

Aus dem Institut für Humangenetik des
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. Andreas Gal

**Partielle Deletion von 4p- und 4q- Material in einem Fetus mit
Ringchromosom 4-Phänotyp und molekulare Kartierung der Bruchpunkte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Anna Kocks
aus Freiburg im Breisgau

Fulda 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

Der Universität Hamburg am: 25.02.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. A. Gal

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. A. Winterpacht

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Glatzel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	DNA und Mutation	3
1.1.1	Strukturelle Chromosomenanomalien	4
1.1.2	Identifizierung von Krankheitsgenen mit Hilfe von Deletionen	6
1.2	Mikrodeletionssyndrome	6
1.2.1	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	8
1.3	Deletionen von Teilen des Chromosoms 4	9
1.3.1	4q-Deletion	9
1.3.2	Das 4p-Deletions-syndrom	11
1.4	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Angaben zum Fetus	15
2.2	Herkunft der Klone für die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung	15
2.2.1	Auswahl der PAC- und BAC- Klone	16
2.2.2	Anzucht der Klone	17
2.3	Isolierung von BAC- und PAC-DNA	18
2.4	DNA-Standardmethoden	19
2.4.1	Restriktionsenzymatische Spaltung von genomischer DNA	19
2.4.2	Agarosegelelektrophorese	19
2.4.3	Fällung von DNA	20
2.5	Polymerase-Kettenreaktion	20
2.6	Nick-Translation	21
2.7	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	22
2.7.1	Herstellung und Kultivierung humaner Fibroblastenkulturen	22
2.7.2	Chromosomenpräparation	22
2.7.3	Vorbehandlung der Chromosomenpräparate	23
2.7.4	Hybridisierung	23
2.7.5	Detektion und Amplifikation der Signale	24
2.7.6	Färbung der Präparate	25
2.8	DNA-Sequenzierung	25
2.8.1	Primersequenzen	26
2.9	Computerprogramme und Datenbanken	26
2.10	Anhang	27
3	Ergebnisse	32
3.1	Klinische Daten	32
3.1.1	Pränataler Befund	32
3.1.2	Sektionsbefund	32
3.2	Neuropathologische Daten	33
3.3	Bruchpunktbestimmung	36
3.3.1	Karyotyp	36
3.3.2	Auswahl der PAC/BAC-Klone	37
3.3.3	Verifizierung der identifizierten PAC/BAC-Klone	39
3.3.4	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	44
4	Diskussion	51
4.1	Das 4q-Deletions-Syndrom	51
4.1.1	Kandidatengene	53
4.2	Das Wolf-Hirschhorn-Syndrom	55
4.2.1	Kandidatengene	56

4.2.2	Vergleich mit der Literatur	58
4.2.3	Ringchromosom 4 und WHS	61
4.2.4	Gen- und Pathomechanismen der neuromuskulären Auffälligkeiten	64
4.2.5	Mausmodel und WHS	69
5	Zusammenfassung	71
	Literaturverzeichnis	73
	Danksagung	77
	Erklärung	78

1 Einleitung

1.1 DNA und Mutation

Mutationen sind einerseits die Grundlage für die Entwicklung der Spezies, können sich andererseits aber auch pathologisch auswirken. Eine Mutation kann endogene oder exogene Ursachen haben. Zu den großräumigen Chromosomenanomalien gehören der Verlust oder Zugewinn von Chromosomen sowie Brüche von Chromosomen und deren Neuverknüpfung. Wenn eine solche chromosomale Anomalie in jeder Zelle des Individuums zu finden ist, wird sie als konstitutionelle Anomalie bezeichnet. Wenn diese Anomalie auftritt, muss sie schon sehr früh in der Entwicklung entstanden sein, möglicherweise als Ergebnis einer Veränderung in den Keimbahnen, einer anomalen Befruchtung oder eines ungewöhnlichen Ereignisses in der frühen Embryonalentwicklung [1]. Daneben gibt es somatische (erworbene) Anomalien, die nur in bestimmten somatischen Zellen oder Geweben beobachtet werden, was z.B. häufig bei der Tumorentstehung eine Rolle spielt. Chromosomale Anomalien, seien sie konstitutionell oder somatisch, lassen sich zwei weiteren Kategorien zuordnen, in numerische und strukturelle Anomalien. Darüber hinaus gibt es zahllose Mutationen, die nur auf DNA-Ebene sichtbar sind und häufig nur den Austausch oder den Verlust einzelner Basen umfassen (Genmutationen).

Numerische Chromosomenanomalien: Durch diese Mutationen wird die Anzahl der Chromosomen im Genom verändert. Dabei unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Arten: Polyploidie, Aneuploidie und Mixoploidie. Bei der Polyploidie gibt es zusätzliche Kopien sämtlicher Chromosomen; die häufigste Form davon ist die Triploidie ($3n$). Wenn nur bestimmte Chromosomen dazu gekommen oder verlorengegangen sind, bezeichnet man diesen Zustand als Aneuploidie. Ist z.B. ein drittes Chromosom neben den beiden Homologen eines Chromosomenpaares vorhanden, so spricht man von einer Trisomie, fehlt dagegen ein Homolog, entsteht eine Monosomie. Bei der Mixoploidie sind in einem Individuum zwei oder mehr genetisch unterschiedliche Zelllinien vorhanden. Die genetisch unterschiedlichen Zellpopulationen können aus derselben Zygote (Mosaik) oder, was seltener vorkommt, aus verschiedenen Zygoten (Chimäre) hervorgehen. Anomalien, die in konstitutioneller Form letal wären, können in einer Mosaikstruktur durchaus lebensfähig sein [1].

Strukturelle Chromosomenanomalien: Diese Mutationen verändern die Struktur einzelner Chromosomen. Brüche in den Chromatiden können zu größeren Rearrangements führen, die ganze Chromosomenteile betreffen. Hierzu gehören Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Ringchromosom und Translokationen. Strukturelle Chromosomenanomalien sind balanciert, wenn es nicht zu einem Zugewinn oder Verlust von chromosomalem Material kommt. Im anderen Fall sind sie unbalanciert. Balancierte Anomalien wirken sich häufig nicht auf den Phänotyp aus. Der Phänotyp wird beeinflusst, wenn der Chromosomenbruch ein wichtiges Gen zerstört, das Gen von einem Kontrollelement getrennt wird oder wenn das Gen durch den Bruch in einen ungeeigneten Chromatinbereich verlagert wird. Balancierte X-autosomale Translokationen führen aufgrund der X-Inaktivierung ebenfalls zu Problemen [1].

1.1.1 Strukturelle Chromosomenanomalien

Neuere molekularzytogenetische Verfahren, wie zum Beispiel die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, haben in den letzten Jahren dazu geführt, dass insbesondere strukturelle Chromosomenanomalien exakt beschrieben und entsprechende Bruchpunkte auf dem Chromosom kartiert werden können. Diese molekularen Methoden haben mittlerweile zur Identifizierung zahlreicher Krankheitsloci beitragen können. Strukturelle Chromosomenanomalien setzen voraus, dass Brüche in den Chromosomen stattgefunden haben. Wenn bei einem Chromosom ein Bruch entsteht, wird dieser in der Regel auch gleich repariert, indem beide Enden wieder vereint werden. Erfolgt aber diese Reparatur nicht oder zu spät, kann sich beispielsweise ein azentrisches Fragment bilden, das in den nächsten Mitosen nicht segregieren kann und verloren geht. Es entsteht so ein Chromosom mit einer Deletion. Sollten aber zwei Brüche in einem oder zwei Chromosomen auftreten, können bei der Reparatur zwei Enden zusammengefügt werden, die ursprünglich nicht zusammen gehörten. Es kommt dadurch zu verschiedenen strukturellen Chromosomenanomalien. Diese umfassen: interstitielle Deletion, parazentrische oder perizentrische Inversion, reziproke Translokation, zentrische Fusion oder Ringchromosom [1].

Bei der Bildung eines Ringchromosoms (Abbildung 1) kommt es während der Zellteilung zu zwei Brüchen in Chromatiden eines Chromosoms und anschließend zur Verknüpfung von zwei Bruchstellen, sodass ein Ring gebildet wird. Zerreißt dieser Ring während der Mitose, kann Chromosomenmaterial Verloren gehen

(Deletion). Ringchromosome sind selten und resultieren häufig aus einer *de novo*-Mutation [2]. Die Fallzahlen von Ringchromosomen bei Neugeborenen und in der Prenataldiagnostik variieren von 1: 27.225 bis 1: 62.279 [2]. Ringchromosome wurden in allen Chromosomenpaaren beobachtet. Beispiele sind das 18-R-Syndrom, das Ringchromosom-13-Syndrom und das Ringchromosom-15-Syndrom. Die Instabilität ist ein typisches Merkmal der Ringchromosome. Sie erweisen sich in der Mitose als stabil, meiotisch gehen sie meist verloren und werden deshalb selten vererbt [3]. Häufig besteht ein Mosaik.

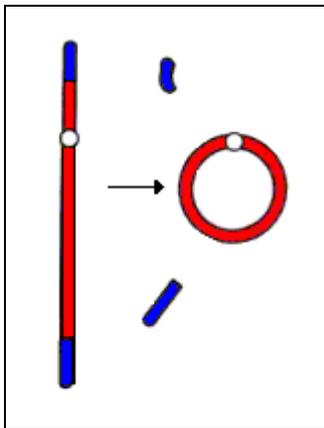


Abbildung 1: Schematische Darstellung von der Entstehung eines Ringchromosoms durch Brüche im p- und q-Arm.

Durch die Deletion kommt es zum Verlust chromosomalen Materials, das nun lediglich in einer Kopie im Genom vorkommt. Häufig ist eine Haploinsuffizienz für die deletierten Gene zubeobachten, was zu einem klinischen Phänotyp führt. Von Haploinsuffizienz spricht man, wenn für das Entstehen eines normalen Phänotyps eine größere Menge eines Genproduktes erforderlich ist, als eine einzige Kopie herstellen kann. Bei Haploinsuffizienz führt die Verringerung der Genfunktion um 50% zu einem anomalen Phänotyp [1]. Sind mehrere Gene deletiert, ist die Haploinsuffizienz der betroffenen Gene häufig gemeinsam für den Phänotyp verantwortlich und äußert sich in einem sehr spezifischen, komplexen Fehlbildungssyndrom.

1.1.2 Identifizierung von Krankheitsgenen mit Hilfe von Deletionen

Ein Kandidatengen ist ein Gen an der passenden chromosomalen Position, von dem anzunehmen ist, dass es sich um ein Krankheitsgen handelt. Kandidatengene müssen einzeln getestet werden, damit genau festgestellt werden kann, ob die Mutationen die gesuchte Krankheit tatsächlich verursachen. Um zu zeigen, dass ein Kandidatengen wahrscheinlich der Krankheitslocus ist, gibt es verschiedene Möglichkeiten [1]. Zu den Möglichkeiten gehören Mutationstests, die Wiederherstellung des gesunden Phänotyps *in vitro* oder die Herstellung eines Mausmodells für die Krankheit. Die Suche nach patientenspezifischen Mutationen (Mutationstest) im Kandidatengen ist die bei Weitem am häufigsten angewandte Methode, da sie sich allgemein anwenden und verhältnismäßig schnell durchführen lässt.

Mit Hilfe von chromosomalen Aberrationen, insbesondere Translokationen und Deletionen können neue Krankheitsgene identifiziert werden. Wenn ein Patient mit einem auffälligen Phänotyp Träger einer *de novo*-Deletion oder balanzierter Translokation ist, kann angenommen werden, dass dieser Phänotyp ursächlich mit dem Chromosomenumbau zusammenhängt und können somit einen ersten Hinweis auf eine grobe Lokalisation des Krankheitsgens geben. Hierbei werden durch eine Chromosomenanalyse zunächst die Bruchpunkte der Deletion grob lokalisiert. Für eine weitere Eingrenzung der Bruchpunkte werden PAC- und BAC-Klone in einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eingesetzt. Hierbei wird nach Klonen gesucht, die jeweils die Bruchpunkte überspannen beziehungsweise deletiert sind. Durch gezielte Datenbankrecherchen kann dann in der eingegrenzten Region nach Kandidatengenen gesucht werden, die für die Erkrankung in Frage kommen.

1.2 Mikrodeletionssyndrome

Einheitliche Symptomenkomplexe, die durch eine gemeinsame Ursache (zum Beispiel Genmutation oder Chromosomenaberration) entstanden sind, werden als Syndrom bezeichnet. Mikrodeletionen sind Deletionen, die zu klein sind, um sie im Mikroskop erkennen zu können (normalerweise unter 3 Mb). Berücksichtigt man, dass unser Genom circa 3000 Mb und etwa 30000 Gene enthält, kann eine Deletion von beispielsweise einer Megabase, die zu klein ist, um sie im Mikroskop

zu sehen, bereits ein Dutzend oder mehr Gene betreffen. Mithilfe von FISH- oder Array-CGH-Analysen konnten in den vergangenen Jahren immer mehr solcher submikroskopischer Chromosomenanomalien identifiziert werden [1]. Aus Sicht der molekularen Pathologie kann man diese Syndrome in drei Gruppen einteilen: Einzelgensyndrome, Genübergreifende Syndrome und Syndrome aufgrund segmentaler Aneuploidie. Alle drei Syndrome werden durch immer wieder auftretende *de novo*-Mikrodeletionen verursacht. Beim **Einzelgensyndrom** sind alle phänotypischen Auswirkungen auf die Deletion oder manchmal die Duplikation eines einzigen Gens zurückzuführen. Die **Genübergreifenden Syndrom** treten vor allem bei männlichen Personen mit einer Deletion im X-Chromosom auf. Je umfangreicher die Deletion ist, umso mehr Gene gehen verloren und umso mehr Symptome tragen zu dem Syndrom bei. Mikrodeletionen treten in einigen Bereichen des X-Chromosoms verhältnismäßig häufig auf (zum Beispiel in der Xp21-Region oder im proximalen Abschnitt der Xq-Region), sind jedoch in anderen Bereichen selten oder nicht bekannt (zum Beispiel in Xp22.1-22.2 oder Xq28) [1]. Bei den **Syndromen aufgrund abschnittsweiser Aneuploidie** handelt es sich um autosomale Mikrodeletionen, die selten wirkliche genübergreifende Syndrome verursachen. Der Phänotyp heterozygoter Menschen beruht normalerweise nur auf der Untergruppe der deletierten, dosisempfindlichen Gene. Immer wieder auftretende *de novo*-Deletionen verursachen mehrere klar umrissene Syndrome. Die für Deletionen anfälligen Bereiche werden hierbei von langen Wiederholungssequenzen flankiert, sodass fehlerhafte Rekombinationen möglich sind.

Je nach Größe der Deletion kann dies zu einem variablen Phänotyp mit komplexen, angeborenen Fehlbildungen führen. Bei großen Deletionen beobachtet man im Allgemeinen fast immer (neben zahlreichen anderen Merkmalen) eine mentale Retardierung. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass für die korrekte mentale Entwicklung eine komplexe Abfolge von unterschiedlichen Entwicklungsschritten [4] nötig ist, für die zahlreiche über das Genom verteilte Gene verantwortlich sind. Typische Syndrome mit segmentaler Aneuploidie sind zum Beispiel das DiGeorge Syndrom, Williams-Syndrom, Cri-du-chat Syndrom und das Wolf-Hirschhorn Syndrom. Diese Syndrome wurden beschrieben bevor die verursachende chromosomale Aberration entdeckt worden war. Die Pathogenese der meisten Syndrome ist bisher weitgehend unbekannt.

Welche Gene in der deletierten Region für welche Anteile des Phänotyps dieser Mikrodeletionssyndrome verantwortlich sind, ist schwierig zu ermitteln. Es gibt mehrere mögliche Vorgehensweisen. Erstens: Auffinden von Personen, die einen Teil des Syndroms als mendelnde Krankheit geerbt haben, die wiederum auf die Mutation eines einzigen Gens in der Kandidatenregion zurückzuführen ist. Zweitens: Deletion der entsprechenden Region bei der Maus und Analyse des Phänotyps. Drittens: Auffinden von Personen, bei denen die Deletionen kürzer sind als die sonstigen Mikrodeletionen und die nur einige Merkmale des Syndroms zeigen und Anlegen einer Phänotyp-Karte (Genotyp-Phänotyp-Korrelation) [1].

1.2.1 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Ein wesentliches Hilfsmittel bei der molekularen Aufklärung von Syndromen mit segmentaler Aneuploidie ist das Erstellen einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Sie erlaubt es zu erklären, warum eine bestimmte genetische Veränderung zu einem bestimmten klinischen Erscheinungsbild führt. In Bezug auf Deletionssyndrome versucht man bei der Genotyp-Phänotyp-Korrelation eine Wechselbeziehung zwischen den beiden Variablen Genotyp und Phänotyp festzustellen, ohne dass damit über die kausale Beziehung zwischen diesen beiden etwas gesagt werden kann. Man erhofft sich jedoch Hinweise auf die Funktion einer bestimmten chromosomalen Region zu erhalten, in dem man Größe und Lokalisation einer Deletion mit dem jeweiligen Phänotyp korreliert. So kann man Rückschlüsse auf die Lage und die Funktion der einzelnen Gene in einem deletierten Bereich ziehen und gelangt zu Hypothesen, die weiter getestet werden müssen. Einige Autoren, wie zum Beispiel Estabrooks et al. [5], erstellen hierbei zunächst den Begriff „Phenotypic Map“ (Phänotypkarte) und meinen damit die Zuordnung der klinischen Merkmale zu einer bestimmten Chromosomenregion. Sie schlagen vor, die klinischen Merkmale mit den Ergebnissen der molekulargenetischen Untersuchungsmethoden, das heißt der Gene in dem betroffenen Chromosomenbereich, zu korrelieren. Es gibt einige grundlegende Voraussetzungen für die Phänotypkartierung, die schon von Epstein beschrieben worden sind [6]. Eine wichtige Rolle spielt die genetische Penetranz. Verschiedene Faktoren wie Umwelteinflüsse oder genetische oder stochastische Effekte können eine reduzierte Penetranz zur Folge haben. Eine

reduzierte Penetranz kann zu einer geringen Ausprägung des Phänotypus und somit zu einer Fehlinterpretation der klinischen Daten führen [5].

Es ist wichtig, die Ausprägung des Phänotypus so präzise wie möglich zu charakterisieren. Die betroffenen Patienten müssen sorgfältig untersucht und die klinischen Merkmalen exakt beschrieben werden. Das äußere Erscheinungsbild sollte zusätzlich durch Photographien dokumentiert werden. Durch spezielle Funktionsuntersuchungen wie Echokardiographie, Sonographie, Audiometrie, Elektroenzephalographie kann der Phänotyp noch genauer charakterisiert werden. Auch bildgebende Verfahren zum Beispiel Röntgendiagnostik oder Computertomographie werden angewandt. Mit Hilfe von speziellen Funktionstests können bestimmte Symptome oder Störungen wie zum Beispiel die Legasthenie (Lese-Rechtschreib-Schwäche) entdeckt werden.

1.3 Deletionen von Teilen des Chromosoms 4

Zwei etwas häufiger vorkommende strukturelle Chromosomenaberrationen betreffen das Chromosom 4. Die Veränderungen, ausgelöst durch partielle Deletionen am langen Arm (q) bzw. am kurzen Arm (p) von Chromosom 4, werden übergreifend als das **4q-Deletions-Syndrom** [7] bzw. das **Wolf-Hirschhorn-Syndrom** [8], [9] beschrieben und gehen mit unterschiedlichen Fehlbildungen einher. Beide Syndrome können in einem einzelnen Individuum gemeinsam auftreten, zum Beispiel bei der Bildung eines Ringchromosoms 4, bei dem Deletionen an den jeweiligen Bruchstellen in 4p und 4q aufgetreten sind. Dies ist jedoch relativ selten der Fall. Patienten mit einem Ringchromosom 4 zeigen dementsprechend eine Kombination der typischen Merkmale beider Syndrome [10], [11], [12]. Im Folgenden sollen zunächst beide Syndrome separat beschrieben werden.

1.3.1 4q-Deletion

Das **4q-Deletions-Syndrom** wird durch Deletionen im terminalen Bereich des langen Arms von Chromosom 4 verursacht. Die Häufigkeit des 4q-Deletions-Syndroms ist gering und liegt bei circa 1/100.000. Der Bruchpunkt liegt in der Regel innerhalb der Regionen 4q31, 4q32 oder 4q33 [7], [13], [14]. Die Deletion kann sich von dort bis zum 4q-Telomerende (4qter) erstrecken und variiert in ihrer

Größe. Keeling et al. schlugen 4q33 als kritische Region für das 4q-Deletions-Syndrom vor [14]. Robertson et al. berichteten von einem Patienten mit einer sehr kleinen interstitiellen Deletion 46,XY, del(4)(q31.1q31.3), der die typischen Merkmale des 4q-Deletions-Syndroms aufweist [13]. Sie schlugen die Region 4q31 als kritische Region vor. In den meisten Fällen handelt es sich um eine Neumutation [15]. Die Pathomechanismen und damit die Gene, die zu den Fehlbildungen führen, sind weitgehend unbekannt.

Die **charakteristischen klinischen Merkmale** dieser Erkrankungen sind psychomotorische Retardierung, Kleinwuchs, Robin-Sequenz (Fehlbildungskomplex bestehend aus Mikrogenie (Unterentwicklung der Mandibula), Mikrognathie (Unterentwicklung der Maxilla), Glossoptose (Zurücksinken der Zunge mit Verlegung der Atemwege), Mikroglossie und Gaumenspalte), Gesichtsdysmorphien wie Hypertelorismus (vergrößerter Abstand der Augen und verbreiteter Nasenrücken), Epikanthus (angeborene sichelförmige Hautfalte am inneren Rand des oberen Augenlids), nach vorne gerichtete Nasenöffnungen, kleine dysplastische Ohren, angeborene Herzfehler, Fehlbildungen des Urogenitalsystems und Fehlbildungen der Extremitäten [7], [13], [14], [15]. Seltener werden auch Fehlbildungen des Gastrointestinaltrakts und der Nieren, sowie Lernschwierigkeiten und Entwicklungsverzögerungen beschrieben. Patienten mit großen Deletionen zeigen häufig stärkere Fehlbildungen und Gesichtsdysmorphien. Der Phänotyp variiert mit dem Ausmaß der Deletion.

Als **Fehlbildungen der Extremitäten** werden beschrieben: Deformation der Endphalangen, besonders der vierten und fünften Finger, postaxiale Hexadaktylie (zusätzlicher 6. Strahl, kleinfinger- oder kleinzehenseits), Klinodaktylie (Schiefstellung der Fingerglieder), milde kutane Syndaktylie (Verwachsung von Zehen- oder Fingeranlagen) zwischen den Strahlen 2 bis 5 und Gelenkkontrakturen [16], [17]. Kleine Deletionen im distal gelegenen Bereich 4q34-4q35 äußern sich in weniger charakteristischen Merkmalen und weniger schweren Retardierungen [14], [12]. Bei diesen Patienten werden häufig Fehlbildungen der distalen Extremitäten wie zum Beispiel Nageldeformitäten des 5. Fingers, Fehlbildung der Endphalangen des 5. Fingers und Klinodaktylien beschrieben, so dass bei 4q33 ein Kandidatengen für Gliedmaßenanomalitäten vermutet werden kann [11], [16], [17].

1.3.2 Das 4p-Deletions-syndrom

Die Erstbeschreibung von komplexen Fehlbildungen mit Deletionen von Teilen des kurzen Arms eines Chromosoms 4 erfolgte 1965 durch die Humangenetiker **Ulrich Wolf** [8] und **Kurt Hirschhorn** [9]. Das Syndrom wurde demnach als Wolf-Hirschhorn-Syndrom (WHS, OMIM #194190) bezeichnet.

Inzwischen weiß man, dass Deletionen speziell im terminalen Abschnitt des kurzen Arms von Chromosom 4 (Chromosomenregion 4p16.3) dieses Syndrom verursachen. Die Häufigkeit des WHS ist gering und liegt bei circa 1/50.000 [18]. In den meisten Fällen tritt die Deletion der 4pter Region als *de novo* Deletion [18], [19] auf, seltener sind elterliche balanzierte Translokationen, Mosaik, familiäre perizentrische Inversionen und Ringchromosome beschrieben. In allen Fällen kommt es aber zu Verlust von 4p-Material. In 20% der Fälle beschränkt sich die Deletion auf den Bereich 4p16.3, in den meisten Fällen ist die Deletion deutlich größer und kann sich bis zu 4p14 erstrecken [18]. Da inzwischen in seltenen Fällen auch kleine, interstitielle Deletionen gefunden wurden [20], wird das WHS den Mikrodeletionssyndromen und hier den segmentalen Aneuploidie-Syndromen [1] zugeordnet. Der Schweregrad des Phänotyps korreliert mit der Größe der Deletion [18], [21].

Folgende **klinische Merkmale** können (je nach Größe der Deletion) auftreten: intrauterine und postpartale Wachstumsretardierung, psychomotorische Retardierung, Gesichtsdysmorphien, muskuläre Hypotonie, Krampfanfälle und weitere klinische Merkmale. Typisch für die Diagnose eines WHS sind die **charakteristischen Gesichtsdysmorphien** („Greek helmet face“). Diese umfassen: prominente Glabella, kurzes Philtrum, Hypertelorismus, Epikanthus, breite hakenförmig gebogene Nase, abfallende Mundwinkel, Mikrogenie, Ohrmuscheldysplasie mit hypoplastischer Anthelix (innerer Rand der Ohrmuschel) und präaurikulären Anhängseln oder Fisteln [18], [5]. **Mittelliniendefekte** treten in 50% der Fälle auf und umfassen Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte, Herzfehler, Kolobome und Hypospadie [18]. Auch **Skelettfehlbildungen**, wie Klumpfuß, Skoliose, Hypoplasie des Os pubis, Pseudoepiphysen an den Phalangen, Mittelhandknochen und Mittelfußknochen und verzögertes Knochenalter werden in 50% der Fälle beschrieben [18], [15], [22]. **Weitere klinische Befunde** des WHS umfassen: Hämangiome, Ptosis, Strabismus, Stenose oder Atresie der

Tränengänge, Schwerhörigkeit, Nierenfehlbildung, Zwerchfellhernien, Agenesie der Gallenblase, Lungenhypoplasie, Kontrakturen, überzählige Hand- und Fingerfurchen, dysplastische Dermatoglyphen (Hautleisten) [18], [15], [19], [23], [24], [25]. Bei Knaben sind hypoplastische Genitalien mit Kryptorchismus und Hypospadie und bei Mädchen Klitorishypertrophie, Uterushypoplasie und bindegewebige Ovarien beschrieben [15], [26], [25].

Zu den **neurologischen Auffälligkeiten** zählen muskuläre Hypotonie, Krampfanfälle und Hirnfehlbildungen. Zu den beschriebenen Hirnfehlbildungen gehören Merkmale wie Mikrozephalie, Kleinhirnhypoplasie, Hydrocephalus internus, abnorme Gyrierung, Heterotopie, Hypoplasie und Myelinisierungsstörung der Pyramiden, Hypoplasie oder Fehlen des Balkens (Corpus callosum), des Septum pellucidum und des Tractus olfactorius (vom Bulbus olfactorius ausgehender Abschnitt der Riechbahn [18], [23], [27]. In Abhängigkeit von der Größe der Deletion gibt es auch hier unterschiedliche Ausprägungen und unterschiedliche Kombinationen der beschriebenen Merkmale. Sehr häufig treten im Säuglingsalter Krampfanfälle mit stereotypem EEG auf [28], [29]. Bei sehr kleinen Deletionen wurden teilweise auch sehr milde neurologische Veränderungen, wie zum Beispiel erniedrigter Intelligenzquotient, Aufmerksamkeitsdefizit oder Probleme in der Feinmotorik, beschrieben [20], [28].

1.3.2.1 Molekulare Charakterisierung des WHS

In den vergangenen Jahren wurde durch molekularzytogenetische Untersuchungen von Patienten mit atypischen Deletionen versucht, eine **WHS-kritische-Region (WHSCR)** zu definieren. Durch den Vergleich verschieden großer und überlappender Deletionen von WHS-Patienten konnte die WHS-kritische-Region eingegrenzt werden. Laut Wright et al. liegt die WHS-kritische-Region in einem 165 Kilobasenpaare (Kbp) großen Intervall zwischen den Markern D4S166 und D4S3327 auf 4p16.3 [26]. Es handelt sich hierbei um den so genannten SRO (smallest region of overlap), also einen Mindestbereich, der von jeder bekannten Deletion bei WHS-Patienten eingeschlossen wird. Zu den Merkmalen, die bei allen Patienten mit einer Deletion dieses Bereiches auftreten, gehören die typischen Gesichtsdysmorphien, eine milde mentale Retardierung, eine leichte Wachstumsverzögerung und eine kongenitale muskuläre Hypotonie.

Andere Charakteristika des WHS wie zum Beispiel Mittelliniendefekte und Herzfehlbildungen sind mit Deletionen, die über die WHSCR hinausreichen, assoziiert [19], [21]. Rauch et al. beschrieben den Fall eines Patienten mit einer sehr kleinen interstitiellen Deletion von 191 Kb, die lediglich die WHSCR umfasst [20]. Dieser Patient hat nur einen sehr milden Phänotyp. Folgende klinische Merkmale werden beschrieben: Sprachentwicklungsverzögerung, Dystrophie (Gewicht <3. Perzentile), im Alter von 5 Jahren verzögertes Knochenalter um 2,5 Jahre (Tabelle nach Greulich und Pyle, 1959), leichte Gesichtsdysmorphien (Dolichocephalie, hohe Stirn, prominente Glabella, kurzes Philtrum, dünne Oberlippe), leichte Klinodaktylie 5, milde kutane Syndaktylie zwischen den Strahlen 2 und 3, Feinmotorikdefizit, leichte Lernschwäche sowie ein Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom.

Inzwischen wurde eine mögliche zweite kritische Region (WHSCR-2) beschrieben. Zollino et al. zufolge, liegt die **WHSCR-2** in einem 300-600 Kilobasenpaare (Kbp) großen Intervall zwischen den Markern D4S3327 und D4S98-D4S168 distal der WHSCR [30]. Aus Deletionen in diesem Bereich resultiert der typische WHS-Phänotyp, einschließlich der charakteristischen Gesichtsdysmorphien, Wachstumsretardierung, psychomotorische Retardierung, Hypotonie und Krampfanfälle. Rodriguez et al. beschreiben einen Fall mit einer Deletion ausgehend von D4S3327 bis zum Telomer-Ende [31]. Die klinischen Merkmale umfassten eine psychomotorische Retardierung, die typischen Gesichtsdysmorphien und drei Fieberkrämpfe.

Mehrere Versuche wurden bisher unternommen, um die involvierten Gene durch Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu identifizieren [5], [19], [21]. Einige Gene konnten bisher innerhalb der WHSCR kartiert werden [32], [33], [34]. Darüber hinaus kommen Gene, die die WHSCR unmittelbar flankieren aufgrund möglicher Positionseffekte ebenfalls als Kandidatengene für bestimmte klinische Merkmale in Frage.

Das **WHSC1 Gen** ist ein 90 kb großes Gen und liegt mit 60 kb im telomernahen Bereich der WHSCR [33]. WHSC1 wird als Kandidatengen für faziale Merkmale diskutiert [33], [18], da es bei allen WHS-Patienten zumindest partiell deletiert ist.

In einer weiteren Arbeit wurde ein neues Gen (**Leucine zipper-, EF-hand-containing transmembrane protein 1 = LETM1**) identifiziert [35], welches direkt an die WHSCR angrenzt. Das 5'Ende von LETM1 befindet sich weniger als 80 kb

distal der WHSCR und ist bei allen Patienten mit voll ausgeprägtem Phänotyp deletiert. Es wird vermutet, dass LETM1 in die neuromuskulären Merkmale (Krampfanfälle) des WHS involviert ist. Schlickum et al. konnten zeigen, dass das LETM1-Protein in den Mitochondrien lokalisiert ist [36]. Aus diesem Grunde wird diskutiert, dass möglicherweise bei WHS-Patienten eine mitochondriale Fehlfunktion eine Ursache der neuromuskulären Symptome sein könnte [36].

Trotz aller Anstrengungen, die unternommen wurden, um die molekulare Basis des Syndroms aufzudecken, weiß man sehr wenig über die Pathogenese der Erkrankung und den veränderten Verlauf der fetalen Entwicklung. Von besonderem Interesse sind hierbei die neuromuskulären Beeinträchtigungen der Patienten, die abhängig von Größe und Lokalisation der Deletion bei allen Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt zu beobachten sind.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekularzytogenetische Charakterisierung eines Fetus mit einem Ringchromosom 4 und klinischen Merkmalen eines WHS. Mit ausgewählten PAC- und BAC-Klonen sollte eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Metaphasechromosomen des Patienten durchgeführt und die Bruchpunktregion auf wenige Kilobasen eingeschränkt werden. Nach der molekularen Bruchpunktbestimmung sollten die Deletionsgrößen mit den Ergebnissen der exakten makroskopischen, neuropathologischen und histologischen Untersuchung korreliert werden. Dabei waren die folgende Punkte von besonderem Interesse: die Ausprägung des Phänotyps, der neuropathologische Status im Hinblick auf mögliche Entwicklungsanomalien, die Größe des deletierten Chromosomenabschnitts, die genaue Lokalisierung der Bruchpunkte und der Versuch einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation.

2 Material und Methoden

2.1 Angaben zum Fetus

Die Ultraschalldiagnostik und die erste Chromosomenanalyse des Fetus erfolgten in der Praxisgemeinschaft für pränatale Diagnostik von Dr. med. D. Masson, Dr. med. E. Cetin, Dr. med. H. Marschner-Schäfer und Dr. med. E. Kaminsky in Hamburg. Auf Grund der Schwere des Befundes (siehe Kapitel 3.1.1) und des Ergebnis der Chromosomenanalyse (siehe Kapitel 3.3.1) entschied sich die Patientin nach eingehender Beratung für einen Schwangerschaftsabbruch und stimmte einer postmortalen Autopsie zu.

Die Sektion wurde im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) im Pathologischen Institut (Prof. Dr. H. Schäfer) von Dr. C. Städtler (Obduzent) vorgenommen. Die Neuropathologische Untersuchung wurde von Dr. M. Makrigeorgi-Butera am Institut für Pathologie in der Abteilung für Neuropathologie (Dir. Prof. Dr. mult. D. Stavrou) durchgeführt.

Für die Bruchpunktbestimmung wurde aus einem Gewebestück der Nabelschnur des Fetus eine Zellkultur angelegt. Nach der hochauflösenden Chromosomenpräparation konnte aus den gefärbten Metaphasechromosomen ein Karyogramm angefertigt werden. Ein Primäransatz (siehe Kapitel 2.7.1) wurde hergestellt und in einem Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff (bei -196°C) gelagert und für weitere Experimente aufbewahrt.

2.2 Herkunft der Klone für die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Die zellabhängige DNA-Klonierung ist ein vielfach angewandtes Verfahren für die Erzeugung großer Mengen an reiner DNA. Die Größe der einzelnen untersuchten DNA-Sequenzen kann jedoch sehr unterschiedlich sein (menschliche Gene beispielsweise reichen von 0,1 kb bis 2 Mb) [1]. Für die Klonierung großer DNA-Fragmente in Bakterien eignen sich Vektoren, die auf dem Bakteriophagen P1 und auf F-Faktoren basieren. Viele Vektoren, die man für die DNA-Klonierung in Bakterien verwendet, basieren auf Replikons, die mit einer hohen bis mittleren Kopienzahl in den Zellen vorliegen. Dadurch erhält man große Ausbeuten an DNA. Ein Nachteil besteht darin, dass es häufig zu Deletionen oder Umlagerungen der klonierten DNA kommt. Um diese Einschränkung zu umgehen, hat man sich in

letzter Zeit auf Vektoren konzentriert, die in niedrigen Kopienzahlen in den Bakterien vorkommen, beispielsweise den F-Faktor (das Fertilitätsplasmid von *E. coli*). Vektoren auf Grundlage des F-Faktorsystems können große Fragmente von Fremd-DNA (mit über 300 kb) aufnehmen. Da jedoch diese künstlichen Bakterienchromosomen (*bacterial artificial chromosomes*, BAC) ein Replikon mit niedriger Kopienzahl enthalten, erhält man aus den Zellen nur eine geringe Ausbeute an rekombinanter DNA [1]. Im Gegensatz hierzu stellen PACs Vektoren dar, die auf Basis der Bakteriophagen P1 und künstlicher P1-Chromosomen hergestellt sind. Diese Bakteriophagen enthalten ein relativ großes Genom. Sie bieten daher die Möglichkeit, daraus Vektoren zu entwickeln, die große Fragmente von Fremd-DNA aufnehmen können [1].

Die in dieser Arbeit verwendeten PAC-Klone (129P5, 121C2, 184O23, 111E4 und 300F20) wurden von Frau Dr. S. Endeke (UKE, Hamburg) im Rahmen der Identifizierung des LETM1 Gens isoliert und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt (Labor, Arbeitsgemeinschaft Prof. Winterpacht) [35]. Alle verwendeten BAC-Klone sind kommerziell erhältliche Klone der humanen genomischen BAC-Bibliothek 753 (RZPD, Humanes Ressourcenzentrum, Berlin). Die verwendeten Zentromer- und Telomersonden (Chromosome 4 alpha-Satellite, TEL 4p DNS Probe und TEL 4q DNS Probe) wurden von Qbiogene (France) bezogen.

2.2.1 Auswahl der PAC- und BAC- Klone

Um die zytogenetisch festgestellten Bruchpunkte (siehe Kapitel 3.3.1) näher einzugrenzen und bis auf einige Megabasenpaare (Mbp) genau zu lokalisieren, wurden Chromosom 4 spezifische PAC- und BAC- Klone aus den flankierenden Bereichen der geschätzten Bruchpunkte (r(4)(p16;q33)) des kurzen und langen Arms ausgewählt. Die Klone wurden nach bekannten Markern oder Genen, die auf dem NCBI Map Viewer verzeichnet sind und mit Hilfe der Datenbanken <http://genomics.med.upenn.edu/genmapdb> und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ausgesucht. Alle ausgewählten Klone und die Telomer-Proben sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Nr.	PAC/BAC Klone Telomer-Proben	Marker	Lokalisation Map Viewer (Mbp)	Lokalisation FISH-Map
1	4p-Telomer-Probe			4p-Telomer
2	4q-Telomer-Probe			4q-Telomer
3	PJ-129P5 (PAC)	D4S142	unklar	4p16.3
4	PJ-121C2 (PAC)	D4S227	unklar	4p16.3 (WHSCR)
5	PJ-184O23 (PAC)	D4S114	unklar	4p16.3 (WHSCR)
6	PJ-111E4 (PAC)	D4S166	4,2	4p16.3 (WHSCR)
7	PJ-300F20 (PAC)	D4S43	unklar	4p16.3
8	RP11-478A6	D4S1233	4,7 (2,5)	4p16.3
9	RP11-7A6	D4S1276, MSX1	7,1 (4,8)	4p16.2
10	RP11-81L15	D4S1511	16,5 (14,8)	4p15.3
11	RP11-119N7	D4S863	27,5 (26,3)	4p15.1-15.2
12	RP11-90I1	unklar	34,6	4p15.1
13	RP11-648O9	D4S2677	112,1	4q32-33
14	RP11-4D13	D4S575	154,8	4q32
15	RP11-177L7	D4S866	165,7	4q32
16	RP11-199O10	D4S882	169,5	4q33
17	RP11-79K2	SHGC-84154	177,4 (179,2)	4q34
18	RP11-274E20	D4S3128	184,8 (190,7)	4q35

Tabelle 1: Aufgeführt sind alle PAC/BAC Klone, die über oben genannte Datenbanken ausgewählt wurden sowie die Telomer-Proben, Stand November 2000 (Stand August 2002).

2.2.2 Anzucht der Klone

Die Klone wurden zunächst auf Agaroseplatten ausgestrichen und vereinzelt. Für die Anzucht einer E. coli Kultur wurden 5 ml LB-Medium in einem Reagenzglas mit einer Einzelkolonie der oben aufgeführten Klone (siehe Tabelle 1) angeimpft. Diese inkubierten über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C. Bei größeren Ansätzen beimpfte man 100-200 ml LB-Medium mit einer stationären Vorkultur. Die Inkubation erfolgte ebenfalls über Nacht bei 37°C.

Um Bakterienkulturen über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden 1,5 ml aus der Kultur zusammen mit 2x FM (Freezing medium) in ein steriles Röhrchen überführt.

2.3 Isolierung von BAC- und PAC-DNA

Um ausreichend BAC- bzw. PAC-DNA aus den Bakterien zu gewinnen, musste von einem größeren Kulturvolumen ausgegangen werden. Damit die gewonnene DNA einen möglichst hohen Reinheitsgrad aufwies, wurden DNA-Midi-Präparationskits (Quiagen, Hilden) verwendet. Die Isolierung von PAC- und BAC-Desoxyribonukleinsäure wurden mit Hilfe von Quiagen-tip 100 bzw. 500 entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde das Kulturmedium in Falconflaschen überführt und zentrifugiert. Die nach Birnboim und Doly [37] mit Hilfe der Methode der alkalischen Lyse erhaltene Suspension wurde mit zwei Zentrifugationsschritten von festen Bestandteilen befreit. Die Quiagensäulen enthalten ein modifiziertes Silica-Gel (Partikelgröße circa 0,1mm) mit extrem hoher Oberflächendichte und Ladung. Diese ermöglicht eine maximale Nuclein-Adsorption und ein spezifisches Eluieren der Doppelstrang-DNA im Kochsalzgradienten. Nachdem das Lysat von den festen Bestandteilen befreit worden war, wurde es auf die Säule gegeben und anschließend durch "Waschen" mit langsam zunehmender NaCl-Konzentration von Proteinen und Ribonukleinsäure gereinigt. Die somit gereinigte DNA wurde luftgetrocknet und in Aqua bidest. oder TE-Puffer zur Langzeitaufbewahrung gelöst.

Folgende Schritte waren zur Midi-Präparation von BAC- bzw. PAC-DNA mit Hilfe des „Qiagen Plasmid Midi Kit“ nötig. Nach der Inkubation der Klone im Schüttelinkubator über Nacht bei 37°C, erfolgte die Zentrifugation für 20 Minuten bei 6000 rpm. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 8 ml Puffer P1 (Zellresuspension) resuspendiert. Nach der Zugabe von 8 ml Lösung P2 (Zell-Lyse) wurde das Ganze sofort vorsichtig invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem weiteren Schritt wurden 8 ml Lösung P3 (Neutralisation) zugegeben, erneut invertiert, für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die Qiagen Säule wurde mit 4 ml Lösung QBT äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand aus der Zentrifugation durch einen Faltenfilter auf die Säule aufgetragen. Nachdem der Überstand durchgeflossen war, wurde die Säule mit 3x 10 ml Lösung QC gewaschen. Schließlich konnte die DNA von der Säule mit 3,5 ml Lösung QF eluiert werden und der Durchfluss in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen werden. Es folgte die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol, Mischen und die Zentrifugation für 60 min bei 5000 rpm. Der Überstand wurde dekantiert, 2 ml 70%

Ethanol zugegeben, gemischt und für 60 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert worden war, wurde das Pellet bei Raumtemperatur für 10 bis 15 min getrocknet. Die somit gereinigte DNA wurde in einem geeigneten Volumen (100 bis 200 µl) Aqua bidest. oder TE-Puffer zur Langzeitaufbewahrung bei -20°C gelöst.

2.4 DNA-Standardmethoden

2.4.1 Restriktionsenzymatische Spaltung von genomischer DNA

Mithilfe von Restriktionsendonucleasen lässt sich die DNA an bestimmten DNA-Sequenzerkennungsstellen schneiden. Hier dient die Spaltung dazu, um sowohl die Quantität als auch die Qualität der in der Midi-Präparation gewonnenen BAC- bzw. PAC-DNA zu beurteilen.

Der Verdau von genomischer DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Restriktionspuffer. In der Regel wurde die DNA mit 10 U Enzym pro µg DNA in einem 20 ml Ansatz restringiert.

Der Ansatz wurde für 2-3h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Die Überprüfung der Restriktion erfolgt auf einem 1%igem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert.

2.4.2 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung fragmentierter DNA bzw. der Darstellung von PCR-Produkten. Dabei ist die Laufstrecke eines Fragments im Gel dem Logarithmus seines Molekulargewichts umgekehrt proportional. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung für 3-6h bei 100 Volt. Die Agarosegelelektrophorese wurden unter Bedingungen durchgeführt, die eine Auftrennung von Fragmenten einer Größe unter ~20 Kb ermöglichte.

Restringierte DNA-Fragmente wurden mit Ladepuffer versetzt und auf horizontalen 0,7-1%igen Agarosegelen je nach Größe der Fragmente unterschiedlich lang aufgetrennt. Als Puffersystem wurde 1x TBE verwendet. Als Längenstandard diente HinIII-restringierte Lambda-DNA oder eine 1kbp-Leiter. Nach einer

Ethidiumbromidfärbung erfolgte die Dokumentation auf dem UV-Transilluminator UVT-28M von Herolab mit dem Bildanalyseprogramm Easy Image Plus Rev. 3.26.

2.4.3 Fällung von DNA

Zur Fällung der DNA wurden 1/10 Vol. 3 M NaAcetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol abs. zugegeben, auf dem Vortex geschüttelt und für 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (14000 Upm). Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, für 15 min zentrifugiert, vakuumgetrocknet und in Aqua bidest. gelöst. PCR-Produkte wurden zur Entfernung kleinerer Oligonukleotide durch Zugabe von 1 Vol. 4 M Ammoniumacetat und zwei Vol. Isopropanol bei Raumtemperatur (100%) gefällt. Die Ansätze wurden hierbei für mind. 30 min bei Raumtemperatur durch Zentrifugation (14000 Upm) pelletiert, mit 70%igem EtOH gewaschen, vakuumgetrocknet und in Aqua bidest. gelöst.

2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) [38] dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Das Prinzip beruht auf der Durchführung repetitiver Reaktionszyklen bei bestimmten Temperaturen. Die optimale Temperatur hängt von den Schmelztemperaturen der Primer ab. Ein Reaktionszyklus besteht in der Regel aus drei Einzelreaktionen. Die Bedingungen werden entsprechend der verwendeten Primerpaare sowie deren DNA-Matrizen variiert. Ausgegangen wurde dabei von folgendem Standardprogramm. Erste Denaturierung für 3min bei 94°C und dann 35 Zyklen mit jeweils 1min bei 94°C, 1min bei 58°C und 1min bei 72°C.

Die zu amplifizierende DNA wurde in einem ersten Zyklus denaturiert. Die Doppelstrang-DNA wurde in Einzelstrang-DNA getrennt, so dass es zur Bindung der spezifischen Primer kommen konnte. Dafür reichten schon geringe Mengen DNA aus. Im zweiten Schritt hybridisierten die eingesetzten Oligonukleotide mit den DNA-Einzelsträngen (Annealing bei 45°C - 70°C). Im dritten Schritt kam es zur eigentlichen Synthese der neuen DNA-Stränge durch die *Taq*-DNA-Polymerase (Elongation bei 72°C) ausgehend von den angelagerten Primern als Startpunkt. Die Amplifikation erfolgte demnach exponentiell, so dass in 30-40

Zyklen eine Vermehrung des entsprechenden DNA-Fragments um den Faktor 10^6 erreicht werden konnte.

Ein 50 μ l Ansatz für die PCR setzte sich wie folgt zusammen:

5 μ l 10x Puffer

1, 5 μ l MgCl

1, 2 μ l NTP-Mix

10 pmol Primer1

10 pmol Primer2

1 U Taq Polymerase

0, 5 μ l DNS

x μ l H₂O

Die Amplifikation erfolgte in dem Thermocycler Gene Amp PCR System 2400 von Perkin Elmer. Es wurde pro Ansatz eine Negativkontrolle mitgeführt, um Verunreinigungen der verwendeten Lösungen auszuschließen. Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurde 1/10 des Reaktionsansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt.

2.6 Nick-Translation

Die Biotinylierung der Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde mittels der Nick- Translation [39] unter Verwendung des Nick- translations Kits (BioNick Labeling System von Gibco BRL, Life Technologies) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Methode der Nick-Translation beruht darauf, dass geringe Konzentrationen von DNase I an statistisch verteilten Stellen eines DNA-Doppelstrangs Einzelstrangsbrüche (*nicks*) erzeugen. Die *E.coli* DNA-Polymerase I benutzt die 3'-OH-Enden dieser *nicks* als Primer für die 5'→3'-DNA-Synthese. Die 5'→3'-Exonuclease-Aktivität der DNA-Polymerase I entfernt dabei gleichzeitig die Nucleotide in Syntheserichtung. Die Polymerase-Aktivität ermöglicht den Einbau der Nucleotide aus dem speziell verdünnten dNTP-Mix, in welchem jeweils ein Nucleotidbaustein mit Biotin markiert ist, während die drei anderen Nucleotid-

Sorten unmarkiert sind. Bei einer Reaktionstemperatur von 16°C wird so unmarkierte DNA durch neu synthetisierte, markierte DNA ersetzt.

Der gesamte Reaktionsansatz (50µl) setzte sich zusammen aus 1µg DNA, 5 µl 10x dNTP-Mix, 5 µl 10x Enzym-Mix und wurde mit H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 45 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 1h bei 16°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 5µl Stop Puffer (0,5 M EDTA) zugegeben. Die markierte Probe wurde dann durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat, 10 µl Cot-DNA (zur Absättigung repetitiver Sequenzen innerhalb der DNA-Sonde), 5µl Lachssperma DNA (zur Absättigung unspezifischer Bindungen) und 2 Vol. Ethanol abs. gefällt. Die DNA wurde für 15 min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Nach einem einmaligen Waschvorgang mit 70% Ethanol wurde die DNA luftgetrocknet und anschließend in 40µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und für die nachfolgende FISH eingesetzt.

2.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

2.7.1 Herstellung und Kultivierung humaner Fibroblastenkulturen

Zur Herstellung humaner Fibroblastenkulturen wurde ein Gewebestück aus der Nabelschnur des Fetus entnommen und in einer Petrischale mit einem Skalpell in 1mm große Schnitte zerteilt. Das Material wurde mit 10 ml 20%igem FCS Medium benetzt und in einem Brutschrank kultiviert. Die konfluent gewachsenen Zellen des Primäransatzes wurden trypsiniert, mit 10 ml 20%igem FCS Medium suspendiert und zentrifugiert (10 min bei 1000 Upm). Das Pellet wurde mit 1 ml 10%iger DMSO-Lsg. Resuspendiert, in ein Kryo-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff (bei -196°C) gelagert und schließlich für weitere Experimente aufbewahrt.

Zur Kultivierung der Fibroblasten wurden die gewünschten Zellen aufgetaut und mit 9 ml 20% FCS Medium in ein 10ml Plastikröhrchen gegeben und 10min bei 800-1000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml 20%igem Medium resuspendiert, in eine Falconflasche überführt und in einem Brutschrank kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

2.7.2 Chromosomenpräparation

Für die Chromosomenenernte wurden der Kultur 3 Tropfen (50µg) Colcemid (10µg/ml) zugesetzt. Die Kultur wurde weiter für 3-5 Std. bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die Zellen trypsinisiert und einschließlich dem abgenommenen Medium 10min bei 1000 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 3ml vorgewärmter (37°C) hypotoner LSG (0,075M KCL) resuspendiert und nach einer Inkubationszeit von 10min bei 37°C erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde auf das Zellpellet vorsichtig eiskaltes Fixativ gegeben, schonend resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Vor dem Auftropfen wurde das Zellpellet durch nochmalige Zentrifugation gewonnen, mit circa 1ml Fixativ suspendiert und dann auf einen nassen Objektträger aufgetropft. Die Ansicht erfolgte an einem Phasenkontrastmikroskop von der Firma Leitz Wetzlar, Germany.

2.7.3 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Zunächst wurden die Objektträger mit den Metaphasechromosomen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 90%) für jeweils 10 min dehydriert und dann luftgetrocknet. Die Denaturierung der chromosomalen DNA erfolgte durch maximal dreiminütiges Eintauchen des Objektträgers in 70% Formamid in 2xSSC bei exakt 68°C. Durch sofortiges Eintauchen in eiskaltes 2xSSC wurde die Denaturierung gestoppt. Die anschließende Dehydrierung der Präparate erfolgte durch eine eiskalte aufsteigende Alkoholreihe. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur getrocknet.

2.7.4 Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurden 20µl der Hybridisierungslösung (Siehe Kapitel 2.6) verwendet. Da die repetitiven Elemente auch an andere Chromosomen binden können, mussten sie durch eine Vorhybridisierung mit einem Überschuss an repetitiver (Cot1), nicht-markierter DNA abgesättigt werden. Dieser Vorgang wird als „Pre-Annealing“ bezeichnet und basiert auf der schnellen Reassoziationskinetik repetitiver DNA. Zu diesem Zweck wurde die biotinylierte DNA in Hybridisierungspuffer für 10 min bei 95°C denaturiert, kurz pelletiert und dann für 90 min bei 37°C mit Cot-DNA vorhybridisiert.

Nach dem Preannealing wurde der Hybridisierungsansatz auf den denaturierten Objektträger pipettiert. Die Deckgläser von 22x22mm wurden aufgelegt und die

Ränder mit Fixogum abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte für 16-18h bei 37°C in einer feuchten Kammer.

2.7.5 Detektion und Amplifikation der Signale

Die Chromosomenpräparate wurden nach einer Übernacht-Hybridisierung zunächst einem Waschschrift mit 50%-igem Formamid (in 2xSSC) unterzogen, um so unspezifische Bindungen zu entfernen. Die nachfolgende Amplifikation und Detektion der hybridisierten Banden basiert auf dem Biotin-Streptavidin-System (Firma Oncor). Dieses beruht auf der extrem hohen Affinität zwischen den beteiligten Bindungspartnern Biotin und Streptavidin. Bei Biotin, einem in der Natur vorkommenden Vitamin, handelt es sich um das Reporter-Molekül, während Streptavidin, ein bakterielles Protein, die Funktion des Affinitätsmoleküls ausübt. Die Bindung zwischen diesen beiden Molekülen ist eine der stärksten, die in der Biologie bekannt ist und weist eine Affinitätskonstante von 10^{-14} auf [1]. Um nun die vorangegangene Hybridisierung mikroskopisch sichtbar zu machen, müssen die biotinylierten Signale amplifiziert werden. Dazu wurden die Metaphase-Präparate zuerst mit Streptavidin-FITC-Konjugat und anschließend mit einem biotinylierten α -Streptavidin-Antikörper inkubiert. Danach erfolgt eine zweite Inkubation mit Streptavidin-FITC-Konjugat. Der biotinylierte α -Streptavidin-Antikörper hat auf diese Weise die Funktion eines Brückenantikörpers, da er das Bindeglied zwischen den Streptavidin-FITC-Konjugat-Molekülen darstellt und so indirekt zu einer Amplifizierung der Hybridisierungssignale führt. Die Detektion der Hybridisierungssignale wird hingegen über das Streptavidin-FITC-Konjugat, welches grün fluoresziert, ermöglicht.

Die Objektträger, auf welchen die Sonden übernacht hybridisiert wurden, wurden folgender Behandlung unterzogen:

- 1.) Vorsichtiges Entfernen des Fixogums und der Deckgläser
- 2.) 5 min. bei Raumtemperatur in Waschlösung I (2xSSC/0,1% Tween)
- 3.) wenige Sekunden in Waschlösung II (50%-iges Formamid (in 2xSSC); 42°C) schwenken
- 4.) 5 min. bei RT in Waschlösung I spülen
- 5.) Zugabe von 30 μ l verdünntem Streptavidin-FITC-Konjugat
- 6.) Abdecken mit 24x60mm-Deckglas
- 7.) 45 min. bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren

- 8.) 5 min. bei Raumtemperatur in Waschlösung I spülen
- 9.) Zugabe von 30 µl verdünntem biotinylierten α-Streptavidin-Antikörper
- 10.) Schritte 6) bis 8) wiederholen
- 11.) Schritte 5) bis 8) wiederholen

2.7.6 Färbung der Präparate

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Präparate für 3-4 min in PI-Gebrauchslösung (Propidiumjodid) gefärbt. Es folgte eine achtminütige Entfärbung in Aqua dest.. Zur Konservierung der Signale wurden die Präparate mit 2 Tropfen Antifade bestückt und mit einem Deckglas (2x6cm) eingedeckelt.

Die Auswertung der Signale erfolgte am Leica DMRA Mikroskop mit Fluoreszenzeinheit und einem 8ter Filterrad. Die Dokumentation erfolgte mit dem Computerprogramm Cytovision Version 2.03 von Applied Imaging.

2.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mittels enzymatischer DNA-Synthese und unter Verwendung von basenspezifischen Kettenabbruch-Didesoxynucleotiden durchgeführt [1]. Diese Reaktion wurde durch die Markierung der DNA-Fragmente am 3'-Ende durch fluoreszierende Didesoxynucleotide modifiziert (automatisierte DNA-Sequenzierung). Die zyklische Doppelstrangsequenzierung von Plasmiden erfolgte mit den Vektorprimern oder mit Primern (10pmol/µl) aus bekannten Abschnitten der inserierten DNA. Als Matrix wurden 5-10 µg PAC-DNA oder 50-300 ng isopropanolgefällte PCR-Produkte verwendet. Für die Sequenzierung wurde das DNS Sequencing Kit von ABI PRISM, Applied Biosystems eingesetzt. Die Sequenzierreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 min bei 95°C, 20 sec bei 95°C, 5 sec bei 58°C und 4 min bei 60°C. Die Schritte 2-4 (20 sec bei 95°C, 5 sec bei 58°C und 4 min bei 60°C) wurden 25fach wiederholt. Für die Direktsequenzierungen von PAC-Plasmiden wurde ein leicht modifiziertes Programm verwendet: nach einer einleitenden Denaturierung von 10min bei 96°C wurden 35 Zyklen, wie oben beschrieben, angeschlossen.

Die Sequenzierprodukte wurden durch Isopropanolpräzipitation von überschüssigen Terminatoren und Primern gereinigt. Das Pellet wurde schonend luftgetrocknet. Die automatische Auswertung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers in dem 377 DNA Sequencer von ABI PRISM.

2.8.1 Primersequenzen

Vektorspezifische Primer:

T7A	5'-AATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6	5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'

Exonprimer:

3-5'	5'-GGAGGCCTCAGTGATTCG-3'
3-3'	5'-GGCTTCAGGGATGTCGTAGA-3'
5-5'	5'-GCGGGAAAAGATACCTTCAT-3'
5-3'	5'-TCAGTCACTGGCGGATGTTA-3'

PAC-Klonspezifische Primer:

D4S43-2A	5'-GACTGGTTGTTTGAGGGCGTTG-3'	Gusella et al. (1992) [40]
D4S43-2B	5'-TCCTTGACTCTGCTTCAGC-3'	
D4S166A	5'-GGCCTGATCTGAGGTTGTGGAAACG-3'	Gusella et al. (1992) [40]
D4S166B	5'-CTGTACCCAGGAGCATTCTCTCCC-3'	
D4S227A	5'-GATCAGGTATCTACTTTCTTATGTAC-3'	Weber et al. (1993)
D4S227B	5'-GTCCACCCACGGGAAGTATGTTTC-3'	
121C2A	5'-CTGACTTGGACCAACTGTCCC-3	
121C2B	5'-GTAGAGGCGTTTCCAGTGTCC-3'	

2.9 Computerprogramme und Datenbanken

Die Suche nach geeigneten Klonen erfolgte unter Zuhilfenahme von folgenden Datenbanken: <http://genomics.med.upenn.edu/genmapdb>, <http://www.rzpd.de> und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Informationen über die genomischen Sequenzen der verwendeten Klone entstammen der Datenbank des NCBI, Stand November 2000. Um Homologievergleiche von DNA-, bzw. Aminosäuresequenzen vorzunehmen, wurde das Computerprogramm „BLAST“ verwendet.

Für die Aufnahme und Bearbeitung der Fluoreszenzbilder wurde das Computerprogramm „Cytovision Version 2.03“ von Applied Imaging benutzt.

Diagramme und Tabellen wurden mit dem Programm „Excel“ oder „Word“ erstellt.

2.10 Anhang

Medien, Puffer und Lösungen

Agar Platten	15 g Agar-Agar ad 1000 ml LB-Medium
Antifade Lösung	1 Vol. p-Phenylendiaminohydrochlorid 9 Vol. Glycerin pH 8,0
Denaturierungs-Mix	70 ml deionisiertes Formamid (100%) 10 ml 20x SSC 20 ml acq. dest.
Denhardts-Lösung, 1 x	50 g/l Ficoll 400 10 g/l Polyvinylpyrrolidon 10 g/l BSA pH 7,0
DNA-„BlueMarker“	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 40 % Sucrose
10%ige DMSO Lösung	1 ml Dimethylsulfoxid 9 ml 20% FCS Medium
Fixativ	1 Teil Eisessig (100%) 4 Teile Methanol (100%)
2x FM	65 % Glycerin 0,1 M MgSO ₄ 0,025 M Tris Cl (pH 8,0)
Gegenfärbung	10 µl Propidiumjodid (PI) der 1% Stammlösung auf 100 ml 0,1% Tween (in 2x SSC)
Hybridisierungslösung	50% Formamid 2 x SSC 1 x Denhardts-Lösung 40 mM NaH ₂ PO ₄ 10% Dextranulphat 0,1% Na-Dodecylsulphat
Hypotone Lösung	0,075 M KCl
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml Aqua bidest., (pH 7,5)
MOPS (10x)	0,2 M 3(N-morpholin)Propansulfonsäure 0,05 M Na-Acetat 0,01 M EDTA (pH 7,0)

P1 (Zellresuspension)	50 mg Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A; (pH 8,0)
P2 (Zell-Lyse)	200 mM NaOH 1 % SDS
P3 (Neutralisation)	3,0 M Kaliumacetat; (pH 5,5)
Puffer QBT (Säulenequilibration)	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15 % Isopropanol 0.15 % Triton X-100; (pH 7,0)
Puffer QC (Wasch-Puffer)	1,0 mM NaCl 50 mM MOPS 15 % Isopropanol; (pH 7,0)
Puffer QF (Elutionspuffer)	1,25 M NaCl 50 mg Tris, Tris-HCl 15 % Isopropanol; (pH 8,5)
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat pH 7,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; (pH 7,8) 1 mM Na ₂ EDTA
10x TBE	1 M Tris/HCl, pH 8,0 1 M Borsäure 20 mM EDTA

Enzyme, Nukleinsäuren Antikörper und Kits

Anti-Avidin, biotinyliert (Ziege)	Oncor
Streptavidin-FITC-Konjugat	Oncor
Cot-1-DNA	Gibco BRL (USA)
dNTP-Mix	Gibco BRL (USA)
Proteinase K	Boehringer (Mannheim)
RNAse A	Boehringer (Mannheim)
Salmon sperm DNA	Sigma (USA)
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL (USA)

Kits:

BioNick Labeling System	Gibco BRL (USA)
DNA Sequencing Kit	ABI PRISM, Applied Biosystems (Weiterstadt)
Licensed for PCR	Gibco BRL (USA)

Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)

Bakterienstämme

DH10B	F-, mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC), 80dlacZDM15, DlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, D(ara, leu)7696, galU, galK, l-, rpsL, nupG
-------	---

Molekulargewichtstandards

100 bp-Leiter	Gibco BRL (USA)
λ x Hind III- Marker	Boehringer (Mannheim)

Feinchemikalien

Agarose	Gibco BRL (USA)
Ampicillin	Gibco BRL (USA)
Antifade-Lösung (Vectashield Mounting Medium)	Vector Laboratories (USA)
Colcemid	Gibco BRL (USA)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Oncor (USA)
Fetales Kälberserum	Sigma (USA)
Fluorescein-Avidin	Vector Laboratories (USA)
Formamid (Ultrapure)	Gibco BRL (USA)
Kanamycin	Sigma (USA)
Tris	Gibco BRL (USA)

Nichtaufgeführte Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer, Mannheim; Merck, Darmstadt und Sigma (USA).

Einheiten

Nanometer	nm	10 hoch minus 9 m
Mikrometer	μ m	10 hoch minus 6 m
Millimeter	mm	10 hoch minus 3 m
Zentimeter	cm	10 hoch minus 2 m
Dezimeter	dm	10 hoch minus 1 m
Meter	m	1 m
Liter (Volumen)	l	10 hoch minus 3 m hoch 3

Gramm (Masse)	g	10 hoch minus 3 kg
Kilogramm (Masse)	kg	1 kg
Minute (Zeit)	min	60 s
Sekunde (Zeit)	s	1 s
Stunde (Zeit)	h	60 x 60 s
Grad Celsius (Temperatur)	t°C	T (°C) = T (K) – 273,15

Geräte

Brutschrank	Heraeus (Hannover)
DNA-Sequenzierer 377	ABI PRISMTM 377 Applied Biosystems GmbH, bzw. PE Biosystems (Weiterstadt) Software: Analysis 2.1.2 und Genescan 672, Power Macintosh 7200/90
Eismaschine 546	Ziegra Eis (Isernhagen)
Feuchtkammerinkubator	Heraeus (Hannover)
Gel-Dokumentationssystem	E.A.S.E.Y. Image Plus Rev. 3.26, Herolab (Wiesloch)
Gelkammer	OWI Separation Systems (Portsmouth, USA)

Mikroskope:

Fluoreszenzmikroskop	Leica DMRA Mikroskop mit Fluoreszenzeinheit und 8ter Filterrad (Wetzlar)
Phasenkontrastmikroskop	Leitz (Wetzlar)

PCR-Geräte:

DNA Engine PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym (Oldendorf)
Gene AmpPCR System 2400	Perkin Elmer Cetus (USA)

Schüttelinkubatoren:

Inkubator Shaker Model G25	New Brunswick Scientific Co. INC, (Edison, New Jersey, USA)
Certomat	B. Braun, Biotech International (USA)

Sterilwerkbank Hera safe	Heraeus (Hannover)
Thermoblock Trio	Biometra (Göttingen)
Trockenschrank	Heraeus (Hannover)
UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab (Wiesloch)
Vakuumentrockner Speedvac plus	Savant (USA)

SC110A	
Vortex Genie 2	Scientific Industries, INC. (Bohemia, N.Y., USA)
Waage Sartorius	Waagenschmitt (Göttingen)

Wasserbäder:

Wasserbad GFL 1083	GFL (Burgwedel)
Wasserbad Uniequip	Laborgeräte (München)

Zellinkubator	CO ₂ -Auto-Zero Inkubator, Heraeus (Hanover)
Zellkulturflaschen, Falcon	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)

Zentrifugen:

Eppendorf Zentrifuge 5415 C, 5417R, 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Laborfuge 400e	Heraeus (Hannover)
Hettich EBA 12R	Hettich (Tuttlingen)
Refrigerated Superspeed Centrifuge RC-5B	Sorvall, Du Pont (Bad Homburg)

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

3.1.1 Pränataler Befund

In der 17. Woche (sonographisches Alter) einer bis dahin unauffälligen 1. Schwangerschaft einer 27 Jahre alten Patientin wurden verschiedene auffällige Befunde in der Praxisgemeinschaft für pränatale Diagnostik von Dr. med. D. Masson, Dr. med. E. Cetin, Dr. med. H. Marschner-Schäfer und Dr. med. E. Kaminsky in Hamburg erhoben. Neben einer intrauterinen Wachstumsretardierung wurden ein fetales Nackenödem (5,6 mm), eine unzureichende Magenfüllung und eine Achsenfehlstellung des Herzens festgestellt. Die Konzeption erfolgte spontan bei Zustand nach Adnexitis. Die Patientin war Nicht-Raucherin, hatte während der Schwangerschaft keinen Alkohol getrunken und hatte eine unauffällige Familienanamnese.

Bei einer weiteren Ultraschalldiagnostik in der 21. Woche wurden zudem eine Lippenspalte, linksseitige Zwerchfellhernie mit Dextroposition des Herzens und eine singuläre Nabelschnurarterie festgestellt. Die Chromosomenanalyse der Praxisgemeinschaft von 23 Metaphasen (GTG-Bänderung) ergab in 56% einen numerisch auffälligen weiblichen Karyotyp mit einer Monosomie 4. In 44% war neben einem strukturell unauffälligen Chromosom 4 ein großes Ringchromosom r(4)(p16; q33) nachweisbar. Die Abruption graviditatis erfolgte am Ende der 21. SSW.

3.1.2 Sektionsbefund

Die Sektion des Feten wurde im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) im Pathologischen Institut (Prof. Dr. H. Schäfer) von Dr. C. Städtler (Obduzent) vorgenommen. Es handelte sich um einen weiblichen Fetus (siehe Abbildung 2) mit einem Körpergewicht von 210 g, einem Kopfumfang von 14 cm, einer Scheitel-Steißlänge von 13 cm, einer Scheitel-Fußlänge von 21 cm und einer Fußlänge von 2 cm. Die oben beschriebenen Ultraschallbefunde wurden bestätigt. Weiterhin fand man tief sitzende Ohren beidseits, eine doppelseitige komplette Lippenkieferraumenspalte, abgeflachte Gesichtsform und Nasenrücken (Griechisches Helmg Gesicht), inkomplette Lappung zwischen rechtem Ober- und

Mittellappen der Lunge, Thymushypoplasie, Gallenblasenaplasie und eine Lappungsanomalie der Milz. Der Fetus hatte eine schwere Herzfehlbildung mit Transpositionsstellung der großen Arterien und einem „Double-outlet“ des rechten Ventrikels. Es zeigten sich keine Anomalien der Extremitäten. Die Ergebnisse der histologischen Sektion waren ausgenommen des hypoplastischen Thymus- und Lungengewebes allesamt altersentsprechend.



Abbildung 2: Fotografie des weiblichen Fetus mit Ringchromosom 4, r(4)(p16;q33).

Die Abbildung zeigt das Foto nach der Abruption graviditatis am Ende der 21. SSW. Man sieht eine Lippenspalte beidseits und Extremitäten ohne Fehlbildungen.

3.2 Neuropathologische Daten

Die neuropathologische Untersuchung wurde von Dr. M. Makrigeorgi-Butera am Institut für Pathologie in der Abteilung für Neuropathologie (Dir. Prof Dr. mult. D. Stavrou) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Die makroskopische Architektur des Gehirns (35,5g nach Fixation) war normal. Bei der weiteren makroskopischen Betrachtung zeigten sich eine altersgerechte Hirnentwicklung, regelrechte Befunde an Kleinhirn und Hirnstamm und kein Anhalt für subarachnoidale oder interzerebrale Blutungen.

Für die histologische und immunhistochemische Untersuchung wurden Proben aus Großhirn, Hirnstamm und Kleinhirn entnommen. Neben der konventionellen Hämatoxylin-Eosin- und van Gieson-Färbung wurden auch immunhistochemische

Verfahren mit Antikörpern gegen Neurofilament, GFAP und CD68 Antikörper durchgeführt. Folgende Regionen wurden untersucht: Corpus callosum, subependymäre Matrixzellzone (periventrikuläre Keimlager), Cortex cerebri (Abbildung 3), Corpus geniculatum laterale, Truncus cerebri mit Hirnnervenkernen III (N. oculomotorius) und XII (N. hypoglossus), Cerebellum (Abbildung 5 und Abbildung 6), Nucleus dentatus, Gyrus cinguli und Medulla oblongata mit Nucleus olivaris inferior (Abbildung 4). Alle anatomischen Strukturen mit Ausnahme des Corpus callosum, welches nicht vollständig erhalten und deshalb nicht verlässlich bewertet werden konnte, zeigten im Vergleich mit normalen Feten gleichen Alters (20. und 22. Woche) eine altersgerechte Entwicklung. Auch die immunhistologischen Befunde waren allesamt altersentsprechend.

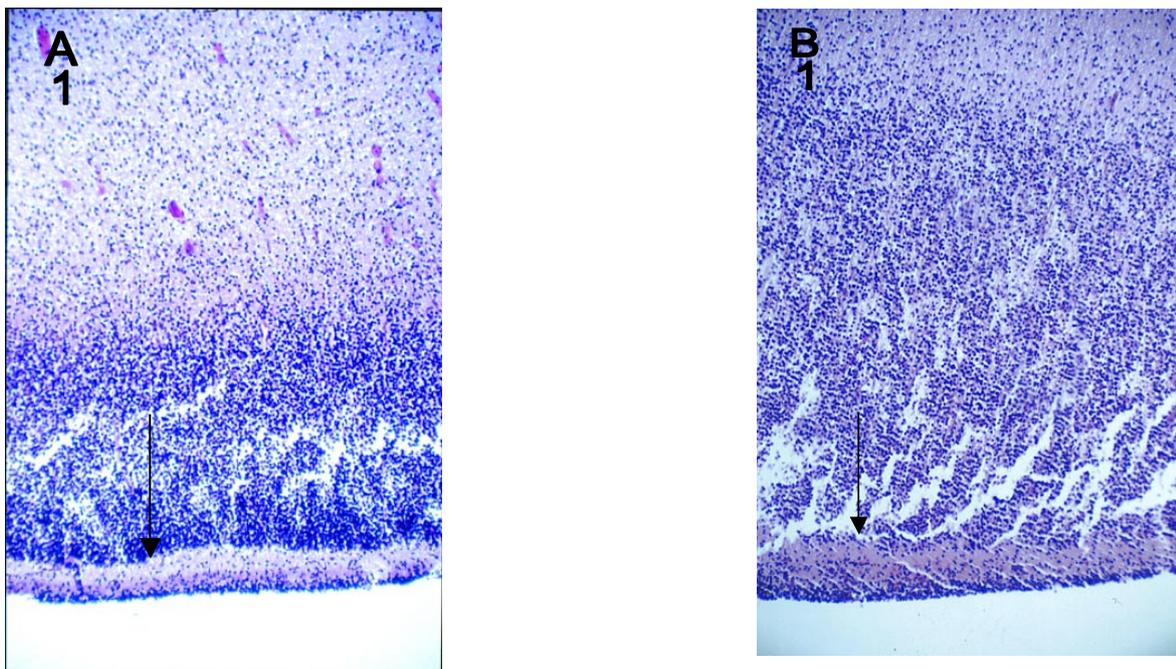


Abbildung 3: Cortex cerebri, HE-Färbung

Dargestellt sind zwei histologische Präparate der Cortex cerebri (Großhirnrinde), äußere Körnerschicht (Pfeil). A1 zeigt den Sektionsbefund des Fetus, B1 stellt einen altersentsprechenden Normalbefund dar. In beiden Präparaten ist eine Ausdifferenzierung noch nicht nachweisbar.

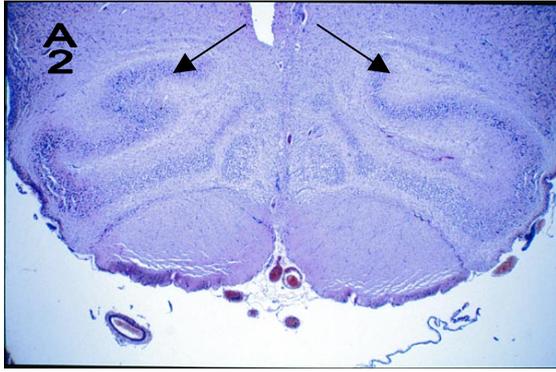


Abbildung 4: Medulla oblongata, HE-Färbung

Dargestellt sind zwei histologische Präparate der Medulla oblongata, der Pfeil deutet auf den Nucleus olivaris inferior. A2 zeigt den Sektionsbefund des Fetus, B2 stellt einen altersentsprechenden Normalbefund dar. In beiden Präparaten ist eine Ausdifferenzierung der Nervenzellen noch nicht nachweisbar, regelrechter Nucleus olivaris inferior.

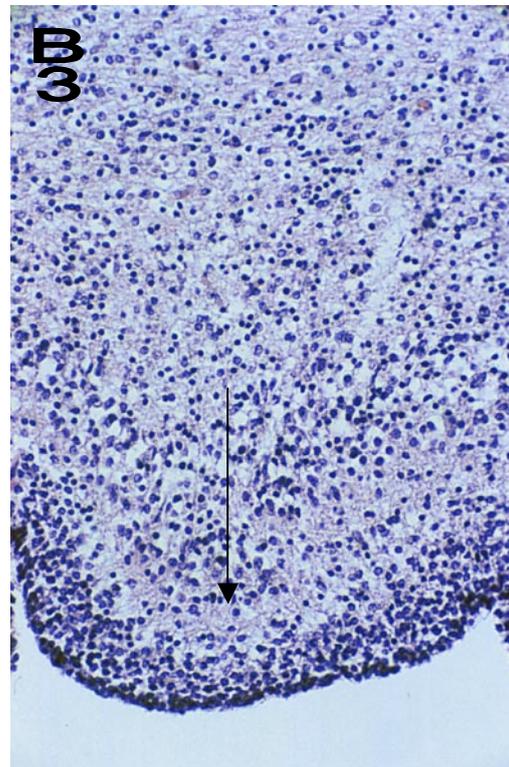
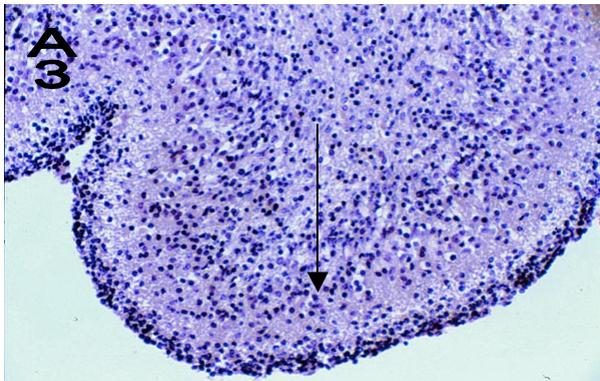


Abbildung 5: Kleinhirnrinde, HE-Färbung

Dargestellt sind zwei histologische Präparate der Kleinhirnrinde, äußere und innere Körnerschicht (Pfeil). A3 zeigt den Sektionsbefund des Fetus, B3 stellt einen altersentsprechenden Normalbefund dar. In beiden Präparaten ist eine Ausdifferenzierung der Purkinjenzellen noch nicht nachweisbar.

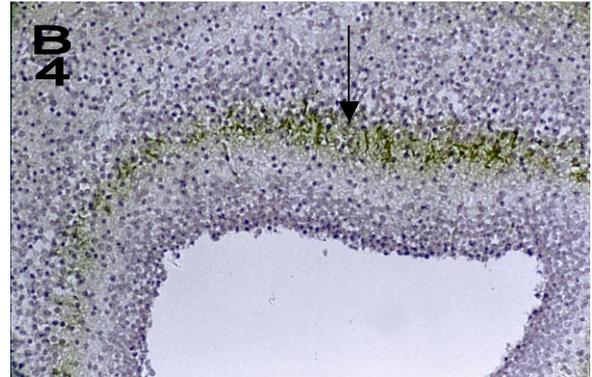
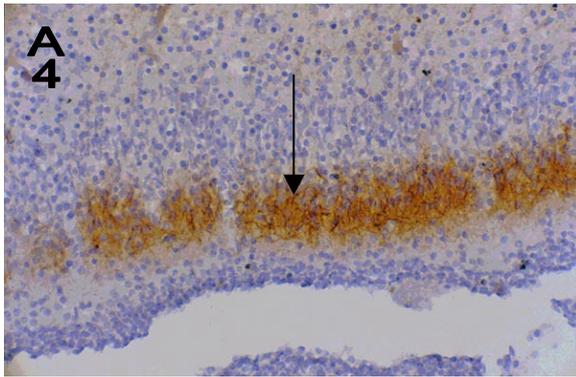


Abbildung 6: Kleinhirnrinde, immunhistochemische Markierung Neurofilament (NF)

Dargestellt sind zwei histologische Präparate der Kleinhirnrinde. Neurofilamente, Axone und kleine Zellen (Pfeil) sind immunhistochemisch markiert. A4 zeigt den Sektionsbefund des Fetus, B4 stellt einen altersentsprechenden Normalbefund dar. In beiden Präparaten altersgerechte Entwicklung.

3.3 Bruchpunktbestimmung

3.3.1 Karyotyp

Die zytogenetische Untersuchung an Zellen aus der Nabelschnur erfolgte am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Hierzu wurden Karyogramme von GTG-gebänderten Metaphasechromosomen untersucht. Der pränatale Befund konnte hierbei bestätigt werden. Das Ergebnis der konventionellen zytogenetischen Nachuntersuchungen aus kultivierten Fibroblasten aus der Nabelschnur des verstorbenen Feten zeigte demnach einen weiblichen Karyotyp mit Mosaik für Monosomie des Chromosoms 4 bzw. Ringchromosom 4 (45, XX, -4/46, XX, r(4)) [41]. Es wurden 6 Metaphasen analysiert. In 2 Metaphasen fehlte ein Chromosom 4. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine mitotische Instabilität des Ringchromosoms [2] zurückzuführen, ein Phänomen, das bei zahlreichen Ringchromosomen beobachtet wurde. Dementsprechend lag ein Mosaik vor. Die Bruchpunkte von Chromosom 4 lagen vermutlich in dem Bereich p16 und q33, so dass in jedem Fall ein Verlust an genetischem Material zu beobachten war. Daraus ergab sich die Karyotypformel: r(4)(p16; q33) (Abbildung 7 und Abbildung 8).

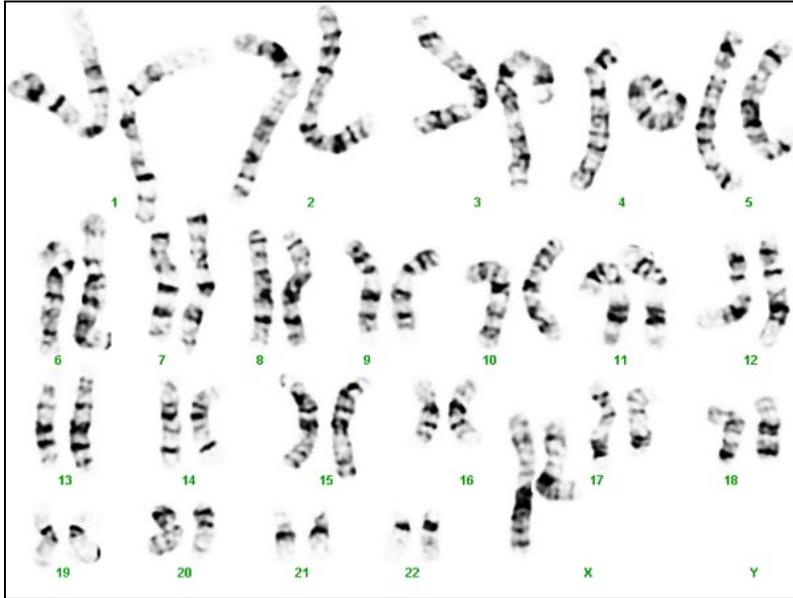


Abbildung 7: Karyogramm des untersuchten Feten mit einem normalen Chromosom 4 und einem Ringchromosom 4.

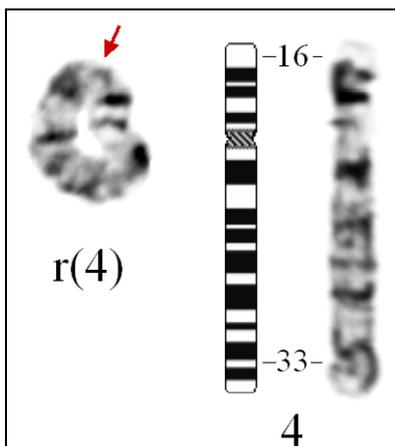


Abbildung 8: Karyotyp 45, XX, -4/46, XX, r(4)(p16;q33).

Der Pfeil kennzeichnet die Verschmelzung der beiden Enden.

3.3.2 Auswahl der PAC/BAC-Klone

Zur genaueren Kartierung der Bruchpunkte und somit der deletierten Chromosomenenden mussten spezifische Sonden für die FISH-Untersuchungen an unterschiedlichen Bruchpunktregionen hergestellt werden. Hierzu waren mehrere Schritte erforderlich. Zuerst wurden mithilfe von Datenbankrecherchen geeignete BAC- bzw. PAC-Klone aus den jeweiligen zytogenetisch bestimmten Bruchregionen ausgewählt. Die PAC-Klone wurden freundlicherweise von Dr. Sabine Endeke zur Verfügung gestellt [42]. Die BAC-Klone wurden nach bekannten Markern oder Genen, die auf dem NCBI Map Viewer verzeichnet sind

und mit Hilfe der Datenbanken <http://genomics.med.upenn.edu/genmapdb> und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ausgesucht und bei verschiedenen Distributoren (RZPD Humanes Ressourcenzentrum Berlin, Qbiogene France) bestellt. Alle ausgewählten Klone und die Telomer-Proben sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die 4p- und 4q-Telomersonden und die Zentromersonde wurden über Qbiogene (Frankreich) bezogen und entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Hybridisierung (Abb.:9 und Abb.:10) mit den Chromosom 4q- und 4p-Telomer-Proben zeigten erwartungsgemäß den Verlust beider Telomerenden. Bei der Entstehung des Ringchromosoms und der Verschmelzung von langem und kurzem Arm sind die Enden jeweils verloren gegangen. Das Zentromer zeigte sich auch beim Ringchromosom erhalten.

4p- und 4q-Telomersonden

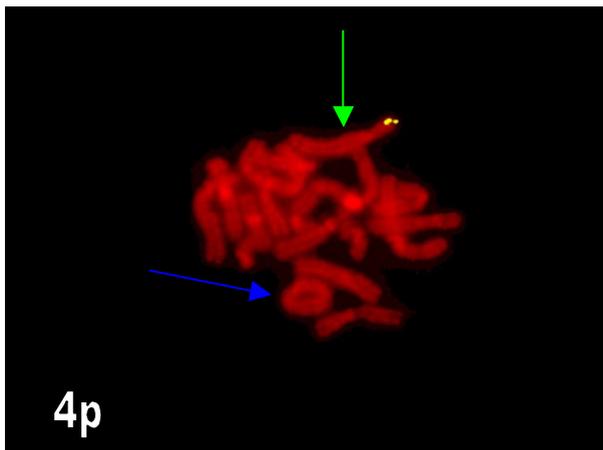


Abbildung 10: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit der 4p-Telomer-Sonde.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab nur auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und nicht auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und ist somit bei der Entstehung des Ringchromosoms verloren gegangen und liegt demnach distal des zytogenetisch determinierten Bruchpunkts.

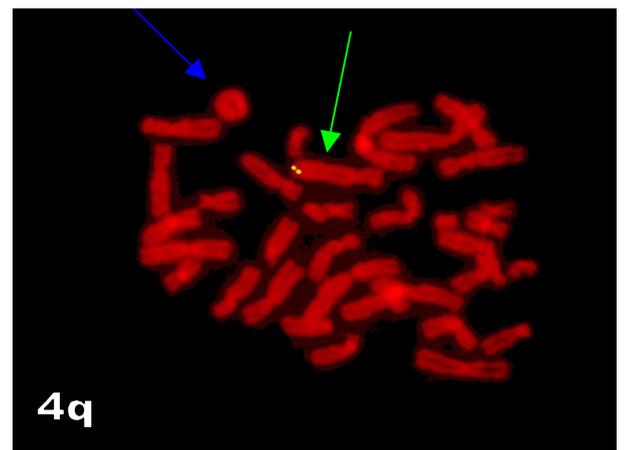


Abbildung 9: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit der 4q-Telomer-Sonde an Metaphasechromosomen des Patienten.

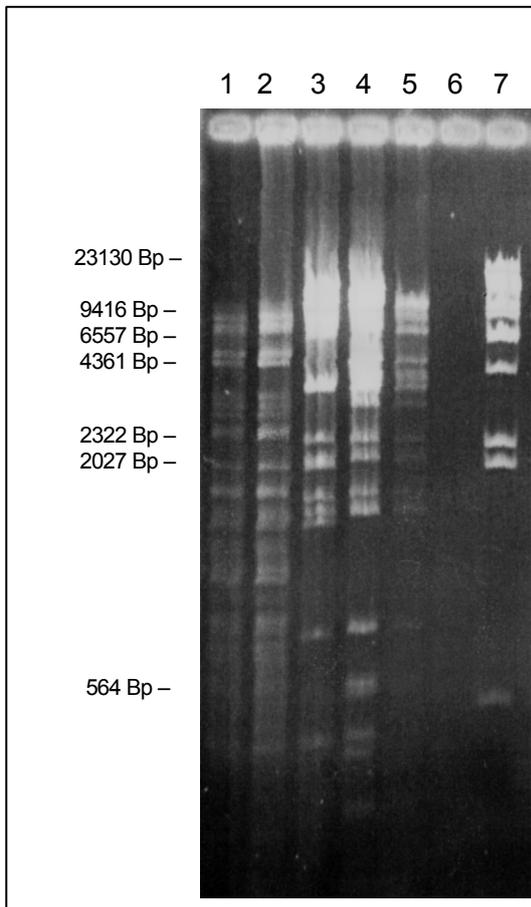
Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab nur auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und nicht auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und ist somit bei der Entstehung des Ringchromosoms verloren gegangen und liegt demnach distal des zytogenetisch determinierten Bruchpunkts.

3.3.3 Verifizierung der identifizierten PAC/BAC-Klone

Nach erfolgreicher Anzucht der BAC- und PAC-Klone wurde die Plasmid-DNA isoliert und von der jeweils gewonnenen DNA eine definierte Menge für die restriktionsenzymatische Spaltung mit *EcoRI* eingesetzt. Die erhaltenen Restriktionsfragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt, um die gewonnene DNA qualitativ und quantitativ beurteilen zu können. Exemplarisch sind in Abbildung 11 die Produkte der mit *EcoRI* restriktionsenzymatisch gespaltenen DNA der Klone RP11-129P5, RP11-121C2 und RP11-300F20 dargestellt.

Die PAC-Klone wurden mittels PCR und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte und die BAC-Klone durch Direktsequenzierung auf ihre Richtigkeit und Identität überprüft. In der Vorbereitung für die Sequenzierung wurde die Qualität der PCR-Produkte mittels gelelektrophoretischer Auftrennung getestet. Exemplarisch ist die Auftrennung der PCR-Produkte der PAC-Klone RP11-129P5 und RP11-300F20 in Abbildung 12 dargestellt. Als Beispiel für die direkte Sequenzierung von BAC-Klonen ist in Abbildung 13 die Sequenz von BAC-Klon RP11-478A6 abgebildet. Für den Homologievergleich der Sequenzen mit den Sequenzen des Humangenoms wurde das Computerprogramm „BLASTN“ (NCBI) benutzt. In Abbildung 14 ist exemplarisch das Ergebnis eines Homologievergleiches der Sequenz des BAC-Klons RP11-478A6 dargestellt. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

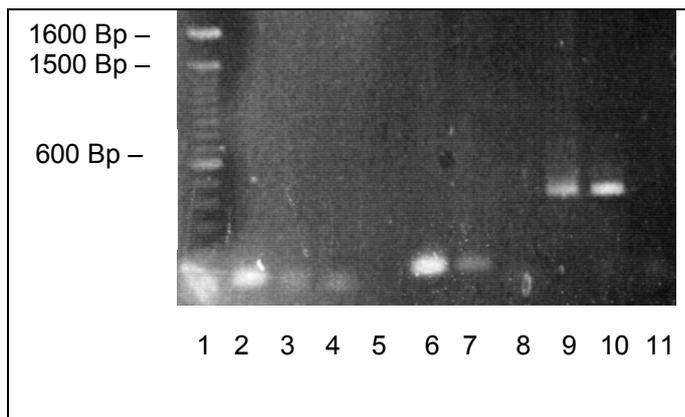
Nur die auf diese Art und Weise, verifizierten Klone wurden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung verwendet, um die Verwendung von falsch lokalisierten Klonen und die Hybridisierung mit Pseudogenen auszuschließen.



(Abb.11):
 1: BAC-Klon 300F20
 2: BAC-Klon 300F20
 3: BAC-Klon 121C2
 4: BAC-Klon 129P5
 5: BAC-Klon 129P5
 6: leer
 7: alpha x Hind III

Abbildung 11: Darstellung der Restriktionsfragmente (Enzym EcoRI) der BAC-DNA im Agarosegel

Gelelektrophoretische Auftrennung der BAC-Klone 300F20, 121C2 und 129P5.



(Abb.12):
 1: 100 Bp Leiter
 2: BAC-Klon 129P5 mit Primer 3-5'/3'
 3: pos. Kontrolle mit Primer 3-5'/3'
 4: neg. Kontrolle mit Primer 3-5'/3'
 5: leer
 6: BAC-Klon 129P5 mit Primer 5-5'/3'
 7: pos. Kontrolle mit Primer 5-5'/3'
 8: neg. Kontrolle mit Primer 5-5'/3'
 9: BAC-Klon 300F20 mit Primer D4S43-2A/2B
 10: pos. Kontrolle mit Primer D4S43-2A/2B
 11: neg. Kontrolle mit Primer D4S43-2A/2B

Abbildung 12: Darstellung der PCR-Produkte im Agarosegel

Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der Klone RP11-129P5 und RP11- 300F20 auf einem 1,5% Agarosegel. Die Banden entsprechen den zu erwarteten Größen der PCR-Produkte. Die Sequenzierung bestätigte die konkrete Herkunft der Klone aus der Region 4p16.3 beziehungsweise 4q 33 (Siehe Abbildung 14).

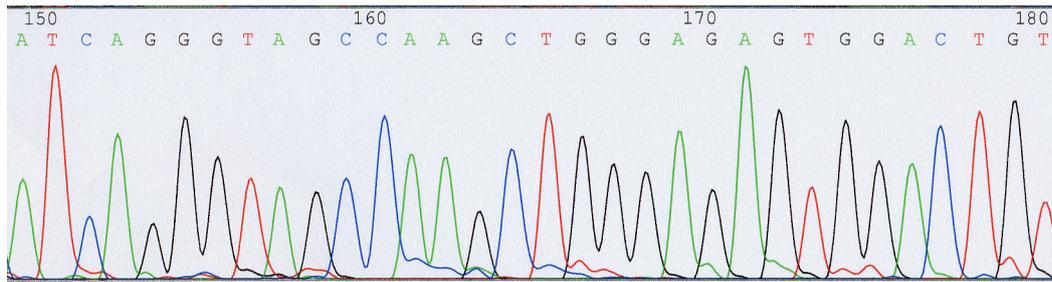


Abbildung 13: Ausschnitt des Sequenzchromatogramm von BAC 478A6

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Chromatogramms der Sequenzierung von BAC-Klon RP11-478A6, sequenziert mit dem Primer SP6. Das Chromatogramm verdeutlicht, dass die Qualität der Sequenzierung sehr gut war, was bei der direkten Sequenzierung von BAC-Klonen nicht immer üblich ist.

BAC-Klon RP11-478A6

```

ref|NT_022865.10|Hs4_23021 Homo sapiens chromosome 4 reference genomic contig
Length = 1105337

Score = 602 bits (313), Expect = e-170
Identities = 315/316 (99%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1      ggccccgcaccattccagcgcccgaaccagtcgccgtcgaggccaagccgagacctgtga 60
             |||
Sbjct: 954743 ggccccgcaccattccagcgcccgaaccagtcgccgtcgaggccaagccgagacctgtga 954802

Query: 61      gtgtggggcattctcagcaggcactggcttgcaggcatcagggttagccaagctgggagagt 120
             |||
Sbjct: 954803 gtgtggggcattctcagcaggcactggcttgcaggcatcagggttagccaagctgggagagt 954862

Query: 121     ggactgtgtgggcctgtgggggactgggctccccccagggtgaggggtgactggaccag 180
             |||
Sbjct: 954863 ggactgtgtgggcctgtgggggactgggctccccccagggtgaggggtgactggaccag 954922

Query: 181     accaggaacactaaatgacccccacccccacccccactccccacagagagggaaaccagct 240
             |||
Sbjct: 954923 accaggaacactaaatgacccccacccccacccccactccccacagagagggaaaccagct 954982

Query: 241     gaccggagcccaccagtggttcccacactctaccactgtggtcctataagtaggtg 300
             |||
Sbjct: 954983 gaccggagcccaccagtggttcccacactctaccactgtggtcctataagtaggtg 955042

Query: 301     ttgagtggagctgtca 316
             |||
Sbjct: 955043 ttgagtggagctgtca 955058

```

Abbildung 14: Homologievergleich

Gezeigt wird das Ergebnis des Homologievergleiches von BAC-Klon RP11-478A6 mit der human genomischen Sequenz mit Hilfe des Programms BLASTN. Der fett gedruckte Bereich entspricht der Sequenz aus Abbildung 13. Die vertikalen Linien zeigen identische Basenpaare zwischen der DNA-Sequenz des BAC-Klons RP11-478A6 und der human genomischen Sequenz. Die Zahlenangaben am ersten und letzten Nukleotid in einer Sequenzreihe geben jeweils die Nukleotidpositionen innerhalb der DNA-Sequenz an. Das Programm gibt auch die Sequenzidentität (315/316) mit 99% und die Contig-nr. NT_022865 an.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse für die PAC-Klone dargestellt. Die PAC-Klone PJ-129P5, PJ-121C2 PJ-184O23, PJ-111E4 und PJ-300F20 wurden von Dr. S. Endele [42] zur Verfügung gestellt und wie oben beschrieben identifiziert und verifiziert.

PAC-Klone	Primerpaar	Ergebnisse des Homologievergleichs (BLASTN)		
		NT-Contig/BAC-Klon	Position	Identität
PJ-129P5	5-5'	AC093879	63983 –64001	100%
	5-3'	HS4PTEL	95603- 95521	94%
	3-5'	BC028359	100- 169	100%
	3-3'	BC028359	149-70	100%
PJ-121C2	D4S227A	NT_006111	731168- 731107	100%
	D4S227B	NT_006111	731137- 731208	96%
PJ-184O23	4F	AC016773	177527- 177598	98%
	15F	n.b.		
PJ-111E4	D4S166A	NT_022865	618026- 618228	100%
	D4S166B	NT_022865	618749- 618468	100%
PJ-300F20	D4S43A	NT_022865	618771- 618510	100%
	D4S43B	n.b.		

Tabelle 2: Aufgeführt sind alle PAC-Klone und das für die PAC-Klon Identifizierung notwendige Ergebnis der Sequenz-Datenanalyse. Die Datenanalyse der Nukleotidsequenzen erfolgte über die Datenbank GenBank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) mit dem Programm BLASTN. Aufgelistet sind jeweils die Contig-nr., die Nukleotidpositionen innerhalb der DNA-Sequenz und die Sequenzidentität. Abweichungen der Homologie von 100% sind vermutlich auf Sequenzierfehler zurückzuführen

Um den Bruchpunkt weiter einzugrenzen, wurden weitere BAC-Klone ausgewählt. Die BAC-Klone wurden über das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) aus der BAC library RPCIB753 bestellt und durch DNA Direktsequenzierung überprüft, es wurden die vektorspezifischen Primer: T7A/ SP6 verwendet. Die Ergebnisse der Sequenzierung und des Homologievergleichs sind in Tabelle 3 dargestellt.

BAC-Klone	Vektorspezifische Primer	Ergebnisse des Homologievergleichs BLASTn		
		NT-Contig/	Position	Identität
RP11-478A6	T7A	n.b.		
	SP6	NT_022865	954743- 955058	99%
RP11-7A6	T7A	NT_006051	1076036-1075772	97%
	SP6	NT_006051	1076040-1075765	99%
RP11-81L15	T7A	NT_006344	1444687 - 1445078	100%
	SP6	NT_006344	1444687-1445078	100%
RP11-119N7	T7A	AC097714	89129- 89204	90%
	SP6	AC097714	89129-89204.....	90%
RP11-648O9	T7A/ SP6			
RP11-4D13	T7A	n. b.		
	SP6	AC013303.....	154838276-154838382	99%
RP11-79K2	T7A	NT_006118	1947380-1947118	99%
	SP6	NT_006118	1786958-1787278	99%
RP11-274E20	T7A/ SP6			
RP-11-177L7 (Chr.9)	T7A	NT_008470	3324660-3324242	99%
	SP6	NT_008470	3149556-3149776	97%
RP11-199O10 (Chr.4)	T7A	AC105148	2006-2323	100%
	SP6	AC092621	6092- 5911	95%

Tabelle 3: Aufgeführt sind alle BAC-Klone und das mit Hilfe des BLASTN-Programms ermittelte Ergebnis der Nukleotidsequenzdatenanalyse (Datenbank GenBank des NCBI (National Center for Biotechnology Information)). Aufgelistet sind jeweils die Contig-nr., die Nukleotidpositionen innerhalb der DNA-Sequenz und die Sequenzidentität.

In einem ersten Schritt konnte die Hybridisierung der 4p- und 4q-Telomersonden erwartungsgemäß den Verlust beider Telomerenden zeigen. Anschließend wurden systematisch die ausgewählten Sonden (siehe Tabelle 1) der Reihe nach verifiziert und anschließend für die FISH eingesetzt. Dabei wurden zunächst die distal gelegenen Sonden eingesetzt, um sich der Bruchstelle schrittweise zu nähern. Die PAC-Klone PJ-129P5, PJ-121C2, PJ-184O23, PJ-111E4 und PJ-

300F20 konnten erfolgreich verifiziert werden und für die FISH eingesetzt werden. Um den Bruchpunkt weiter einzugrenzen, wurden die proximal von 4p16.3 gelegenen BAC-Klone RP11- 478A6, RP11-7A6, RP11-81L15, RP11-119N7 und RP11-90I1 ausgewählt. Dabei konnten die BAC-Klone RP11- 478A6, RP11-7A6, RP11-81L15 und RP11-119N7 problemlos mittels Direktsequenzierung identifiziert werden. Der anfänglich ausgewählte BAC-Klone RP11-90I1 (Lokalisation FISH-Map bei 4p15.1, siehe Tabelle 1) wurde nicht mehr verifiziert, da der Bruchpunkt schon vorher durch die Hybridisierung von RP11-7A6, RP11-81L15 und RP11-119N7 eingegrenzt werden konnte.

Um den Bruchpunkt auf dem langen Arm des Chromosoms 4 im Bereich 4q33 näher einzugrenzen, wurden die BAC-Klone RP11-648O9, RP11-4D13, RP11-177L7, RP11-199O10, RP11-79K2 und RP11-274E20 ausgewählt. Die Klone RP11-4D13 und RP11-79K2 konnten problemlos mittels Direktsequenzierung identifiziert werden. RP11-648O9 und RP11-274E20 konnten nicht erfolgreich sequenziert werden. Die FISH war jedoch mit allen 4 BAC-Klonen erfolgreich (s. Kapitel 3.3.4). Da laut Map Viewer der Klon RP11-648O9 proximal von RP11-4D13 und der Klon RP11-274E20 distal von RP11-79K2 lokalisiert wurde, konnte man mit RP11-648O9 und RP11-274E20 den Bruchpunkt nicht näher eingrenzen. Deshalb wurden zwei weitere dem Bruchpunkt nähergelegene BAC-Klone ausgewählt: RP11-177L7 und RP11-199O10. Die Sequenzanalyse von RP11-177L7 ergab jedoch eine Position auf Chromosom 9 und wurde deshalb für die FISH nicht verwendet. Der BAC-Klon RP11-199O10 konnte ebenso identifiziert werden, ergab jedoch eine Position auf Chromosom 4 und wurde deshalb ebenfalls nicht verwendet. Die Ergebnisse der FISH mit den ausgewählten Sonden sind in Kapitel 3.3.4 dargestellt.

3.3.4 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Alle verifizierten Klone wurden mittels Nick-translation mit Biotin markiert. Für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurden die Fibroblastenkulturen verwandt, die, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, hergestellt wurden. Nach der hochauflösenden Chromosomenpräparation (siehe Kapitel 2.7.2) wurden die Objektträger mit den Metaphasechromosomen denaturiert (siehe Kapitel 2.7.3). Die Hybridisierung, Detektion und Amplifikation der Signale und die anschließende Färbung der

Präparate erfolgte wie unter **2.7.4** bis **2.7.6** (siehe Seite 23) beschrieben. Die Ergebnisse der FISH werden im Folgenden dargestellt.

In der FISH hybridisierten alle 5 PAC-Klone PJ-129P5, PJ-121C2, PJ-184O23, PJ-111E4 und PJ-300F20 auf dem kurzen Arm des normalen Chromosoms 4 und nicht auf dem Ringchromosom 4 und liegen demnach distal des zytogenetisch determinierten Bruchpunkts. Exemplarisch sind die Bilder der FISH der PAC-Klone PJ-129P5, PJ-121C2 und PJ-111E4 in den Abbildungen 18, 19 und 20 gezeigt. Um den Bruchpunkt auf dem kurzen Arm weiter einzugrenzen wurde eine FISH mit den BAC-Klonen RP11- 478A6, RP11-7A6, RP11-81L15, RP11-119N7 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser FISH sind in den Abbildungen 21, 22, 23 und 24 dargestellt. Die BAC-Klone RP11- 478A6 und RP11-7A6 hybridisierten auf dem kurzen Arm des normalen Chromosoms 4 und nicht auf dem Ringchromosom 4 und sind somit bei der Entstehung des Ringchromosoms verloren gegangen. Die BAC-Klone RP11-81L15 und RP11-119N7 zeigten ein Signal auf dem kurzen Arm des normalen Chromosoms 4 und auf dem Ringchromosom 4 und hybridisierten somit proximal des Bruchpunkts. Damit lässt sich der Bruchpunkt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 zwischen RP11-7A6 und RP11-81L15 auf wenige Megabasenpaare genau lokalisieren. Wie Datenbankanalysen zeigen (Stand 11/2000) handelt es sich um einen Bereich von 9,7 Mb Größe.

Um den Bruchpunkt auf dem langen Arm des Chromosoms 4 im Bereich 4q33 näher einzugrenzen, wurden die BAC-Klone RP11-648O9, RP11-4D13, RP11-79K2 und RP11-274E20 zur FISH eingesetzt. Der Bruchpunkt liegt in einem 22 Mb großen Intervall zwischen RP11-4D13 und RP11-79K2. Aktuelle Datenbankrecherchen mit dem Programm Clone Registry (NCBI) bestätigen den Befund. Die Größe des Intervalls wird auf 23,8 Mb korrigiert.

Die Daten der FISH sind in Abbildung 25 nochmals zusammengefasst.

BAC Klone	Marker	Lokalisation Map Viewer (Mbp) Stand 11.2000 / 08.2002 / 01.2007	Lokalisation FISH-Map
RP11-478A6	D4S1233	4,7 / 2,5 / 2,5	4p16.3
RP11-7A6	D4S1276, MSX1	7,1 / 4,8 / 5,0	4p16.2
RP11-81L15	D4S1511	16,5 / 14,8 / 14,7	4p15.3
RP11-119N7	D4S863	27,5 / 26,3 / 25,9	4p15.1-15.2
RP11-648O9	D4S2677	112,1 / - /	4q32-33
RP11-4D13	D4S575	154,8 / - /	4q32
RP11-177L7	D4S866	165,7 / - / 165,3	4q32
RP11-199O10	D4S882	169,5 / - / 169,1	4q33
RP11-79K2	SHGC-84154	177,4 /179,2 / 178,6	4q34
RP11-274E20	D4S3128	184,8 /190,7 / 185,9	4q35

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt den aktualisierten Stand der Lokalisation der BAC-Klone. Benutzt wurde das Programm Clone Registry der Datenbank des NCBI. Die Daten werden mit dem Stand 11/2000 verglichen.

Sonden für den distalen Abschnitt von 4q

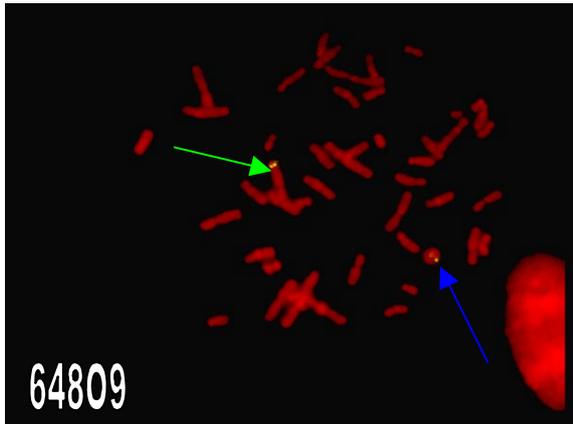


Abbildung 14: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit dem BAC 64809.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und hybridisierte somit proximal des Bruchpunkts.

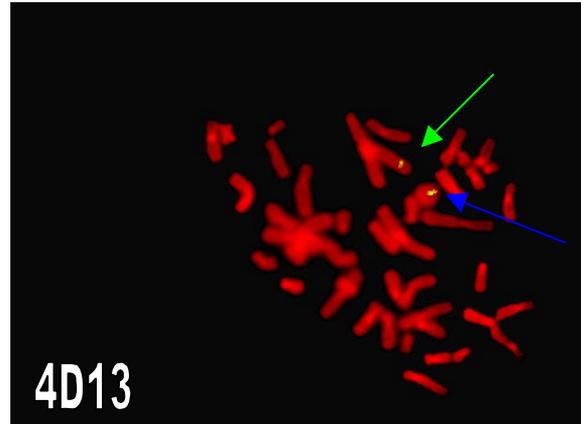


Abbildung 15: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit dem BAC 4D13.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und hybridisierte somit proximal des Bruchpunkts.

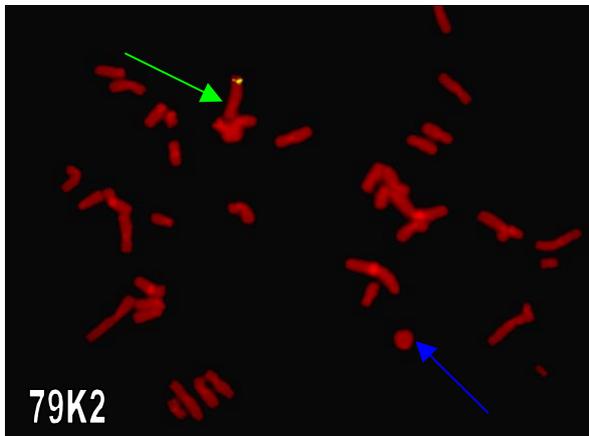


Abbildung 16: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit dem BAC 79K2.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab nur auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und nicht auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und ist somit bei der Entstehung des Ringchromosoms verloren gegangen und liegt demnach distal des zytogenetisch determinierten Bruchpunkts.

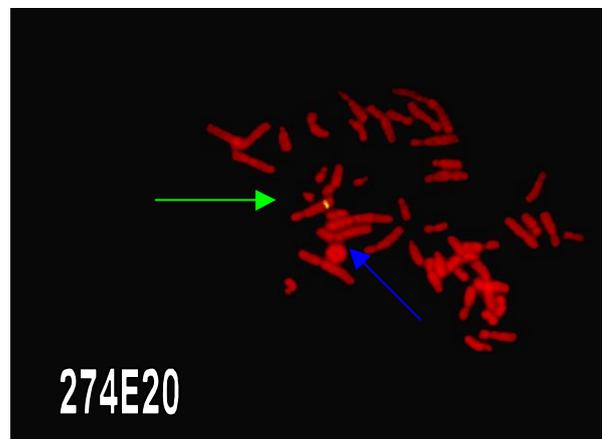


Abbildung 17: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit dem BAC 274E20.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab nur auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und nicht auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und ist somit bei der Entstehung des Ringchromosoms verloren gegangen und liegt demnach distal des zytogenetisch determinierten Bruchpunkts.

Sonden für den distalen Abschnitt von 4p

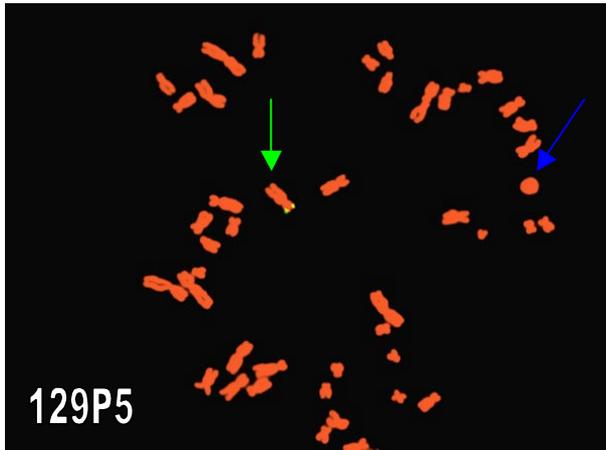


Abbildung 18: Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit dem PAC 129P5.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab nur auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und nicht auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und ist somit bei der Entstehung des Ringchromosoms verloren gegangen. Sie liegt demnach distal des zytogenetisch determinierten Bruchpunkts.

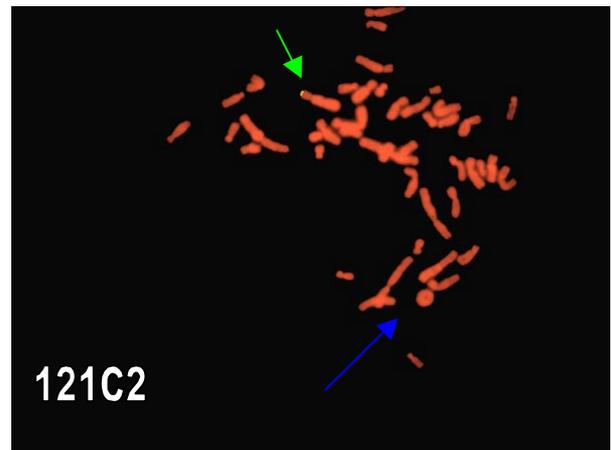


Abbildung 19: Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit dem PAC 121C2 .

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab nur auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und nicht auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und ist somit bei der Entstehung des Ringchromosoms verloren gegangen. Sie liegt demnach distal des zytogenetisch determinierten Bruchpunkts.

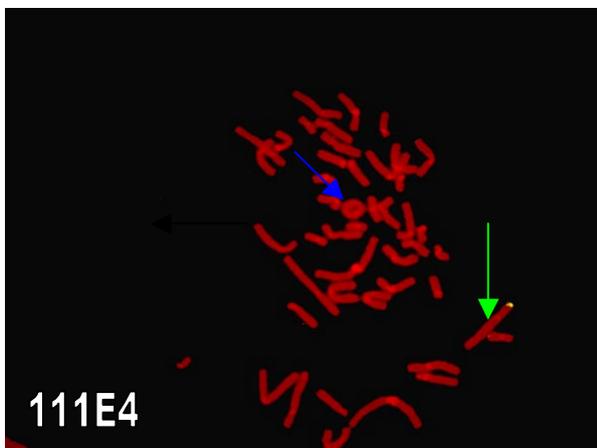


Abbildung 20: Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit dem PAC 111E4.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab nur auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und nicht auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und ist somit bei der Entstehung des Ringchromosoms verloren gegangen. Sie liegt demnach distal des zytogenetisch determinierten Bruchpunkts.

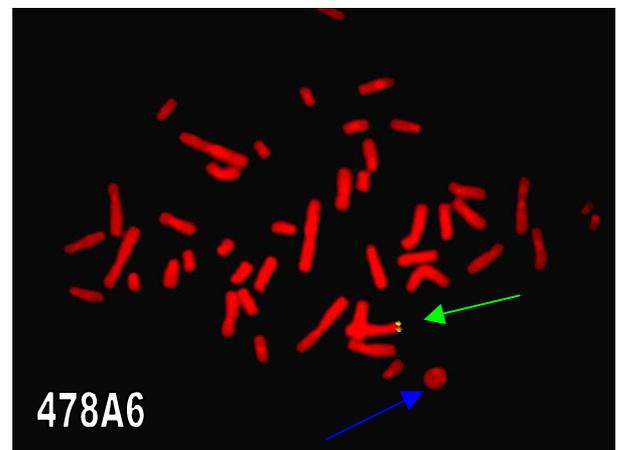


Abbildung 21: Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit dem BAC 478A6.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab nur auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und nicht auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und ist somit bei der Entstehung des Ringchromosoms verloren gegangen. Sie liegt demnach distal des zytogenetisch determinierten Bruchpunkts.

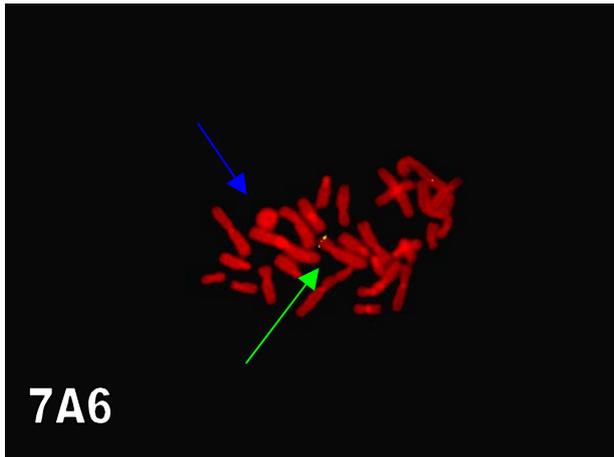


Abbildung 22: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit dem BAC 7A6.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab nur auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und nicht auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und ist somit bei der Entstehung des Ringchromosoms verloren gegangen. Sie liegt demnach distal des zytogenetisch determinierten Bruchpunkts.

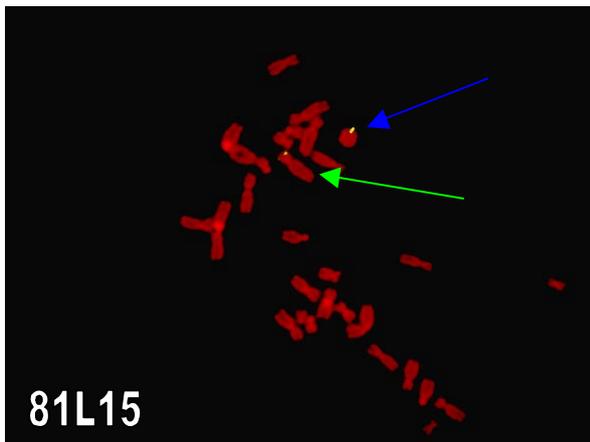


Abbildung 23: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit dem BAC 81L15.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und hybridisierte somit proximal des Bruchpunkts.

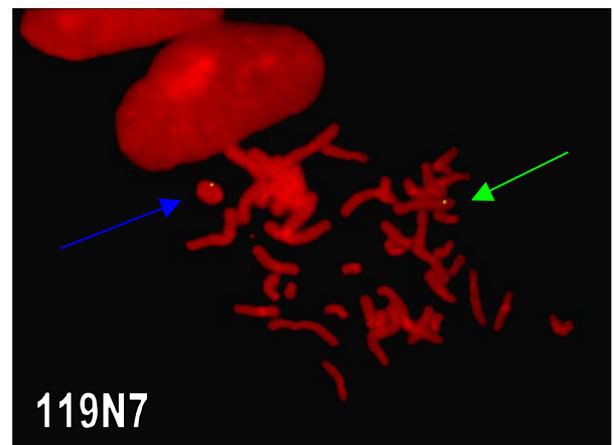


Abbildung 24: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit dem BAC 119N7.

Die gelb-fluoreszierende Sonde ergab auf dem normalen Chromosom 4 (grüner Pfeil) und auf dem Ringchromosom 4 (blauer Pfeil) ein Signal und hybridisierte somit proximal des Bruchpunkts.

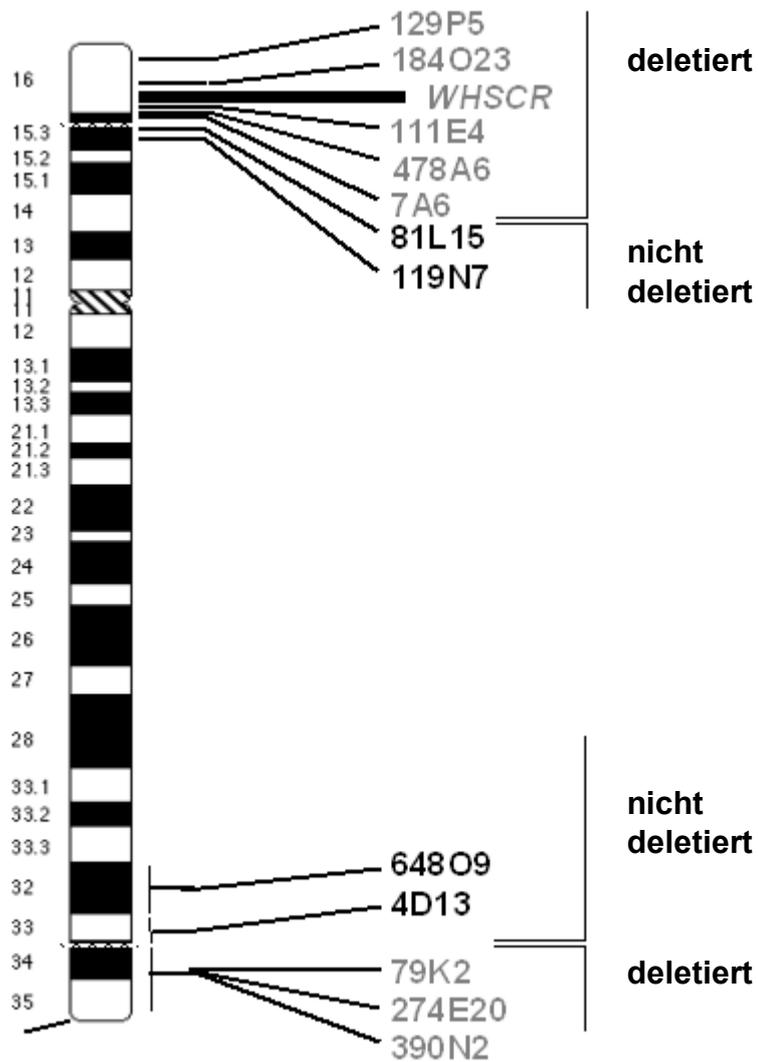


Abbildung 25: Schematische Zusammenfassung der FISH-Ergebnisse

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte die chromosomale Veränderung bei einem Patienten mit komplexen Fehlbildungen zytogenetisch und molekularzytogenetisch charakterisiert werden. Es handelt sich um einen Feten mit einem weiblichen Karyotyp mit Mosaik für Monosomie des Chromosoms 4 bzw. Ringchromosom 4 (45, XX, -4/46, XX, r(4)). Die Bruchpunkte des Ringchromosoms konnten mit molekularen Methoden eingegrenzt werden. Aktuellen Datenbankrecherchen zufolge konnte der Bruchpunkt auf dem langen Arm des Chromosoms 4 in einem 23,8 Mb großen Intervall zwischen den Klonen RP11- 4D13 und RP11- 79K2, also vermutlich in der Bande 4q33 lokalisiert werden. Und der Bruchpunkt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 konnte zwischen den Klonen RP11- 7A6 (4p16.2) und RP11- 81L15 (4p15.3) in einem 9,7 Mb großen Intervall lokalisiert werden.

4.1 Das 4q-Deletions-Syndrom

Terminale Deletionen mit dem Bruchpunkt in 4q33 verursachen das 4q-Deletions-syndrom [14]. Als Hauptmerkmal dieses Syndroms gelten Robin-Sequenz, typische Gesichtsdysmorphie (kleine Nase mit nach oben gerichteten Nasenlöchern, Mikrognathie und Gaumenspalte), Fehlbildungen der Gliedmaßen, Entwicklungsverzögerung und verschiedene Herzfehler, wie Aortenisthmusstenose, Aortenklappenstenose, Ventrikelseptumdefekte, Vorhofseptumdefekte und Pulmonalstenose [14], [7], [43].

Robertson et al. berichten von einem Patienten mit einer sehr kleinen interstitiellen Deletion 46,XY, del(4)(q31.1q31.3), der die typischen Merkmale des 4q-Deletions-Syndroms aufweist [13]. Sie schlagen die Region 4q31 als kritische Region vor, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Deletionsgröße mit Hilfe von zytogenetischen Methoden (GTG-Bänderung) bestimmt wurde und möglicherweise nicht exakt ist.

Keeling et al. schlagen als kritische Region den Bereich 4q33 vor [14]. In ihrer Arbeit vergleichen sie unterschiedlich große Deletionen von 4q32, 4q33 und 4q34-pter mit den entsprechenden klinischen Merkmalen und kommen zu dem Schluss, dass vor allem Deletionen im Bereich 4q33 den typischen Phänotyp einschließlich Fehlbildungen der Extremitäten zur Folge haben. In der Arbeit von Keeling et al. fehlen jedoch genaue Angaben [14], mit welchen Methoden die Deletionsgrößen

ermittelt wurden. Auf die Arbeit von Robertson et al. und die dort vorgeschlagene kritische Region 4q31 [13] wird nicht eingegangen, obwohl dort ebenfalls Fehlbildungen der Extremitäten beschrieben werden. Die Aussagen dieser Autoren bleiben also widersprüchlich.

Townes et al. berichten über den Sektionsbefund eines Patienten mit einer 4q-Deletion, Bruchpunkt bei 4q31-qter [7]. Bei dem Patienten handelte es sich um ein männliches Frühgeborenes mit 30 Schwangerschaftswochen, Geburtsgewicht 1295g, Apgar 1/1. Der Patient verstarb eine Stunde nach der Geburt (Kaiserschnitt). Die postmortale Untersuchung ergab: Hypertelorismus, auffällige Nase mit nach vorne gerichteter Nasenöffnungen, Mikrognathie, Retrognathie, tief sitzende Ohren, hypoplastische Mamillen, Klinodaktylie der fünften Finger und Zehen, hypoplastische Zehennägel. Die postmortale Autopsie ergab keinen Anhalt für innere Fehlbildungen. Der histopathologische Befund von Lunge, Jejunum und Pankreas zeigte keine angeborenen Fehlbildungen [7]. Townes et al. vergleichen in ihrer Arbeit die Ergebnisse ihres Patienten mit drei anderen Fällen aus der Literatur und schlagen ebenfalls die Region 4q31-qter als kritische Region vor.

Tomkins et al. berichten über zwei Fälle von 4q-Deletionen mit Bruchpunkt in 4q33 und vergleichen den Schweregrad der klinischen Merkmale mit den Deletionsgrößen mit 19 anderen Fällen aus der Literatur [16]. Dabei wird deutlich, dass das Ausmaß der Wachstumsretardierung mit der Deletionsgröße korreliert. Gesichtsdysmorphien, Mittelliniendefekte, Herzfehler und Gliedmaßenfehlbildungen scheinen häufiger in großen Deletionen mit Bruchpunktlokalisierung in 4q31 aufzutreten. Hierbei scheint es Ausnahmen zu geben, da in einzelnen Fällen Gesichtsdysmorphien, Herzfehler und Extremitätenfehlbildungen auch bei Deletionen mit Bruchpunkt in 4q33 beschrieben wurden [16].

Berücksichtigt werden muss allerdings bei diesen Studien, dass zum damaligen Zeitpunkt die Bruchpunkte nur mit Hilfe von zytogenetischen Methoden (GTG-Bänderung) bestimmt wurden. Daher waren eine genaue Lokalisation und die Erstellung einer exakten Phänotyp-Karte nur bedingt möglich. Dies ist vermutlich einer der Hauptgründe für die widersprüchlichen Vorschläge in Bezug auf die mögliche kritische Region.

Die klinischen Merkmale im vorliegenden Fall umfassen eine intrauterine Wachstumsretardierung, linksseitige Zwerchfellhernie, Gesichtsdysmorphien mit tiefsitzenden Ohren, abgeflachte Gesichtsform und Nasenrücken, eine

doppelseitige komplette Lippenkiefergaumenspalte, eine schwere Herzfehlbildung mit Transpositionsstellung der großen Arterien und einem Double-outlet des rechten Ventrikels, sowie eine inkomplette Lappung zwischen rechtem Ober- und Mittellappen der Lunge, Thymushypoplasie, Gallenblasenaplasie und eine Lappungsanomalie der Milz. Die beschriebenen Gesichtsdysmorphien treten sowohl beim 4p- als auch beim 4q-Deletionssyndrom auf. Mittelliniendefekte, Herzfehler und Wachstumsretardierungen sind auch bei 4q-Deletionen beschrieben worden [14]. Daher ist es nicht leicht festzulegen, welche der klinischen Merkmale auf die 4q-Deletion zurückzuführen ist. Es handelt sich vermutlich um einen gemischten Phänotyp.

4.1.1 Kandidatengene

Herzfehler und HAND

Zu der Familie der basic Helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren gehören eHAND und dHAND (extraembryonic/deciduum membrane, heart, autonomic nervous system, neural crest - derived tissues). Die Transkriptionsfaktoren HAND1 (eHAND, Hxt, Thing1) und HAND2 (dHAND, Hed, Thing2) spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Herzens, der Inneren Organe und des sympathischen Nervensystems [44], [45]. HAND2 ist ein Transkriptionsfaktor, der proximal von RP11- 79K2 in 4q33 (bei ~ 174 Mb) lokalisiert ist und als interessantes Kandidatengen für Herzfehler diskutiert wird. HAND2 scheint eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des rechten Ventrikels und der Aortenbogenarterien zu spielen [45], [46].

Im vorliegenden Fall liegt ein schwerer Herzfehler mit Transpositionsstellung der großen Arterien und einem Double-outlet des rechten Ventrikels vor. Der Bruchpunkt liegt in einem 23,8 Mb großen Intervall in der Region 4q33. **HAND2 ist proximal des BAC-Klon RP11- 79K2 lokalisiert und damit im vorliegenden Fall ebenfalls deletiert.** Das vorliegende klinische Bild passt gut zu einer Veränderung der Expression von HAND2.

Heterozygote Knock-out-Mäuse für *Hand2* sind phänotypisch unauffällig [44]. Dies ist ein Unterschied zum Menschen, da hier der hemizygoter Verlust von HAND2 eine Rolle spielt. Aufgrund der Unterschiede zwischen Mensch und Maus kommt es nicht selten vor, dass spontan oder künstlich erzeugte Mausmodelle für

Krankheiten Phänotypen zeigen, die sich von den entsprechenden menschlichen Krankheiten deutlich unterscheiden. Beispielsweise kann es bei Knock-out-Mutanten zu einer „durchlässigen“ Expression kommen oder die Expression eines Transgens wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie etwa durch Positionseffekte. Auch die genetische Redundanz spielt eine Rolle bei der Auswirkung des Phänotypes, wenn es jeweils ein anderes Gen gibt, das die Funktion des inaktivierten Gens übernimmt.

Es gibt Hinweise, die darauf hindeuten, dass ein weiteres Gen, welches bei der Herzentwicklung beteiligt sein könnte, in der distal von 4q33 gelegenen Region zu finden ist. Tsai et al. berichten über eine 4q34.2-4qter-Deletion bei einem Patienten mit angeborenem Herzfehler (ASD, VSD, Pulmonalstenose) [43]. In diesem Fall kann eine Deletion von HAND2 ausgeschlossen werden, trotzdem sind angeborene Herzfehler beschrieben. Dies zeigt, wie komplex die Entstehung der angeborenen Herzfehler ist und dass außer HAND2 noch weitere Gene, aber auch Umweltfaktoren, daran beteiligt sein werden. Die Identifizierung der deletierten oder mutierten Gene von betroffenen Patienten ist ein erster wichtiger Beitrag, um die Entstehung der angeborenen Herzfehler besser verstehen zu können.

Abschließend ist zu berücksichtigen, dass es sich im vorliegenden Fall aber um einen gemischten Phänotyp (4p- und 4q-Deletions-Syndrom) handelt und auch bei großen 4p-Deletionen Herzfehler beschrieben wurden.

Fehlbildungen der Extremitäten

Interessanterweise zeigten sich im vorliegenden Fall keine Anomalien der Extremitäten. Dieses klinische Merkmal gehört jedoch ebenfalls zu dem typischen klinischen Bild der 4q-Deletionen [14], [43] und ist in 30-60% der Patienten mit 4q33-qter-Deletion beschrieben [16], [17]. Am häufigsten treten uni- und bilaterale Ulnardefekte auf, wobei die Fehlbildungen links häufiger als rechts beobachtet werden. Weiterhin werden kleine Anomalien wie Klinodaktylie der Hände und Füße, hypoplastische Nägel und Fehlbildungen der Zehen beschrieben [14]. Menko et al. untersuchten einen weiteren Fall mit Extremitätenfehlbildungen [17]. Die Patientin hatte eine terminale 4q-Deletion mit Bruchpunkt in 4q33. Die klinischen Merkmale umfassten Wachstumsretardierung, Robin-Sequenz, Gaumenspalte und einen verkürzten linken Unterarm mit zwei Fingern. Das

Röntgenbild zeigte eine Ulnar-Aplasie und nur zwei Mittelhand- und Fingerknochen, vermutlich Daumen und Zeigefinger [17]. Darüber hinaus gibt es weitere Hinweise dafür, dass Gene, die für Extremitätenfehlbildungen verantwortlich sind, in 4q33 lokalisiert sind [11], [14]. Keeling et al. berichten von einem Patienten mit einer kleinen interstitiellen Deletion in der Region 4q32-34 [14]. Dieser Patient zeigte eine leichte Entwicklungsverzögerung, die typischen Gesichtsdysmorphien, eine Klinodaktylie des 5. Fingers an der rechten Hand und am linken Arm das Fehlen der Ulnar und der ulnarseitigen Mittelhandknochen und Fingerglieder III, IV und V. Weiterhin vergleichen Keeling et al. die Daten aus insgesamt 11 Veröffentlichungen über 4q-Deletionen miteinander. Keeling et al. kommen zu dem Schluss, dass die Gene, die in die Entwicklung der Extremitäten, des Herzens, des Zentralnervensystems und des Gesichts involviert sind, in der Region 4q33 zu lokalisieren sind [14].

Im hier vorgestellten Fall liegen keine Veränderungen an den Extremitäten vor, das verantwortliche Gen liegt somit vermutlich in der Region 4q33 proximal von RP11-79K2 und kann somit durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und im Vergleich mit anderen Publikationen weiter eingegrenzt werden. Durch den Mosaikstatus und der gleichzeitigen 4p-Deletion werden weitergehende Aussagen jedoch schwierig.

4.2 Das Wolf-Hirschhorn-Syndrom

Das Wolf-Hirschhorn-Syndrom wurde erstmals 1965 durch Wolf et al. [8] und Hirschhorn et al. [9] als ein komplexes klinisch variables Fehlbildungs- und Retardierungssyndrom beschrieben. Kennzeichnend für das Syndrom sind neben den prä- und postnatalen Wachstums- und Entwicklungsstörungen schwere mentale Retardierung und muskuläre Hypotonie. Weiterhin charakteristisch sind die typischen Gesichtsdysmorphien mit kurzem Philtrum und abfallenden Mundwinkeln, prominenter Glabella, tief angesetzten dysplastischen Ohren, einer breiten gebogenen Nase, Hypertelerismus, Strabismus und Iriskolobomen. Die Patienten weisen zudem kraniale Asymmetrie, Mikrozephalie, Mikrognathie und Hirnfehlbildungen wie Agenesie/Hypoplasie des Corpus callosum, sowie Kleinhirnhypoplasie auf. Weiterhin sind Fehlbildungen der inneren Organe, hauptsächlich Herz-, Nieren- und Genitalfehlbildungen, sowie Lippen-Kiefer-

Gaumenspalten in einigen Fällen beschrieben [5], [8], [9], [18], [19], [21]. Ursache des WHS ist eine Deletion im terminalen Abschnitt des kurzen Arms eines Chromosoms 4 (4p16.3). Die Deletionen können sehr groß sein (5 bis 20 MB), aber auch Mikrodeletionen sind beschrieben [18], [20]. Der Schweregrad des Phänotypes ist von der Größe der Deletion abhängig. Kleine Deletionen führen meist zu einem milderem Phänotyp, bei dem kongenitale Fehlbildungen nicht beobachtet werden.

4.2.1 Kandidatengene

Aufgrund der Variabilität des Phänotypes, der Beobachtung von Patienten mit überlappenden Deletionen, aber komplettem bzw. nicht komplettem WHS-Phänotyp, und des hohen Anteils an *de novo*-Deletionen kann angenommen werden, dass das Vollbild des WHS durch Hemizygotie von mehr als einem Gen hervorgerufen wird. Die Erkrankung kann in der Gruppe der Mikrodeletionssyndrome der Syndrome aufgrund abschnittsweiser Aneuploidie („segmental aneusomy syndromes“) zugerechnet werden. Neben den Dosis-sensitiven Genen kommt auch die Deletion eines monoallelisch exprimierten Gens oder die Demaskierung einer normalerweise rezessiven Mutation im verbleibenden Gen als Ursache für den Phänotyp in Frage. Die Haploinsuffizienz mehrerer Gene trägt also zu dem komplexen Phänotyp des WHS bei. Durch vergleichende Analyse überlappender Deletionen verschiedener Patienten konnte die „Wolf-Hirschhorn-syndrome critical region“ **WHSCR** auf ein circa 165 Kilobasenpaare (Kbp) großes Intervall zwischen den Markern D4S166 und D4S3327 auf 4p16.3 eingengt werden [26]. Zwei wichtige Gene, das Wolf-Hirschhorn-Syndrom-Kandidatengen 1 (**WHSC1**) [33], [26] und 2 (**WHSC2**) [32] sind bisher in dieser Region beschrieben worden.

Das **WHSC1-Gen** ist ein 90 kb großes Gen und liegt mit 60 kb im telomernahen Bereich der WHSCR [33]. Es wird als Kandidatengen für faziale Merkmale diskutiert und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Telencephalon, Rhombencephalon, Mandibula, Maxilla und der fronto-nasalen Partie [18]. Daten von Zollino et al. [30] weisen darauf hin, dass die Haploinsuffizienz von WHSC1 möglicherweise für bestimmte faziale Dysmorphien verantwortlich sein könnte. Auch in dem vorliegenden Fall ist das WHSC1-Gen deletiert. Erwartungsgemäß zeigt der Fetus die typischen Gesichtsdysmorphien, wie im Sektionsbefund

beschrieben. Die gründliche neuropathologische Untersuchung ergab jedoch einen unauffälligen Befund. Dies unterstreicht, dass eine Hemizygotie von WHSC1 vermutlich primär für die fazialen Veränderungen verantwortlich ist, was auch durch weitere Untersuchungen (s. o.) bestätigt wird.

Das **Gen WHSC2** wurde erstmals von Wright et al. kloniert und beschrieben [32]. Es zeigt eine ubiquitäre Expression in fetalen und adulten Gewebe von Mensch und Maus. Weiterhin scheint es von grundlegender Bedeutung für die Transkription zu sein [32]. Aufgrund der ubiquitären Expression und der Beteiligung an essentiellen Transkriptionsvorgängen ist WHSC2 ein schlechtes Kandidatengen für spezifische phänotypische Merkmale des WHS.

Durch die Identifizierung eines WHS-Patienten mit einer terminalen 1,9 Mb großen Deletion distal der WHSCR wurde eine mögliche 2. WHSCR [30] beschrieben. Zollino et al. zufolge, liegt die **WHSCR-2** in einem 300-600 Kilobasenpaare (Kbp) großen Intervall zwischen den Markern D4S3327 und D4S98-D4S168 distal der WHSCR [30]. Patienten mit Deletionen in diesem Bereich weisen den typischen WHS-Phänotyp auf [18]. Das Vorhandensein der WHSCR-2 ist allerdings umstritten.

In der WHSCR2 liegt als weiteres wichtiges Kandidatengen **LETM1**, ein Kalzium-Kanal-Gen. LETM1 ist in fast allen beschriebenen Patienten deletiert und direkt flankierend zur Region WHSCR-1 auf dem Chromosom 4. Das ubiquitär expremierte LETM1-Gen („*Leucin-Zipper und EF-Hand-enthaltendes Transmembranprotein I*“) wurde erstmals 1999 durch Endele beschrieben [35]. Es wird vermutet, dass LETM1 in die neuromuskulären Merkmale (Krampfanfälle) des WHS involviert ist. Schlickum et al. zeigten, dass das LETM1 Protein in den Mitochondrien lokalisiert ist [36]. Bei WHS-Patienten könnte also die mitochondriale Fehlfunktion eine Ursache der neuromuskulären Symptome einschließlich der Krampfanfälle sein.

Zwei weitere Gene in der WHSCR-1 sind WHSC3 und WHSC5. Sie gelten als Kandidatengene für Defekte der neurologischen Entwicklung und werden deshalb im Abschnitt „Gen- und Pathomechanismen der neuromuskulären Auffälligkeiten“ (4.2.4) ausführlicher beschrieben.

Mittelliniendefekte treten vor allem bei großen Deletionen (< 2,5 Mb) auf und scheinen mit dem Verlust von Genen assoziiert, die proximal der WHSCR2 liegen [18]. Dies lässt vermuten, dass Kandidatengene für Mittelliniendefekte in einem

Bereich lokalisiert sind, der circa 2,5 Mb bis 5,0 Mb vom Telomerende entfernt liegt.

Die genauen molekularen Mechanismen, die zu dem typischen Phänotyp des WHS führen, sind unklar. Wahrscheinlich sind mehrere Gene für den gleichen Phänotyp beteiligt. Bisher gibt es allerdings noch keine sichere Assoziation zwischen bestimmten Genen und phänotypischen Merkmalen. Es gibt mehrere Versuche, eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation durch den Vergleich der Patienten und der vorliegenden Deletionsgröße zu erstellen, was allerdings bisher nur bedingt erfolgreich war. Fast immer ist jedoch WHSC1 betroffen. Dieses Gen ist vermutlich primär für die fazialen Veränderungen verantwortlich, welche für die WHS-Diagnose entscheidend sind.

4.2.2 Vergleich mit der Literatur

Im vorliegenden Fall handelt es sich um eine große Deletion. Der Bruchpunkt konnte zwischen den Klonen RP11- 7A6 (4p16.2) und RP11- 81L15 (4p15.3) in einem 9,7 Mb großen Intervall lokalisiert werden. Der Klon RP11-7A6 beinhaltet das MSX1 Gen (Position laut FISH Karte bei 4p16.1-16.3), welches schon von Zollino et al. als eine 4p16.1 spezifische FISH-Probe für die Phänotyp-Genotyp-Kartierung bei WHS-Patienten verwendet wurde [21]. Damit liegt der Bruchpunkt deutlich proximal der WHSCR, vermutlich in 4p16.1. Dies bedeutet eine Deletion des gesamten distalen Bereiches einschließlich beider WHSCRs und der darin liegenden Gene (WHSC2, WHSC1, LETM1).

Der klinische Untersuchungsbefund ergab schwere Fehlbildungen und, soweit dies bei einem Feten zu beurteilen war, das Vollbild des typischen WHS-Phänotyps. Im vorliegenden Fall wurde eine intrauterine Wachstumsretardierung, eine doppelseitige komplette Lippenkiefergaumenspalte, eine linksseitige Zwerchfellhernie, eine schwere Herzfehlbildung mit Transpositionsstellung der großen Arterien und einem Double-outlet des rechten Ventrikels, die typischen Gesichtsdysmorphien (abgeflachte Gesichtsform und Nasenrücken, tiefsitzende Ohren) und weitere Fehlbildungen wie inkomplette Lappung zwischen rechtem Ober- und Mittellappen der Lunge, Thymushypoplasie, Gallenblasenaplasie und eine Lappungsanomalie der Milz beschrieben. Die Schwere der Fehlbildungen und das Vorliegen von Mittelliniendefekten (Lippenkiefergaumenspalte, Zwerchfellhernie, schwere Herzfehlbildung) korrelierte mit der Größe der Deletion

und den vorliegenden Literaturdaten. Ähnlich große Deletionen wie in der vorliegenden Arbeit wurden schon bei anderen WHS-Patienten beschrieben. Die Patienten hatten einen voll ausgeprägten Phänotyp mit den typischen klinischen Merkmalen einschließlich Herz- und Nierenfehlbildungen [5], [19], [21].

Estabrooks et al. berichten über 11 Patienten mit 4p-Deletionen und vergleichen die Größe der Deletion mit den klinischen Merkmalen [5]. Anhand dieser Daten wurde von Ihnen eine vorläufige Phänotyp-Karte erstellt. Die typischen Gesichtsdysmorphien und Krampfanfälle wurden auf dieser Karte von 4pter bis circa 2,6 Mb lokalisiert. Angeborene Herzfehler wurden einem Bereich von 2,6 Mb bis circa 25 Mb und Nierenfehlbildungen von 2,6 Mb bis 5,8 Mb zugeordnet [5]. Im vorliegenden Fall bestehen die typischen Gesichtsdysmorphien und ein schwerer Herzfehler. Dies passt zu den aufgrund der Deletionsgröße zu erwartenden Merkmalen. Krampfanfälle konnten nicht beobachtet werden, und es wurden auch keine ZNS-Fehlbildungen beschrieben. Dies wird später in dem Kapitel 4.2.4 diskutiert. Aber auch Nierenfehlbildungen wurden nicht beschrieben. Daraus kann gefolgert werden, dass entweder unterschiedliche Gene deletiert sind (unterschiedliche Deletionsgrößen) oder dass evtl. durch die Deletion rezessive, heterozygot vorliegende Mutationen in Nieren-Genen demaskiert und damit wirksam werden. Es kann aber auch möglich sein, dass die WHS typischen pathologischen Veränderungen der Nieren mit denen hier verwandten Methoden nicht dargestellt werden konnten oder diese Veränderungen in der 21. SSW noch nicht vorhanden sind. Vielleicht treten die Nieren-Veränderungen in Folge unterschiedlicher Phänotypausprägung nicht bei jedem WHS-Patienten auf.

Bei Wiczorek et al. wurden bei 13 Patienten die klinischen Merkmale mit der Größe der Deletion verglichen [19]. 4 von 13 Patienten wiesen eine ähnlich große Deletion wie im vorliegenden Fall auf, 2 Patienten hatten den Karyotyp 46,XY, del(4)(p16.2), 1 Patient den Karyotyp 46,XX, del(4)(p16.2) und 1 Patient den Karyotyp 46,XX, del(4)(p16.1). Alle 4 Patienten hatten die typischen Gesichtsdysmorphien, mentale Retardierung, muskulären Hypotonus, Krampfanfälle. Ein Patient zeigte Mittelliniendefekte und 3 Patienten intrauterine Wachstumsverzögerung. Laut Wiczorek et al. korrelieren die Standardabweichungen des Geburtsgewichts, der Geburtslänge und des postpartalen Kopfumfanges ebenso wie die Ausprägung der mentalen Retardierung mit der Größe der Deletion [19]. Im Vergleich mit unseren Daten

scheint die Größe der Deletion ähnlich, und die Ausprägung des Phänotyps entspricht den zu erwartenden Merkmalen. Für das Fehlen der Herzfehlbildungen können unterschiedliche Gründe diskutiert werden. Entweder sind unterschiedliche Gene deletiert (unterschiedliche Deletionsgrößen) oder durch die Deletion sind rezessive, heterozygot vorliegende Mutationen in Herz-Genen demaskiert und damit wirksam geworden. Es kann aber auch möglich sein, dass die WHS typischen pathologischen Veränderungen des Herzens mit denen von Wieczorek et al. [19] verwandten Methoden nicht dargestellt werden konnten.

Von Rauch [20] wurde 2001 ein Patient beschrieben, der eine kleine interstitielle Deletion, fast ausschließlich die WHSCR-1 betreffend, aufweist. Diese kleine interstitielle Deletion umfasst nicht LETM1. Dieser Patient zeigt Merkmale von WHS, weist insgesamt lediglich einen milden Phänotyp auf und ist nicht von Krampfanfällen betroffen. Daher wurde das LETM1-Gen mit der Pathogenese von Krampfanfällen in Verbindung gebracht. Im vorliegenden Fall ist das LETM1-Gen sicher deletiert. Es kann aber keine Aussage zu dem Auftreten von Krampfanfällen gemacht werden. Im vorliegenden Fall wurde schließlich aufgrund der Schwere der zu erwarteten Fehlbildungen am Ende der 21. SSW eine Abruption graviditatis durchgeführt. Dies macht deutlich, wie schwierig die Aufstellung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei komplexen, klinisch variablen Fehlbildungssyndromen ist.

Die Größe der Deletion unseres Patienten ist ebenfalls vergleichbar mit der Größe der Deletionen von 6 aus 16 WHS-Patienten, die von Zollino et al. beschrieben wurden [21]. Die Deletionen dieser Patienten sind gekennzeichnet durch Verlust des terminalen Bereiches, einschließlich des MSX1, und den Karyotyp 46,XY, del(4)(p16.1) und 46,XX, del(4)(p16.1). Alle 6 Patienten wiesen eine prä- und postnatale Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, Gesichtsdysmorphie, Muskelhypotonie, und mentale Retardierung auf. Zusätzlich wurden bei ihnen Mittelliniendefekte beschrieben, 4 Patienten hatten Herzfehler (1 Patient ASD, 1 Patient ASD und PDA, 1 Patient VSD, 1 Patient hatte eine Pulmonalstenose) und 4 von 6 Patienten hatten Nierenfehlbildungen, wie zum Beispiel renale Hypoplasie oder Dilatationen des Nierenbeckens. Bei 5 von 6 Patienten traten Krampfanfälle auf. Zollino et al. kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des Phänotyps und der Größe der Deletion besteht [21].

In einer weiteren Arbeit von Van Buggenhout et al. wurden 6 Patienten mit einer kleinen 4p-Deletion untersucht und anhand der Ergebnisse eine Genotyp-Phänotyp-Karte erstellt [28]. Eine der Patienten mit einer kleinen terminalen Deletion (mit Deletion der WHSCR) und dem Karyotyp 46,XX, del(4)(p16.3) weist einen typischen Phänotyp auf und zeigt weiterhin schwere Fehlbildungen, einschließlich Zwerchfellhernie, Pulmonalstenose und Gaumenspalte [28]. Dies unterstützt die Theorie, dass Kandidatengene für Mittelliniendefekten in einem Bereich distal der WHSCR circa 2,5 Mb bis 5,0 Mb vom Telomerende zu vermuten sind. Auch bei unserem Patienten liegen eine intrauterine Wachstumsretardierung, Gesichtsdysmorphien, Mittelliniendefekte und Herzfehlbildungen vor.

Vergleicht man die Angaben der oben genannten Autoren und die Größe und Lokalisation unserer Deletion, dann entspricht dies zwar meistens der zu erwartenden Ausprägung der klinischen Merkmale. Jedoch gibt es immer wieder kleine Unstimmigkeiten und Abweichungen. Schließlich treten die beschriebenen Gesichtsdysmorphien sowohl beim 4p- als auch beim 4q-Deletionssyndrom auf. Insbesondere Mittelliniendefekte, Herzfehler und Wachstumsretardierungen sind bei beiden Syndromen beschrieben worden. Daher ist es nicht leicht festzulegen, welche der klinischen Merkmale auf die 4p-Deletion zurückzuführen sind. Es handelt sich vermutlich um einen gemischten Phänotyp.

4.2.3 Ringchromosom 4 und WHS

Die Bildung eines Ringchromosoms ist das Ergebnis von zwei Brüchen in beiden Armen des Chromosoms und anschließender Verknüpfung der zwei Bruchstellen mit Verlust der distalen Segmente (Deletion), so dass ein Ring gebildet wird. Ein anderer Mechanismus ist die Verbindung beider Telomerenden miteinander. Ringchromosome sind selten und resultieren häufig aus einer *de novo*-Mutation [2]. Die Fallzahlen von Ringchromosomen bei Neugeborenen und in der Prenataldiagnostik variieren von 1: 27.225 bis 1: 62.279 [2]. Ringchromosome wurden in allen Chromosomenpaaren beobachtet, Beispiele sind das 18-R-Syndrom, das Ringchromosom-13-Syndrom und das Ringchromosom-15-Syndrom. Die Instabilität ist ein typisches Merkmal der Ringchromosome. Sie erweisen sich in der Mitose als stabil, meiotisch gehen sie meist verloren und werden deshalb selten vererbt [3]. Häufig besteht ein Mosaik. Durch die Deletion kommt es zum Verlust chromosomalen Materials, das nun lediglich in einer Kopie

im Genom vorkommt. Häufig ist eine Haploinsuffizienz für die deletierten Gene zubeobachten, was zu einem klinischen Phänotyp führt. Sind mehrere Gene deletiert, ist die Haploinsuffizienz der betroffenen Gene häufig gemeinsam für den Phänotyp verantwortlich und äußert sich in einem sehr spezifischen, komplexen Fehlbildungssyndrom.

Im vorliegenden Fall handelt es sich um einen Feten mit einem weiblichen Karyotyp mit Mosaik für Monosomie des Chromosoms 4 bzw. Ringchromosom 4 (45, XX, -4/46, XX, r(4)(p16q33)). Da die oben beschriebenen Gesichtsdysmorphien, Mittelliniendefekte, Herzfehler und Wachstumsretardierungen sowohl beim 4p- als auch beim 4q-Deletionssyndrom auftreten, liegt vermutlich ein gemischter Phänotyp vor. Ähnliche Fälle wurden bereits in der Literatur beschrieben.

Balci et al. [47] berichten vom einem 16 Monate alten männlichen Patienten mit Ringchromosom 4 (Karyotyp 46, XY, r(4)(p16q35)) und den klinischen Merkmalen des Wolf-Hirschhorn Syndroms. Die Bruchpunkte wurden durch eine Multicolor FISH bestimmt. Der Patient hatte eine einseitige Lippen-Gaumen-Spalte, weitere typische Gesichtsdysmorphien mit kurzen Philtrum, Hypertelerismus, tief angesetzte Ohren, Iriskolobome und Mikrozephalie. Weiterhin bestand neben der intrauterinen Wachstumsverzögerung auch eine psychomotorische Retardierung. Auch Malrotation, Hypospadie, Ventrikelseptumdefekt mit Aneurysma, hypoplastische Daumen und deformierte Finger wurden beschrieben. Im Alter von 8 Monaten traten regelmäßig Krampfanfälle auf. Eine Kernspintomographie des Schädels ergab eine Hypoplasie des Corpus callosum, eine Myelinisierungsstörung sowie eine Frontal- und Okzipitallappenatrophie [47]. Der Patient zeigte also typische Merkmale des Wolf-Hirschhorn Syndroms und auch leichte Fehlbildungen der Extremitäten, wie sie vor allem beim 4q-Deletionssyndrom beschrieben werden. Der Bruchpunkt auf dem langen Arm des Chromosoms 4 wurde bei 4q35 angegeben, damit ist HAND2 im vorliegenden Fall nicht deletiert (vergl. 4.1.1). Hier wird erneut deutlich, wie komplex die Entstehung der angeborenen Herzfehler ist, und dass außer HAND2 noch weitere Gene daran beteiligt sein werden. Auch die Identifizierung der Gene, die für Extremitätenfehlbildungen verantwortlich sind, ist schwierig und komplex. Im Kapitel 4.1.1 wurde die Region 4q33 als interessante Region für Kandidatengene für Extremitätenfehlbildungen diskutiert. Bei Balci et al. [47] liegt der Bruchpunkt

deutlich proximal der Region 4q33. Trotzdem werden leichte Fehlbildungen (hypoplastische Daumen) beschrieben. Dies steht somit im Widerspruch zu dem in Kapitel 4.1.1 diskutierten Vorschlag Kandidatengene für Extremitätenfehlbildungen in der Region 4q33 zu lokalisieren.

Pérez-Castillo et al. berichten von einem 5 Tage alten männlichen Neugeborenen mit den typischen klinischen Merkmalen des Wolf-Hirschhorn Syndroms (beidseitige Lippen-Gaumen-Spalte, abfallende Mundwinkel, Hypertelerismus, Epikanthus, tief angesetzte Ohren, Iriskolobome und beidseitige Klinodaktylie der V. Fingern) [10]. Der Karyotyp des Patienten (46, XY, r(4), (p15q35)) wurde mit Hilfe von zytogenetischen Methoden (GTG-Bänderung) bestimmt. Dies muss bei der Interpretation der Daten mitberücksichtigt werden. Pérez-Castillo et al. schätzen den Verlust des chromosomalen Materials des langen Arms (4q) in seiner Bedeutung sehr gering ein und führen die klinischen Merkmale des Patienten vor allem auf die Deletion in 4p15 zurück [10]. Eine exakte Lokalisation der Bruchpunkte ist damit nicht möglich, was die Identifizierung von möglichen Kandidatengenen erschwert.

Calabrese et al. [12] berichten über zwei Neugeborene mit Deletionen am langen Arm von Chromosom 4. In einem der beiden Fälle besteht ein Ringchromosom mit Karyotyp 46, XY, r(4)(pterq35.2-qter)/45, XY, -4. Die Chromosomenanalyse erfolgte zunächst mit zytogenetischen Methoden (GTG-Bänderung). Es folgte eine FISH, die den Verlust der beiden Telomerenden zeigte. In einem weiteren Schritt konnten mit FISH-Proben die Bruchpunkte in den Regionen p16.3 und q35 lokalisiert werden [12]. Bei dem Patienten handelte es sich um ein männliches Neugeborenes mit Mikrozephalie, Mikrognathie, Hypertelerismus, abfallenden Mundwinkeln, hypoplastischer linker Niere und beidseitiger Klinodaktylie der Digiti V. Im Verlauf wurde eine leichte Entwicklungsretardierung beobachtet. Die Computertomographie des Schädels, die Echokardiographie, die Audiometrie sowie die ophthalmologische Untersuchung zeigten allesamt unauffällige Ergebnisse [12]. In diesem Fall ist also HAND2 nicht deletiert, was gut mit den klinischen Merkmalen und dem Fehlen schwerer Herzfehler überein stimmt. In der Region 4q33 wird weiterhin das Kandidatengen für Extremitätenfehlbildungen vermutet. Auch dieses Gen ist vermutlich nicht deletiert. Trotzdem werden bei dem Patienten leichte Fehlbildungen wie die beidseitige Klinodaktylie der Digiti V beschrieben. Dies steht somit im Widerspruch zu dem in Kapitel 4.1.1 diskutierten

Vorschlag, Kandidatengene für Extremitätenfehlbildungen in der Region 4q33 zu lokalisieren. Es deckt sich jedoch mit den Daten von Balci et al. [47], deren Ergebnissen zufolge der Bruchpunkt ebenfalls deutlich proximal der Region 4q33 liegt und dennoch hypoplastische Daumen beschrieben werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten im vorliegenden Fall durch eine Demaskierung heterozygoter Mutationen bzw. durch eine reduzierte Penetranz des Phänotyps erklärt werden.

4.2.4 Gen- und Pathomechanismen der neuromuskulären Auffälligkeiten

Es gibt in der Literatur wenige Fallberichte von ZNS-Fehlbildungen von Feten oder verstorbener Neugeborener mit WHS.

Nach Lazjuk et al. ist der histopathologische Sektionsbefund von zwei Patienten mit WHS gekennzeichnet durch folgende neuropathologische Veränderungen: eine verkürzte H2-Region des Ammonshorn, hypoplastische und unzureichend myelinisierte Pyramiden und eine abnorme Gyrierung des Kleinhirns [23]. Allerdings wurden bei dieser Untersuchung die Ergebnisse der neuropathologischen Untersuchungen unabhängig von dem Gestationsalter oder Lebensalter der Patienten betrachtet, was ihre Vergleichbarkeit etwas erschwert. Lazjuk et al. berichten über zwei Fälle mit WHS. Beim ersten Fall handelte es sich um ein weibliches Todgeborenes (5 Wochen vor dem errechneten Termin). Beim zweiten Fall wurden keine genaueren Angaben zum Gestationsalter oder Lebensalter gemacht. In beiden Fällen wurden keine genauen Informationen zur Deletionsgröße und zur Methode, mit der die Deletion festgestellt wurde, angegeben. Damit lassen sich die Daten schlecht vergleichen und eignen sich nur bedingt für die Weiterentwicklung der Phänotypisierung und Genotypisierung des WHS.

Als weitere Sektionsbefunde von WHS-Patienten wurden generalisierte Hirnhypoplasie (4/10 Fällen), abnorme Gyrierung der Großhirnrinde mit Heterotopie der Neurone (5/10 Fällen), Hypoplasie oder Aplasie des Corpus callosum (5/10 Fällen) und Dysplasie verschiedener Kerne wie zum Beispiel des Nucleus dorsolaterale geniculatus und des Nucleus dentatus (3/5 Fällen) [22], [27] beschrieben.

Tachdjian et al. berichten von 5 Einzelfällen mit WHS [22]. In 3 (Schwangerschaftsabbrüche mit 26, 30 und 35 SSW) der 5 Fälle zeigte sich ein

makroskopisch und histologisch unauffälliger ZNS-Befund. Ein Fall war eine Frühgeburt mit 33 SSW, Exitus in der 5. Lebensminute, Karyotyp 46,XX, del(4)(p15), der eine Agenesie des posterioren Corpus callosum bei histologisch unauffälligem ZNS-Befund zeigte. Ein weiterer Fall war eine Abruption mit 37 SSW, Karyotyp 46,XY, del(4)(p16), bei dem ebenfalls eine Agenesie des posterioren Corpus callosum sowie eine Kleinhirnheterotopie gefunden wurde. Der Karyotyp der Patienten wurde mit Hilfe von zytogenetischen Methoden (GTG-Bänderung) bestimmt. Die Deletionsgrößen wurden mit del(4)(p14), del(4)(p15) bis del(4)(16) angegeben. Eine exakte Bruchpunktbestimmung war nicht möglich und die Identifizierung von möglichen Kandidatengenomen somit nicht näher möglich.

Gottfried et al. [27] berichteten über neuropathologische Befunde in zwei Fällen mit WHS. Im ersten Fall handelte es sich um ein männliches Neugeborenes mit den typischen Merkmalen eines WHS. Der Bruchpunkt wurde in der Region 4p15.3 lokalisiert. Als der Patient im Alter von einem Jahr verstarb, wurde eine Autopsie veranlasst. Der posteriore Anteil des Corpus callosum zeigte sich sehr schmal, der anteriore Anteil war normal groß. Der Corpus geniculatum laterale zeigte sich beidseits schwer verändert. Nucleus dentatus und Nucleus olivaris waren beidseits unauffällig. Regelrechte Befunde zeigten sich auch in der Großhirnrinde, im Kleinhirn und im Hirnstamm [27]. Im zweiten Fall wurde ein weibliches Neugeborenes untersucht. Die Patientin zeigte ebenfalls die typischen klinischen Merkmale des WHS. Sie verstarb im Alter von 5½ Monaten. Die Chromosomenanalyse ergab den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 4, eine genaue Bruchpunktangabe wurde nicht gemacht. Die Patientin zeigte ebenfalls ein sehr schmales Corpus callosum sowie schwere Veränderungen des Corpus geniculatum laterale beidseits [27]. Abschließend kommen Gottfried et al. zu folgendem Schluss: zu häufigen ZNS-Veränderungen beim WHS zählen ein kleines Gehirn, Gyrierungsdefekte und Heterotopie, Dysplasie von Corpus geniculatum laterale, Nucleus dentatus und Nucleus olivaris inferior sowie Veränderungen des Corpus callosum [27]. In dieser Arbeit wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen der Schwere der ZNS-Veränderungen und der Größe der Deletion und dem Lebensalter der Patienten hergestellt.

Von Kitsiou et al. [25] wurden die Befunde der Autopsie eines weiblichen Neugeborenen mit WHS vorgestellt. Die Patientin verstarb mit drei Monaten. Der Karyotyp der Patientin (46, XY, del(4), (p15)) wurde mit Hilfe von zytogenetischen

Methoden (GTG-Bänderung) bestimmt. Die Obduktion zeigte ein kleines Gehirn (400g, altersentsprechendes Normalgewicht 411g). Die Gyrierung war beidseits atroph und unreif [25]. Auch hier wurde kein Zusammenhang zwischen der Schwere der ZNS-Veränderungen und der Größe der Deletion und dem Lebensalter der Patienten diskutiert.

Im vorliegenden Fall handelte es sich um eine Deletion des gesamten distalen Bereiches einschließlich der darin liegenden Gene WHSC3, WHSC5 und LETM1, die als Kandidatengene für Krampfanfälle und Defekte in der neurologischen Entwicklung diskutiert werden.

LETM1 wird als Kandidatengenen für neuromuskuläre Symptome und Krampfanfälle diskutiert [33], [35], da seine Haploinsuffizienz die Ursache für mitochondriale Fehlfunktionen sein könnte. Krampfanfälle und mögliche andere Folgen einer mitochondrialen Fehlfunktion werden häufig aber erst in einem späteren Entwicklungsabschnitt beobachtet und treten zumindest bei Neugeborenen selten auf.

WHSC3 und WHSC5 sind zwei weitere Gene in der WHSCR-1 und gelten als Kandidatengene für Defekte der neurologischen Entwicklung, da sie offensichtlich an der Cortexentwicklung beteiligt sind.

Das **WHSC3-Gen** wurde erstmals von Endele beschrieben [42]. Von Schlickum [36] konnte durch RNA-*in situ*-Hybridisierung an Sagittalschnitten von Mausembryonen verschiedener Entwicklungsstadien die *Whc3*-Expression in der intermediären Zone des Cortex und in Cajal-Retzius-Zellen der Marginalzone nachgewiesen werden. An Transversalschnitten von P0-Mausgehirn konnten spezifische perinukleäre Hybridisierungssignale in den Neuronen der Cortikalplatte im Großhirn und Expression in den Cajal-Retzius-Zellen der Marginalzone gezeigt werden [36]. Von Endele [42] konnte an Gehirnschnitten einer adulten Maus mit RNA-ISH eine Expression in kortikalen und subkortikalen Bereichen des Gehirns nachgewiesen werden. Außerdem war Expression in den Körnerzellen im Endbereich des Hippocampus, im Kleinhirn innerhalb der Körnerzellen der Körnerschicht und in Zellen der Molekularschicht zu beobachten [42]. Aufgrund der bisherigen Daten scheint es sich um ein Neuropeptid zu handeln. Somit könnte das WHSC3-Gen ein viel versprechendes Kandidatengenen für einige neurologische Merkmale des WHS darstellen.

Das **WHSC5-Gen** wurde erstmals durch Pfarr [34] beschrieben. Das WHSC5-Gen wird in Gehirn, Hoden und Milz exprimiert, wie in Northern Blot-Analysen gezeigt wurde [34]. Bei der Maus findet die Expression von *Whsc5* sowohl während der Embryonalentwicklung als auch in adulten Tieren in Gehirn und Hoden statt [34]. Weiterhin konnte durch Pfarr [34] gezeigt werden, dass die Expression von WHSC5 auf spezifische Regionen im Gehirn begrenzt ist. Dabei ist besonders die Expression in der subventrikulären Zone, der Cortikalplatte und der Marginalzone des Cortexes zu beachten. Somit stellt das WHSC5-Gen ebenfalls ein Kandidatengen für die neurologischen Veränderungen bei WHS-Patienten dar.

Im vorliegenden Fall besteht ein gemischter Phänotyp. Es gibt nur einige wenige Fallberichte von ZNS-Fehlbildungen von Feten oder verstorbener Neugeborener mit 4q-Deletions-Syndrom.

Von Eric Scott Sills et al. [48] werden die Befunde einer weiblichen Patientin mit einer 4q-Deletion diskutiert. Der Karyotyp der Patientin (46, XY, del(4) 32q) wurde mit Hilfe von FISH bestimmt. Eine Kernspintomographie des Schädels ergab einen unauffälligen Befund. Nebenbefundlich fiel eine kleine intrakranielle Läsion auf, vermutlich am ehesten ein kleiner alter lakunärer Infarkt [48]. Weiterhin werden eine leichte Entwicklungsverzögerung und auch eine geringe intellektuelle Retardierung im Alter von 7 Jahren beschrieben [48]. In welchem Alter die Kernspintomographie des Schädels durchgeführt wurde, wird nicht angegeben. Aus den Befunden ergibt sich jedoch keine signifikante neuropathologische Veränderung, welche das 4q-Deletions-Syndrom kennzeichnen könnte.

Quadrelli et al. [49] berichten von einer Patientin mit einem 4q-Deletions-Syndrom. Der Nachweis der chromosomalen Deletion erfolgte mittels CGH (Comparative genomic hybridization) Microarray Kit. Der Bruchpunkt wurde bei 4q32.3 lokalisiert. Die Patientin zeigte einige typische kraniofaziale Dysmorphien, schwere Herzfehlbildungen und Fehlbildungen der Extremitäten. Weiterhin bestand bei der Patientin eine große okzipitale Enzephalozele. Eine Kernspintomographie des Schädels ergab eine Arnold-Chiari-Malformation Typ II [49]. Damit unterscheidet sich dieser Fall in Bezug auf die neuropathologischen Befunde deutlich von den bisher beschriebenen Fällen mit 4q-Deletions-Syndrom. Laut Quadrelli et al. [49] ist dies der erste Fall einer 4q-Deletion mit einer Enzephalozele.

Der Einfluss des 4q-Deletions-Syndroms auf die neuropathologischen Veränderungen scheint nach derzeitiger Datenlage eher gering zu sein. Weitere Untersuchungen von Patienten mit 4q-Deletions-Syndrom einschließlich EEG, MRT und gegebenenfalls Obduktion sind wichtig und unerlässlich, um in Zukunft den Pathomechanismus von ZNS-Fehlbildungen bei 4q-Deletionen weiter aufzuklären.

In unserem Fall ergab die histopathologische und immunhistologische Untersuchung der zellulären Differenzierung keine sichtbaren Veränderungen. Die neuropathologischen und immunhistologischen Befunde waren allesamt altersentsprechende Normalbefunde. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass im fetalen Gehirn kleine Fehlbildungen wie zum Beispiel partiell veränderte Gyrierung im frühen Gestationsalter (21 SSW) leicht übersehen werden können. Zusätzlich konnte in unserem Fall das Corpus callosum nicht vollständig untersucht werden, da es nicht im Ganzen erhalten werden konnte. Trotz allem findet man im Vergleich mit Sektionsbefunden von Feten vergleichbaren Alters ohne WHS in unserem Fall keine der typischen WHS assoziierten ZNS-Merkmale. Im Vergleich mit den publizierten Fällen bedeutet dies, dass manche Feten Gehirnefehlbildungen und damit Defekte bei der ZNS-Entwicklung aufweisen, andere hingegen nicht. Daraus kann gefolgert werden, dass entweder unterschiedliche Gene deletiert sind (unterschiedliche Deletionsgrößen) oder evtl. durch Deletion rezessive, heterozygot vorliegende Mutationen in ZNS-Genen demaskiert sind und damit wirksam werden. Darüber hinaus kann es dafür verschiedene Gründe geben. Entweder können die WHS typischen pathologischen Veränderungen des ZNS mit denen von uns verwendeten Methoden nicht dargestellt werden oder diese Veränderungen sind in der 21. SSW noch nicht vorhanden. Vielleicht treten die ZNS-Veränderungen in Folge unterschiedlicher Phänotypausprägung nicht bei jedem WHS-Patienten auf. Diese Theorie wird ebenfalls bei Gonzales et al. und Kitsiou et al. diskutiert [24], [25]. Dies hat Konsequenzen für die Suche nach Genen, die an den neuromuskulären Veränderungen (Entwicklungsdefekten) beteiligt sind. Es müsste nach Genen gesucht werden, die erst in einem späteren Stadium von Bedeutung sind oder deren Pathomechanismus erst in einem späteren Stadium in einem auffälligen Krankheitsbild resultiert.

Letztlich werden jedoch durch den Mosaikstatus und die gleichzeitig bestehende 4p-Deletion weitergehende Aussagen schwierig. Es ist nicht leicht festzulegen, welche der klinischen Merkmale auf das WHS und welche auf die 4p-Deletion zurückzuführen sind, da es sich um einen gemischten Phänotyp handelt.

4.2.5 Mausmodel und WHS

Naf et al. publizierten 2001 Ergebnisse eines Maus-Modells für das WHS [50]. Bei Mäusen liegt der homologe WHS-Bereich auf Chromosom 5. Berichtet wird über 5 Mäuse mit künstlich erzeugten Deletionen von unterschiedlicher Größe, die jedoch alle die WHSCR umfassten. Naf et al. beschrieben ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Deletionsgröße und Schwere der klinischen Merkmale [50]. Ähnlich wie WHS-Patienten traten auch bei den Mäusen Wachstumsretardierung, Gesichtsdysmorphien, Mittelliniendefekte, Krampfanfälle und Hirnfehlbildungen auf. Die neuropathologische Untersuchung ergab folgende Auffälligkeiten: Hypoplasie der Großhirnrinde und des Kleinhirns sowie fehlende Gyrierung [50]. Auch in dieser Arbeit werden die neuropathologischen Untersuchungsbefunde nicht in Zusammenhang mit dem Lebensalter der Mäuse gebracht. Die Daten sind deshalb nicht unbedingt mit unserem Fall zu vergleichen. Darüber hinaus handelte es sich um extrem große Deletionen. Tiermodelle menschlicher Krankheiten sind für die medizinische Forschung von großer Bedeutung. Bis vor kurzem waren vor allem Tiermodelle verfügbar, die spontan entstanden oder durch zufällige Mutagenese erzeugt worden waren. Inzwischen ist es jedoch durch gezielte Genveränderung und Transgenverfahren möglich, Tier- und Zellkulturmodelle für Krankheiten zu erzeugen. Interessanterweise wird zunehmend klar, dass Krankheitsphänotypen, die durch vergleichbare Mutationen in orthologen Genen bei Mensch und Maus entstehen, oftmals erhebliche Unterschiede aufweisen [1]. Dies hat mehrere Ursachen. Es gibt deutliche Unterschiede in den biochemischen Reaktionswegen und in den Entwicklungswegen. Die Unterschiede bei den Entwicklungsprozessen von Mensch und Maus sind noch größtenteils unbekannt. Man nimmt aber an, dass sie bei einigen Organsystemen von Bedeutung sind, beispielsweise beim Gehirn [1]. Weiterhin unterscheiden sich die durchschnittlichen Lebenszeiten bei Mensch und Maus, so dass sich bestimmte Krankheiten, die sich beim Menschen erst spät manifestieren, wahrscheinlich bei der Maus nur schwer nachbilden lassen.

Hieraus folgt, dass Tiermodelle zur Aufklärung des WHS nur bedingt beitragen können. Wichtig sind aber weitere humane Fälle, wie der in der vorliegenden Arbeit diskutierte. Diese Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zur Weiterentwicklung der Phänotypisierung und Genotypisierung, sowie zur Identifizierung von Kandidatengen für WHS und 4q-Deletions-Syndrom.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die chromosomale Veränderung bei einem Patienten mit komplexen Fehlbildungen zytogenetisch und molekulargenetisch charakterisiert. Es handelte sich um einen Feten mit einem weiblichen Karyotyp mit Mosaik für Monosomie des Chromosoms 4 bzw. Ringchromosom 4 (45, XX, -4/46, XX, r(4)). Die Bruchpunkte des Ringchromosoms konnten mit molekularen Methoden (FISH) eingegrenzt werden. Er liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 4 in einem 23,8 Mb großen Intervall zwischen den Klonen RP11-4D13 und RP11-79K2, in der Bande 4q33. Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 konnte er zwischen den Klonen RP11-7A6 (4p16.2) und RP11-81L15 (4p15.3) in einem 9,7 Mb großen Intervall lokalisiert werden. Die verwendeten PAC/BAC-Klone wurden durch Sequenzierung verifiziert, um falsch lokalisierte Klone und die Hybridisierung mit Pseudogenen auszuschließen.

Nach der molekularen Bruchpunktbestimmung wurde die Deletionsgröße mit den Ergebnissen der makroskopischen, neuropathologischen und histologischen Untersuchung korreliert und mit den Daten aus der Literatur verglichen. Die beschriebenen Gesichtsdysmorphien, Mittelliniendefekte, Herzfehler und Wachstumsretardierungen treten sowohl beim 4p- als auch beim 4q-Deletionssyndrom auf. Die neurohistopathologischen und immunhistologischen Befunde ergaben keine sichtbaren Veränderungen und zeigten allesamt altersentsprechende Normalbefunde.

Die erhobenen Befunde zeigen, dass HAND2, ein Kandidatengenen für Herzfehler, welches proximal von BAC-Klon RP11-79K2 in der Region 4q33 lokalisiert, im vorliegenden Fall deletiert ist. Das vorliegende klinische Bild passt gut zu einer Veränderung der Expression von HAND2. Aufgrund der vorliegenden Daten konnte ein weiteres potentiell Kandidatengenen für Extremitätenfehlbildungen weiter eingegrenzt werden. Die Befunde sprechen dafür, dass das verantwortliche Gen in der Region 4q33 proximal von RP11-79K2 lokalisiert ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch neuropathologische und immunhistochemische Untersuchungen gezeigt werden, dass der Fet neuropathologisch keine Veränderungen aufwies. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise die WHS-typischen pathologischen Veränderungen des ZNS mit den von uns verwendeten Methoden nicht dargestellt werden können oder diese Veränderungen in der 21. SSW noch nicht vorhanden sind. Letzteres wäre von

erheblicher Bedeutung für die Suche nach neuen Kandidatengen für diese neuronalen Veränderungen.

Literaturverzeichnis

1. Strachan T., R. A. P. (2005) Molekulare Humangenetik. Elsevier GmbH., München Heidelberg. (3. Auflage: S 59, 61, 499, 550, 569, 709)
2. Steven L. Gersen, M.B.K. (1999) The Principles of Clinical Cytogenetics. Humana Press Inc. (Totowa, New Jersey).
3. Hirsch-Kauffmann M., S. M. (1992) Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Thieme Verlag., Stuttgart New York.
4. Schmickel, R. (1986) Contiguous gene syndromes: A component of recognizable syndromes. The Journal of Pediatrics. 109(2): p. 231-41.
5. Estabrooks LL, R.K., Driscoll DA, Crandall BF, Dean JC, Ikonen E, Korf B, Aylsworth AS. (1995) Preliminary phenotypic map of chromosome 4p16 based on 4p deletions. Am J Med Genet, p. 581-6.
6. Epstein, C. (1993) The Phenotypic Mapping of Down Syndrome and Other Aneuploid Conditions. Wiley-Liss, Inc, New York.
7. Townes PL, W.M., Di Marzo SV (1979) 4q- syndrome. Am J Dis Child, p. 383-5.
8. Wolf U, R.H., Porsch R, Schrötter R and Baitsch H (1965) Defizienz an den kurzen Armen eines Chromosoms Nr. 4. Humangenetik. 1: p. 397-413.
9. Hirschhorn K, C.H., Firschein IL (1965) Deletion of short arms of chromosome 4-5 in a child with defects of midline fusion. Humangenetik, 1: p. 479-482.
10. Perez-Castillo A, A.J. (1977) Ring chromosome 4 and Wolf syndrome. Hum Genet, p. 87-91.
11. Lurie, I. (1995) Further study of genetic interactions: loss of short arm material in patients with ring chromosome 4 changes developmental pattern of del(4)(q33). Am J Med Genet, p. 308-11.
12. Calabrese G, G.A., Mingarelli R, Di Gilio M C, Piemontese M R, Palka G.(1997) Two newborns with chromosome 4 imbalances: deletion 4q33-->q35 and ring r(4)(pterq35.2-qter). Clin. Genetics, p. 264-7.
13. Robertson SP, O.D.K., Bankier A (1998) The 4q-syndrome: delineation of the minimal critical region to within band 4q31. Clin Genet, p. 70-3.
14. Keeling SL, L.-J.L., Thompson P (2001) Interstitial deletion 4q32-34 with ulnar deficiency: 4q33 may be the critical region in 4q terminal deletion syndrome. Am J Med Genet, p. 94-8.
15. Burg G, K.J., Pongratz D, Scheurlen PG, Schinzel A, Spranger J. In: Adler G. (Hrsg). Die klinischen Syndrome. Syndrome, Sequenzen und Symptomenkomplexe. Urban und Schwarzenberg., München, Wien, Baltimore. (Krankheitsbilder, Band 1, S 148).
16. Tomkins DJ, H.A., Uchida IA, Roberts MH (1982) Two children with deletion of the long arm of chromosome 4 with breakpoint at band q33. Clin Genet, p. 348-55.
17. Menko FH, M.K., Baart JA, Beukenhorst HL (1992) Robin sequence and a deficiency of the left forearm in a girl with a deletion of chromosome 4q33-qter. Am J Med Genet: p. 696-8.
18. Bergemann A. D., C.F., Hirschhorn K (2005) The etiology of Wolf-Hirschhorn syndrome. TRENDS in Genetics, Vol. 21 No. 3: p. 188-195.
19. Wiczorek D, K.M., Majewski F, Albrecht B, Horn D, Riess O, Gillissen-Kaesbach G (2000) Effect of the size of the deletion and clinical

- manifestation in Wolf-Hirschhorn syndrome: analysis of 13 patients with a de novo deletion. *Eur J Hum Genet*, p. 519-26.
20. Rauch A, S.S., Kraus C, Dorr HG, Trautmann U, Altherr MR, Pfeiffer RA, Reis A (2001) First known microdeletion within the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region refines genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet*, p. 338-42.
 21. Zollino M, D.S.C., Zampino G, Mastroiacovo P, Wright TJ, Sorge G, Selicorni A, Tenconi R, Zappala A, Battaglia A, Di Rocco M, Palka G, Pallotta R, Altherr MR, Neri G (2000) Genotype-phenotype correlations and clinical diagnostic criteria in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet*, p. 254-61.
 22. Tachdjian G, F.C., Tapia S, Hutten Y, Blot P, Nessmann C (1992) The Wolf-Hirschhorn syndrome in fetuses. *Clin Genet*, p. 281-7.
 23. Lazjuk GI, L.I., Ostrowskaja TI, Kirillova IA, Nedzved MK, Cherstvoy ED, Silyaeva NF (1980) The Wolf-Hirschhorn syndrome. II. Pathologic anatomy. *Clin Genet*, p. 6-12.
 24. Gonzalez CH, C.V., Wajntal A (1981) Pathologic findings in the Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome. *Am J Med Genet*, p. 183-7.
 25. Kitsiou S, B.C., Alexiou D, Mourtzinis D (1986) Unusual pathologic findings in a girl with Wolf-Hirschhorn syndrome, del (4p). *Pediatr Pathol*, p. 161-5.
 26. Wright TJ, R.D., Denison K, Abmayr S, Cotter PD, Hirschhorn K, Keinanen M, McDonald-McGinn D, Somer M, Spinner N, Yang-Feng T, Zackai E, Altherr MR (1997) A transcript map of the newly defined 165 kb Wolf-Hirschhorn syndrome critical region. *Hum Mol Genet*, p. 317-24.
 27. Gottfried M, L.L., Roessmann U (1981) Neuropathological findings in Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome. *Acta Neuropathol*, p. 163-5.
 28. Van Buggenhout G., M.C., Dutta B., Froyen G., Van Hummelen P., Marynen P., Matthijs G., de Ravel T., Devriendt K., Fryns J. P., Vermeesch J. R (2004) Mild Wolf-Hirschhorn syndrome: micro-array CGH analysis of atypical 4p 16.3 deletions enables refinement of the genotype-phenotype map. *J Med Genet*, 41: p. 691-698.
 29. Sgro V, R.E., Canevini MP, Colamaria V, Rottoli A, Minotti L, Canger R, Dalla Bernardina B (1995) 4p-Syndrome: a chromosomal disorder associated with a particular EEG pattern. *Epilepsia*, 36: p. 1206-1214.
 30. M. Zollino, R.L., R. Fischetto, M. Murdolo, F. Faravelli, A. Selicorni, C. Butte, I. Memo, G. Capovilla, G. Neri (2003) Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. *Am. J. Hum. Genet*, 72: p. 590-597.
 31. Rodriguez L., Z.M., Climent S., Mansilla E., Lopez-Grondona F., Martinez-Fernandez M. L., Murdolo M., Martinez-Frias M. L (2005) The New Wolf-Hirschhorn Syndrome Critical Region. *Am. J. Med. Genet*, 136A: p. 175-178.
 32. Wright TJ, C.J., Naranjo C, Francis-West P, Altherr MR (1999) Comparative analysis of a novel gene from the Wolf-Hirschhorn/Pitt-Rogers-Danks syndrome critical region. *Genomics*, p. 203-12.
 33. Stec I, W.T., van Ommen GJ, de Boer PA, van Haeringen A, Moorman AF, Altherr MR, den Dunnen JT (1998) WHSC1, a 90 kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a *Drosophila* dysmorphia gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical

- region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma. *Hum Mol Genet*, p. 1071-82.
34. N. Pfarr, S.E., S. Schlickum, C. Steglich, M. Oswald, B.U. Zabel, J.-H. Bebermeier, A. Winterpacht (2001) Complete transcript map of the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region (WHSCR) by comparative sequence analysis between man and mouse, expression analysis and functional studies. *Am. J. Hum. Genet.*, 69: p. 465.
 35. Ende S, F.M., Pak SJ, Zabel BU, Winterpacht A (1999) LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2+)-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics*, p. 218-25.
 36. Schlickum S, M.A., Simpson JC, Steglich C, O'Brien RJ, Winterpacht A, Ende SU (2004) LETM1, a gene deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome, encodes an evolutionarily conserved mitochondrial protein. *Genomics*, p. 254-61.
 37. Birnboim H C, D.J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7: p. 1513-1523.
 38. Saiki RK, G.D., Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839): p. 487-91.
 39. Macgregor HC, M.S. (1976) In situ hybridization of "nick-translated" 3H-ribosomal DNA to chromosomes from salamanders. *Chromosoma*, 54(1): p. 15-25.
 40. Gusella JF, A.M., McClatchey AI, Doucette-Stamm LA, Tagle D, Plummer S, Groot N, Barnes G, Hummerich H, Collins FS, Housman DE, Lehrach H, MacDonald ME, Bates G, Wasmuth JJ (1992) Sequence-Tagged Sites (STSs) Spanning 4 p16.3 and the Huntington Disease Candidate Region. *Genomics*, 13: p. 75-80.
 41. Kocks A, E.S., Heller R, Schröder B, Schäfer H-J, Städtler C, Makrigeorgi-Butera M, Winterpacht A (2002) Partial deletion of 4p and 4q in a fetus with ring chromosome 4: phenotype and molecular mapping of the breakpoints. *J Med Genet*, 39: p. e23.
 42. Ende, S. (2000) Molekulare Untersuchung des Wolf-Hirschhorn-Syndroms. Transkriptidentifizierung und Gencharakterisierung in der distalen Chromosomenregion 4p16.3. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
 43. Tsai CH, V.D.D., Feldman GL (1999) Child with velocardiofacial syndrome and del (4)(q34.2): another critical region associated with a velocardiofacial syndrome-like phenotype. *Am J Med Genet*, p. 336-9.
 44. Firulli, A.B. (2003) A HANDful of questions: the molecular biology of the heart and neural crest derivatives (HAND)-subclass of basic helix-loop-helix transcription factors. *Gene*, 312: p. 27-40.
 45. Deepak Srivastava, M. (2003) Building a heart: Implications for congenital heart disease. *J Nucl Cardiol*, 10: p. 63-70.
 46. Srivastava D, T.T., Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN (1997) Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet*, p. 154-60.
 47. Sevim Balci, Ö.E., Dilek Aktas, Ibrahim Vargel, M.S. Beksac, Kristin Mrasek, Joris Vermeesch, and Thomas Liehr (2006) Ring Chromosome 4

- and Wolf-Hirschhorn Syndrome (WHS) in a Child With Multiple Anomalies. *American Journal of Medical Genetics*, 140A: p. 628-632.
48. Eric Scott Sills, M.B., Laurinda D Parker, Lisa P Carrol, Lisa L Kephart, CS Dyer, Peter R Papenhausen and Jessica G Davis (2007) Further phenotypic delineation of subtelomeric (terminal) 4q deletion with emphasis on intracranial and reproductive anatomy. *Orhanet Journal of Rare Diseases*, 2.
 49. Roberto Quadrelli, E.M.S., Alicia Vaglio, Mariela Larrandaburu, Burix Mechoso, Andrea Quadrelli, Yao-Shan Fan, Taosheng Huang (2007) A Girl with del(4)(q33) and Occipital Encephalocele: Clinical Description and Molecular Genetic Characterization of a Rare Patient. *Genetic Testing*, 11: p. 4-10.
 50. Naf D, W.L., Bergstrom RA, Smith RS, Goodwin NC, Verkerk A, van Ommen GJ, Ackerman SL, Frankel WN, Schimenti JC (2001) Mouse models for the Wolf-Hirschhorn deletion syndrome. *Hum Mol Genet*, p. 91-8.
 51. Feenstra I., B.H.G., van Ravenswaaij C. M. A. (2006) Cytogenetic genotype-phenotype studies: Improving genotyping, phenotyping and data storage. *Cytogenetic and Genome Research*, 115: p. 231-239.

Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Prof. Dr. rer. nat. Andreas Winterpacht danke ich außerordentlich für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen, Hinweise und Motivation bezüglich der Arbeit und der guten Betreuung.

Herrn Universitätsprofessor Prof. Dr. Andreas Gal danke ich - als Direktor des Instituts für Humangenetik - für die Möglichkeit einer freien und unabhängigen Forschung in seiner Klinik.

Frau Dr. rer. nat. Sabine Endeke danke ich sehr für die kooperative Zusammenarbeit, die gute Betreuung und die zahlreichen Ideen bei der Arbeit im Labor und für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Dr. med. Raoul Heller danke ich für die die zahlreichen Anregungen und die fachliche Diskussion der klinischen Ergebnisse.

Den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik, insbesondere Frau B. Schröder und Frau K. von Hadeln, möchte ich für die Arbeit im Labor und die gute Betreuung danken.

Ich danke Prof. Dr. H. Schäfer - als ehemaligem Direktor des Pathologischen Instituts - sowie seinem Mitarbeiter Dr. C. Städtler (Obduzent) und Prof. Dr. mult. D. Stavrou -als ehemaligem Direktor des Instituts für Neuropathologie - und seiner Mitarbeiterin Frau Dr. M. Makrigeorgi-Butera für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Geduld, Unterstützung und Motivation.

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: