt sie milde faziale Dysmorphien, wie z.B. einen Epikanthus und eine Synophrys. Die psychomotorische Untersuchung ergab weiterhin unkoordinierte Bewegungen und ein unsicheres Gangbild ohne Ataxie. Außerdem hatte sie eine geringe Aufmerksamkeitsspanne und eine geringe Frustrationstoleranz und war hyperaktiv. Aufgrund dieser Auffälligkeiten wurde damals in Belgien eine Chromosomenanalyse durchgeführt, die eine *de novo* vorliegende parazentrische Inversion am Chromosoms 20 mit dem Karyotyp 46,XX,inv(20)(q12;q13.3) ergab. Als die Patientin mit 6 Jahren noch einmal untersucht wurde, hatte sie kaum Fortschritte gemacht, so dass die psychomotorische und mentale Entwicklungsverzögerung deutlicher wurde. Die Eltern der Patientin sind nicht miteinander verwandt, und sie hat außerdem einen jüngeren gesunden Bruder. Die am Institut für Humangenetik in Hamburg durchgeführte Chromosomenanalyse ergab den Karyotyp 46,XX,inv(20)(q11.23-q12;q13.33) (Abb. 41).

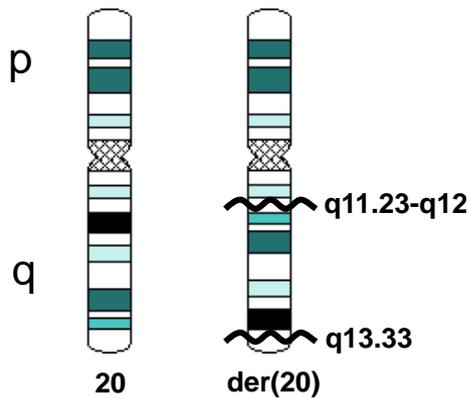


Abb. 41: Schematische Darstellung der Wildtyp- und derivativen Chromosomen der Patientin 7 mit 20q-Inversion

Die Abbildung zeigt das Wildtyp-Chromosom 20 (türkis) und das rearrangierte Chromosom 20 [der(20)]. Mit Hilfe einer Schlangenlinie sind die zytogenetisch bestimmten Bruchpunkte 20q11.23-q12 und 20q13.33 hervorgehoben.

9.2 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 20q11.23

Die Auswertung von sechs BAC- und zwei PAC-Klonen mittels serieller FISH-Analyse ergab zwei proximal und vier distal hybridisierende Klone. Zwei BACs (RP11-1152L20 und RP11-298O1) gaben „Split-Signals“. Bei dem Klon RP11-1152L20 wurden in etwa 80% der untersuchten Metaphasen ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 20 und ein Signal am Telomer des derivativen Chromosoms 20 gefunden. In den restlichen 20% der untersuchten Metaphasen zeigten sich die Signale nahe des Centromers am derivativen Chromosom 20. Das Insert des Klons RP11-298O1 lag ungefähr symmetrisch über dem Bruchpunkt. In allen untersuchten Metaphasen fanden sich Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 20 und ein „Split-Signal“ auf dem derivativen Chromosom 20, wie in Abbildung 42 zu sehen ist.

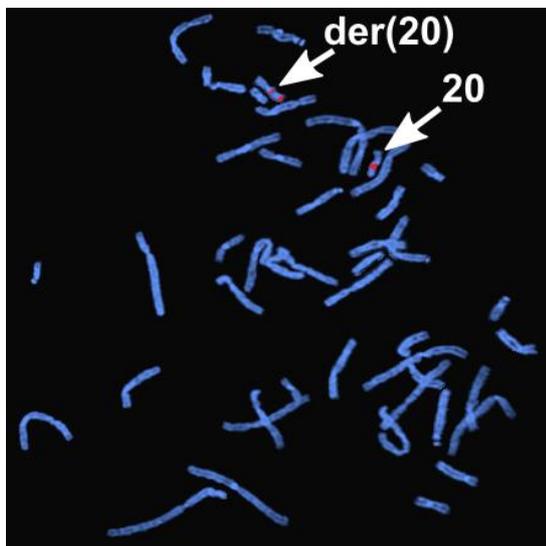


Abb. 42: FISH mit dem BAC-Klon RP11-298O1 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patientin 7

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde RP11-298O1 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 20 und am Telomer und Centromer des derivativen Chromosoms 20, wobei die Signalintensität am Centromer und Telomer gleich stark ausgeprägt ist. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Für die Feinkartierung wurden vier Fosmide analysiert. Deren FISH-Auswertung ergab, dass ein Fosmid proximal und drei Fosmide distal zum Bruchpunkt hybridisierten. Durch die Fosmide G248P89785C12 (proximal) und G248P8257H2 (distal) konnte die

Bruchpunktregion schließlich in 20q11.23 auf etwa 10 bis 15 Kb eingegrenzt werden (Abb. 43).

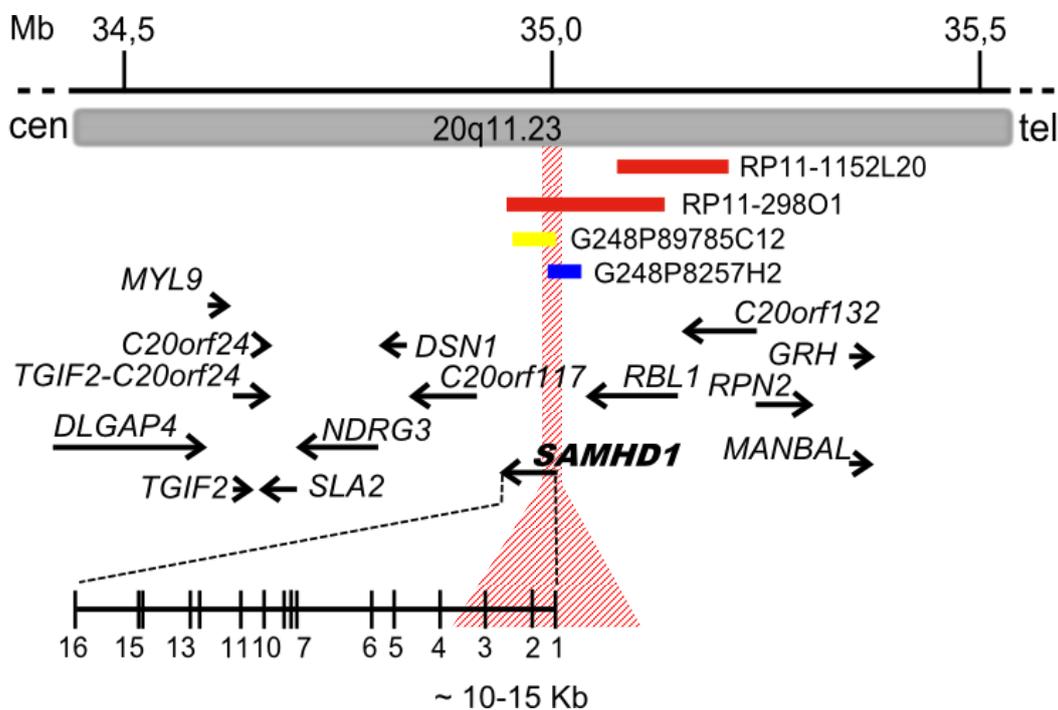


Abb. 43: Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 20q11.23 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 20q11.23. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Die bruchpunktüberspannenden BACs sind rot markiert. Das Fosmid, das distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und das Fosmid, das proximal hybridisierte, gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben ist das möglicherweise unterbrochene Gen, welches vergrößert dargestellt ist. Dabei stellen die senkrechten schwarzen Striche Exons dar. Zwischen den einzelnen Exons befinden sich die Introns, die durch eine horizontale Linie wiedergegeben werden. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Wie in Abbildung 43 dargestellt, kann es durch die parazentrische Inversion zu einer möglichen Unterbrechung des Gens *SAMHD1* kommen. Homozygote Mutationen in *SAMHD1* verursachen das Aicardi-Goutières-Syndrom (Rice GI 2009). Genauere Erläuterungen finden sich in der Diskussion unter 8.1.

Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-381P2	20q11.22	WT 20, der(20) p
RP11-231F10	20q11.23	WT 20, der(20) p
G248P89785C12	20q11.23	WT 20, der(20) p
RP11-298O1	20q11.23	WT 20, der(20) p, der(20) d
RP11-1152L20	20q11.23	WT 20, der(20) p; WT 20, der(20) d

G248P8257H2	20q11.23	WT 20, der(20) d
G248P81370C	20q11.23	WT 20, der(20) d
G248P87410A9	20q11.23	WT 20, der(20) d
RP11-451G10	20q11.23	WT 20, der(20) d
RP4-6330O20	20q11.23	WT 20, der(20) d
RP11-122O1	20q11.23	WT 20, der(20) d
RP1-94E24	20q11.23	WT 20, der(20) d

Tab. 14: Eingesetzte BAC-, PAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 20q11.23 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC-, PAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. „p“ steht für proximal und bedeutet, dass das Signal nahe des Centromers gefunden wurde bzw. „d“ für distal, d.h. das Signal wurde nahe des Telomers gefunden. Fett hervorgehoben sind die bruchpunktüberspannenden BACs.

9.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 20q13.33

Mit Hilfe der seriellen FISH-Untersuchung wurden insgesamt fünf BAC-Klone und ein PAC-Klon analysiert (Tab. 15). Vier BACs hybridisierten proximal und ein BAC distal vom Bruchpunkt. Das „Split-Signal“ wurde schließlich mit dem PAC-Klon RP4-583P15 gefunden. In 7 von 10 untersuchten Metaphasen fand sich ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 20 und ein Signal am Telomer des derivativen Chromosoms 20 und in 3 von 10 untersuchten Metaphasen ein Signal am Centromer des derivativen Chromosoms 20. Der Bruchpunkt wurde also nach diesem Ergebnis im ersten proximalen Drittel des PAC-Inserts vermutet, daher wurden vier Fosmide (G248P88403H1, G248P84486D9, G248P87848E4 und G248P85792B9) untersucht, die um den zu erwartenden Bruchpunkt lokalisiert waren. Es stellte sich jedoch entgegen unseren Erwartungen heraus, dass alle vier Fosmide distal vom Bruchpunkt kartierten. Aus diesem Grund wurden weitere sieben proximal gelegene Fosmide bestellt, wovon zwei proximal und vier distal vom Bruchpunkt hybridisierten. Das Fosmid G248P85335H7 gab ein „Split-Signal“ auf dem derivativen Chromosom 20, wobei die Signalintensität am Centromer und Telomer etwa gleich stark ausgeprägt war (Abb. 44).

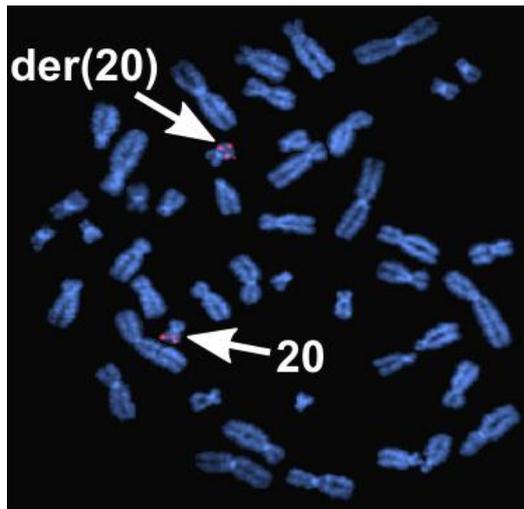


Abb. 44: FISH mit dem Fosmid G248P85335H7 als DNA-Sonde an Metaphase-Chromosomen von Patientin 7

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde G248P85335H7 findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 20 und am Telomer und Centromer des derivativen Chromosoms 20, wobei die Signalintensität am Centromer und Telomer gleich stark ausgeprägt ist. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Unmittelbar proximal vom bruchpunktüberspannenden Fosmid hybridisierte G248P81285H9 und distal G248P85658C7, so dass die Bruchpunktregion in 20q13.33 auf 15 bis 20 Kb eingegrenzt werden konnte (Abb. 45).

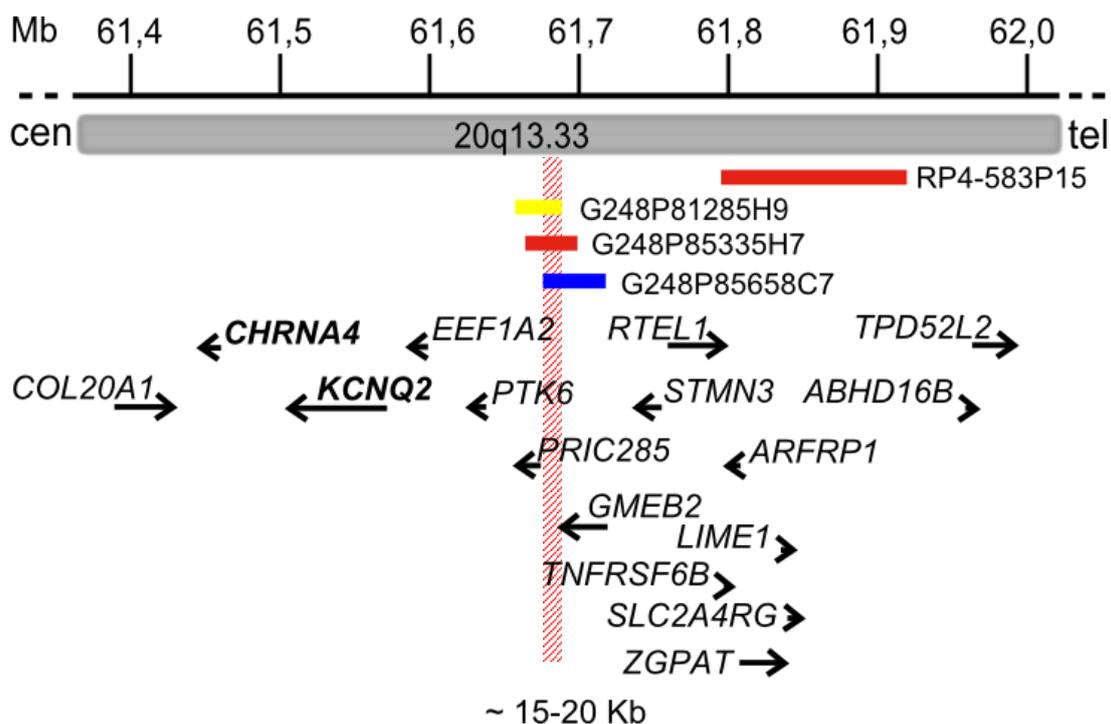


Abb. 45: Schematische Darstellung ausgewählter Fosmid-Klone und der in der Bruchpunktregion 20q13.33 liegenden Gene

In grau dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Region 20q13.33. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) angegeben. Links vom Ausschnitt befindet sich das Centromer (cen) und rechts das Telomer (tel). Die bruchpunktüberspannenden Klone sind rot markiert. Das Fosmid, das distal vom Bruchpunkt hybridisierte, ist blau und das Fosmid, das proximal hybridisierte, ist gelb markiert. Die Gene sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Pfeilrichtung jeweils die 5'→3'-Orientierung anzeigt. Fett hervorgehoben sind die Kandidatengene für den Phänotyp der Patientin 7. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Die Abbildung 45 zeigt, dass die Inversion wahrscheinlich nicht zu einer direkten Unterbrechung eines Gens führt. Proximal vom Bruchpunkt sind sechs und distal davon sind zehn Gene dargestellt, wobei die proximal zum Bruchpunkt gelegene Gene *CHRNA4* (180 Kb) und *KCNQ2* (80 Kb) interessante Gene sind. Weitere Erläuterungen zu diesen Genen sind in der Diskussion unter 8.2 vorhanden.

Klone (cen → tel)	Chromosomale Region	Signale
RP11-164D18	20q13.32	WT 20, der(20) p
RP11-93B14	20q13.33	WT 20, der(20) p
RP11-157P1	20q13.33	WT 20, der(20) p
RP11-358D14	20q13.33	WT 20, der(20) p
G248P86057E1	20q13.33	WT 20, der(20) p
G248P81285H9	20q13.33	WT 20, der(20) p
G248P85335H7	20q13.33	WT 20, der(20) p, der(20) d
RP4-583P15	20q13.33	WT 20, der(20) p; WT 20, der(20) d
G248P85658C7	20q13.33	WT 20, der(20) d
G248P83874G5	20q13.33	WT 20, der(20) d
G248P82228F2	20q13.33	WT 20, der(20) d
G248P83214E3	20q13.33	WT 20, der(20) d
G248P88403H1	20q13.33	WT 20, der(20) d
G248P84486D9	20q13.33	WT 20, der(20) d
G248P87848E4	20q13.33	WT 20, der(20) d
G248P85792B9	20q13.33	WT 20, der(20) d
RP11-238J15	20q13.33	WT 20, der(20) d

Tab. 15: Eingesetzte BAC-, PAC- und Fosmid-Klone zur Eingrenzung der Bruchpunktregion 20q13.33 und FISH-Signale

In der linken Spalte sind die BAC-, PAC- und Fosmid-Klone aufgelistet und in der mittleren Spalte ist die chromosomale Region, aus der der jeweilige Klon stammt, angegeben. In der rechten Spalte ist das FISH-Ergebnis angegeben, wobei „WT“ Wildtyp-Chromosom und „der“ derivatives Chromosom bedeutet. „p“ steht für proximal und bedeutet, dass das Signal nahe des Centromers gefunden wurde bzw. „d“ für distal, d.h. das Signal wurde nahe des Telomers gefunden. Fett hervorgehoben sind die bruchpunktüberspannenden PAC- und Fosmid-Klone.

V. Diskussion

1. Allgemeine Vorgehensweise bei der Suche nach Kandidatengen

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von seriellen FISH-Analysen 15 Bruchpunkte von sechs Patienten mit einer Translokation und einer Patientin mit einer Inversion auf 10 bis 100 Kb eingegrenzt. Nach Eingrenzung der Bruchpunkte erfolgte die Suche nach möglichen Kandidatengen für den Phänotyp des jeweiligen Patienten mittels ausführlicher Datenbankrecherchen. Da die Vorgehensweise für alle Patienten in ähnlicher Weise ablief, wird sie hier beschrieben.

Nachdem der Bruchpunkt auf wenige Kilobasen eingengt worden war, ließ sich mit Hilfe der Datenbank „UCSC“ und dem bruchpunktüberspannenden Klon oder den Bruchpunteingrenzenden Klonen herausfinden, ob die Translokation zu einer direkten Unterbrechung eines Gens geführt hat. In diesem Fall wurde von einer „Loss-of-function“-Mutation ausgegangen, die vergleichbar mit einer Deletion von Teilen oder des ganzen Gens ist. Wurde kein Gen direkt unterbrochen, kann ein Positionseffekt auf ein zum Bruchpunkt benachbartes Gen vorliegen, der ebenfalls zu einem (partiellen) Funktionsverlust eines Gens führen kann. Um ein Gen in den Bruchregionen des Patienten, sei es nun gebrochen oder nicht, als Kandidatengen für den jeweiligen Krankheitsphänotyp zu identifizieren, wurden zunächst mit Hilfe der Datenbank „PubMed“ Informationen zur Funktion und der Expression der von den in den Bruchpunkt liegenden Genen kodierten Proteine eingeholt. Korrelierte die Funktion eines Proteins mit dem Phänotyp des Patienten, also spielte das Protein beispielsweise eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems und zeigte der Patient eine geistige Behinderung, so wurde das entsprechenden Gen als Kandidatengen in Betracht gezogen. Zusätzlich wurde nach genetischen Evidenzen für ein Kandidatengen gesucht. Hierfür wurden die Datenbanken „PubMed“, „Decipher“ und „Database of Genomic Variants“ genutzt, in denen nach Imbalancen (Deletionen oder Duplikationen), die die jeweilige Bruchregion und darin lokalisierte Gene enthielten, gesucht wurde. Dabei wurde zwischen Imbalancen unterschieden, die bei Patienten mit einem klinischen Bild vorlagen, und solchen, die bei Normalpersonen vorkamen. Diese Imbalancen konnten helfen, ein Kandidatengen weiter zu erhärten, wenn beispielsweise mehrere Deletionen beschrieben worden sind, die a) das Kandidatengen enthielten und b) diese bei Patienten vorlagen, die einen zum Phänotyp des Patienten mit dem chromosomalen Rearrangement ähnliches klinisches Bild hatten. Wurden hingegen das Kandidatengen enthaltende Imbalancen bei Normalpersonen gefunden, handelte es sich vermutlich eher um „copy number variations“ (CNVs), die nicht mit einem Krankheitsphänotyp assoziiert sind.

Gelegentlich gaben funktionelle Daten und genetische Befunde Hinweise auf ein Kandidatengen, das distal oder proximal zu einem Bruchpunkt liegt und somit von einem Positionseffekt betroffen sein könnte. In diesem Fall wurde mit Hilfe der Datenbanken „UCSC“, „Ancora“ und „Vista Enhancer Browser“ nach hochkonservierten nicht-kodierenden DNA-Elementen (HCNEs), für die ein regulatorisches Potential vorhergesagt wurde, stromaufwärts und stromabwärts des Kandidatengens gesucht. Fanden sich HCNEs in der entsprechenden Region, wurde dies als weiterer Hinweis auf einen bei dem Patienten vorliegenden Positionseffekt gewertet.

2. Beide Translokationsbruchpunkte des Patienten 1 konnten auf 10 bis 20 Kb eingegrenzt werden

2.1 In der Bruchpunktregion 9p22.1 kommt es zu einer direkten Unterbrechung des *ADAMTSL1*-Gens

Patient 1 zeigt sowohl eine psychomotorische als auch eine sprachliche Entwicklungsverzögerung sowie einen Mikrocephalus. Die Datenbankrecherchen ergaben, dass die 5;9-Translokation bei ihm zu einer direkten Unterbrechung des Gens *ADAMTSL1* führt. Dabei liegt die 10 bis 20 Kb große Bruchpunktregion in 9p22.1 im Bereich von Intron 6, Exon 7 und Intron 7. *ADAMTSL1* kodiert für das Glykoprotein Punctin, das in der extrazellulären Matrix lokalisiert ist (Hirohata S 2002). In den Datenbanken „Decipher“ und „Database of Genomic Variants“ sind vier intragenische Deletionen in diesem Gen bei gesunden Personen dokumentiert. Es wurden zwar auch zwei große interstitielle Deletionen (12 Mb und 14 Mb) bei Patienten mit mentaler Retardierung beschrieben, allerdings kann die mentale Retardierung auf andere deletierte Gene zurückgeführt werden. Zudem wurde eine 1 Mb große Duplikation, die nur einen Teil des Gens *ADAMTSL1* umfasst, bei einer Normalperson beschrieben. Vermutlich führt diese Duplikation zu einer Unterbrechung von *ADAMTSL1*. Zusammengefasst deuten die bei Normalpersonen gefundenen Kopienzahlveränderungen das *ADAMTSL1*-Gen betreffend daraufhin, dass eine Unterbrechung dieses Gens vermutlich nicht zu einem klinischen Bild führt, und damit der Phänotyp des Patienten 1 nicht auf den Bruch im *ADAMTSL1*-Gen zurückzuführen ist.

2.2 In der 5q23.2-Bruchpunktregion ist das *SNCAIP*-Gen ein Kandidatengen für den Phänotyp des Patienten 1

Durch serielle FISH-Analysen wurde die Bruchpunktregion in 5q23.2 auf etwa 10 bis 15 Kb eingegrenzt, wobei Datenbankrecherchen ergaben, dass kein Gen direkt durch die Translokation unterbrochen wird. Allerdings scheint das etwa 50 Kb proximal zum

Bruchpunkt lokalisierte *SNCAIP* ein interessantes Kandidatengen zu sein. *SNCAIP* wird besonders hoch im Nervengewebe exprimiert, wobei es vor allem in den präsynaptischen Nervenendigungen von großen Neuronen wie z.B. Purkinje-Zellen, pyramidalen Neuronen und Neuronen der Substantia nigra vorkommt (Engelender S 2000, Ribeiro CS 2002, Murray IVJ 2003). Das kodierte Protein Synphilin-1 hat mehrere Proteinbindungsstellen, darunter sechs Ankyrin-ähnliche Domänen, eine „coiled-coil“ und eine ATP/GTP-bindende Domäne (Abb. 46).

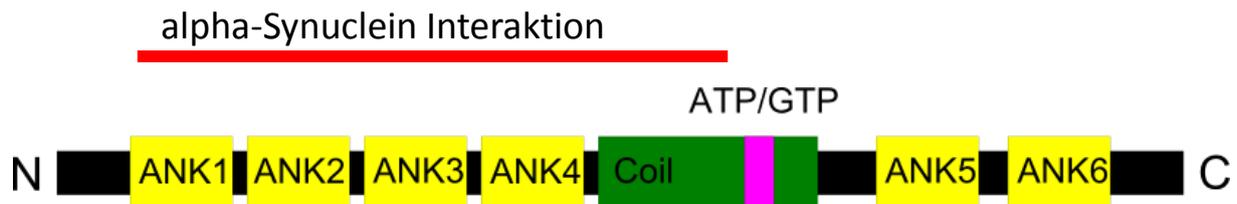


Abb. 46: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Synphilin-1

Die Ankyrin-ähnlichen Domänen sind gelb, die „coiled-coil“-Domäne grün und die ATP/GTP-bindende Stelle rosa dargestellt. Der rote horizontale Balken gibt die Interaktionsstellen von Synphilin-1 mit alpha-Synuclein wieder. „N“ bedeutet N-terminales Ende und „C“ C-terminales Ende.

Über die genaue physiologische Funktion des Proteins ist wenig bekannt. Synphilin-1 interagiert mit dem Protein alpha-Synuclein (Abb. 46). *PARK1*, das alpha-Synuclein kodiert, ist das erste beschriebene Gen, in dem Mutationen mit einer hereditären Form der Parkinson'schen Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden (Krüger 2004). Interessanterweise wurde 2003 in der Arbeit von Marx und Mitarbeitern eine Mutation im *SNCAIP*-Gen bei zwei Parkinson-Patienten gefunden. Beide hatten eine Punktmutation (c. 1861C>T), die auf Proteinebene zu einem Austausch von Arginin zu Cystein führt (p.R621C) (Marx FP 2003). Der in der Arbeit untersuchte Patient 1 zeigt zwar keine Symptome einer Parkinson'schen Erkrankung, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Erkrankung sich bei ihm im hohen Alter manifestiert.

Ein anderes interessantes Gen, welches aufgrund der Expression und der Funktion des kodierten Proteins mit dem Phänotyp des Patienten 1 assoziiert sein könnte, ist das 800 Kb distal zum Bruchpunkt lokalisierte *CEP120*. *CEP120* ist ein Centrosomen-assoziiertes Protein, das vor allem im Gehirn exprimiert wird (Guerrier S 2007), und bei Mäusen für die Stabilität und Dynamik der Mikrotubuli, die Motilität des Centrosoms und für die Ausbildung und das Wachstum der Axone verantwortlich ist (De Anda FC 2010).

In der Literatur werden verschiedene Deletionen beschrieben, die wahrscheinlich sowohl *SNCAIP* als auch *CEP120* einschließen. Beispielsweise finden sich sechs zytogenetisch bestimmte Deletionen von 5q22 bis 5q31 (Kadotani T 1984, G.-E. L. Rivera H 1987, S. P. Rivera H 1990, Kobayashi T 1991, Lindgren V 1992, Harréus UA 2002) und zwei über die

FISH-Technik bestimmte Deletionen von 5q22.3 bis 5q31.2 (Garcia-Miñaur S 2005, Tzschach A 2006). Die entsprechenden Patienten weisen als gemeinsames klinisches Merkmal eine mentale und psychomotorische Retardierung auf. Aus diesem Grund kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass in der deletierten Region mindestens ein Gen, das mit mentaler Retardierung assoziiert ist, liegt. Weitere Deletionen, die beide Gene umfassen und bei Patienten mit mentaler Retardierung gefunden worden sind, werden in „Decipher“ gelistet. Hier finden sich fünf interstitielle Deletionen von 13 Mb bis 26 Mb. Darüber hinaus lassen sich sowohl eine Teile von *CEP120* umfassende Deletion als auch eine Duplikation, die nur einen Teil von *CEP120* umfasst, bei Normalpersonen finden. Diese genetischen Befunde sprechen eher gegen *CEP120* als Kandidatengen für mentale Retardierung. Für *SNCAIP* als Kandidatengen spricht auch, dass in verschiedenen Datenbanken hochkonservierte nicht-kodierende Elemente zwischen den Genen *SNCAIP* und *SNX2* gefunden wurden, welche auf regulatorische Einheiten hindeuten und möglicherweise auf die Expression von *SNCAIP* wirken könnten (Abb. 47).

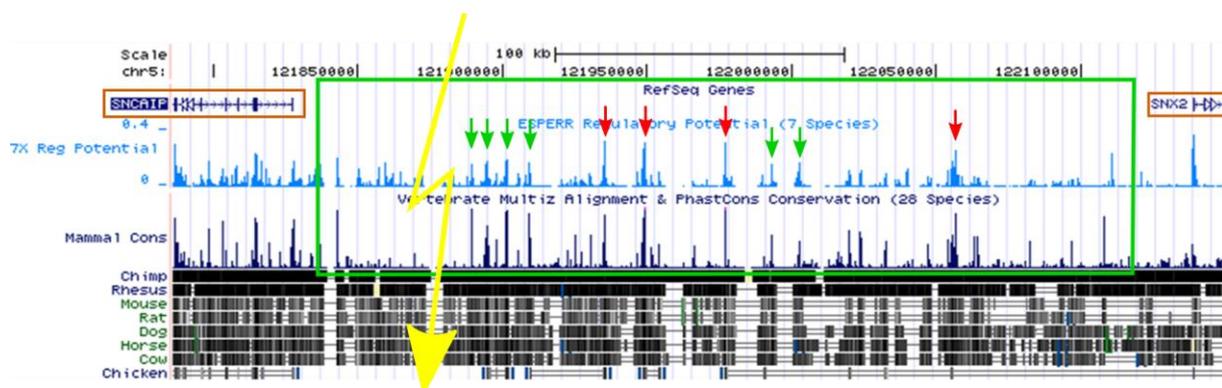


Abb. 47: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen zwischen den Genen *SNCAIP* und *SNX2* in 5q23.2

Die Abbildung zeigt einen etwa 250 Kb großen Ausschnitt aus 5q23.2. Die Gene *SNCAIP* und *SNX2*, die die grün markierte Region begrenzen, sind braun umrandet. Die hellblauen „Peaks“ geben die „Regulatory-Potential-Scores“ wieder, die aus Sequenzvergleichen von bekannten regulatorischen Einheiten von Mensch, Schimpanse, Makake, Maus, Ratte, Hund und Rind mit der vorliegenden DNA-Sequenz abgeleitet werden. Die dunkelblauen „Peaks“ zeigen die Konservierung der Sequenz in dem dargestellten Bereich, die aus Sequenzvergleichen von 28 Spezies generiert wird. Die grünen Pfeile zeigen auf Positionen, die sowohl konserviert sind als auch regulatorisches Potential haben; die roten Pfeile weisen auf nicht-kodierende DNA-Abschnitte mit besonders hohem regulatorischen Potential. Der gelbe Blitz gibt den Bruchpunkt des Patienten 1 an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Die Translokation hat dazu geführt, dass die in Abbildung 47 gezeigten, nicht-kodierenden Elemente auf den kurzen Arm von Chromosom 9 transloziert wurden und damit möglicherweise die zeitlich und örtlich korrekte Expression des *SNCAIP*-Gens nicht mehr kontrollieren können. Es kann vermutet werden, dass der klinische Phänotyp des Patienten 1 hiermit in Zusammenhang steht.

3. Die Translokationsbruchpunkte des Patienten 2 konnten auf 10 bis 15 Kb und auf etwa 100 Kb eingegrenzt werden

3.1 Das CA8-Gen in der Bruchpunktregion 8q12.1 könnte unterbrochen sein

Patient 2 weist eine sprachliche und motorische Entwicklungsverzögerung sowie einen Kleinwuchs und rezidivierende, cerebrale Krampfanfälle auf. Mit Hilfe der seriellen FISH-Analysen wurde der Bruchpunkt auf Chromosom 8 auf etwa 100 Kb eingegrenzt. Datenbankrecherchen ergaben, dass die Translokation u. U. zu einer Unterbrechung des CA8-Gens im Intron 8 oder Exon 9 geführt hat. Das CA8-Gen kodiert für ein Protein, das zu karbonischen Anhydrasen homolog ist. Karbonische Anhydrasen gehören zur Familie der monomerischen Zink-Metalloenzyme und katalysieren die reversible Hydrierung von CO₂. Da dem CA8-Protein eins von drei Histidinresten fehlt, die für die Bindung von Zinkionen notwendig sind, hat es keine katalytische Aktivität (Sjöblom B 1996). Die bisher einzig bekannte biochemische Funktion von CA8 ist, dass es die Bindung von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) an den IP₃-Rezeptor 1 (ITPR1) inhibiert, indem es die Affinität zum Rezeptor herabsetzt (Hirota J 2003). ITPR1 selbst hat eine wichtige Funktion bei der Regulierung der calciumabhängigen Signaltransduktion (Hur EM 2005). Sowohl ITPR1 als auch CA8 werden vor allem in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns exprimiert (Matsumoto M 1996, Taniuchi K 2002). In der Arbeit von Türkmen und Mitarbeitern (2009) wurde im CA8-Gen eine homozygote Punktmutation (c.298T>C) gefunden, die auf Proteinebene zu einem Austausch von Serin nach Prolin (p.S100P) führt. Vermutlich kommt es zu einer verminderten Proteinstabilität und damit zu einem gesteigerten Abbau des veränderten Proteins. Als Folge wird eine Störung der Regulierung des ITPR1 durch CA8 angenommen, was zu einer Fehlregulation der calciumabhängigen Signaltransduktion führen könnte (Türkmen S 2009). Die Betroffenen zeigten neben einer milden mentalen Retardierung und einer Ataxie einen Vierfüßler-Gang. Gegen CA8 als Kandidatengen für den Phänotyp von Patient 2 spricht, dass bei ihm eine heterozygote Mutation (Unterbrechung des CA8-Gens auf einem Allel) vorliegt, wohingegen bei den von Türkmen und Mitarbeitern (2009) beschriebenen Betroffenen eine homozygote Mutation vorlag. Die Sequenzierung des CA8-Gens bei dem Patienten 2 ergab zudem keine krankheitsrelevante Veränderung (unveröffentlichte Daten, Arbeitsgruppe Prof. Dr. K. Kutsche), so dass CA8 als Kandidatengen kaum mehr in Frage kommt. Bisher wurden keine CNVs, die das CA8-Gen einschließen, dokumentiert. Im Gegensatz dazu werden Deletionen in 8q12 und Mutationen in *CDH7*, welches sich etwa 400 Kb distal von CA8 befindet, in Zusammenhang mit dem CHARGE-Syndrom gebracht (Vissers LE 2004). Typisch für dieses Syndrom sind Herzfehler, Kolobom, Choanalatresie, Wachstums- und Entwicklungsverzögerung, Hypoplasie der

Genitale, Anomalien der Ohren und Taubheit (Chang TM 2010). Keine Merkmale des CHARGE-Syndroms, außer der Wachstums- und Entwicklungsverzögerung, sind bei Patient 2 vorhanden. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass ein Bruch auf dem Chromosom 8 vermutlich nicht mit dem Phänotyp des Patienten 2 assoziiert ist.

3.2 Das *SALL3*-Gen in 18q23 kristallisiert sich als Kandidatengen für den Phänotyp des Patienten 2 heraus

Mit Hilfe von BAC- und Fosmid-Klonen wurde mittels serieller FISH-Analysen der Bruchpunkt auf dem Chromosom 18 in q23 auf 10 bis 15 Kb eingrenzt. Es könnte sein, dass das *SALL3*-Gen im Exon 1 oder Intron 1 unterbrochen ist. Bisher sind sieben CNVs, die entweder das gesamte Gen oder Teile des Gens einschließen, bei Normalpersonen bekannt, was darauf hindeuten könnte, dass eine heterozygote Mutation in diesem Gen keine krankheitsrelevante Bedeutung hat. Doch auf der anderen Seite sind in „Decipher“ sowohl eine 51 Mb-Duplikation als auch 14 Deletionen von 1,5 bis 29 Mb, die alle *SALL3* einschließen, gelistet. Interessant ist, dass diese Patienten phänotypische Überschneidungen mit dem Patienten 2 aufweisen, wie z.B. die Entwicklungs- und Sprachverzögerung, den Kleinwuchs und die breite Stirn. Weitere häufige klinische Merkmale der Deletionspatienten, die Patient 2 jedoch nicht aufweist, sind kongenitale Auralatresie, mentale Retardierung und angeborene Herzfehler. Erwähnenswert ist, dass in der Literatur die oben genannten klinischen Merkmale und auch Epilepsie unter dem 18q-Deletionssyndrom zusammengefasst werden (De Grouchy J 1964). Weiterhin interessant ist, dass Feenstra und Mitarbeiter (2007) nachweisen konnten, dass bei 22 Patienten mit 18q-Deletionssyndrom, die alle einen Kleinwuchs aufwiesen, *SALL3* deletiert ist. Diese Beobachtung spricht für *SALL3* als mögliches Kandidatengen für den Phänotyp des Patienten 2. Aber auch die Funktion des kodierten Proteins könnte auf einen Zusammenhang hindeuten. *SALL3* gehört zur Familie der Spalt-Proteine, welche aus vier Mitgliedern besteht (*SALL1-4*) und eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Extremitäten, des Nervensystems und anderer Organe, wie z.B. Niere und Herz, spielt (Sweetman D 2006). Es wird vermutet, dass die Proteine über ihre DNA-bindende Zinkfinger-Domäne in der Lage sind, als Transkriptionsfaktoren zu fungieren und wahrscheinlich an der Regulation des Zellzyklus und/oder der Zelladhäsion beteiligt sind (Parrish M 2004, De Celis JF 2009). *SALL3* wird besonders stark im zentralen Nervensystem exprimiert. Dort wird es in primären Motoneuronen, Hinterhörnern und entlang des gesamten sich entwickelnden Rückenmarks exprimiert, aber auch im Telencephalon, Diencephalon, Rhombencephalon, Herzen, Ohr, in der Niere und vor allem auch im Gaumen, in der Zunge und in der Region des zentralen Nervensystems, die diese Strukturen innerviert (Camp E 2003, Parrish M 2004). Homozygote „Knock-out“-Mäuse bestätigten die Bedeutung von *Sall3* im Bereich des Rachens, denn die Mäuse zeigten eine Fehlbildung des

Gaumens, der Epiglottis, der Zunge und der kranialen Nerven, vor allem des Nervus glossopharyngeus, der die eben genannten Strukturen innerviert (Parrish M 2004). Weiterhin wird angenommen, dass homozygote „Knock-out“-Mäuse Schwierigkeiten bei der Koordination von Bewegungen und Reflexen haben (Parrish M 2004). Mutationen in anderen *SALL*-Genen wurden bereits mit monogenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. So führen heterozygote Mutationen in *SALL1* zum Townes-Brocks-Syndrom, das durch anorektale Anomalien, Polydaktylie und sensorineuralem Hörverlust charakterisiert ist (W. A. Kohlhasse J 1998). Heterozygote Mutationen in *SALL4* hingegen führen zum Okihiro-Syndrom, welches typischerweise radiale Veränderungen der oberen Extremitäten und eine Duane-Anomalie, einer besonderen Form des Schielens, bei der die Patienten nicht nach außen sehen können, aufweist (H. M. Kohlhasse J 2002). Einige dieser Patienten zeigen eine Wachstumsretardierung (C. D. Kohlhasse J 2005, Miertus J 2006), was ebenfalls für *SALL3* als Kandidatengen für den Phänotyp des Patienten 2 spricht.

Nach Eingrenzung der Bruchpunktregion ist nicht sicher, ob *SALL3* gebrochen ist; es könnte auch ein Positionseffekt auf das Gen vorliegen. Stromaufwärts von *SALL3* befindet sich eine etwa 2 Mb große genleere DNA-Region mit HCNEs (Rizzolio F 2008), die proximal von *GALR1* flankiert wird. Diese HCNEs haben teilweise regulatorisches Potential und könnten auf die Expression von *SALL3* wirken. HCNEs werden häufig in der Nähe von Genen gefunden, die regulierend auf das Wachstum wirken (Pennacchio LA 2006), was auf *SALL3* zutrifft. Mit Hilfe der Datenbanken „Vista Enhancer Browser“ und „UCSC“ konnten drei HCNEs identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich regulatorisches Potential haben: hs1047, hs634 und hs1186 (Abb. 48).

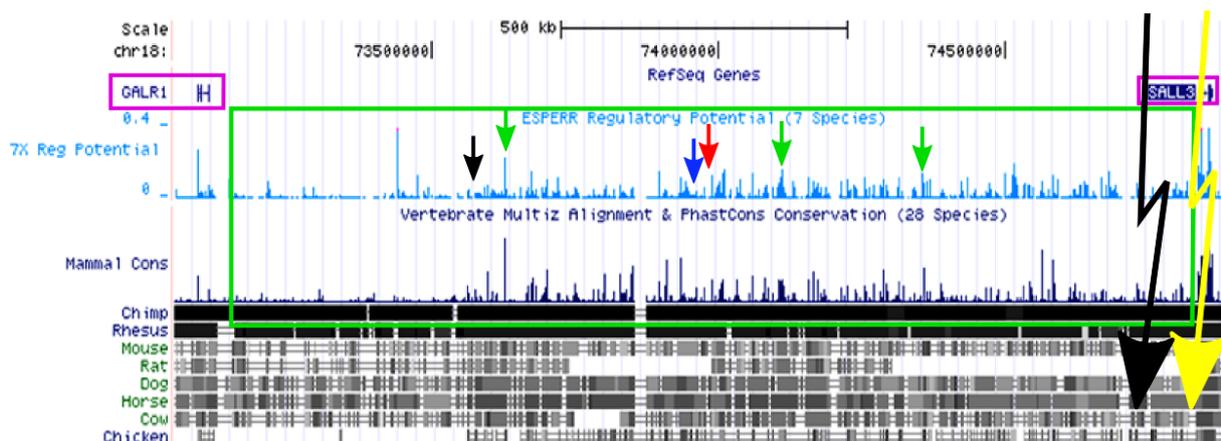


Abb. 48: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen zwischen den Genen *GALR1* und *SALL3* in 18q23

Die Abbildung zeigt einen etwa 2 Mb großen Abschnitt aus 18q23. Die Gene *GALR1* und *SALL3*, die die grün markierte HCNE-Region begrenzen, sind rosa umrandet. Die hellblauen „Peaks“ geben die „Regulatory-Potential-Scores“ wieder, die sich aus Sequenzvergleichen von bekannten regulatorischen Einheiten von Mensch, Schimpanse, Makake, Maus, Ratte, Hund und Rind mit der vorliegenden DNA-Sequenz ergeben. Die dunkelblauen „Peaks“ darunter zeigen die Konservierung der Sequenz in dem dargestellten Bereich, die aus

Sequenzvergleichen von 28 Spezies resultiert. Der rote Pfeil zeigt auf die DNA-Sequenz hs1047, der blaue Pfeil auf hs634 und der kleine schwarze Pfeil auf hs1186. Die grünen Pfeile zeigen auf weitere DNA-Sequenzen, die sowohl konserviert als auch regulatorisches Potential haben. Der große gelbe Pfeil gibt den Bruchpunkt des Patienten 2 und der große schwarze Pfeil den der Patientin von Larizza und Mitarbeitern (1993) wieder. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Die Bedeutung dieser HCNE-Region wird auch in der Arbeit von Rizzolio und Mitarbeitern (2008) deutlich, in der die Bruchpunkte einer X;18-Translokation bestimmt wurden. Der Bruchpunkt in 18q23 befindet sich 80 Kb proximal von *SALL3* (schwarzer Pfeil in Abb. 48). Durch Untersuchungen an lymphoblastoiden Zellen der Translokationspatientin wurden Veränderungen der Chromatinmodifikation von *SALL3* beobachtet. Als Ursache wird der Verlust der HCNE-Region angenommen, da *SALL3* auf das X-Chromosom transloziert wurde (Rizzolio F 2008). Für Patient 2 könnte ein ähnlicher Mechanismus angenommen werden, so dass die Translokation zu einer veränderten Expression von *SALL3* geführt haben könnte. Hierfür spricht außerdem, dass die Patientin mit der X;18-Translokation und Patient 2 phänotypische Gemeinsamkeiten aufweisen: Beide haben eine breite Stirn und liegen mit ihrer Körpergröße deutlich unterhalb der durchschnittlichen Norm (Patient 2 mit -2,5 SD und die X;18-Translokationspatientin mit -3 SD) (Larizza D 1993). Aufgrund dieser Befunde und der oben genannten Argumente scheint *SALL3* ein attraktives Kandidatengen für den Phänotyp des Patienten 2 zu sein.

4. Höchstwahrscheinlich ist die Unterbrechung des *SHANK2*-Gens mit der mentalen Retardierung des Patienten 3 assoziiert

4.1 In der Bruchpunktregion 17q25.1 liegen die Gene *SPHK1* und *UBE2O*

Symptomatisch zeigte Patient 3 eine psychomotorische und sprachliche Entwicklungsverzögerung sowie kraniofaziale Dysmorphien. Durch serielle FISH-Analysen wurde der Bruchpunkt auf dem Chromosom 17 auf 40 bis 45 Kb eingrenzt. In dieser Region liegen die Gene *SPHK1* und *UBE2O*, wobei eins der beiden Gene unterbrochen sein könnte. Es wurden zwei Deletionen (200 Kb und 2 Kb) bei Normalpersonen dokumentiert, wobei eine Deletion beide Gene und die andere nur einen Teil von *SPHK1* umfasst. Außerdem wird in „Decipher“ eine 3,5 Mb-Deletion aufgezeigt, die beide Gene beinhaltet und bei einem Patienten mit mentaler Retardierung und Entwicklungsverzögerung gefunden worden ist. Da dieser Phänotyp vermutlich auf andere deletierte Gene zurückzuführen ist und Kopienzahlveränderungen, die die Bruchpunktregion einschließen, bei Normalpersonen beobachtet wurden, scheint aus genetischer Sicht der Phänotyp des Patienten 3 nicht auf eine Unterbrechung eines der beiden Gene zurückzuführen zu sein. Darüber hinaus scheint kein Zusammenhang zwischen der Funktion der Proteine, welche von *SPHK1* und *UBE2O* kodiert werden, und dem Phänotyp des Patienten 3 zu bestehen. *SPHK1* ist eine

Sphingosin-Kinase und für die Phosphorylierung von Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat, welches Wachstum, Proliferation und Überleben einer Zelle bestimmt, verantwortlich (Shida D 2008). Das distal von *SPHK1* gelegene *UBE2O* kodiert für ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym, das an der Differenzierung von Erythroblasten zu Retikulozyten beteiligt ist (Wefes I 1995, Yokota T 2001). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Translokation des 17q-Arms auf das Chromosom 11 wahrscheinlich nicht mit dem Phänotyp des Patienten 3 assoziiert ist.

4.2 In der Bruchpunktregion 11q13.3 ist das *SHANK2*-Gen disruptiert

Mit Hilfe der seriellen FISH-Analysen wurde die Bruchpunktregion in 11q13.3 auf 10 bis 15 Kb eingegrenzt; die Translokation führt zu einer Unterbrechung des *SHANK2*-Gens im Intron 13. *SHANK2* besteht aus 22 Exons und kodiert für ein Protein, welches zur SHANK-Familie gehört, die aus drei Mitgliedern (*SHANK1-3*) besteht. Alle drei Proteine werden hauptsächlich im Gehirn exprimiert, wobei *SHANK2* vor allem im Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Riechkolben und im Mittelhirn nachgewiesen wurde (Boeckers TM 1999). *SHANK*-Proteine fungieren als Gerüstproteine in der postsynaptischen Dichte, die sich unterhalb der postsynaptischen Membran exzitatorischer Synapsen befinden (Sheng M 2000, Boeckers TM 2002). Wie Abbildung 49 zeigt, besitzt *SHANK2* mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen wie SH3 („src homology 3“), PDZ („PSD-95/discs large/ZO-1“), PRO („prolin rich“) und SAM („sterile alpha motif“).

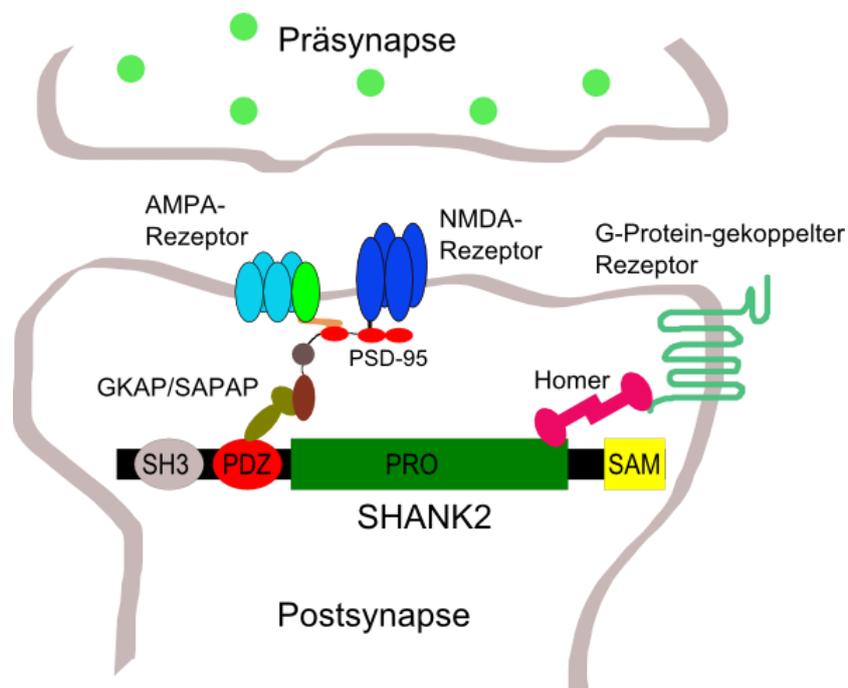


Abb. 49: Schematische Darstellung der postsynaptischen Dichte mit *SHANK2* und einiger Interaktionspartner

Dargestellt ist eine Synapse mit dem SHANK2-Protein und den Domänen SH3 (grau), PDZ (rot), PRO (grün) und SAM (gelb). Über die intrazytoplasmatischen Proteine GKAP/SAPAP (oliv-grün), PSD-95 (rot) und Homer (rosa) ist SHANK2 mit den Glutamatrezeptoren AMPA (hellblau), NMDA (dunkelblau) und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (hellgrün) in der postsynaptischen Membran verankert.

SHANK2 vermittelt über die Bindung an die Proteine GKAP/SAPAP, PSD-95 und Homer eine Verankerung der Glutamatrezeptoren in der postsynaptischen Membran mit dem Aktin-Zytoskelett. Dieses deutet darauf hin, dass SHANK2 als Gerüstprotein für die Morphologie der dendritischen Dornen eine wichtige Rolle spielt (Sheng M 2000). Es wurden zwei Deletionen (2,5 Mb und 5 Mb), die einerseits einen Teil des Gens und andererseits das gesamte Gen umfassen, beschrieben, die bei Patienten mit mentaler Retardierung, Entwicklungsverzögerung, kraniofazialen Dysmorphien und kongenitaler Taubheit gefunden wurden. Weiterhin wurden zwei Duplikationen (7 Mb und 7,5 Mb), die *SHANK2* umfassen, dokumentiert und ebenfalls mit ähnlichen Symptomen wie bei den Deletionspatienten assoziiert sind. In einer aktuellen Arbeit von Berkel und Mitarbeitern (2010), die 580 Patienten mit mentaler Retardierung bzw. Autismus auf Mutationen im *SHANK2*-Gen untersucht haben, wurden zwei *de novo* vorliegende Mikrodeletionen, die zu einer Leserasterschiebung führen und damit zu einem Funktionsverlust von SHANK2, bei Patienten mit mentaler Retardierung bzw. Autismus identifiziert. Außerdem wurden durch die Sequenzierung des Gens acht intragenische Mutationen detektiert, die in der Kontrollgruppe aus 659 Normalpersonen und in den dbSNP-Datenbanken nicht dokumentiert waren. Somit wird davon ausgegangen, dass heterozygote Mutationen im *SHANK2*-Gen mit mentaler Retardierung und Autismus assoziiert sind (Berkel S 2010). Aufgrund dieser Befunde und der bekannten neurobiologischen Funktion von SHANK2, kann davon ausgegangen werden, dass die Unterbrechung von *SHANK2* mit dem Phänotyp des Patienten 3 assoziiert ist.

5. Bei dem Patienten 4 konnte der Bruchpunkt auf Chromosom 1 auf etwa 100 Kb und der auf Chromosom 5 auf 10 bis 15 Kb eingegrenzt werden

5.1 In der Bruchpunktregion 1q41 liegen die Gene *EPRS*, *BPNT1*, *IARS2* und *RAB3GAP2*

Patient 4 zeigt eine allgemeine Entwicklungsverzögerung mit Autismus. Bei ihm konnte die Bruchpunktregion in 1q41 auf etwa 100 Kb eingegrenzt werden. Datenbankrecherchen ergaben, dass die vier Gene *EPRS*, *BPNT1*, *IARS2* und *RAB3GAP2* in dieser Bruchpunktregion lokalisiert sind, wobei eines dieser Gene durch das Rearrangement unterbrochen sein könnte.

Bisher sind eine 12 Mb-Duplikation und zwei Deletionen (3 und 4 Mb) bei Patienten mit mentaler Retardierung und fazialen Dysmorphien, die entweder eines der Gene oder alle vier Gene umfassen, gefunden. Zusätzlich zu den in „Decipher“ dokumentierten Imbalancen werden weitere acht über die FISH-Technik detektierte Deletionen von 2,5 bis 9,5 Mb, die die Bruchpunktregion einschließen, in der Literatur beschrieben (Kantarci S 2006, Slavotinek AM 2006, T. A. Shaffer LG 2007). Diese Patienten zeigen im Wesentlichen mentale Retardierung, Entwicklungsverzögerung, epileptische Anfälle und Mittelliniendefekte. Es handelt sich hierbei um relativ große Deletionen, so dass die mentale Retardierung und die Entwicklungsverzögerung auf andere deletierte Gene zurückzuführen sein könnte. Hier wird insbesondere das *DISP1*-Gen diskutiert (T. A. Shaffer LG 2007, Filges I 2010). Da dieses Gen etwa 2 Mb distal vom Bruchpunkt des Patienten 4 entfernt ist, spielt es für den Phänotyp des Patienten 4 eher keine Rolle. Aber auch die Funktion der Proteine, die von *EPRS*, *BPNT1*, *IARS2* oder *RAB3GAP2* kodiert werden, sprechen wenig dafür, dass eines ein mögliches Kandidatengen ist. *EPRS* kodiert für zwei Aminoacyl-tRNA-Synthetasen unterschiedlicher Klassen (Kaiser E 1994). Beide katalysieren die Bindung von Aminosäuren an ihre tRNAs und sind somit an der Proteinbiosynthese beteiligt (Kaiser E 1994). Distal von *EPRS* liegt das Gen *BPNT1*, welches für die Bisphosphat-3'-Nukleotidase kodiert und zur Familie der Magnesium-abhängigen Phosphomonoesterasen gehört (Spiegelberg BD 1999). Die genaue Funktion des Proteins ist bisher nicht bekannt. *IARS2* kodiert für eine mitochondriale Isoleucyl-tRNA-Synthetase (Bonfond L 2005). Das vierte Gen in der Bruchpunktregion ist *RAB3GAP2*. *RAB3GAP2* bildet zusammen mit *RAB3GAP1* den heterodimeren Komplex *RAB3GAP*, der bei der Calcium-vermittelten Exozytose von Hormonen und Neurotransmittern als Schlüsselregulator fungiert (Takai Y 1996). Biallelische Mutationen in *RAB3GAP2* führen zum Martsolf-Syndrom; hierfür typische Merkmale sind kongenitale Katarakt, Hypogonadismus und eine milde mentale Retardierung (Aligianis IA 2006). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass keines der vier in der 1q41-Bruchpunktregion liegenden Gene ein interessantes Kandidatengen für den Phänotyp des Patienten 4 ist.

5.2 In der Bruchpunktregion 5q31.1 kommen *CDKL3* und *NEUROG1* als Kandidatengene für den Phänotyp des Patienten 4 in Frage

Die Translokation des Patienten 4 führt zu einer Unterbrechung des Gens *CATSPER3*, wobei die Bruchpunktregion in Intron 2, Exon 3 oder Intron 3 lokalisiert ist. Das von diesem Gen kodierte Protein gehört zu einer Calciumkanal-Proteinfamilie, die aus insgesamt vier Mitgliedern besteht (*CATSPER1-4*). *CATSPER* steht für „cation channel of sperm“, d.h., es handelt sich anscheinend um spermiumspezifische Proteine (Li HG 2007), die als spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle bei Mäusen eine wichtige Funktion bei der hyperaktiven

Motilität der Spermien haben und damit u.a. für Fertilität eine Rolle spielen (Qi H 2006). Äußerst interessant ist dabei das Ergebnis einer 2010 veröffentlichten Arbeit von Kim und Mitarbeitern (2010). Da im Hoden exprimierte Gene häufig auch im Gehirn exprimiert werden (Guo JH 2005), untersuchte die Gruppe von Kim und Mitarbeitern (2010) das Expressionsmuster von *Catsper1-4* im Gehirn und konnte dort durch Western-Blot-Analysen vor allem *Catsper3* nachweisen. Die Expression war im Cortex, Hippocampus, Hypothalamus und Kleinhirn besonders hoch (Kim CW 2010). Zusammen mit der Tatsache, dass Mutationen in Genen, die für spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle kodieren, mit Autismus in Zusammenhang stehen (Lory P 2010), könnte die Unterbrechung des Gens *CATSPER3* mit dem Krankheitsphänotyp des Patienten 4 assoziiert sein.

In dieser Bruchpunktregion befinden sich noch drei weitere Gene (*CDKL3*, *PITX1* und *NEUROG1*), die möglicherweise über einen Positionseffekt mit dem Phänotyp des Patienten 4 assoziiert sein könnten. *CDKL3* liegt etwa 0,6 Mb proximal zum 5q31.1-Bruchpunkt und kodiert für eine putative Serinkinase, welche zu MAP- („mitogen-activated protein“) und Cyclin-abhängigen Kinasen homolog ist (Yee KW 2003). Vermutlich spielt *CDKL3* beim Wachstum der Dendriten und Axone sowie bei der Reifung des zentralen Nervensystems eine Rolle (Liu Z 2010). Für *CDKL3* spricht weiter, dass es bei einer X;5-Translokationspatientin mit milder mentaler Retardierung unterbrochen ist (Dubos A 2008). Die Mutter dieser Patientin, über die es keine klinischen Informationen gibt, trägt ebenfalls die Translokation (Dubos A 2008). Deswegen kann spekuliert werden, dass eine Mutation im *CDKL3*-Gen möglicherweise mit einer unvollständigen Penetranz einhergeht. Dies könnte auch erklären, warum die Mutter des Patienten 4, die ebenfalls Trägerin der 1;5-Translokation ist, phänotypisch unauffällig ist.

Die beiden Gene *PITX1* und *NEUROG1* sind etwa 30 Kb bzw. 0,5 Mb distal vom Bruchpunkt lokalisiert und wurden bereits als Kandidatengene für Autismus diskutiert (Philippi A 2007). *Pitx1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der während der Embryogenese eine hohe Expression in den unteren Extremitäten von Mäusen und Hühnern zeigt (Lanctôt C 1997). Gurnett und Mitarbeiter (2008) publizierten eine heterozygote Missense-Mutation (c.388G>A; p.E130K) im *PITX1*-Gen bei Patienten mit Klumpfuß. Dieser Befund spricht eher gegen *PITX1* als Kandidatengene für einen neurologischen Phänotyp. Interessant an *NEUROG1*, das ebenfalls für einen Transkriptionsfaktor kodiert (Ma Q 1996) und bei der Neurogenese eine Rolle spielt (F. C. Ma Q 1999), ist, dass Assoziationsstudien darauf hindeuten, dass bestimmte Sequenzvarianten in *NEUROG1* mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Schizophrenie einhergehen (Fanous AH 2007). Zusammen mit der Hypothese von Crespi und Mitarbeitern (2010), dass Autismus und Schizophrenie sich an den entgegengesetzten Endpunkten eines gemeinsamen neuropsychiatrischen Spektrums befinden (Crespi B 2010), könnte ein Positionseffekt auf *NEUROG1* mit dem Phänotyp des Patienten 4 in

Zusammenhang stehen. Tatsächlich konnten mit Hilfe unterschiedlicher Datenbanken HCNEs, die auf regulatorisches Potential hinweisen und eventuell auf die Expression von *CDKL3*, *PITX1* und/oder *NEUROG1* wirken könnten, gefunden werden (Abb. 50):

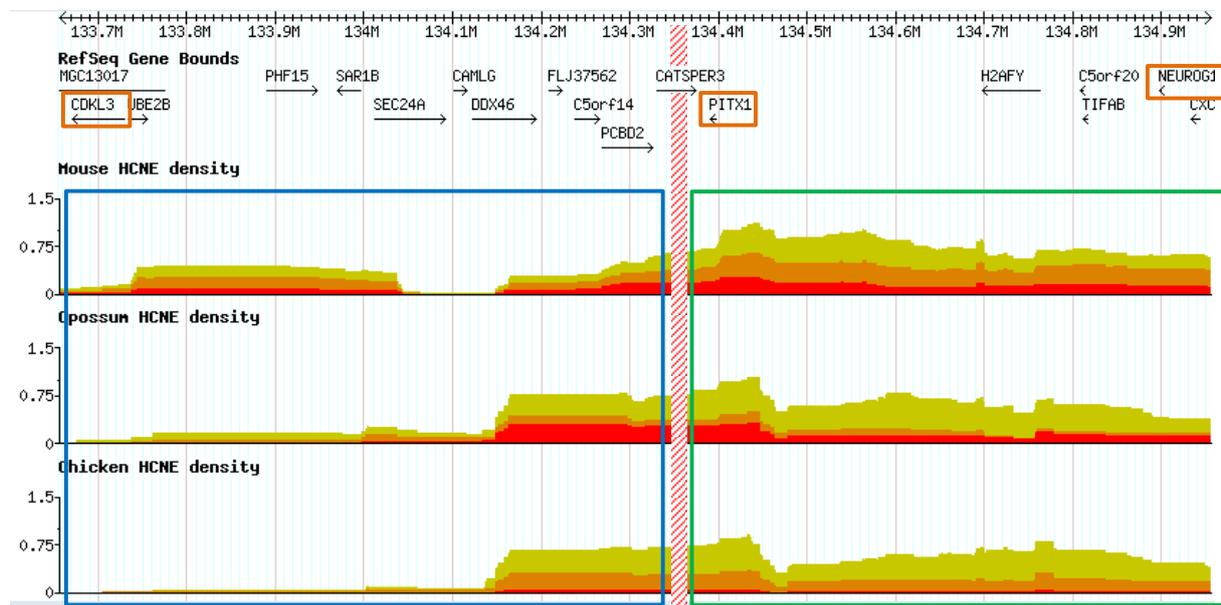


Abb. 50: Darstellung von HCNEs in 5q31.1

Die Abbildung zeigt einen etwa 1,3 Mb großen Abschnitt aus 5q31.1. Die Kandidatengene *CDKL3*, *PITX1* und *NEUROG1* sind braun umrandet. Die HCNEs, welche möglicherweise auf die Expression von *CDKL3* wirken könnten, sind im grünen und die, die auf die Expression von *PITX1* und *NEUROG1* wirken könnten, im blauen Kasten hervorgehoben. Die HCNEs entstehen durch Sequenzvergleiche zwischen Maus und Mensch, Opossum und Mensch bzw. Huhn und Mensch. Beim Vergleich zwischen Maus und Mensch gibt die rote Fläche eine 100%ige Übereinstimmung über 30 Basenpaaren (Bp), die orange Fläche eine 98%ige Übereinstimmung über 50 Bp und die grüne Fläche einer 96%igen Übereinstimmung über 50 Bp wieder. Beim Vergleich zwischen Opossum und Mensch gibt die rote Fläche eine 98%ige Übereinstimmung über 50 Bp, die orange Fläche eine 96%ige Übereinstimmung über 50 Bp und die grüne Fläche eine 90%ige Übereinstimmung über 50 Bp wieder. Beim Vergleich von Huhn und Mensch gibt die rote Fläche eine 100%ige Übereinstimmung über 30 Bp, die orange Fläche eine 90%ige Übereinstimmung über 50 Bp und die grüne Fläche eine 80%ige Übereinstimmung über 50 Bp wieder. Die rot schraffierte Fläche stellt die Bruchpunktregion dar. Die physikalische Karte wurde aus der Datenbank „ANCORA“ (Human March 2006 Assembly) übernommen.

Gegen *NEUROG1* und *PITX1* als Kandidatengene für den Phänotyp des Patienten 4 spricht jedoch, dass eine Mutationsanalyse von *PITX1* und *NEUROG1* in 276 Familien mit mindestens zwei Kindern mit Autismus keine Auffälligkeit in dem jeweiligen Gen ergab (Philippi A 2007). In der Literatur sind sechs zytogenetisch bestimmte Deletionen von 5q22 bis 5q31 (Kadotani T 1984, G.-E. L. Rivera H 1987, S. P. Rivera H 1990, Kobayashi T 1991, Lindgren V 1992, Harréus UA 2002) und zwei über die FISH-Technik bestimmte Deletionen von 5q22.3 bis 5q31.2 (Garcia-Miñaur S 2005, Tzschach A 2006) bekannt, die wahrscheinlich *CATSPER3*, *CDKL3*, *PITX1* und *NEUROG1* einschließen und bei Patienten mit mentaler Retardierung und Entwicklungsverzögerung gefunden wurden. Da diese Deletionen sowohl den Bruchpunkt auf Chromosom 5 des Patienten 1 als auch den Bruchpunkt auf Chromosom 5 des Patienten 4 einschließen, finden sich nähere

Erläuterungen dazu bei Patient 1. Darüber hinaus werden in „Decipher“ eine 10 Mb-Deletion, die alle vier hier diskutierten Gene umfasst, eine 3 Mb-Deletion, die *CATSPER3*, *PITX1* und *NEUROG1* umfasst, und eine 10,5 Mb-Deletion, die *CDKL3*, *CATSPER3* und *PITX1* einschließt, aufgezeigt. Sowohl die 3 Mb-Deletion als auch die 10,5 Mb-Deletion sind bei Patienten mit mentaler Retardierung gefunden worden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in der deletierten Region mindestens ein Gen lokalisiert ist, das mit mentaler Retardierung assoziiert ist. Der Patient mit der 10 Mb-Deletion zeigte keine mentale Retardierung, sondern faziale Dysmorphien und einen Klumpfuß, der vermutlich auf die Deletion von *PITX1* zurückzuführen ist. Daher scheint *PITX1* als Kandidatengenen für den Phänotyp des Patienten 4 unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung dafür, dass der Patient mit der 10 Mb-Deletion, die sowohl *CDKL3* als auch *NEUROG1* umfasst, keine mentale Retardierung oder Autismus aufweist, könnte eine unvollständige Penetranz sein. Zumindest für Autismus ist bekannt, dass die genetischen Veränderungen mit unvollständiger Penetranz einhergehen können (Toro R 2010). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die Mutter des Patienten 4 ebenfalls die 1;5-Translokation trägt und keinen neurologischen Phänotyp zeigt. Gegen *PITX1* als Kandidatengenen spricht weiterhin, dass drei Duplikationen von 7 bis 50 Kb, die Teile oder das gesamte *PITX1*-Gens einschließen, bei Normalpersonen gefunden worden sind. Aber auch eine 5 Kb-Deletion, die einen Teil des *CATSPER3*-Gens umfasst, wurde bei einer Normalperson dokumentiert, so dass *CATSPER3* ebenfalls ein unwahrscheinliches Kandidatengenen ist. Zusammenfassend ist ein möglicher Positionseffekt auf die Expression von *CDKL3* und/oder *NEUROG1* als Ursache für den Phänotyp des Patienten 4 denkbar.

6. Bei dem Patienten 5 konnte kein Zusammenhang zwischen der Translokation und dem Krankheitsbild hergestellt werden

6.1 In der Bruchpunktregion 5q21.1 wird kein Gen unterbrochen

Bei dem Patienten 5 stehen klinisch Gynäkomastie, Bluthochdruck und Übergewicht im Vordergrund. Hier führten serielle FISH-Untersuchungen zu einer Eingrenzung des Bruchpunktes in 5q21.1 auf 15 bis 20 Kb. Die anschließende Datenbankrecherche ergab, dass durch die Translokation kein Gen direkt unterbrochen wurde. In der Datenbank „Decipher“ sind vier Deletionen von 1,8 bis 26 Mb dokumentiert, die die Bruchpunktregion einschließen. Diese Deletionen wurden bei Patienten mit mentaler Retardierung gefunden. Da bei Patient 5 keine mentale Retardierung oder andere gemeinsame klinische Merkmale mit den in „Decipher“ dokumentierten Deletionspatienten vorhanden sind, ist eine Translokation eines Teils des q-Arms von Chromosom 5 auf Chromosom 13 wahrscheinlich nicht mit dem Krankheitsphänotyp des Patienten 5 assoziiert.

6.2 Die Bruchpunktregion 13q14.12 ist vermutlich nicht mit dem Phänotyp des Patienten 5 assoziiert

Mit Hilfe der seriellen FISH-Analyse konnte der Bruchpunkt auf Chromosom 13 in q14.12 auf 10 bis 15 Kb eingegrenzt werden. Datenbankrecherchen ergaben, dass es wahrscheinlich zu einer Unterbrechung des *CPB2*-Gens kommt. Es sind drei Deletionen von 19 bis 36 Mb, die die Bruchpunktregion und das *CPB2*-Gen einschließen, bei Patienten mit mentaler Retardierung oder Autismus und kraniofazialen Dysmorphien dokumentiert. Keiner dieser Deletionspatienten zeigte einen Bluthochdruck und/oder Gynäkomastie. Zwei andere Deletionen (80 Kb und 20 Kb), die Teile von *CPB2* umfassen, wurden bei Normalpersonen beobachtet. Dabei scheint *CPB2* nicht nur aus genetischer Sicht ein unwahrscheinliches Kandidatengen zu sein, sondern auch aus Sicht der Proteinfunktion. *CPB2* kodiert für das hepatische Zymogen, das als CPU (Procarboxypeptidase U) oder TAFI (Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyse Inhibitor) bekannt ist und vermutlich eine Rolle beim Fibrinolyse-System spielt (Wang W 1994). Aber auch andere Gene, die sich bis zu 1,5 Mb proximal und distal vom Bruchpunkt befinden, scheinen nicht mit dem Phänotyp des Patienten 5 in Zusammenhang zu stehen. Gesucht wurde nach einem Gen/Protein, das im Hormonhaushalt, insbesondere bei den Sexualhormonen, eine Rolle spielt. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die 5;13-Translokation vermutlich nur ein Zufallsbefund bei dem Patienten 5 war, und er eine andere Mutation im Genom aufweist, die für sein klinisches Bild verantwortlich ist.

7. Alle Bruchpunkte der 3;5;6-Translokation der Patientin 6 wurden auf 10 bis 50 Kb eingegrenzt

7.1 In der Bruchpunktregion 5p14.3 kommt es nicht zu einer Genunterbrechung

Bei der 33-jährigen Patientin 6 stehen skelettale Veränderungen, wie Dolichomelie, Arachnodaktylie, Kyphoskoliose und eine progressive Destruktion beider Hüften, sowie ein disproportionierter Kleinwuchs im Vordergrund. Datenbankrecherchen ergaben, dass in der 10 bis 15 Kb großen Bruchpunktregion in 5p14.3 kein Gen direkt unterbrochen wurde. Es sind insgesamt drei Deletionen von 3 bis 35 Mb bekannt, die die Bruchpunktregion einschließen und entweder keinen krankheitsassoziierten Phänotyp oder keine Überschneidungen mit dem Krankheitsphänotyp der Patientin 6 aufweisen. Dieses deutet daraufhin, dass die Translokation des 5p-Arms vermutlich nicht mit dem Phänotyp der Patientin 6 assoziiert ist. Unterstützt wird diese Annahme durch die Arbeit von Overhauser und Mitarbeitern (1986), die eine Familie über drei Generationen untersuchte. In dieser Familie wiesen sechs Mitglieder eine lichtmikroskopisch sichtbare Deletion in der Region

5p14 auf und hatten keinen Krankheitsphänotyp (Overhauser J 1986). Ein anderer erwähnenswerter Fall ist ein Patient mit einer zytogenetisch bestimmten, interstitiellen Deletion in 5p14 (Johnson EI 2000). Durch FISH wurden der distale Bruchpunkt in 5p14.3 und der proximale Bruchpunkt in 5p14.1 kartiert. Ob diese Deletion die Bruchpunktregion der Patientin 6 beinhaltet, kann aufgrund der publizierten Daten nicht gesagt werden. Der von Johnson und Mitarbeitern (2000) beschriebene Patient hatte eine Mikrocephalie, Epilepsie und eine Entwicklungsverzögerung und zeigt damit keine klinischen Übereinstimmungen mit dem Phänotyp der Patientin 6. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass eine Unterbrechung dieses Chromosoms wahrscheinlich nicht mit dem klinischen Bild der Patientin 6 in Zusammenhang steht.

7.2 Durch die Translokation kommt es zu einer direkten Unterbrechung von *EYA4* in 6q23.2

Laut Datenbankrecherchen kommt es in der 45 bis 50 Kb großen Bruchpunktregion in 6q23.2 zu einer direkten Unterbrechung des Gens *EYA4* im Intron 2. *EYA4* besteht aus 21 Exons und gehört zur Familie der *EYA*-Gene (*EYA1-4*), die für Transkriptionsaktivatoren kodieren und an der Entwicklung verschiedener Organe beteiligt sind. Alle *EYA*-Proteine enthalten eine hochkonservierte carboxyterminale Domäne mit Phosphatase-Aktivität, eine variable Domäne mit unbekannter Funktion und Interaktionsmotive für den Transkriptionsfaktor Sine oculis (*SIX*), durch den die *EYA*-Proteine vom Zytosol in den Zellkern transloziert werden (Rebay I 2005). Die Wirkung von *EYA* im Zellkern erfolgt u.a. über *SIX*, da *EYA* selbst keine DNA-bindende Domäne enthält (Abe Y 2009). Diese Proteine werden in vielen Geweben während der frühen Embryogenese exprimiert, wobei nur *EYA1* und *EYA4* im otischen Vesikel des Embryos nachweisbar sind (Ohto H 1999). Dieses erklärt, warum Mutationen in *EYA4* zu einer dominanten Form von sensorineuralem Hörverlust, entweder mit oder ohne spätmanifeste, dilatative Kardiomyopathie, führen können (Schönberger J 2005). Obwohl das Gen bei Patientin 6 unterbrochen ist und sich Mutationen in *EYA4* dominant auswirken, zeigt sie keine Symptome, die auf einen Hörverlust oder eine Kardiomyopathie hindeuten. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass es sich um eine spätmanifeste Form (Erkrankungsalter: von der Adoleszenz bis zur 5. Dekade) handeln könnte (Wayne S 2001, Abe Y 2009). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass durch die Translokation des großen Anteils des *EYA4*-Gens dieses nicht exprimiert und dementsprechend auch kein aberrantes Protein gebildet wird, welches einen dominant-negativen Effekt auf das Wildtyp-Protein haben könnte. Es wird nämlich vermutet, dass die meisten *EYA4*-Mutationen, die mit sensorineuralem Hörverlust mit oder ohne Kardiomyopathie assoziiert sind, zu einem verkürzten *EYA4*-Protein führen, welches möglicherweise das Wildtyp-*EYA4* negativ beeinflusst, vor allem wenn berücksichtigt wird,

dass EYA4 Heterodimere bildet (Schönberger J 2005, Abe Y 2009). Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass in der Arbeit von Abe und Mitarbeitern (2009) ein Patient mit einer über eine Array-CGH bestimmte Deletion in 6q22.31-q23.2, die u.a. zu einem Verlust des Promotors und der ersten beiden Exons von *EYA4* führt, beschrieben wurde. Dieser Patient zeigte eine milde Entwicklungs- und Wachstumsverzögerung sowie eine Holoprosencephalie, wobei letztere auf andere deletierte Gene zurückzuführen sein könnte. Die hier dargestellten Befunde sprechen also eher dagegen, dass eine Unterbrechung von *EYA4* mit dem skelettalen Phänotyp der Patientin 6 assoziiert ist.

7.3 Möglicherweise sind *FNDC3B* und *GHSR* in der Bruchpunktregion 3q26.31 mit dem Phänotyp der Patientin 6 assoziiert

Serielle FISH-Untersuchungen ergaben eine Eingrenzung des Bruchpunktes in 3q26.31 auf 10 bis 15 Kb. In dieser Bruchpunktregion liegt das Gen *FNDC3B*, das im Intron 1 unterbrochen wurde. Das kodierte FAD104-Protein enthält neun Fibronectin Typ III-Domänen und eine Transmembrandomäne. Lokalisiert ist das Protein am endoplasmatischen Retikulum, wobei die genaue Funktion noch unbekannt ist (Nishizuka M 2009, Kishimoto K 2010). Es wird angenommen, dass es bei der Adhäsion, Ausbreitung, Migration, dem Wachstum und der Differenzierung von Zellen, insbesondere von Adipozyten, eine Rolle spielt (Sastry SK 2000, Geiger BH 2002, Tominaga K 2004, Kishimoto K 2010). Darüber hinaus wird eine Beteiligung von Fad104 an der Osteogenese angenommen (Kishimoto K 2010). Fad104-defiziente murine, embryonale Fibroblasten bildeten knochenähnliches Gewebe, so dass Kishimoto und Mitarbeiter (2010) die Hypothese aufstellten, dass Fad104 als negativer Regulator für die Osteoblastendifferenzierung fungiert (Kishimoto K 2010).

Ein anderes interessantes Gen, welches sich etwa 50 Kb distal von *FNDC3B* befindet und möglicherweise mit dem Phänotyp der Patientin 6 assoziiert ist, ist das *GHSR*-Gen. Dieses Gen kodiert für einen aus sieben Transmembrandomänen bestehenden G-Proteingekoppelten Rezeptor und wird im Gehirn und in der Hypophyse hoch exprimiert (Howard AD 1996). Heterozygote Mutationen im *GHSR*-Gen werden mit autosomal-dominantem, idiopathischem Kleinwuchs in Zusammenhang gebracht (L. M.-L. Pantel J 2006, L. M.-L. Pantel J 2009, Inoue H 2011). In den beschriebenen Familien mit *GHSR*-Mutationsträgern wurde sowohl unvollständige Penetranz als auch variable Expressivität beobachtet (L. M.-L. Pantel J 2006, L. M.-L. Pantel J 2009). Da die Patientin 6 ebenfalls einen Kleinwuchs aufweist, könnte bei ihr ein Positionseffekt auf das *GHSR*-Gen vorliegen und mit ihrem Phänotyp assoziiert sein. Mit Hilfe von verschiedenen Datenbanken konnten hochkonservierte nicht-kodierende Elemente proximal vom 3q26.31-Bruchpunkt gefunden

werden, die auf regulatorische Einheiten hindeuten und möglicherweise auf die Expression von *GHSR* wirken könnten (Abb. 51).

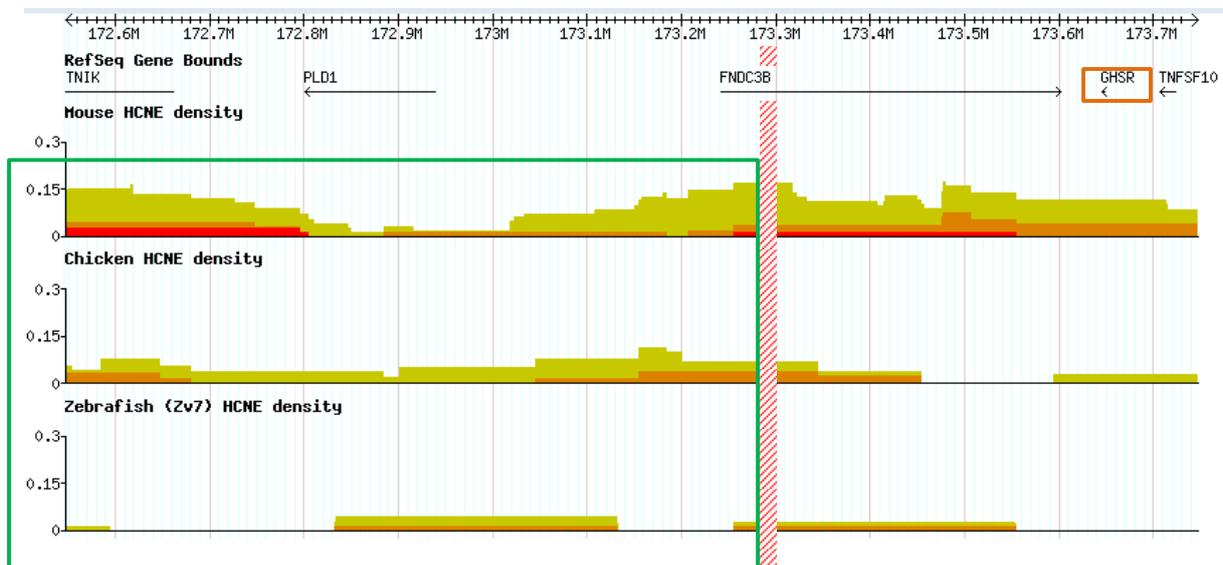


Abb. 51: Darstellung von HCNEs in 3q26.31

Die Abbildung zeigt einen etwa 1 Mb großen Abschnitt aus 3q26.31. Das Kandidatengen *GHSR* ist braun umrandet. Die HCNEs sind im grünen Kasten hervorgehoben und entstehen durch Sequenzvergleiche zwischen Maus und Mensch, Huhn und Mensch bzw. Zebrafisch und Mensch. Beim Vergleich zwischen Maus und Mensch gibt die rote Fläche eine 100%ige Übereinstimmung über 30 Basenpaare (Bp), die orange Fläche eine 98%ige Übereinstimmung über 50 Bp und die grüne Fläche eine 96%ige Übereinstimmung über 50 Bp wieder. Beim Vergleich zwischen Huhn und Mensch gibt die orange Fläche eine 90%ige Übereinstimmung über 50 Bp und die grüne Fläche eine 80%ige Übereinstimmung über 50 Bp wieder. Beim Vergleich von Zebrafisch und Mensch gibt die orange Fläche eine 80%ige Übereinstimmung über 50 Bp und die grüne Fläche eine 70%ige Übereinstimmung über 50 Bp wieder. Die rot schraffierte Fläche stellt die Bruchpunktregion dar. Die physikalische Karte wurde aus der Datenbank „ANCORA“ (Human March 2006 Assembly) übernommen.

In „Decipher“ werden zwei Deletionen (1 Mb und 9 Mb), die *GHSR* einschließen, aufgezeigt, wobei für die 9 Mb-Deletion kein Krankheitsphänotyp eingetragen wurde und die 1 Mb-Deletion bei einem Patienten mit Ptosis und Ohranomalitäten gefunden worden ist. Diese Beobachtungen widersprechen *GHSR* als mögliches Kandidatengen für den Phänotyp der Patientin 6 nicht, da *GHSR*-Mutationen mit unvollständiger Penetranz einhergehen können. Da diese beiden Deletionen auch das *FNDC3B*-Gen umfassen, aber keine skelettalen Veränderungen bei den Deletionspatienten beschrieben sind, scheint eine Unterbrechung von *FNDC3B* als Ursache für den Phänotyp der Patientin 6 weniger wahrscheinlich. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Kleinwuchs der Patientin 6 mit einem Positionseffekt auf *GHSR* in Zusammenhang stehen könnte. Dennoch erklärt dies vermutlich nicht allein den disproportionierten Kleinwuchs der Patientin 6. Denkbar wäre, dass der auf *GHSR* wirkende Positionseffekt in Kombination mit der Unterbrechung des *FNDC3B*-Gens zur Ausprägung des Skelettphänotyps der Patientin 6 beigetragen haben könnte.

8. Beide Inversionsbruchpunkte der Patientin 7 konnten auf 10 bis 20 Kb eingegrenzt werden

8.1 In der Bruchpunktregion 20q11.23 könnte es zu einer Unterbrechung von *SAMHD1* gekommen sein

Patientin 7 zeigt eine mentale Retardierung, eine psychomotorische und sprachliche Entwicklungsverzögerung und Bewegungsstörungen. Weiterhin auffällig sind bei ihr die geringe Frustrationstoleranz und die Hyperaktivität. Die auf die seriellen FISH-Analysen folgende Datenbankrecherche ergab, dass die parazentrische Inversion möglicherweise zu einer Unterbrechung des aus 16 Exons bestehenden *SAMHD1*-Gens in 20q11.23 geführt haben könnte. Das *SAMHD1*-Protein besteht aus 626 Aminosäuren und enthält eine SAM- („sterile alpha motif“) und eine HD- („conserved doublet of predicted catalytic residues in members of superfamily of predicted phosphohydrolases“) Domäne. Die genaue Proteinfunktion ist noch unbekannt. Es wird vermutet, dass es als zelluläre Nuklease eine Rolle spielt (Rice GI 2009). Bisher wurden Mutationen in *SAMHD1* in Zusammenhang mit dem Aicardi-Goutières-Syndrom gebracht (Rice GI 2009). Dieses Syndrom wird in der Regel autosomal-rezessiv vererbt; autosomal-dominante Vererbung wurde bisher nur bei Mutationen im *TREX1*-Gen beobachtet (Crow YJ 2006). Charakterisiert ist dieses Syndrom durch eine subakute Encephalopathie, verkalkte Basalganglien, Leukodystrophie und Lymphozytose der Zerebrospinalflüssigkeit (Abdel-Salam GM 2010). Die hier beschriebenen Symptome stimmen kaum mit denen von Patientin 7 überein. Patientin 7 zeigt keine schwere Entwicklungsverzögerung, und außerdem hat sie die für das Aicardi-Goutières-Syndrom typischen frostbeulenartigen Läsionen nicht. Ein weiteres Argument, das gegen *SAMHD1* als mögliches Kandidatengen für den Phänotyp der Patientin 7 spricht, ist, dass biallelische Mutationen vorliegen müssen, damit es zur Ausprägung der Erkrankung kommt (Aicardi J 2010). Um nach einer zweiten Mutation zu suchen, könnte eine Sequenzierung des Gens bei der Patientin 7 erfolgen.

Ein anderes interessantes Gen, das aufgrund der Funktion des kodierten Proteins mit dem Phänotyp der Patientin 7 in Zusammenhang gebracht werden könnte, ist *RBL1*. Dieses Gen befindet sich etwa 50 Kb distal vom Bruchpunkt und kodiert für das Protein p107, das zur Familie der Tumorsuppressorproteine bei Retinoblastomen gehört und als Inhibitor des G1/S-Übergangs an der Regulierung und Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist (Vanderluit JL 2007). Dabei scheint p107 vor allem den Pool von neuronalen Vorläuferzellen im wachsenden und adulten Gehirn zu bestimmen, indem es die Selbsterneuerung und Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen reguliert (F. K. Vanderluit JL 2004). Aufgrund dieser Tatsache könnte eine Störung in der Regulation der neuronalen Vorläuferzellen mit der mentalen

Retardierung und/oder Gangstörung der Patientin 7 assoziiert sein. In „Decipher“ ist eine 4 Mb-Deletion, die sowohl *RBL1* als auch *SAMHD1* einschließt, dokumentiert. Diese Deletion wurde bei einem Patienten mit mentaler Retardierung, Kleinwuchs und kurzen Fingern gefunden. Dieses könnte darauf hindeuten, dass die Deletion ein oder mehrere Gene, die mit mentaler Retardierung assoziiert sind, einschließt. In der Literatur wurden drei Patienten mit einer interstitiellen Deletion in dieser Region beschrieben: ein Patient hat eine 6,6 Mb große Deletion in 20q11.21-q11.23 (Callier P 2006), ein zweiter eine 6,8 Mb Deletion in 20q11.2-q12 (Iqbal MA 2007) und ein dritter eine 6,8 Mb Deletion in 20q11.2-q12 (Hiraki Y 2011). Alle Deletionen umfassen die Gene *SAMHD1* und *RBL1* (Hiraki Y 2011). Die Patienten wiesen Wachstumsretardierung, Entwicklungsverzögerung, kraniofaziale Dismorphien, cerebrale Atrophie und Fütterungsprobleme auf. Die Patientin 7 ist ebenfalls entwicklungsverzögert, so dass *RBL1* ein mögliches Kandidatengen für den Phänotyp der Patientin 7 ist, wohingegen *SAMHD1* eher unwahrscheinlich ist.

8.2 *KCNQ2* ist das attraktivste Kandidatengen für den Phänotyp der Patientin 7

Durch serielle FISH-Untersuchungen konnte die zweite Bruchpunktregion auf Chromosom 20 in q13.33 auf 15 bis 20 Kb eingegrenzt werden. Die Datenbankrecherche ergab, dass es durch die Inversion wahrscheinlich nicht zu einer direkten Unterbrechung eines Gens kam. Allerdings scheinen das 180 Kb proximal zum Bruchpunkt gelegene *CHRNA4* und das 80 Kb proximal zum Bruchpunkt gelegene *KCNQ2* interessante Kandidatengene für den Phänotyp der Patientin 7 zu sein.

CHRNA4 kodiert für die $\alpha 4$ -Untereinheit eines Liganden-gekoppelten, nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors (Steinlein O 1994), der für eine schnelle Reizweiterleitung in den Synapsen verantwortlich ist. *Chrna4* wird in Zellen der Neuralleiste, im Hinterhirn und im Mittelhirn im Zebrafisch exprimiert (Ackerman KM 2009). Die Rezeptoren spielen vermutlich nicht nur bei der Funktion des Nervensystems eine wichtige Rolle, sondern auch bei dessen Entwicklung. Mutationen in diesem Gen werden mit der autosomal-dominanten nächtlichen Frontallappen-Epilepsie (ADNFLE) in Zusammenhang gebracht (M. J. Steinlein OK 1995), wobei eine erhöhte Sensitivität der Acetylcholin-Rezeptoren als Ursache vermutet wird (Marini C 2007). Bei dieser Epilepsieform kommt es in der Regel zu kurzen, hyperkinetischen oder tonischen Anfällen, die im Frontallappen ihren Ursprung haben und vor allem nachts im Schlaf auftreten (Scheffer IE 1994). Bei Patientin 7 wurden bisher keine epileptischen Anfälle beschrieben, dennoch schließt diese Tatsache *CHRNA4* als mögliches Kandidatengen nicht aus, da die Anfälle häufig erst in der Adoleszenz auftreten (Baulac S 2010) und somit bei Patientin 7 später noch auftreten könnten. Bestimmte Sequenzvarianten in *CHRNA4* wurden zudem als assoziiert mit dem Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) beschrieben (Banaschewski T 2010, Faraone SV 2010). Dies könnte die

Verhaltensauffälligkeiten der Patientin 7 erklären, da bei ihr eine geringe Aufmerksamkeitsspanne und geringe Frustrationstoleranz sowie ein hyperaktives Verhalten beschrieben worden sind, welche typische Symptome des ADHS sind (Banaschewski T 2010).

Das 80 Kb proximal zum Bruchpunkt gelegene Gen *KCNQ2* kodiert für einen spannungsgesteuerten Kaliumkanal vom Typ M, der im Gehirn (Cortex, Cerebellum, Basalganglien und Hippocampus) exprimiert wird (Biervert C 1998). Diese Kaliumkanäle sind hauptsächlich am Axonhügel von Neuronen lokalisiert (Devaux JJ 2004, Pan Z 2006) und wirken modulierend auf die Erregbarkeit von Neuronen (Peters HC 2005). Mutationen in diesem Gen werden mit der autosomal-dominanten benignen familiären neonatalen Epilepsie (BFNE) in Zusammenhang gebracht (Biervert C 1998). Diese Form der Epilepsie ist charakterisiert durch generalisierte oder fokale tonisch-klonische Anfälle, die in der Regel um den dritten postnatalen Tag auftreten und spontan innerhalb des ersten Lebensmonats wieder persistieren (Baulac S 2010). Obwohl einige genetische Imbalancen in 20q13.33, die Teile oder das gesamte *KCNQ2*-Gen umfassen, bei Normalpersonen beschrieben wurden, sind in „Decipher“ sieben Duplikationen von 1,5 bis 4 Mb und zwei etwa 1 Mb große Deletionen, die alle *KCNQ2* und *CHRNA4* umfassen, dokumentiert. Die Phänotypen der Patienten, bei denen diese Imbalancen gefunden worden, zeigen Übereinstimmungen mit dem Phänotyp der Patientin 7, wie z.B. mentale Retardierung, Entwicklungs- und Sprachverzögerung und Gangstörung. Diese Befunde machen *CHRNA4* und *KCNQ2* als mögliche Kandidatengene für den Phänotyp der Patientin 7 wahrscheinlich. Unterstützt wird die Aussage durch die Ergebnisse von Traylor und Mitarbeitern (2010), Béna und Mitarbeitern (2007) und Bèri-Deixheimer und Mitarbeitern (2007), die insgesamt neun Patienten mit über FISH- und/oder Array-CGH-Technik identifizierten, *de novo* vorliegenden Mikrodeletionen in 20q13.33 beschrieben. Bei acht Patienten sind *CHRNA4* und *KCNQ2* deletiert und bei einem Patienten nur *KCNQ2*. Interessant ist, dass die Patienten aus den oben genannten Studien und Patientin 7 gemeinsame phänotypische Merkmale aufweisen, wie Entwicklungsverzögerung, mentale Retardierung, Sprachstörung, ADHS-ähnliche Symptome, unkoordinierte Bewegungen und motorische Dyspraxien. Vier der publizierten Patienten hatten keine epileptischen Anfälle, was auf unvollständige Penetranz hinweisen könnte (Traylor RN 2010). *CHRNA4* und *KCNQ2* sind damit Kandidatengene für den Phänotyp der Patientin 7. Bei einigen Patienten (bis zu 15%) mit einer intragenischen *KCNQ2*-Mutation lag neben der BFNE eine mentale Retardierung, eine verzögerte psychomotorische Entwicklung oder eine schwere Enzephalopathie vor (Borgatti R 2004, Schmitt B 2005, C. C. Steinlein OK 2007). Diese Befunde sprechen dafür, dass Mutationen in *KCNQ2* auch mit einer Entwicklungsverzögerung einhergehen können, wie sie bei Patientin 7 vorliegt. Unter der Annahme, dass *CHRNA4* und/oder *KCNQ2* Kandidatengene

für den Phänotyp der Patientin 7 sind, muss ein Positionseffekt vermutet werden. In verschiedenen Datenbanken wurden hochkonservierte nicht-kodierende Elemente distal vom 20q13.33-Bruchpunkt gefunden, die auf regulatorische Einheiten hindeuten und eventuell die Expression von *CHRNA4* und/oder *KCNQ2* beeinflussen könnten (Abb. 52).

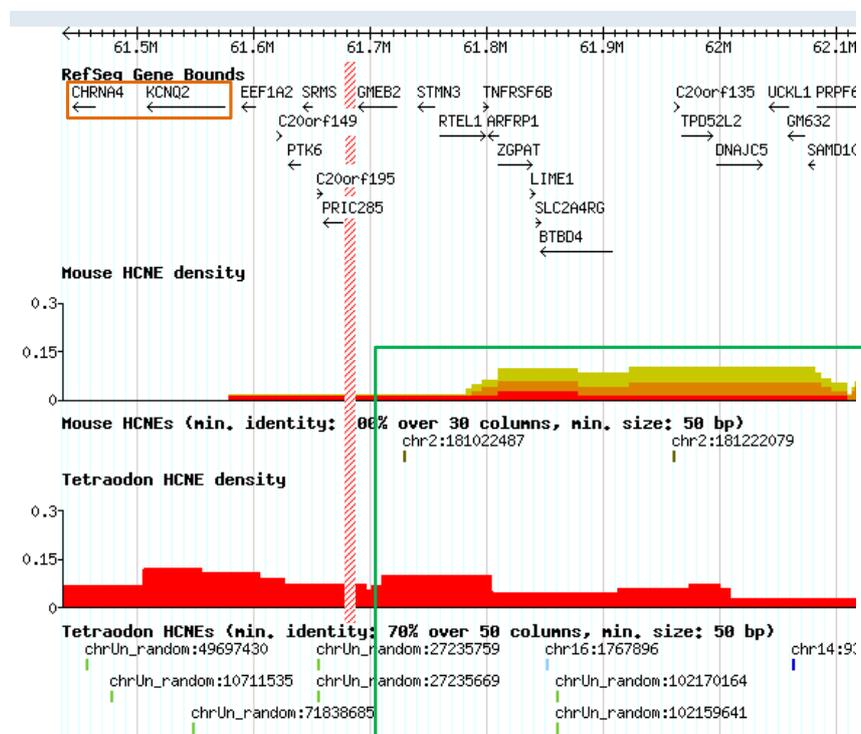


Abb. 52: Darstellung von HCNEs in 20q13.33

Die Abbildung zeigt einen etwa 0,7 Mb großen Abschnitt aus 20q13.33. Die Kandidatengene *CHRNA4* und *KCNQ2* sind braun umrandet. Die HCNEs sind im grünen Kasten hervorgehoben und entstehen durch Sequenzvergleiche zwischen Maus und Mensch bzw. Tetraodon und Mensch. Beim Vergleich zwischen Maus und Mensch gibt die rote Fläche eine 100%ige Übereinstimmung über 30 Basenpaaren (Bp), die orange Fläche eine 98%ige Übereinstimmung über 50 Bp und die grüne Fläche eine 96%ige Übereinstimmung über 50 Bp wieder. Beim Vergleich zwischen Tetraodon und Mensch gibt die rote Fläche eine 70%ige Übereinstimmung über 50 Bp wieder. Zusätzlich sind die HCNEs, die eine 100%ige Übereinstimmung über 30 Bp mit der Maus und eine 70%ige Übereinstimmung über 50 Bp mit dem Tetraodon zeigen, als senkrechte Balken dargestellt. Die rot schraffierte Fläche gibt die Bruchpunktregion wieder. Die physikalische Karte wurde aus der Datenbank „ANCORA“ (Human March 2006 Assembly) übernommen.

Zusammengenommen scheint dennoch, dass *KCNQ2* das attraktivste Kandidatengen für den Phänotyp der Patientin 7 zu sein. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein anderes Gen in der 20q13.33-Bruchregion mit der Entwicklungsverzögerung der Patientin 7 assoziiert ist. Dies könnte beispielsweise das etwa 60 Kb distal zum Bruchpunkt liegende *STMN3*-Gen sein. *Stmn3* (*Scnip*) wird besonders hoch in Purkinje-Zellen exprimiert (Ozon S 1999) und scheint eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Entwicklung des dendritischen Baums zu spielen (Poulain FE 2008). Daher könnte z.B. ein Zusammenhang zwischen der Gangstörung der Patientin 7 und dem *STMN3*-Gen vermutet werden.

VI. Zusammenfassung

Bis heute sind die Ursachen vieler genetisch bedingter Erkrankungen noch unklar. Für die Identifizierung monogener Krankheitsgene gibt es unterschiedliche Herangehensweisen. Beispielsweise können balancierte, konstitutionelle Chromosomenaberrationen Hinweise auf die Lokalisation eines Krankheitsgens im Genom geben. Insbesondere bei Personen, die ein *de novo* vorliegendes chromosomales Rearrangement und einen Mendel'schen Krankheitsphänotyp aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass die chromosomale Aberration mit der Erkrankung in Zusammenhang steht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die chromosomalen Bruchpunkte von sieben Patienten mit einem Krankheitsphänotyp und einer lichtmikroskopisch sichtbaren, strukturellen Chromosomenaberration mittels serieller Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen feinkartiert. Anschließend erfolgte mit Hilfe von Datenbankrecherchen die Identifizierung von Kandidatengen in der feinkartierten Region, die möglicherweise mit dem Krankheitsphänotyp des jeweiligen Patienten in Zusammenhang stehen.

Patient 1 hat eine *de novo* 5;9-Translokation. Er zeigt eine psychomotorische und sprachliche Entwicklungsverzögerung, einen sekundären Mikrocephalus und eine Aplasie des Corpus callosum. Der Bruchpunkt in 9p22.1, der zur Unterbrechung des *ADAMTSL1*-Gens führt, scheint aus genetischer und biologischer Sicht nicht mit dem Phänotyp des Patienten 1 assoziiert zu sein. Der 5q23.2-Bruchpunkt führt nicht zu einer direkten Unterbrechung eines Gens, dennoch wird ein Positionseffekt auf das 50 Kb proximal zum Bruchpunkt gelegene *SNCAIP*-Gen, dessen Genprodukt Synphilin-1 eine wichtige neurobiologische Funktion hat, vermutet.

Patient 2, der eine *de novo* vorliegende, balanciert erscheinende 8;18-Translokation aufweist, wurde durch eine motorische und sprachliche Entwicklungsverzögerung, Kleinwuchs und rezidivierende cerebrale Krampfanfälle auffällig. Während der 8q12.1-Bruchpunkt zur Disruption des *CA8*-Gens führt, in dem biallelische Mutationen zu einer autosomal-rezessiven Bewegungsstörung führen und *CA8* daher eher nicht mit dem Phänotyp des Patienten 2 assoziiert ist, kommt es in 18q23 möglicherweise zur Unterbrechung des *SALL3*-Gens. Das für die Embryonalentwicklung benötigte *SALL3*-Protein, ein Transkriptionsfaktor, scheint ein attraktives Kandidatengen für den Phänotyp des Patienten 2 zu sein.

Patient 3 zeigt eine psychomotorische und geistige Entwicklungsverzögerung, einen Ventrikelseptumdefekt und faziale Dismorphien. Durch eine zytogenetische Routineuntersuchung wurde bei ihm eine *de novo* 11;17-Translokation aufgedeckt. Der Bruchpunkt in 11q13.3 führt zur Unterbrechung des Gens *SHANK2*, dessen Genprodukt als Gerüstprotein in der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen eine wichtige Rolle spielt. Da heterozygote *SHANK2*-Mutationen kürzlich mit mentaler Retardierung und/oder Autismus assoziiert

wurden, ist die *SHANK2*-Disruption mit großer Wahrscheinlichkeit für das Krankheitsbild des Patienten 3 verantwortlich.

Patient 4 ist Träger einer von seiner gesunden Mutter vererbten 1;5-Translokation. Er zeigt eine Entwicklungsverzögerung und autistische Züge. Für Gene im Bereich des 1q41-Bruchpunktes konnte keine Korrelation mit dem klinischen Bild des Patienten hergestellt werden. In 5q31.1 kommt es zur Unterbrechung des Gens *CATSPER3*, das für einen Calciumkanal kodiert und im Gehirn exprimiert wird. Denkbar wäre aber auch ein Positionseffekt auf die für einen neurologischen Phänotyp interessanten Kandidatengene *CDKL3* und *NEUROG1*, die bis zu 0,6 Mb vom Bruchpunkt lokalisiert sind.

Patient 5 zeigt eine ausgeprägte Gynäkomastie, einen Bluthochdruck und Übergewicht. Die zytogenetische Untersuchung ergab eine *de novo* 5;13-Translokation. Obwohl die Bruchpunkte in 5q21.1 und 13q14.12 erfolgreich eingegrenzt wurden, konnte kein Gen in einem der Bruchregionen mit dem Phänotyp des Patienten 5 in Zusammenhang gebracht werden.

Die Patientin 6 mit einer *de novo* 3;5;6-Translokation weist im Wesentlichen skelettale Veränderungen auf, wie Dolichomelie, Arachnodaktylie, Kyphoskoliose und eine progressive Destruktion der Hüften. Im 5p14.3-Bruchpunkt wird kein Gen direkt unterbrochen, wohingegen in 6q23.2 das *EYA4*-Gen in seiner Integrität gestört ist. Da dominant-negativ wirkende *EYA4*-Mutationen zu sensorineuralem Hörverlust und dilatativer Kardiomyopathie führen, ist die Unterbrechung von *EYA4* und der daraus resultierende Funktionsverlust vermutlich eher nicht mit dem Krankheitsphänotyp der Patientin 6 assoziiert. In 3q26.31 kommt es zur Disruption von *FNDC3B*. Die Beteiligung des vom *Fndc3b*-Gens kodierten Fad104-Proteins an der Osteogenese lässt einen Zusammenhang zwischen der Unterbrechung von *FNDC3B* und dem Krankheitsbild der Patientin 6 vermuten. Aber auch das etwa 50 Kb distal von *FNDC3B* gelegene *GHSR*-Gen, in dem heterozygote Mutationen zu Kleinwuchs führen, könnte als Kandidatengen für den Phänotyp der Patientin 6 in Frage kommen.

Patientin 7 trägt eine *de novo* parazentrische 20q-Inversion und zeigt als klinische Merkmale mentale Retardierung, sprachliche und psychomotorische Entwicklungsverzögerung, unsicheres Gangbild sowie Symptome, die beim Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom vorkommen. Der 20q11.23 Bruchpunkt führt zur Unterbrechung von *SAMHD1*, in dem biallelische Mutationen zum Aicardi-Goutières-Syndrom führen, weswegen der heterozygote Funktionsverlust von *SAMHD1* wahrscheinlich nicht mit dem Phänotyp der Patientin 7 assoziiert ist. In 20q13.33 wird kein Gen unterbrochen. Dennoch ist ein Positionseffekt auf die benachbarten Gene *CHRNA4* und/oder *KCNQ2* denkbar, da heterozygote Mutationen in diesen Genen mit bestimmten Epilepsieformen in Zusammenhang gebracht werden und bei etwa 15% der Patienten mit *KCNQ2*-Mutation ein schwerer Phänotyp mit verzögerter

psychomotorischer Entwicklung, mentaler Retardierung oder schwerer Enzephalopathie beobachtet wurde.

VII. Literaturverzeichnis

- Abdel-Salam GM, El-Kamah GY, Rice GI, El-Darouti M, Gornall H, Szykiewicz M, Aymard F, Zaki MS, Abdel-Aleem AK, Lebon P, Crow YJ (2010). Chilblains as a diagnostic sign of Aicardi-Goutières Syndrome. *Neuropediatrics*. 41: 18-23.
- Abe Y, Oka A, Mizuguchi M, Igarashi T, Ishikawa S, Aburatani H, Yokoyama S, Asahara H, Nagao K, Yamada M, Miyashita T (2009). EYA4, deleted in a case with middle interhemispheric variant of holoprosencephaly, interacts with SIX3 both physically and functionally. *Hum Mutat*. 30:E946-E955.
- Ackerman KM, Nakkula R, Zirger JM, Beattie CE, Boyd RT (2009). Cloning and spatiotemporal expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 6 and alpha 4 subunit RNAs. *Dev Dyn*. 238:980-992.
- Aicardi J, Crow YJ, Stephenson JBP (2010). Aicardi-Goutières Syndrome. *Gene Reviews*.
- Aligianis IA, Morgan NV, Mione M, Johnson CA, Rosser E, Hennekam RC, Adams G, Trembath RC, Pilz DT, Stoodley N, Moore AT, Wilson S, Maher ER (2006). Mutation in Rab3 GTPase-activating protein (RAB3GAP) noncatalytic subunit in a kindred with Martsolf syndrome. *Am J Hum Genet*. 78:702-707.
- Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B, Coghill D (2010). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 19:237-257.
- Baulac S, Baulac M (2010). Advances on the genetics of mendelian idiopathic epilepsies. *Clin Lab Med*. 30:911-929.
- Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Theisen A, Kashork CD, Shaffer LG (2005). Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: Is less more? *Am J Med Genet A*. 134:259-267.
- Béna F, Bottani A, Marcelli F, Sizonenko LD, Conrad B, Dahoun S (2007). A de novo 1.1-1.6 Mb subtelomeric deletion of chromosome 20q13.33 in a patient with learning difficulties but without obvious dysmorphic features. *Am J Med Genet A*. 143A:1894-1899.
- Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan DJ, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT, McBride D, Golzio C, Fisher M, Perry P, Abadie V, Ayuso C, Holder-Espinasse M, Kilpatrick N, Lees MM, Picard A, Temple IK, Thomas P, et al. (2009). Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nat Genet*. 41:359-364.
- Béri-Deixheimer M, Gregoire MJ, Toutain A, Brochet K, Briault S, Schaff JL, Leheup B, Jonveaux P (2007). Genotype-phenotype correlations to aid in the prognosis of individuals with uncommon 20q13.33 subtelomere deletions: a collaborative study on behalf of the 'association des Cytogénéticiens de langue Française'. *Eur J Hum Genet*. 15:446-452.
- Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, Endris V, Roberts W, Szatmari P, Pinto D, Bonin M, Riess A, Engels H, Sprengel R, Scherer SW, Rappold GA (2010). Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat Genet*. 42:489-491.
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*. 279:403-406.
- Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED (2002). ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem*. 81:903-910.
- Boeckers TM, Kreutz MR, Winter C, Zuschratter W, Smalla KH, Sanmarti-Vila L, Wex H, Langnaese K, Bockmann J, Garner CC, Gundelfinger ED (1999). Proline-rich synapse-associated protein-1/cortacin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density. *J Neurosci*. 19:6506-6518.

- Bonnefond L, Fender A, Rudinger-Thirion J, Giegé R, Florentz C, Sissler M (2005). Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry*. 44:4805-4816.
- Borg I, Squire M, Menzel C, Stout K, Morgan D, Willatt L, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Ropers HH, Tommerup N, Kalscheuer VM, Sargan DR (2002). A cryptic deletion of 2q35 including part of the PAX3 gene detected by breakpoint mapping in a child with autism and a de novo 2;8 translocation. *J Med Genet*. 39:391-399.
- Borgatti R, Zucca C, Cavallini A, Ferrario M, Panzeri C, Castaldo P, Soldovieri MV, Baschirotto C, Bresolin N, Dalla Bernardina B, Tagliatela M, Bassi MT (2004). A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation. *Neurology*. 63:57-65.
- Bulger M, Groudine M (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*. 144:327-339.
- Buselmaier W, Tariverdian G (2007). *Humangenetik*. Heidelberg: Springer.
- Callier P, Faivre L, Marle N, Thauvin-Robinet C, Sanlaville D, Gosset P, Prieur M, Labenne M, Huet F, Mugneret F (2006). Major feeding difficulties in the first reported case of interstitial 20q11.22-q12 microdeletion and molecular cytogenetic characterization. *Am J Med Genet A*. 140A:1859-1863.
- Camp E, Hope R, Kortschak RD, Cox TC, Lardelli M (2003). Expression of three spalt (sal) gene homologues in zebrafish embryos. *Dev Genes Evol*. 213:35-43.
- Chalmers IJ, Höfler H, Atkinson MJ (1999). Mapping of a cadherin gene cluster to a region of chromosome 5 subject to frequent allelic loss in carcinoma. *Genomics*. 57:160-163.
- Chang TM, Ke YY, Chen WL, Chen M, Yang AD (2010). Unilateral agenesis of the internal carotid artery in CHARGE syndrome. *Pediatr Neonatol*. 51:363-366.
- Crespi B, Stead P, Elliot M (2010). Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Comparative genomics of autism and schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:1736-1741.
- Crow YJ, Hayward BE, Parmar R, Robins P, Leitch A, Ali M, Black DN, van Bokhoven H, Brunner HG, Hamel BC, Corry PC, Cowan FM, Frints SG, Klepper J, Livingston JH, Lynch SA, Massey RF, Meritet JF, Michaud JL, Ponsot G, Voit T, Lebon P, Bonthron DT, et al. (2006). Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat Genet*. 38:917-920.
- De Anda FC, Meletis K, Ge X, Rei D, Tsai LH (2010). Centrosome Motility is Essential for Initial Axon Formation in the Neocortex. *J Neurosci*. 30:10391-10406.
- De Celis JF, Barrio R (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int J Dev Biol*. 53:1385-1398.
- De Grouchy J, Royer P, Salmon C, Lamy M (1964). Partial deletion of the long arms of the chromosome 18. *Pathol Biol*. 12:579-582.
- De Ravel TJ, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR (2007). What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *Eur J Pediatr*. 166:637-643.
- Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS (2004). KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci*. 24:1236-1244.
- Dubos A, Pannetier S, Hanauer A (2008). Inactivation of the CDKL3 gene at 5q31.1 by a balanced t(X;5) translocation associated with nonspecific mild mental retardation. *Am J Med Genet A*. 146A:1267-1279.
- Emison ES, McCallion AS, Kashuk CS, Bush RT, Grice E, Lin S, Portnoy ME, Cutler DJ, Green ED, Chakravarti A (2005). A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature*. 434:857-863.
- Engelender S, Wanner T, Kleiderlein JJ, Wakabayashi K, Tsuji S, Takahashi H, Ashworth R, Margolis RL, Ross CA (2000). Organization of the human synphilin-1 gene, a candidate for Parkinson's disease. *Mamm Genome*. 11:763-766.

- Fanou AH, Chen X, Wang X, Amdur RL, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS (2007). Association between the 5q31.1 gene neurogenin1 and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 144B:207-214.
- Fantes J, Redeker B, Breen M, Boyle S, Brown J, Fletcher J, Jones S, Bickmore W, Fukushima Y, Mannens M, Danes S, Heyningen V van, Hanson I (1995). Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. *Hum Mol Genet.* 4:415-422.
- Faraone SV, Mick E (2010). Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am.* 33:159-180.
- Feenstra I, Vissers L, Orsel M, van Kessel AD, Brunner HG, Veltman JA, van Ravenswaaij-Arts CMA (2007). Genotype-phenotype mapping of chromosome 18q deletions by high resolution array CGH: An update of the phenotypic map. *Am J Med Genet A.* 143A:1858-1867.
- Filges I, Röthlisberger B, Boesch N, Weber P, Wenzel F, Huber AR, Heinimann K, Miny P (2010). Interstitial deletion 1q42 in a patient with agenesis of corpus callosum: Phenotype-genotype comparison to the 1q41q42 microdeletion suggests a contiguous 1q4 syndrome. *Am J Med Genet A.* 152A:987-993.
- Garcia-Miñaur S, Ramsay J, Grace E, Minns RA, Myles LM, FitzPatrick DR (2005). Interstitial deletion of the long arm of chromosome 5 in a boy with multiple congenital anomalies and mental retardation: Molecular characterization of the deleted region to 5q22.3q23.3. *Am J Med Genet A.* 132:402-410.
- Geiger BH, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2002). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:793-805.
- Giacalone JP, Francke U (1992). Common sequence motifs at the rearrangement sites of a constitutional X/autosome translocation and associated deletion. *Am J Hum Genet.* 51:226.
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP (2005). The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocation in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet.* 42:8-16.
- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, et al. (1999). *Modern Genetic Analysis.* New York: W.H. Freeman.
- Guerrier S, Polleux F (2007). The ups and downs of neural progenitors: Cep120 and TACCs control interkinetic nuclear migration. *Neuron.* 56:1-3.
- Guo JH, Huang Y, Studholme DJ, Wu CQ, Zhao Z (2005). Transcriptomic analyses support the similarity of gene expression between brain and testis in human as well as mouse. *Cytogenet Genome Res.* 111:107-109.
- Gurnett CA, Alaei F, Kruse LM, Desruisseau DM, Hecht JT, Wise CA, Bowcock AM, Dobbs MB (2008). Asymmetric lower-limb malformations in individuals with homeobox PITX1 gene mutation. *Am J Hum Genet.* 83:616-622.
- Harréus UA, Issing WJ (2002). Chromosome 5q-syndrome-ENT pathologies. *Laryngorhinootologie.* 81:565-567.
- Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N (2011). A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet A.* 155:409-414.
- Hirohata S, Wang LW, Miyagi M, Yan L, Seldin MF, Keene DR, Crabb JW, Apte SS (2002). Punctin, a Novel ADAMTS-like Molecule, ADAMTSL-1, in Extracellular Matrix. *J Biol Chem.* 372:12182-12189.
- Hirota J, Ando H, Hamada K, Mikoshiba K (2003). Carbonic anhydrase-related protein is a novel binding protein for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *Biochem J.* 372:435-441.
- Ho HC, Suarez SS (2003). Characterization of the intracellular calcium store at the base of flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod.* 68:1590-1596.

- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hemelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, et al. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 273:974-977.
- Hur EM, Park YS, Huh YH, Yoo SH, Woo KC, Choi BH, Kim KT (2005). Junctional membrane inositol 1,4,5-triphosphate receptor complex coordinates sensitization of the silent EGF-induced Ca²⁺ signaling. *J Cell Biol*. 169:657-667.
- Inoue H, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K (2011). Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 96:E373-E378.
- Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet*. 6:84-89.
- Iqbal MA, Al-Owain M (2007). Interstitial del(20)(q11.2q12) - clinical and molecular cytogenetic characterization. *Am J Med Genet A*. 143A:1880-1884.
- Iwaya T, Maesawa C, Ogasawara S, Tamura G (1998). Tylosis esophageal cancer locus on chromosome 17q25.1 is commonly deleted in sporadic human esophageal cancer. *Gastroenterology*. 114: 1206-1210.
- Jacobs PA, Hunt PA, Mayer M, Bart RD (1981). Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am J Hum Genet*. 33:513-518.
- Johnson EI, Marinescu RC, Punnett HH, Tenenholz B, Overhauser J (2000). 5p14 deletion associated with microcephaly and seizures. *J Med Genet*. 37:125-127.
- Kadotani T, Kanata S, Kubo S, Kodama H, Watanabe Y (1984). A case with the interstitial deletion of the long arm of no. 5 chromosome. *Proc Japan Acad* 60. 29:406.
- Kaiser E, Hu B, Becher S, Eberhard D, Schray B, Baack M, Hameister H, Knippers R (1994). The human EPRS locus (formerly the QARS locus): a gene encoding a class I and a class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Genomics*. 19:280-290.
- Kantarci S, Casavant D, Prada C, Russell M, Byrne J, Haug LW, Jennings R, Manning S, Blaise F, Boyd TK, Fryns JP, Holmes LB, Donahoe PK, Lee C, Kimonis V, Pober BR (2006). Findings from aCGH in patients with congenital diaphragmatic hernia (CDH): a possible locus for Fryns syndrome. *Am J Med Genet A*. 140:17-23.
- Kim CW, Tak HM, Kim GT, Mun YJ, Tak B, Kim HJ, Roh GS, Han J, Kang D (2010). H₂O₂-Induced Up-Regulation of CatSper3 in Mouse Brain. *Mol Reprod Dev*. 77:650.
- Kishimoto K, Kato A, Osada S, Nishizuka M, Imagawa M (2010). Fad104, a positive regulator of adipogenesis, negatively regulates osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 397:187-191.
- Kleinjan DA, van Heyningen V (2005). Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet*. 76:8-32.
- Kleinjan DJ, Heyningen van V (1998). Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet*. 7:1611-1618.
- Kobayashi T, Narahara K, Yokoyama Y, Ueyama S, Mohri O, Fujii T, Fujimoto M, Ohtsuki S, Tsuji K, Seino Y (1991). Gardner syndrome in a boy with interstitial deletion of the long arm of chromosome 5. *Am J Med Genet*. 41:460-463.
- Kohlhase J, Chitayat D, Kotzot D, Ceylaner S, Froster UG, Fuchs S, Montgomery T, Rösler B (2005). SALL4 mutations in Okhiro syndrome (Duane-radial ray syndrome), acro-renal-ocular syndrome, and related disorders. *Hum Mutat*. 26:176-183.
- Kohlhase J, Heinrich M, Schubert L, Liebers M, Kispert A, Laccone F, Turnpenny P, Winter RM, Reardon W (2002). Okhiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet*. 11:2979-2987.

- Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H, Froster U, Engel W (1998). Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet.* 18:81-83.
- Krüger, R (2004). The role of synphilin-1 in synaptic function and protein degradation. *Cell Tissue Res.* 318:195-199.
- Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, Nothwang HG, Orth U, Boavida MG, David D, Chelly J, Fryns JP, Moraine C, Ropers HH, Hamel BC, van Bokhoven H, Gal A (2000). Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet.* 26:247-250.
- Lanctôt C, Lamolet B, Drouin J (1997). The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development.* 124:2807-2817.
- Larizza D, Maraschio P, Maghnie M, Sampaolo P (1993). Hypogonadism in a patient with balanced X/18 translocation and pituitary hormone deficiency. *Eur J Pediatr.* 152:424-427.
- Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, et al. (1963). 3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 257:3098-3102.
- Li HG, Ding XF, Liao AH, Kong XB, Xiong CL (2007). Expression of CatSper family transcripts in the mouse testis during post-natal development and human ejaculated spermatozoa: relationship to sperm motility. *Mol Hum Reprod.* 13:299-306.
- Lindgren V, Bryke CR, Ozcelik T, Yang-Feng TL, Francke U (1992). Phenotypic, cytogenetic, and molecular studies of three patients with constitutional deletions of chromosome 5 in the region of the gene for familial adenomatous polyposis. *Am J Hum Genet.* 50:88-97.
- Liu Z, Xu D, Zhao Y, Zheng J (2010). Non-syndromic mild mental retardation candidate gene CDKL3 regulates neuronal morphogenesis. *Neurobiol Dis.* 39:242-251.
- Lory P, Mezghrani A (2010). Calcium channelopathies in inherited neurological disorders: relevance to drug screening for acquired channel disorders. *IDrugs.* 13:467-471.
- Lucito R, Healy J, Alexander J, Reiner A, Esposito D, Chi M, Rodgers L, Brady A, Sebat J, Troge J, West JA, Rostan S, Nguyen KC, Powers S, Ye KQ, Olshen A, Venkatraman E, Norton L, Wigler M (2003). Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res.* 13:2291-2305.
- Ma Q, Fode C, Guillemot F, Anderson DJ (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev.* 13:1717-1728.
- Ma Q, Kintner C, Anderson DJ (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell.* 87:43-52.
- Marini C, Guerrini R (2007). The role of the nicotinic acetylcholine receptors in sleep-related epilepsy. *Biochem Pharmacol.* 74:1308-1314.
- Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, Li L, Eberhardt O, Gerhardt E, Cookson MR, Hernandez D, Farrer MJ, Kachergus J, Engelender S, Ross CA, Berger K, Schöls L, Schulz JB, Riess O, Krüger R (2003). Identification and functional characterization of a novel R624C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 12:1223-1231.
- Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, Nagata E, Tanaka K, Takano H, Minowa O, Kuno J, Sakakibara S, Yamada M, Yoneshima H, Miyawaki A, Fukuuchi Y, Furuichi T, Okano H, Mikoshiba K, Noda T (1996). Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature.* 379:168-171.
- McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C, Daly MJ, Altshuler DM (2006). Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet.* 38:86-92.
- Miertus J, Borozdin W, Frecer V, Tonini G, Bertok S, Amoroso A, Miertus S, Kohlhase J (2006). A SALL4 zinc finger missense mutation predicted to result in increased DNA binding affinity is associated with cranial midline defects and mild features of Okhiro syndrome. *Hum Genet.* 119:154-161.
- Muller, HJ (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet.* 22:299-335.

- Murray IVJ, Medford MA, Guan HP, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VMY (2003). Synphilin in normal human brains and in synucleinopathies: studies with new antibodies. *Acta Neuropathol.* 105:177-184.
- Nishizuka M, Kishimoto K, Kato A, Ikawa M, Okabe M, Sato R, Niida H, Nakanishi M, Osada S, Imagawa M (2009). Disruption of the novel gene *fad104* causes rapid postnatal death and attenuation of cell proliferation, adhesion, spreading and migration. *Exp Cell Res.* 315:809-819.
- Ohto H, Kamada S, Tago K, Tominaga SI, Ozaki H, Sato S, Kawakami K (1999). Cooperation of *six* and *eya* in activation of their target genes through nuclear translocation of *Eya*. *Mol Cell Biol.* 19:6815-6824.
- Osoegawa K, Mammoser AG, Wu C (2001). A Bacterial Artificial Chromosome Library for Sequencing Complete Human Genome. *Genome Res.* 11:483-496.
- Overhauser J, Golbus MS, Schonberg SA, Wasmuth JJ (1986). Molecular analysis of an unbalanced deletion of the short arm of chromosome 5 that produces no phenotype. *Am J Hum Genet.* 39:1-10.
- Ozon S, El Mestikawy S, Sobel A (1999). Differential, regional, and cellular expression of the stathmin family transcripts in the adult rat brain. *J Neurosci Res.* 56:553-564.
- Page DC, Fisher EM, McGillivray B, Brown LG (1990). Additional deletion in sex-determining region of human Y chromosome resolves paradox of X;(Y;22) female. *Nature.* 346:279-281.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC (2006). A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci.* 26:2599-2613.
- Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, Nivot S, Vie-Luton MP, Grouselle D, Kerdanet M, Kadiri A, Epelbaum J, Bouc Y, Amselem S (2006). Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest.* 116:760-768.
- Pantel J, Legendre M, Nivot S, Vie-Luton MP, le Bouc Y, Epelbaum J, Amselem S (2009). Recessive isolated growth hormone deficiency and mutations in the ghrelin receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:4334-4341.
- Parrish M, Ott T, Lance-Jones C, Schuetz G, Schwaeger-Nickolenko A, Monaghan AP (2004). Loss of the *SALL3* Gene leads to Palate Deficiency, Abnormalities in Cranial Nerves, and Perinatal Lethality. *Mol Cell Biol.* 24:7101-7112.
- Pennacchio LA, Ahituv N, Moses AM, Prabhakar S, Nobrega MA, Shoukry MA, Minovitsky S, Dubchak I, Holt A, Lewis KD, Plajzer-Frick I, Akiyama J, De Val S, Afzal V, Black BL, Couronne O, Eisen MB, Visel A, Rubin EM (2006). In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature.* 444:499-502.
- Peters HC, Hu H, Pongs O, Storm JF, Isbrandt D (2005). Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat Neurosci.* 8:51-60.
- Philippi A, Tores F, Carayol J, Rousseau F, Letexier M, Roschmann E, Lindenbaum P, Benajjou A, Fontaine K, Vazart C, Gesnouin P, Brooks P, Hager J (2007). Association of autism with polymorphisms in the paired-like homeodomain transcription factor 1 (*PITX1*) on chromosome 5q31: a candidate gene analysis. *BMC Med Genet.* 8:1-8.
- Poulain FE, Chauvin S, Wehrlé R, Desclaux M, Mallet J, Vodjdani G, Dusart I, and Sobel A (2008). *SCLIP* is crucial for the formation and development of the Purkinje Cell dendritic arbor. *J Neurosci.* 28:7387-7398.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE (2006). All four *CatSper* ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:1219-1223.
- Rebay I, Silver SJ, Tootle TL (2005). New vision from Eyes absent: transcription factors as enzymes. *Trends Genet.* 21:163-171.

- Ribeiro CS, Carneiro K, Ross CA, Menezes JR, Engelender S (2002). Synphilin-1 is developmentally localized to synaptic terminals, and its association with synaptic vesicles is modulated by alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 277:23927-23933.
- Rice GI, Bond J, Asipu A, Brunette RL, Manfield IW, Carr IM, Fuller JC, Jackson RM, Lamb T, Briggs TA, Ali M, Gornall H, Couthard LR, Aeby A, Attard-Montalto SP, Bertini E, Bodemer C, Brockmann K, Brueton LA, Corry PC, Desguerre I, Fazzi E, et al. (2009). Mutations involved in Aicardi-Goutières Syndrome implicate SAMHD1 as a regulator of the innate immune response. *Nat Genet.* 41:829-832.
- Rieger S, Volkmann K, Köster RW (2008). Polysialyltransferase expression is linked to neuronal migration in the developing and adult zebrafish. *Dev Dyn.* 1:276-285.
- Rivera H, Garcia-Esquivel L, Moller M, Cantú JM (1987). Constitutional del(5)(q23.3q31.1). *Ann Genet.* 30:91-93.
- Rivera H, Simi P, Rossi S, Pardelli L, Di Paolo MC (1990). A constitutional 5q23 deletion. *J Med Genet.* 27:267-268.
- Rizzolio F, Bione S, Sala C, Tribioli C, Ciccone R, Zuffardi O, di Iorgi N, Maghnie M, Toniolo D (2008). Highly Conserved Non-Coding Sequences and the 18q Critical Region for Short Stature: A Common Mechanism of Disease? *PLoS One.* 3:e1460.
- Sanlaville D, Lapierre JM, Turleau C, Coquin A, Borck G, Colleaux L, Vekemans M, Romana SP (2005). Molecular karyotyping in human constitutional cytogenetics. *Eur J Med Genet.* 48:214-231.
- Sastry SK, BurrIDGE K (2000). Focal adhesion: a nexus for intracellular signalling and cytoskeletal dynamics. *Exp Cell Res.* 261:25-36.
- Scheffer IE, Bhatia KP, Lopes-Cendes I, Fish DR, Marsden CD, Andermann F, Andermann E, Desbiens R, Cendes F, Manson JI, et al. (1994). Autosomal dominant frontal epilepsy misdiagnosed as sleep disorder. *Lancet.* 343:515-7.
- Schmitt B, Wohlrab G, Sander T, Steinlein OK, Hajnal BL (2005). Neonatal seizures with tonic clonic sequences and poor developmental outcome. *Epilepsy Res.* 65:161-168.
- Schönberger J, Wang L, Shin JT, Kim SD, Depreux FF, Zhu H, Zon L, Pizard A, Kim JB, Macrae CA, Mungall AJ, Seidman JG, Seidman CE (2005). Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet.* 37:418-422.
- Schrider DR, Hahn MW (2010). Gene copy-number polymorphism in nature. *Proc Biol Sci.* 277:3213-3221.
- Shaffer LG, Bejjani BA (2006). Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenet Genome Res.* 115:303-309.
- Shaffer LG, Theisen A, Bejjani BA, Ballif BC, Aylsworth AS, Lim C, McDonald M, Ellison JW, Kostiner D, Saitta S, Shaikh T (2007). The discovery of microdeletion syndromes in the post-genomic era: review of the methodology and characterization of a new 1q41q42 microdeletion syndrome. *Genet Med.* 9:607-616.
- Sheng M, Kim E (2000). The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci.* 113:1851-1856.
- Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Majnemer A, Noetzel M, Sheth RD (2003). Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 60:367-380.
- Shida D, Takabe K, Kapitonov D, Milstien S, Spiegel S (2008). Targeting SphK1 as a New Strategy against Cancer. *Curr Drug Targets.* 9:662-673.
- Sjöblom B, Elleby B, Wallgren K, Jonsson BH, Lindskog S (1996). Two point mutations convert a catalytically inactive carbonic anhydrase-related protein (CARP) to an active enzyme. *FEBS Lett.* 398:322-325.
- Slavotinek AM, Moshrefi A, Davis R, Leeth E, Schaeffer GB, Burchard GE, Shaw GM, James B, Ptacek L, Pennacchio LA (2006). Array comparative genomic hybridization in patients with congenital diaphragmatic hernia: mapping of four CDH-critical regions and sequencing of candidate genes at 15q26.1-15q26.2. *Eur J Hum Genet.* 14:999-1008.

- Spiegelberg BD, Xiong JP, Smith JJ, Gu RF, York JD (1999). Cloning and characterization of a mammalian lithium-sensitive bisphosphate 3'-nucleotidase inhibited by inositol 1,4-bisphosphate. *J Biol Chem.* 280:13619-13628.
- Steinlein O, Smigrodzki R, Lindstrom J, Anand R, Köhler M, Tocharoentanaphol C, Vogel F (1994). Refinement of the localization of the gene for neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit (CHRNA4) to human chromosome 20q13.2-q13.3. *Genomics.* 22:493-495.
- Steinlein OK, Conrad C, Weidner B (2007). Benign familial neonatal convulsions: always benign? *Epilepsy Res.* 73:245-249.
- Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF (1995). A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet.* 11:201-203.
- Sweetman D, Münsterberg A (2006). The vertebrate spalt genes in development and disease. *Dev Biol.* 293:285-293.
- Takai Y, Sasaki T, Shirataki H, Nakanishi H (1996). Rab3A small GTP-binding protein in Ca(2+)-dependent exocytosis. *Genes Cells.* 1:615-632.
- Taniuchi K, Nishimori I, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Onishi S (2002). cDNA cloning and developmental expression of murine carbonic anhydrase-related proteins VIII, X, and XI. *Mol Brain Res.* 109:207-215.
- Tominaga K, Kondo C, Johmura Y, Nishizuka M, Imagawa M (2004). The novel gene fad104, containing a fibronectin type III domain, has a significant role in adipogenesis. *FEBS Lett.* 577:49-54.
- Tommerup, N (1993). Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. *J Med Genet.* 30:713-27.
- Toro R, Konyukh M, Delorme R, Leblond C, Chaste P, Fauchereau F, Coleman M, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T (2010). Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends Genet.* 26:363-372.
- Traylor RN, Bruno DL, Burgess T, Wildin R, Spencer A, Ganesamoorthy D, Amor DJ, Hunter M, Caplan M, Rosenfeld JA, Theisen A, Torchia BS, Shaffer LG, Ballif BC, Slater HR (2010). A genotype-first approach for the molecular and clinical characterization of uncommon de novo microdeletion of 20q13.33. *PLoS One.* 5:e12462.
- Trembath DG, Semina EV, Jones DH, Patil SR, Qian Q, Amendt BA, Russo AF, Murray JC (2004). Analysis of two translocation breakpoints and identification of a negative regulatory element in patients with Rieger's syndrome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 70:82-91.
- Türkmen S, Guo G, Garshasbi M, Hoffmann, Amjad AJ, Mischung C, Kuss A, Humphrey N, Mundlos S, Robinson PN (2009). CA8 Mutations Cause a Novel Syndrome Characterized by Ataxia and Mild Mental Retardation with Predisposition to Quadrupedal Gait. *PLoS Genet.* 5:e1000487.
- Tzschach A, Krause-Plonka I, Menzel C, Kalscheuer V, Toennies H, Scherthan H, Knoblauch A, Radke M, Ropers HH, Hoeltzenbein M (2006). Molecular cytogenetic analysis of a de novo interstitial deletion of 5q23.3q31.2 and its phenotypic consequences. *Am J Med Genet A.* 140:496-502.
- van Bakel I, Holt S, Craig I, Boyd Y (1995). Sequence analysis of the breakpoint regions of an X;5 translocation in a female with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 57:329-336.
- Vanderluit JL, Ferguson KL, Nikolettou V, Parker M, Ruzhynsky V, Alexson T, McNamara SM, Park DS, Rudnicki M, Slack RS (2004). p107 regulates neural precursor cells in the mammalian brain. *J Cell Biol.* 166:853-863.
- Vanderluit JL, Wylie CA, McClellan KA, Ghanem N, Fortin A, Callaghan S, MacLaurin JG, Park DS, Slack RS (2007). The retinoblastoma family member p107 regulates the rate of progenitor commitment to a neuronal fate. *J Cell Biol.* 178:129-139.
- Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EH, de Jong PJ, Hamel BC, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA, van Kessel AG

- (2004). Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet.* 36:955-957.
- Volpi EV, Bridger JM (2008). FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques.* 45:385-390.
- Wang W, Hendriks DF, Scharpe SS (1994). Carboxypeptidase U, a plasma carboxypeptidase with high affinity for plasminogen. *J Biol Chem.* 269:15937-15944.
- Warburton, D (1991). De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 49:995-1013.
- Wayne S, Robertson NG, DeClau F, Chen N, Verhoeven K, Prasad S, Tranebjärg L, Morton CC, Ryan AF, Van Camp G, Smith RJ (2001). Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet.* 10:195-200.
- Wefes I, Mastrandrea JD, Haldeman M, Koury ST, Tamburlin J, Pickart CM, Finley D (1995). Induction of ubiquitin-conjugating enzymes during terminal erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci.* 92:4982-4986.
- Wippold FJ 2nd, Perry A (2007). Neuropathology for the neuroradiologist: Fluorescence in situ hybridization. *AJNR Am J Neuroradiol.* 28:406-410.
- Yee KW, Moore SJ, Midmer M, Zanke BW, Tong F, Hedley D, Minden MD (2003). NKIAMRE, a novel conserved CDC2-related kinase with features of both mitogen-activated protein kinases and cyclin-dependent kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 308:784-792.
- Yokota T, Nagai H, Harada H, Mine N, Terada Y, Fujiwara H, Yabe A, Miyazaki K, Emi M (2001). Identification, tissue expression, and chromosomal position of a novel gene encoding human ubiquitin-conjugating enzyme E2-230k. *Gene.* 267:95-100.
- Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrié A, Billuart P, McDonnell N, Couvert P, Francis F, Chafey P, Fauchereau F, Friocourt G, des Portes V, Cardona A, Frints S, Meindl A, Brandau O, Ronce N, Moraine C, van Bokhoven H, Ropers HH, Sudbrak R, et al. (2000). A new gene involved in x-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet.* 24:167-170.

VIII. Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation. Insbesondere möchte ich mich für ihre konstruktive Kritik und ihre unermüdliche Unterstützung bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gal für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die Möglichkeit am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf promovieren zu können. Außerdem bedanke ich mich für die Ermöglichung der Teilnahme an der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e.V.

Frau Dr. Fanny Kortüm danke ich für die geduldige und engagierte Einarbeitung in die FISH-Technik, aber auch für die Hilfe und Unterstützung während der gesamten Zeit am Institut.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Siegrid Fuchs, Karin Ziegler und Anette Stryczek für die Bereitstellung und das Auftropfen von Chromosomenpräparaten bedanken, sowie dafür, dass sie jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatten.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Kutsche und bei den anderen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche und schnelle Aufnahme und für die ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein besonderer Dank geht auch an die Patienten und deren Familien für die Einwilligung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Von Herzen danke ich meinen Eltern für die liebevolle und finanzielle Unterstützung. Meinen Schwerstern Martina, Kristina und Regina danke ich dafür, dass sie für mich da waren und jederzeit und kurzfristig die Betreuung von Alexander übernehmen konnten. Aber auch bei meinen Schwiegereltern möchte ich mich für die wundervolle Betreuung von Alexander bedanken.

Der allergrößte Dank geht an meinen liebevollen Ehemann Bruno Chilian, von dem ich jederzeit fürsorgliche Unterstützung erhielt, der meine Launen, vor allem während der Schreibphase, geduldig ertragen und mich ständig motiviert hat. Ohne ihn an meiner Seite hätte ich es nicht geschafft.

Auch dir, Alex, möchte ich Danke sagen dafür, dass du ein Meister darin bist, mich jederzeit von meinen Problemen abzulenken und ein Lächeln auf mein Gesicht zu zaubern.

IX. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: