

**Aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf**

**Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Gal**

**Zwei verschiedene unbalancierte Karyotypen,  
hervorgegangen aus einer mütterlichen  
balancierten Translokation t(10;22)  
bei drei Geschwistern mit schwerwiegenden  
klinischen Auffälligkeiten**

**DISSERTATION**

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

**Dr. rer. nat. Mojgan Drasdo**

**Hamburg 2011**

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 27.07.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. A. Gal**

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. R. Santer**

**Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. M. Horstmann**

# INHALTVERZEICHNIS:

<b>1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
2.1. Indikation für eine postnatale zytogenetische Chromosomenanalyse .....	1
2.2. Entstehung und Folgen reziproker Translokationen .....	2
2.3. Methodik und Fragestellungen der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	6
2.4. Organisation der Subtelomerregion und ihre Bedeutung für chromosomale Rearrangements .....	9
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Konventionelle Chromosomen-Analyse.....</b>	<b>12</b>
3.1.1. Kultivierung und Aufarbeitung der Blutkulturen .....	12
3.1.2. G-Bänderung der Chromosomen .....	14
<b>3.2. Molekularzytogenetische Chromosomen-Analyse mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....</b>	<b>15</b>
3.2.1. Vorbehandlung der Chromosomenpräparate .....	15
3.2.2. Hybridisierung der Chromosomenpräparate.....	16
3.2.3. Untersuchung der Chromosomen nach <i>in situ</i> Hybridisierung.....	16
<b>3.3. Subtelomerscreening mit der ToTelVysion Multi-color FISH Probe.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4. Herstellung von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden aus BAC- und Fosmid- Klonen .....</b>	<b>19</b>
3.4.1. BAC-Klone .....	19
3.4.2. Fosmid-Klone .....	20
3.4.3. Isolierung von BAC- und Fosmid-DNA aus E. coli.....	22
3.4.4. Synthese und Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten BAC- und Fosmid-DNA- Sonden .....	23
<b>4. FALLBESCHREIBUNG UND ZYTOGENETISCHE DIAGNOSTIK .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Patientin 1 [P1].....</b>	<b>25</b>
4.1.1 Anamnese.....	25
4.1.2. Zytogenetische Untersuchung der Patientin1 (P1) .....	27

4.1.2.1. Karyotypisierung von P1 mittels konventioneller Chromosomenanalyse.....	27
4.2.2.2. Verifizierung und Verfeinerung des zytogenetischen Befundes mittels molekularzytogenetischen Subtelomerscreening an Metaphase-Chromosomen bei P1 .....	28
<b>4.2. Patient 2 [P2] .....</b>	<b>30</b>
4.2.1. Anamnese.....	30
4.2.2. Zytogenetische Untersuchung des Patienten (P2) .....	31
4.2.2.1. Karyotypisierung von Patient 2 mittels konventioneller Chromosomenanalyse.....	31
4.2.2.2. Verifizierung des zytogenetischen Befundes mittels molekularzytogenetischer Untersuchung an Metaphase-Chromosomen von P2.....	32
<b>4.3. Zytogenetische Untersuchung der Eltern .....</b>	<b>33</b>
4.3.1. Karyotypisierung mittels konventioneller Chromosomenanalyse.....	33
4.3.2. Verifizierung des zytogenetischen Befundes der Mutter mittels molekularzytogenetischer Analyse .....	34
<b>4.4. Patientin 3 [P3].....</b>	<b>36</b>
4.4.1. Anamnese.....	36
4.4.2. Zytogenetische Untersuchung der Patientin 3 (P3) .....	37
4.4.2.1. Karyotypisierung der Patientin 3 mittels konventioneller Chromosomenanalyse .....	37
4.4.2.2. Molekularzytogenetische Untersuchung von P3 mittels FISH-Analysen .....	38
<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1. Bruchpunktbestimmung anhand der mütterlichen Chromosomen.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2. Bruchpunktbestimmung mit Hilfe von BAC-Klonen auf Chromosom 10 .....</b>	<b>42</b>
<b>5.3. Weitere Eingrenzung der Bruchpunktregion in 10q26.13 mittels FISH-Analyse mit Fosmid-Klonen .....</b>	<b>44</b>
<b>5.4. Bruchpunktbestimmung mit Hilfe von BAC-Klonen auf Chromosom 22 .....</b>	<b>47</b>
<b>5.5. Weitere Eingrenzung der Bruchpunktregion in 22q13.32 mittels FISH-Analyse mit Fosmid-Klonen .....</b>	<b>49</b>
<b>5.6. Bestätigung der Bruchpunktlokalisierung bei den Patienten P1, P2 und P3 .....</b>	<b>51</b>
<b>6. DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>
<b>6.1. Zwei Formen eines unbalancierten Zustandes hervorgegangen aus einer maternalen reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 22 und 10 .....</b>	<b>55</b>
<b>6.2. Eingrenzung der Bruchpunktregionen auf den Chromosomen 10 und 22 .....</b>	<b>57</b>
<b>6.3. Phänotypische Auswirkung der Bruchereignisse .....</b>	<b>58</b>

<b>6.4. Zwei Formen einer Imbalance durch Adjacent-1-Segregation .....</b>	<b>59</b>
<b>6.5. Klinische Merkmale bei Trägern einer partiellen Trisomie 22qter und die Gemeinsamkeiten mit P1 und P2 .....</b>	<b>60</b>
<b>6.6. Klinische Merkmale bei Trägern einer partiellen Monosomie 10qter und die Gemeinsamkeiten mit P1 und P2 .....</b>	<b>61</b>
<b>6.7. Klinische Merkmale bei Trägern einer partiellen Monosomie 22 und die Gemeinsamkeiten mit P3.....</b>	<b>67</b>
<b>6.8. Klinische Merkmale bei Trägern einer partiellen Trisomie 10q26 und die Gemeinsamkeiten mit P3.....</b>	<b>69</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>72</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>73</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>80</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>81</b>
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>82</b>

# 1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Bei drei Geschwistern wurden zwei verschiedene Formen eines unbalancierten Karyotyps, hervorgegangen aus einer mütterlichen Translokation zwischen einem Chromosom 10 und 22 festgestellt, die sowohl gleiche als auch unterschiedliche klinische Auffälligkeiten zeigten. Hierzu gehören Entwicklungsverzögerung, mentale Retardierung, Herzfehler und faziale Dysmorphien. Die Chromosomenanalyse zeigt zwei verschiedene Formen eines unbalancierten Karyotyps, hervorgegangen aus einer mütterlichen Translokation zwischen einem Chromosom 10 und 22.

In dieser Arbeit sollten zuerst anhand der mütterlichen balancierten Translokation die genauen Bruchpunkte auf Chromosom 10qter und 22qter bestimmt werden. Damit können einerseits möglicherweise unterbrochene Gene identifiziert und andererseits die Größe von translozierten DNA-Abschnitten und damit das Ausmaß der partiellen Monosomien bzw. Trisomien bei den unbalancierten Nachkommen bestimmt werden.

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe von Datenbanken- und Literaturrecherche die Korrelation zwischen Phänotyp und translozierten Regionen untersucht, und diese Ergebnisse mit den klinischen Befunden unserer Patienten diskutiert.

## 2. EINLEITUNG

### 2.1. Indikation für eine postnatale zytogenetische Chromosomenanalyse

Unter angeborenen Fehlbildungen versteht man die funktionellen Defekte und strukturellen Abweichungen eines Organes. Zu den wichtigen Ursachen gehören genetische Störungen bzw. chromosomale Aberrationen in 25% der Fälle (Graumann und Baur 2004). Man spricht von einer chromosomalen Aberration, wenn die genetischen Veränderungen durch eine zytogenetische Chromosomenanalyse nachweisbar sind. Chromosomenaberrationen werden in numerische und strukturelle Veränderungen eingeteilt.

Bei numerischen Chromosomenaberrationen ist die Chromosomenzahl verändert. Es werden drei Arten numerischer Chromosomenanomalien unterschieden: Polyploidie (Vervielfachung des Chromosomensatzes, z. B. Triploidie), Aneuploidie (Anzahl einzelner Chromosomen vermehrt oder verringert, z.B. Trisomie 21, Monosomie X) und Mixoploidie (Mosaik aus zwei oder mehr Zelllinien mit unterschiedlicher Anzahl der Chromosomen).

Strukturelle Chromosomenaberrationen entstehen bei Chromosomenbrüchen und deren Reparatur und können unterschiedliche Folgen haben. So können ein balancierter Zustand ohne Zugewinn oder Verlust an genetischem Material (z. B. im Falle einer Inversion und reziproken Translokation) oder ein unbalancierter Zustand mit Zugewinn oder Verlust an genetischem Material (z.B. im Falle einer Deletion, Duplikation und unbalancierter Translokation) entstehen.

Chromosomale Aberrationen kommen mit einer Frequenz von ca. 0,6% bei Neugeborenen vor (Tamura 2002). Unter ihnen ist die Trisomie 21 (Down Syndrom) mit einer Frequenz von 0,12% die häufigste Störung. Bei den strukturellen Aberrationen überwiegen die balancierten Translokationen mit einer Frequenz von 0,18% (Jacobs *et al.* 1992, Gardner 2004).

Das typische klinische Bild von angeborenen Chromosomenstörungen ist gekennzeichnet durch die klassische Trias von Dysmorphien, variablen Organfehlbildungen und mentaler Retardierung. Meist besteht auch eine gewisse Wachstumsverzögerung.

Bei Kindern und Jugendlichen mit den genannten klinischen Merkmalen werden häufig konventionelle und molekularzytogenetische Chromosomenanalysen durchgeführt, um eventuell vorhandene chromosomale Aberrationen zu identifizieren. Auch bei fehlendem

Eintritt der Pubertät und/oder Anomalien der Genitalorgane kann eine zytogenetische Chromosomenanalyse durchgeführt werden und zur Klärung der Ursachen beitragen. Bei gesunden Erwachsenen kann eine Chromosomenanalyse angeboten werden bei bekannter Chromosomenaberration in der Familie, Frühgeburten mit Fehlbildungen, rezidivierenden Aborten, Infertilität und vor einer *in vitro* Fertilisation (IVF).

## 2.2. Entstehung und Folgen reziproker Translokationen

Unter einer Translokation versteht man eine Umlagerung von Chromosomenabschnitten innerhalb eines Chromosomenbestandes. Die reziproke Translokation ist die häufigste Form einer Translokation. Bei der reziproken Translokation kommt es zu je einem Bruch in zwei nicht homologen Chromosomen, wobei jeweils ein Teilstück mit dem Centromer („centrisches Segment“) und ein Centromerfreies Segment entstehen. Anschließend wird jeweils ein zentrisches Segment mit dem Centromerfreien Segment des nicht homologen Chromosoms verbunden. Der Austausch der Segmente betroffener Chromosomen wird durch Ähnlichkeiten der DNA-Sequenzen gefördert. Centromerfreie Segmente, die zwischen den beteiligten Chromosomen ausgetauscht werden, bezeichnet man als die „translozierten Segmente“ (Abb.1.1), die rearrangierten Chromosomen als derivative Chromosomen.

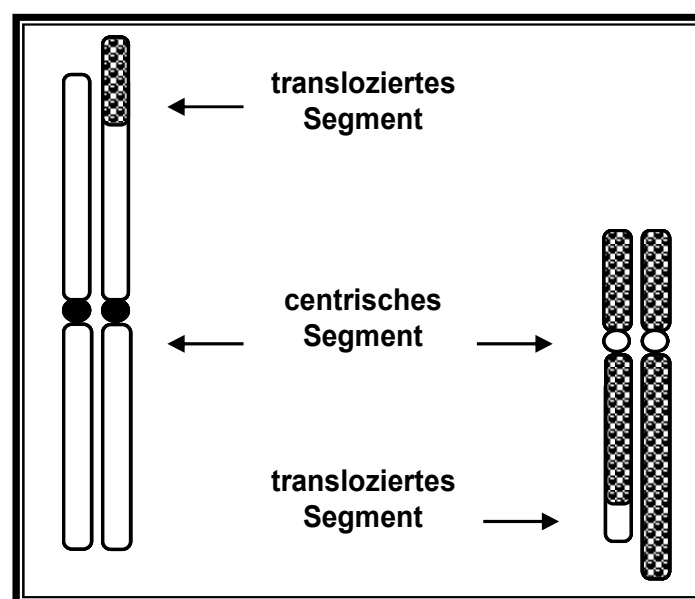


Abb.1.1.: Schematische Darstellung einer reziproken Translokation.



Man spricht von einer balancierten Translokation, wenn es hierbei lichtmikroskopisch weder zum Verlust noch zum Zugewinn von genetischem Material kommt.

Eine Translokation kann *de novo* entstehen oder durch einen Träger in der Familie vererbt werden. In der Normalbevölkerung kommt eine reziproke Translokation mit einer Häufigkeit von ca. 1 zu 500 vor (Scriven 1998, Van Dyke 1983).

Träger einer balancierten Translokation sind in der Regel phänotypisch unauffällig, haben aber ein hohes Risiko für Fehlgeburten und für Nachkommen mit mentalen und/oder physischen Anomalien. Der Grund für dieses Risiko ist die Entstehung einer segmentalen Aneusomie nach Befruchtung entsprechend unbalancierter Keimzellen der Translokationsträger. Segmentale Aneusomie ist ein typischer unbalancierter Zustand, in dem eines der zwischen zwei nicht homologen Chromosomen tranlozierten Segmente dupliziert, während das andere deletiert ist. Dieser Zustand entspricht zugleich einer vorliegenden partiellen Trisomie und Monosomie.

Abhängig von den beteiligten Chromosomen haben viele Translokationsträger ein Risiko von 5-10%, ein Kind mit angeblichen Anomalien zu bekommen. Nur bei wenigen Translokationsträgern liegt dieses Risiko bei 20% oder darüber (Gardner und Sutherland 2004). Demgegenüber ist das Risiko für Fehlgeburten generell sehr hoch.

Eine segmentale Aneusomie entsteht während der Keimzellreifung. Normalerweise bilden die beiden homologen Chromosomen in der Prophase von Meiose I sog. Bivalente. Im Fall einer reziproken Translokation bilden die derivativen Chromosomen zusammen mit den beiden normalen Chromosomen hingegen ein Quadrivalent. Hierbei handelt es sich um eine kreuzförmige Konfiguration, welche die Paarung aller homologen Segmente ermöglicht (Abb.1.2.).

In der Anaphase von Meiose I kommt es zur Segregation, wobei sich die homologen Chromosomen trennen. Die typische Trennung ist die 2:2 Segregation. Dabei erhalten beide Tochterzellen jeweils zwei von vier Chromosomen. Die 3:1 Segregation und die 4:0 Segregation sind zwar selten, kommen aber vor.

Bei der 2:2 Segregation ist entscheidend, welche zwei Chromosomen zusammen in eine Zelle gelangen. In Abb. 1.2. sind die drei Möglichkeiten der 2:2 Segregation schematisch dargestellt. Hierbei werden die normalen Chromosomen als A und B, die derivativen Chromosomen als A' und B' bezeichnet. Wenn die zwei normalen Chromosomen A & B zusammen in die erste und die zwei derivativen Chromosomen A' und B' in die zweite Tochterzelle kommen, so bezeichnet man diese Trennung als alternierende Segregation (Abb.1.2.a). Wenn ein normales Chromosom von einem Paar und das derivative

Chromosom von dem anderen Paar, d.h. A & B' bzw. B & A' in einer Zelle zusammenkommen, nennt man dies Adjacent-1 Segregation (Abb.1.2.b). Von einer Adjacent-2 Segregation spricht man, wenn die Keimzellen jeweils das normale und das derivative Chromosom mit dem gleichen zentrischen Segment, d. h. die Kombination A & A' bzw. B & B' erhalten (Abb.1.2.c).

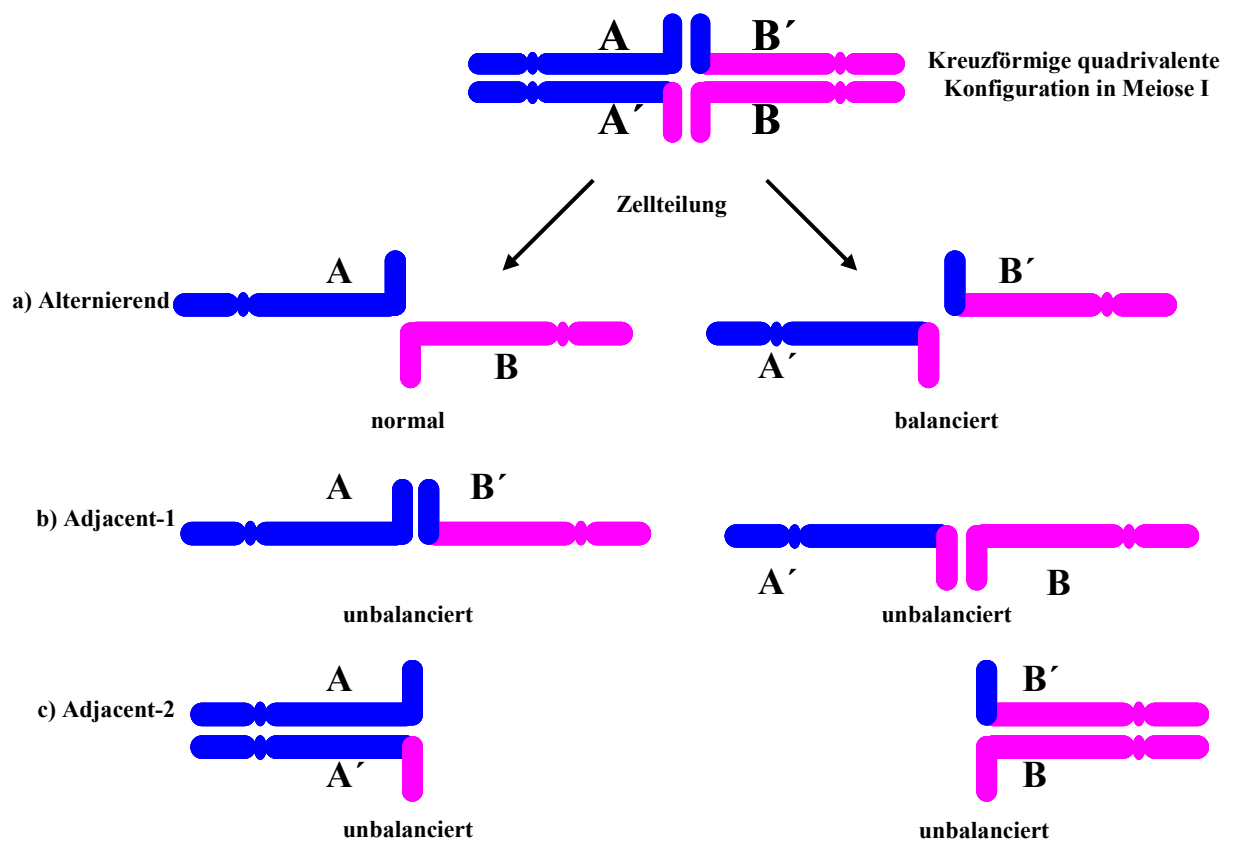


Abb.1.2. 2:2 Segregation in der Meiose I bei einer reziproken Translokation. Die partiellen Karyotypen der beiden Keimzellen nach Segregation sind horizontal nebeneinander dargestellt.

Beispielsweise wird bei einer Trägerin einer reziproken Translokation der Chromosomensatz einer befruchteten Eizelle durch die Art der Chromosomen-Segregation bei der Keimzellbildung bestimmt. Die aus einer alternierenden Segregation hervorgegangene Eizelle hat ein vollständiges Genom. Nach Befruchtung dieser Eizelle mit einem chromosomal normalen Spermium entsteht ein Embryo mit entweder einem normalen oder einem balancierten Chromosomensatz, was in beiden Fällen in der Regel einen normalen Phänotyp zur Folge hat. Bei einem Embryo nach Zygotenbildung unter Beteiligung einer aus Adjacent-1 Segregation hervorgegangenen Eizelle liegt ein Karyotyp mit einer partiellen Trisomie für das eine und einer partiellen Monosomie für das andere translozierte Segment vor. Die Zygote nach vorangegangener Adjacent-2 Segregation zeigt jeweils sowohl eine Trisomie für das zentrische Segment des einen Chromosoms als auch eine Monosomie für das zentrische Segment des anderen Chromosoms. Derartige Chromosomenkonstellationen sind in der Regel nicht lebensfähig vereinbar. Die partiellen Karyotypen der aus unterschiedlichen Segregationsformen hervorgegangenen Eizellen vor und nach der Befruchtung sind in Abb. 1.3. schematisch dargestellt.

Unbalancierte Chromosomen-Kombinationen sind häufig mit einer enormen genetischen Imbalance verbunden, so dass es sehr früh in der Schwangerschaft zu einem okkulten Abort kommen kann oder die Einnistung der Zygote gar nicht erst stattfindet. Mildere Imbalancen führen zur späteren Aborten oder Fehlgeburten. Nur Embryonen mit einer geringen Imbalance, d. h. mit kleinen translozierten Segmenten, haben eine Überlebenschance. Eine partielle Trisomie oder Monosomie ist mit dem Leben vereinbar, wenn nur kleine terminale Segmente involviert sind, die entweder keine Gene oder Gene enthalten, deren Produkte eine Dosis-unabhängige Funktion haben. Diese Situation ist am ehesten nach einer Adjacent-1-Segregation gegeben.

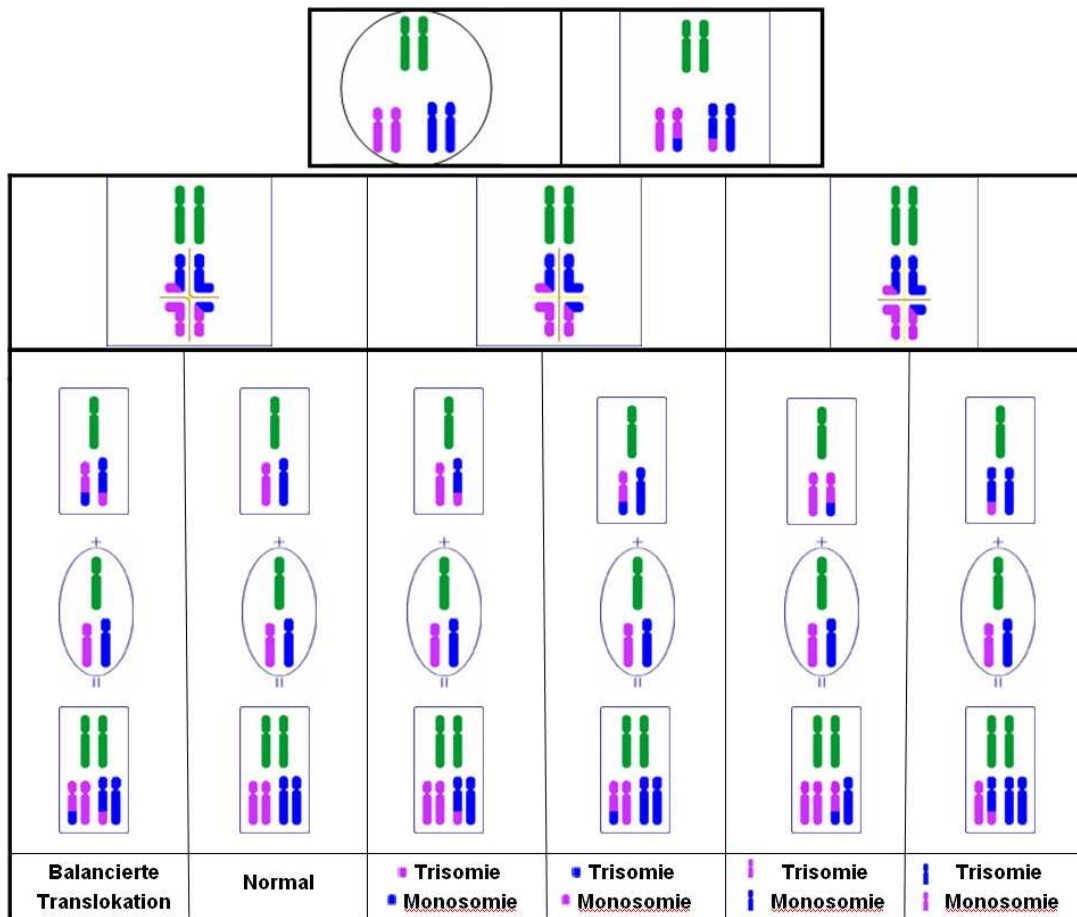


Abb. 1.3. Mögliche Chromosomenkonstellationen in den Eizellen und Zygoten der Trägerin einer reziproken Translokation. Die grün markierten Chromosomen symbolisieren die 21 weiteren Chromosomenpaare, die nicht an der Translokation beteiligt sind. Das geänderte Bild entnommen aus: <http://www.tokyo-med.ac.jp/genet/index-e.htm>

### 2.3. Methodik und Fragestellungen der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

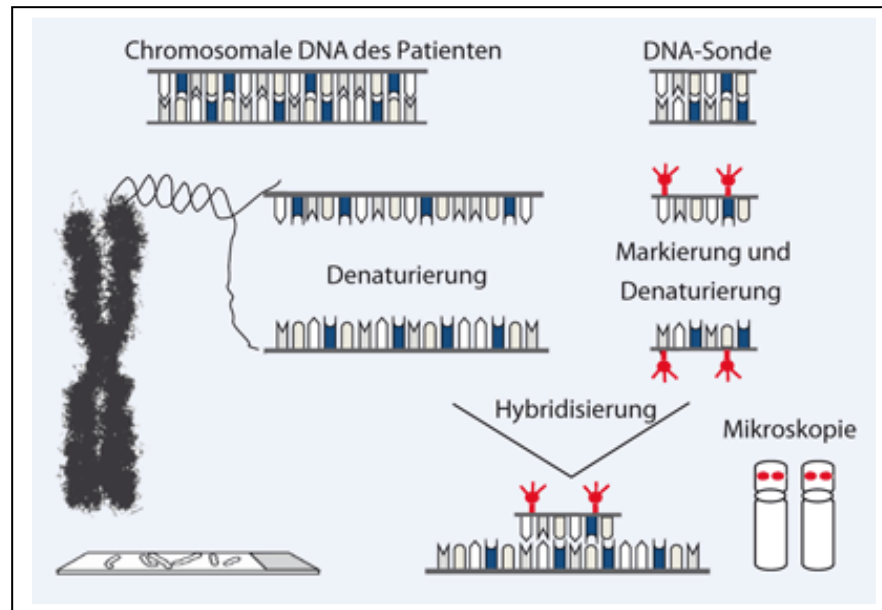
Klassische zytogenetische Methoden wie Orcein- und Giemsa-Färbungen erlaubten zunächst nur eine grobe Gruppierung der Chromosomen nach Länge und der Lage ihres Zentromers. Mit der Entwicklung der Bänderungstechnik (Zech 1979) wurde es möglich, neben numerischen Chromosomenaberrationen auch intra- und interchromosomale Rearrangments zu identifizieren. Sind die chromosomalen Rearrangements kleiner als 5 Mb, werden sie mit den konventionellen Bänderungstechniken in der Regel nicht detektiert. Mit den heutigen molekularzytogenetischen Methoden (FISH) können chromosomale

Aberrationen mit einem Auflösungsvermögen von bis zu 50 kb kartiert werden (Liehr *et al.* 2002).

FISH basiert auf der 1969 von Gall und Pardue entwickelten *in situ* Hybridisierungsmethode (ISH) (Rooney und Czepulkowski 1992), mit der Nukleinsäuresequenzen *in situ*, d.h. in ihrer natürlichen Umgebung wie Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen sichtbar gemacht werden können. Während der 70er Jahre wurden für ISH radioaktiv markierte DNA-Sonden benutzt. Diese wurden schließlich immer mehr durch fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden ersetzt.

Grundlage für die ISH-Technik bilden die komplementären Basenpaarungen in der DNA-Doppelhelix. Diese Bindungen können durch physikalische Kräfte leicht aufgelöst werden, wobei zwei zueinander komplementäre einzelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Die als Schmelzen bezeichnete Denaturierung der DNA ist reversibel. Unter geeigneten Milieu- und Temperaturbedingungen finden die beiden DNA-Einzelstränge über komplementäre Basenpaarung wieder zu einer Doppelhelix zusammen. Mischt man DNA-Moleküle vor Denaturierung mit DNA-Molekülen anderer Herkunft, so kommt es bei Renaturierung des DNA-Gemischs zur Ausbildung von Hybridmolekülen, wenn beide DNA-Spezies Sequenzhomologien aufweisen. Diesen Vorgang der Reassoziaton von Nukleinsäuremolekülen unterschiedlicher Herkunft aufgrund von Sequenzhomologien bezeichnet man als Hybridisierung. Durch ISH ist es möglich, spezifische Nukleinsäuresequenzen *in situ* mit Hilfe komplementärer, markierter Nukleinsäuremoleküle zu detektieren, die als Sonden dienen. Wenn die Sonde mit Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, wird dieses Vorgehen als Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) bezeichnet.

Bei der diagnostischen FISH-Methode werden gezielt hergestellte fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden und die DNA auf Chromosomenpräparaten von Patienten mittels Hitze zur Einzelsträngen denaturiert. Bei der Hybridisierung der komplementären DNA-Sequenzen lagern sich die fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden an die passenden Bereiche der Patienten-DNA an. Im Fluoreszenzmikroskop werden so das Vorhandensein und die Lokalisation der entsprechenden DNA-Sequenzen des Patienten mit Hilfe des Fluoreszenzsignals der Sonde erkennbar (Abb. 1.5.).



**Abb. 1.5.** Schematische Darstellung der FISH-Technik für die Diagnosestellung der chromosomalen Aberrationen (entnommen von Schröck *et al.* 2008).

Die entscheidende Voraussetzung für die diagnostische Anwendung der FISH-Methode war erfüllt, als es erstmals gelang, die komplexe DNA unter Suppression repetitiver DNA-Elemente hochspezifisch zu hybridisieren. Unspezifische repetitive Sequenzen sind über das gesamte Genom verteilt. Bei einer Hybridisierung mit DNA-Sonden führt dies zu einer unspezifischen Hintergrund-Fluoreszenz auf den Chromosomen. Durch Vorhybridisierung mit einem Überschuss von nicht markierter kompetitiver DNA werden die repetitiven Sequenzen abgesättigt. Währenddessen bleiben die für die Sonden zielspezifischen Einzel-Kopie-Sequenzen einzelsträngig. Diese Methode wird chromosomale *in situ* Suppressions [CISS]-Hybridisierung genannt (Lichter *et al.* 1998).

FISH ist die meist verwendete Methode in der zytogenetischen Diagnostik und Forschung. Sie wird zur Identifizierung und Analyse von Strukturaberrationen, darunter Mikrodeletionen, Duplikationen, Inversionen, Translokationen sowie für die Charakterisierung von Markerchromosomen, zur Kartierung von Chromosomenbruchpunkten und für das Aneuploidiescreening im pränatalen Schnelltest benutzt.

Mit der FISH-Technik kann man abhängig von der Art der verwendeten DNA-Sonden das gesamte Chromosom (whole Chromosome painting, wcp), Teilbereiche eines Chromosoms (partial chromosome painting, pcp), einen spezifischen Abschnitt von einer

Chromosomenbande sowie Telomere und Zentromere sichtbar machen (Liehr und Claussen 2002).

## **2.4. Organisation der Subtelomerregion und ihre Bedeutung für chromosomale Rearrangements**

Insgesamt 5% des Euchromatins im Humangenom bilden Segmente mit nahezu identischer Sequenz, die durch wiederholte Duplikationsereignisse entstanden sind und als Duplicons bezeichnet werden. Diese Duplicons besitzen über 90% Sequenzübereinstimmung und können in ihrer Länge von 1 bis 200 kb sehr stark variieren (Ambrosini *et al.* 2007, Riethman *et al.* 2004). Obwohl die Duplikons im ganzen Genom verteilt sind, neigen sie zur Clusterbildung, besonders wenn sie sich in der Nähe von Zentromeren und Telomeren befinden. Diese instabilen Bereiche des Genoms sind bevorzugte Orte für krankheitsrelevante chromosomale Bruchpunkte (Stankiewicz und Lupski 2002), „*large-scale copy number polymorphisms*“ (Iafrate *et al.* 2004), sowie evolutionäre chromosomale Bruchpunkte (Murphy *et al.* 2005).

Die Enden der Chromosomen werden von den sogenannten Telomeren gebildet, die aus zahlreichen (TTAGGG)-Wiederholungen einer Gesamtlänge von 5-15 kb bestehen (Riethman 2008). Unmittelbar proximal zu den terminalen (TTAGGG)-Wiederholungen liegt die Subtelomerregion, die aus einer komplexen Abfolge von „subtelomerischen repeats“ (Srpt) besteht.

Jedes dieser Srpt kann man sich als eine Art Patchwork aus verschiedenen Duplicons vorstellen (Mefford und Trask 2002), von denen einige nur im Subtelomerbereich eines Chromosoms, andere dagegen in verschiedenen Subtelomeren vorkommen. Zusätzlich befinden sich in den Subtelomerregionen Einzel-Kopie Sequenzen sowie (TTAGGG)n-ähnliche Sequenzen, welche die Duplicons flankieren.

Die Größe, Sequenz und Organisation der Duplicons in Verbindung mit Telomer- und Einzel-Kopie Sequenzen sind für jedes Subtelomer unterschiedlich. Es scheint, dass die in der Nähe von Telomeren gefundenen „*large-scale polymorphisms*“ (50-500 kb) primär auf variablen Kombinationen von Duplicons beruhen. Die Architektur jeder humanen Subtelomerregion ist demnach hinsichtlich ihres Srpt-Bestandes einzigartig, und zwar nicht nur für verschiedene Telomere, sondern oft auch für verschiedene Allele eines Telomers (Riethman *et al.* 2004).

Seit 1996 gibt es ein komplettes Set von FISH-Sonden, die in einem Abstand von etwa 300 kb vor den Telomer-Bereichen an die DNA binden (Colleaux *et al.* 2001, Rio *et al.* 2002). Die FISH-Analyse mittels dieser Sonden dient als Standardmethode zur Untersuchung der Subtelomerregionen. Das Subtelomerscreening hat einige Vorteile: Die Subtelomerregionen sind genreich, somit haben Veränderungen in diesen Regionen häufiger phänotypische Konsequenzen als in anderen Bereichen des Genoms (Saccone *et al.* 1992). Zahlreiche strukturelle Aberrationen kommen in chromosomalen Subtelomerbereichen vor, die zu genetischen Erkrankungen führen können (Yao-Shan Fan 2002).

Die Untersuchung der Subtelomerregionen ist in zweierlei Hinsicht interessant:

Erstens wurden Transkripte nicht nur für Einzel-Kopie Sequenzen gefunden, sondern auch für Duplikons und Srpts. In den Subtelomerbereichen finden sich Mitglieder von 25 kleinen Gen-Familien in einer Dichte von einem Gen pro 30 kb (Linardopoulou *et al.* 2005). 18 dieser Gen-Familien haben mindestens ein subtelomerisches Mitglied, welches ein funktionales Protein kodiert. Subtelomerische Gene kodieren Proteine mit ganz verschiedenen Funktionen, wie z. B. Zytokin-Rezeptoren, Tubuline und Transkriptionsfaktoren.

Zweitens sind die Subtelomerbereiche aufgrund der großen Sequenzähnlichkeit, auch zwischen nichthomologen Chromosomen, begünstigte Orte für chromosomale Rearrangements wie Deletionen, Duplikationen und Translokationen während der Meiose. Diese mit Zugewinn, Verlust oder Umbau von genetischer Information verbundenen Ereignisse haben hier häufiger phänotypische Auswirkungen als in chromosomalen Bereichen mit geringerer Gendichte (Rooms *et al.* 2005).

Ein signifikanter Teil der genetischen Defekte bei der idiopathischen mentalen Retardierung und bei multiplen kongenitalen Anomalien beruht auf einem Rearrangement von subtelomerischen Chromosomenbereichen. So liegt die Häufigkeit subtelomerischer Rearrangements im Fall von mentaler Retardierung bei 5-7% (Rooms *et al.* 2005).

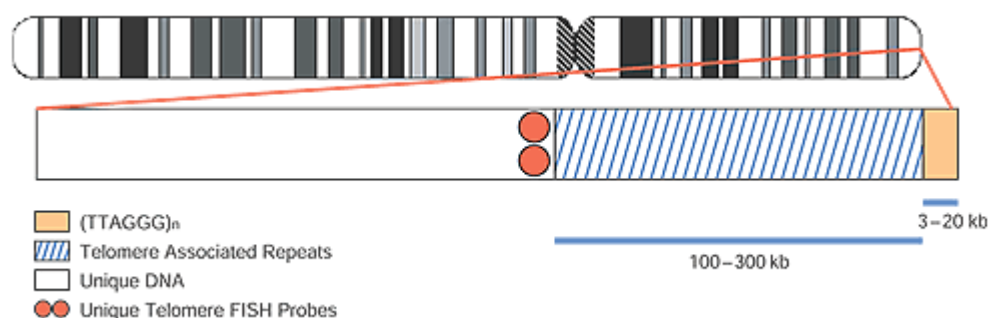
Die Identifizierung subtelomerischer Rearrangements ist heute ein wichtiger Bestandteil der zytogenetischen Diagnostik. Manche Rearrangements sind zu klein, um mit konventionellen Methoden wie G-Bänderung identifiziert zu werden. Bei einer optimalen Bänderung liegt die Auflösung bei 5-8 Mb.

Es existieren verschiedene hochauflösende Verfahren, die für den Nachweis von subtelomerischen Rearrangements Verwendung finden. Hierzu gehören Fluoreszenz *in situ*



Hybridisierung (FISH) mit subtelomerischen Sonden (Knight *et al.* 1997), Analyse mit Mikrosatelliten-Markern (Rio *et al.* 2002), HR-CGH (high-resolution comparative genomic hybridization) (Van Karnebeek *et al.* 2002), MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) (Koolen *et al.* 2004), MAPH (multiplex amplifiable probe hybridization) (Sismani *et al.* 2002, White *et al.* 2004), qPCR (real-time quantitative PCR) (Boehm *et al.* 2004) und Microarrays (Le Caignec *et al.* 2005).

Die Analyse der Subtelomerbereiche bei Mitgliedern der von uns untersuchten Familie wurde mit FISH unter Verwendung von subtelomerischen Sonden durchgeführt. Die Tatsache, dass die Subtelomerbereiche für jedes Telomer einzigartig sind, ermöglichte das Design von sequenzspezifischen Sonden. Jede dieser Sonden bindet an eine spezifische „single copy“ Sequenz eines bestimmten Chromosoms, die unmittelbar proximal zum Sprt liegt und eine Länge von 60-175 kb hat. In Abb. 1.4 ist die Bindungsstelle der Subtelomersonden schematisch dargestellt.



**Abb. 1.4. Schematische Darstellung der Bindungsstelle für eine Subtelomersonde auf einem Chromosom.** Die ToTelVysion probes (subtelomerspezifischen Sonden) binden im Abstand von 300 kb vor der Telomerregion und sind als zwei dunkelbraune Kreise dargestellt. Das Telomer besteht aus TTAGGG-Wiederholungen einer Länge von 3-20 kb (entnommen aus Abbott-Webseite. Schematic of the make-up of human chromosome telomeric regions. Diagram courtesy of C.Lese and D. Ledbetter, University of Chicago)

## 3. MATERIAL UND METHODEN

### 3.1. Konventionelle Chromosomen-Analyse

Chromosomen sind nur in der Mitose als einzelne Strukturen sichtbar. Aus diesem Grund benötigt man für jede Chromosomen-Analyse Zellen in Teilung. *In vivo* enthalten nur Zellen aus Knochenmark einen ausreichenden Anteil mitotischer Zellen. Andere Zellarten müssen vor einer Chromosomenuntersuchung zuerst kultiviert werden. Das gängigste Verfahren ist die Präparation von Chromosomen aus Blutkulturen. Zur Stimulation der Mitose gibt man Phytohämagglutinin hinzu, das unspezifisch T-Lymphozyten zur Teilung anregt. Nach zwei bis drei Tagen Kulturdauer wird durch Zugabe des Spindelgifts Colcemid die Teilung der Lymphozyten arretiert, so dass es zu einer relativen Anreicherung von Zellen in der Metaphase kommt.

#### 3.1.1. Kultivierung und Aufarbeitung der Blutkulturen

Material:

- LymphoGrow Komplett-Medium: LymphoGrow (CytoGen GmbH, Sinn, Germany)
- RPMI Komplett-Medium: RPMI 1640 (Gibco, Karlsruhe), 20% FCS (Biochrom, Berlin, Germany), 2 mM L-Glutamine (Gibco), 2% Phytohemagglutinin (Gibco)
- Methotrexat (MTX, Sigma, Arbeitslösung 0,5 mg/ml)
- Colcemid 10µg/ml (Gibco)
- Fixativ-Lösung: Gemisch aus 3 Teilen Methanol und einem Teil Eisessig 100%
- BrdU, 5-Bromo-2-deoxyuridine (Sigma, Arbeitslösung 153,5 mg /50 ml)
- 75 mM KCl (Merck)

Durchführung:

Von den Blutproben wurde je eine Kultur für die konventionelle Ernte von „schlichten“ Chromosomen mit einer Bandauflösung von ca. 350-500 bphs und eine Kultur für die Ernte von „langen“ Chromosomen mit hoher Auflösung der Bänderung (500-800 bphs) angesetzt. Letzteres wurde durch Behandlung der Zellen mit MTX und BrdU erreicht. Für die „schlichte“ Ernte erfolgte die Anzucht der Zellen in Lymphogrow Medium, für die „lange“

Ernte in RPMI Komplet-Medium. Es wurden jeweils 10 ml Medium in einem Glasröhrchen mit 0,3 ml heparinisiertem Venenblut angesetzt.

### **3.1.1.1. Präparation von „schlichten“ Chromosomen**

Die Kulturen wurden für 72 Stunden bei 37°C inkubiert, mit 0,2 ml Colcemid versehen und für weitere 45 min bei 37°C gehalten. Dann wurden die Zellen in ein 15 ml Plastikzentrifugenröhrchen überführt, für 10 min mit einer Geschwindigkeit von 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. 7 ml einer auf 37°C erwärmten KCl-Lösung wurden unter Aufwirbeln des Sediments auf dem Rüttler tropfenweise zu den Zellen gegeben, wonach eine zehnminütige Inkubation bei 37°C erfolgte. Durch diese hypotone Behandlung quellen die Lymphozyten und die Chromosomen können sich strecken. Nach gründlichem Mischen mit 10 Tropfen eiskalter Fixativlösung wurde der Ansatz schließlich wieder wie oben zentrifugiert, gefolgt vom Absaugen des Überstandes (s.o.). Unter Aufwirbeln des Sediments auf dem Rüttler wurden tropfenweise 6 ml eiskalte Fixativ-Lösung zugegeben, gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation (s.o.). Die Fixativ-Behandlung wurde noch zweimal wie beschrieben wiederholt bis der Zellüberstand klar war. Nach dem letzten Waschen wurde soviel Fixativ abgesaugt, bis das aufgeschüttelte Sediment eine leichte weißliche Trübung zeigte. Die Suspension wurde kalt gehalten und mit einer Mikroliterpipette auf entfettete, gereinigte und mit Aqua dest. benetzte kalte Objektträger aufgetropft (mehrere Tropfen von insgesamt ca. 100 µl pro OT). Vor der G-Bänderung wurden die Präparate für 15 min bei 95°C hitzefixiert.

### **3.1.1.2. Präparation von „langen“ Chromosomen unter Verwendung von MTX und BrdU**

Die Kulturen wurden für 50 Stunden bei 37°C inkubiert, wonach durch Zugabe von 150µl MTX eine Hemmung der DNA-Synthese erfolgte. Nach weiteren 17 Stunden Inkubationszeit wurde das MTX-haltige Medium von der Kultur abgesaugt und durch Zugabe von 100 µl vorgewärmter BrdU-Arbeitslösung plus 9 ml frischem Medium die Blockade der DNA-Synthese aufgehoben. Auf diese Weise werden die Zellen synchronisiert und der Anteil der Zellen in der frühen Prophase zum Zeitpunkt der Ernte

signifikant erhöht. Es folgte eine fünfstündige Inkubation bei 37°C bis zur Arretierung der Zellteilung mit 0,15 ml Colcemid für weitere 15 min bei 37°C. Nach Überführen der Zellen in ein Plastikzentrifugenröhrchen wurde die Ernte der „langen“ Chromosomen in der oben für die konventionelle Ernte beschriebenen Weise fortgesetzt.

### **3.1.2. G-Bänderung der Chromosomen**

Material:

- 0,25 %ige Trypsinlösung in HBSS
  - Trypsin solution (2,5%, von Gibco)
  - HBSS (Gibco)
- 10%ige Giemsa-Färbelösung
  - Giemsa's Azur-Eosin Methyleneblaulösung (Merck)
  - Weisesche Pufferlösung (Titrisol, pH 7,2, Merck)
- Xylol Isomerengemisch (Sigma)
- Eukitt [Cytooseal 60 (Richard-Allan-Scientific)]
- Deckgläschen 24 × 60 mm (Assistent)

Durchführung:

Präparate mit „schlichten“ Chromosomen wurden für 7 Sekunden und Präparate mit „langen“ Chromosomen für 9 Sekunden in Trypsin/HBSS Lösung getaucht. Danach wurden die OT sofort für ca. 9-10 min in eine Küvette mit Giemsa-Färbelösung überführt, anschließend kurz mit kaltem Leitungswasser abgespült und luftgetrocknet. Jedes Präparat wurde kurz (max. 3 min) in Xylol gewaschen und nach Auftragen von 2 Tropfen Eukitt mit einem Deckglas versehen.

#### **3.1.2.1. Analyse und Karyotypisierung an G-gebänderten Metaphasen**

Zunächst wurden die für eine Chromosomenanalyse geeigneten Metaphasen (mit vollständiger Chromosomenzahl und wenigen Überlagerungen) mikroskopisch identifiziert und ihre Koordinaten notiert. Danach wurden mit Hilfe des Computerprogramms Cytovision die Karyogramme von jeweils 5 Metaphasen erstellt und strukturell beurteilt.

## 3.2. Molekularzytogenetische Chromosomen-Analyse mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Für die FISH-Analyse wurden zunächst Präparate mit gespreiteten Metaphase Chromosomen durch Auftropfen der Zellsuspension auf vorbereitete Objektträger (s.o.) angefertigt. Die chromosomale DNA wurde auf den OT denaturiert, um im Folgenden eine Hybridisierung mit den markierten Sonden zu ermöglichen.

### 3.2.1. Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Material:

- 20× SSC (3M NaCl, 0,3 M Nacitrat, pH 7)
- Denaturierungsmix (70% Formamid in 2× SSC)
- Ethanol (70%, 80% und 90%)
- Deckgläschen (Assistent) (22 × 22 mm)
- Fixogum-Kleber (Marabu)
- Tween 20 (Sigma)
- Antifade-Lösung (Vectashield mounting medium with DAPI, Firma Vector)

Durchführung:

Die luftgetrockneten Chromosomenpräparate wurden für 5 min bei RT in 2× SSC gespült, jeweils 2 min in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 80%, 90%) dehydriert und anschließend luftgetrocknet. Dann wurden die Präparate für 3 min bei 70°C in Denaturierungsmix getaucht und anschließend sofort für 5 min in eiskaltes 2× SSC überführt, um die Reassoziaton der aufgeschmolzenen DNA-Doppelstränge zu verhindern. In aufsteigender eiskalter Ethanolreihe (70%, 80%, 90%) wurden die Präparate dann wieder für jeweils 2 min dehydriert und zum Schluss an der Luft getrocknet.

### 3.2.2. Hybridisierung der Chromosomenpräparate

Die fluoreszenzmarkierten kommerziellen-Sonden (Tabelle 3.1.) wurden nach Angaben des Herstellers mit Hybridisierungspuffer gemischt und vor Hybridisierung für 10 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Sonden auf das vorbehandelte Chromosomenpräparat pipettiert und dieses mit Deckgläschen versehen und mit Fixogum abgedichtet. Die Objektträger wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

**Tabelle 3.1. Kommerzielle DNA-Sonden**

Sondenbezeichnung	Molekulare Region	Chromosomale Position	Länge kb	Herkunft/Referenz
TelVysion 10p	Z96139	10pter	80	Firma Abbott/Vysis
TelVysion 10q	D10S2490	10qter	116	Firma Abbott/Vysis
TelVysion 22q	D22S1726	22qter	80	Firma Abbott/Vysis
Vysis LSI 22	BCR	22q11.2	300	Firma Abbott/Vysis
ST22q	D22S1056	22qter	200	Kreatech Holding BV
CEP 10	Alpha Satellite DNA	10p11.1-q11.1	-	Firma Abbott/Vysis
SE14/22	D14Z1/D22Z1	14p11.1/22p11.1 22p11.1	-	Kreatech Holding BV

### 3.2.3. Untersuchung der Chromosomen nach *in situ* Hybridisierung

Die über Nacht mit den fluoreszenzmarkierten Sonden inkubierten Chromosomenpräparate wurden nach Entfernen von Fixogum-Kleber und Deckgläschen für 5 min bei RT in 2x SSC gewaschen und dann für 5 Sekunden bei 43°C in einer Küvette mit 50% Formamid/ 2x SSC gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Es folgte ein fünfminütiges Nachwaschen der OT in 2x SSC/0,1% Tween bei RT, wonach die noch feuchten Präparate mit zwei Tropfen DAPI- haltiger Antifade-Lösung eingedeckt wurden. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DMR) mit 10er Neofluar und 63er PlanApochromat-Öl-Immersion Objektiv. Durch Anregungsfilter im Mikroskop wurde die geeignete Wellenlänge für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff eingestellt. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe waren FITC,

Spectrum Green, Texas Red bzw. Spectrum Red. Die Chromosomen selbst erschienen aufgrund der unspezifischen Anfärbung mit DAPI blau.

Zur Dokumentation wurden geeignete Metaphasen aufgenommen und mit dem Computerprogramm „Cytovision“ der Firma Applied Imaging weiter bearbeitet.

### **3.3. Subtelomerscreening mit der ToTelVysion Multi-color FISH Probe**

Um chromosomale Rearrangements in Subtelomerbereich zu identifizieren, wurde ein Subtelomerscreening mit dem Probengemisch „ToTelVysion Multi-color FISH-Probe Mixtures“ der Firma Abbott/Vysis durchgeführt. Das Kit besteht aus 15 Gemischen von insgesamt 62 markierten DNA-Sonden, darunter 41 subtelomerspezifische Sonden (YAC-Klone) und 21 zentromerspezifische Sonden (LSI- Einzelsequenz- oder CEP-alpha-Satelliten-Sonden). Die CEP-Sonden dienen zur Identifizierung der Chromosomen. Die detaillierten Informationen über die Sondengemische sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

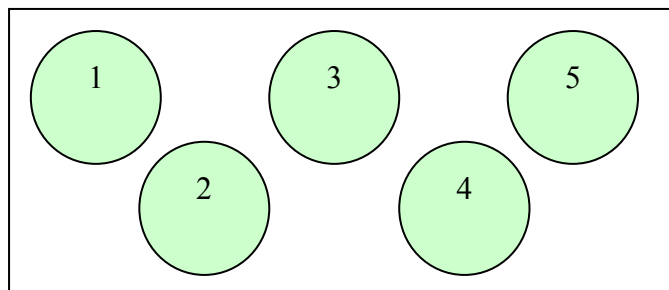
Mit den FISH-Sonden werden die Subtelomerregionen auf den p- und q-Armen der meta- und submetazentrischen Chromosomen markiert. Für die akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21 und 22) gibt es nur Sonden für den q-Arm. Die Subtelomersonden haben einen Abstand von 100-300 kb zum Telomer und sind etwa 60-175 kb lang.

**Tabelle 3.2. Für das Subtelomerscreening verwendete Sondengemische**

ToTelVysion Probe Mixture Description
<b>Mixture 1,</b> TelVysion 1p SpectrumGreen, TelVysion 1q SpectrumOrange, TelVysion Xp/Yp SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP X SpectrumAqua
<b>Mixture 2,</b> TelVysion 2p SpectrumGreen, TelVysion 2q SpectrumOrange, TelVysion Xq/Yq SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP X SpectrumAqua
<b>Mixture 3,</b> TelVysion 3p SpectrumGreen, TelVysion 3q SpectrumOrange, TelVysion 22q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI bcr (22q11) SpectrumAqua
<b>Mixture 4,</b> TelVysion 4p SpectrumGreen, TelVysion 4q SpectrumOrange, TelVysion 21q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI AML (21q22) SpectrumAqua
<b>Mixture 5</b> TelVysion 5p SpectrumGreen, TelVysion 5q SpectrumOrange
<b>Mixture 6,</b> TelVysion 6p SpectrumGreen, TelVysion 6q SpectrumOrange, TelVysion 13q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI 13 (13q14) SpectrumAqua
<b>Mixture 7,</b> TelVysion 7p SpectrumGreen, TelVysion 7q SpectrumOrange, TelVysion 14q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI TCR (14q11.2) SpectrumAqua
<b>Mixture 8,</b> TelVysion 8p SpectrumGreen, TelVysion 8q SpectrumOrange, TelVysion 17p SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP 17 SpectrumAqua
<b>Mixture 9,</b> TelVysion 9p SpectrumGreen, TelVysion 9q SpectrumOrange, TelVysion 17q SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP 17 SpectrumAqua
<b>Mixture 10,</b> TelVysion 10p SpectrumGreen, TelVysion 10q SpectrumOrange, TelVysion 15q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI PML (15q22) SpectrumAqua
<b>Mixture 11,</b> TelVysion 11p SpectrumGreen, TelVysion 11q SpectrumOrange, TelVysion 18p SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP 18 SpectrumAqua
<b>Mixture 12,</b> TelVysion 12p SpectrumGreen, TelVysion 12q SpectrumOrange, TelVysion 18q SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP 18 SpectrumAqua
<b>Mixture 13,</b> TelVysion 16p SpectrumGreen, TelVysion 16q SpectrumOrange
<b>Mixture 14,</b> TelVysion 19p SpectrumGreen, TelVysion 19q SpectrumOrange, LSI 19p13 SpectrumAqua
<b>Mixture 15,</b> TelVysion 20p SpectrumGreen, TelVysion 20q SpectrumOrange

Durchführung:

Für die Hybridisierung mit allen 15 ToTelVysion Gemischen wurden 3 Objektträger (OT) mit jeweils 5 Arealen pro OT entsprechend folgender Abbildung vorbereitet.



Die Präparate wurden wie in 3.2 beschriebener Prozedur behandelt, mit jeweils 3 µl denaturiertem Sondengemisch hybridisiert und mikroskopisch untersucht.



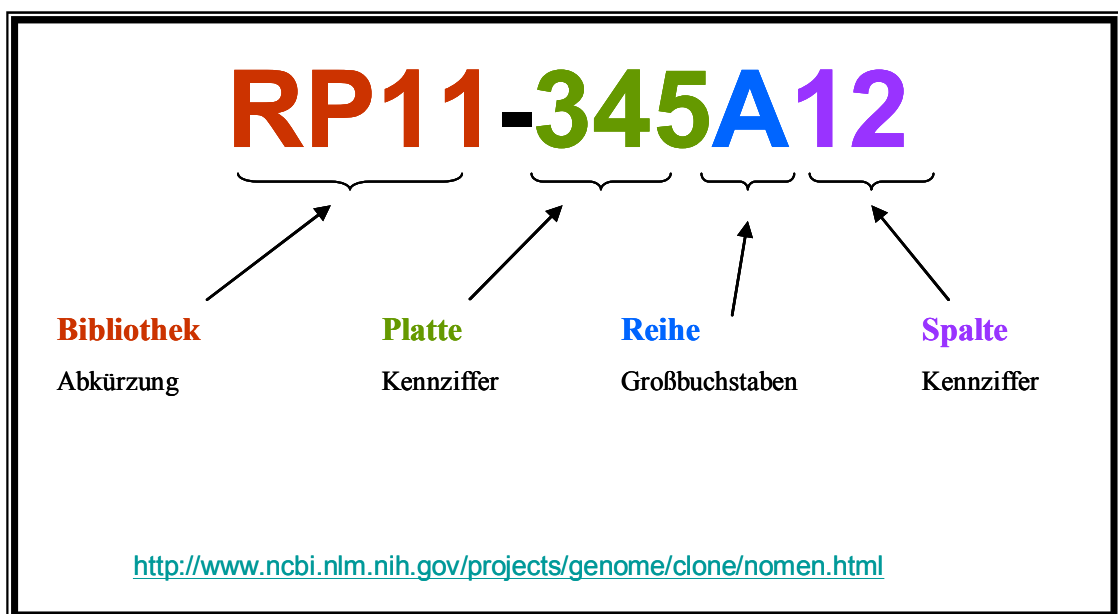
## 3.4. Herstellung von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden aus BAC- und Fosmid-Klonen

### 3.4.1. BAC-Klone

Die 150-200 kb langen genomischen DNA-Fragmente, die später als Sonden dienen, sind Inserts künstlicher bakterieller Chromosomen (BAC Bank, bacterial artificial chromosomes). Die verwendeten BAC-Klone sind in den Tabellen 3.4.1.1 und 3.4.1.2 aufgelistet.

Die Nomenklatur bzw. standardisierte Bezeichnung der auf Mikrotiter-Platten archivierten BAC-Klone erfolgt nach Herkunft und Position und setzt sich zusammen aus einem vorgestellten Kürzel für die jeweilige Klon-Bibliothek, der Plattennummer und den Koordinaten von Reihe und Spalte. Die standardisierten Namen sind normalerweise in gängigen Genbanken eingegeben. Ein Beispiel ist in der folgenden Abbildung dargestellt. RP11 ist die Abkürzung für „*RPCI human BAC library 11*“ eine ausschließlich BAC-Klone umfassende Bibliothek. Diese Bibliothek besteht aus 1440 Platten (nummeriert von 1 bis 1440) mit 292367 Klonen.

Die Klon-Informationen wurden aus der Datenbank von UCSC Genome Bioinformatics (Version 2006) entnommen.



**Tabelle 3.4.1.1. BAC-Klone aus der Region 10q25-qter**

BAC-Klone Zeichnung	Band Region	Position und Länge (bp)	Herkunft/Referenz
RP11-317F20	10q25.3	116.116.187 – 116.283.810 Länge: 167624	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-295O23	10q25.3	118.059.271 – 118.275.301 Länge: 216.031	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-88I10	10q26.11	121.433.475 – 121.547.718 Länge: 114244	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-47G11	10q26.13	125.710.219 – 125.859.456 Länge: 149238	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-113M14	10q26.13	125.987.836 – 126.149.864 Länge: 162029	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-937K22	10q26.13	126.166.519 – 126.376.451 Länge: 209933	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-1080O18	10q26.13	126.463.406 – 126.680.675 Länge: 217270	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-57G20	10q26.13- 10q26.2	127.311.475 – 127.483.991 Länge: 172517	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,

**Tabelle 3.4.1.2. BAC-Klone aus der Region 22q13-qter**

BAC-Klone Zeichnung	Band Region	Position und Länge (bp)	Herkunft/Referenz
RP11-255N20	22q13.31	~ 46.100.000 – 46.285.694 Länge: 185649	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-1035C10	22q13.32	47.517.250 – 47.708.096 Länge: 190847	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-636D2	22q13.32	47.699.686 – 47.901.364 Länge: 201679	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-46J14	22q13.32	47.879.610 – 48.045.043 Länge: 165434	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-350L11	22q13.32- 22q13.33	48.026.715 – 48.215.693 Länge: 188979	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-732O9	22q13.33	48.203.411 – 48.357.762 Länge: 154352	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,
RP11-494O16	22q13.33	48.622.812 – 48.673.269 Länge: 50458	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, California,

### 3.4.2. Fosmid-Klone

Ein Fosmid besteht aus einem *low copy number* -Vector, der den F-Faktor von *Escherichia coli* als Ausgangspunkt für Replikation (origin of replication) trägt. Fosmide ermöglichen die stabile Klonierung der genomischen DNA. Die Insertlänge der Fosmid-Klone beträgt ~40 kb.

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Fosmid-Klone wurden vom „BACPAC Resources Center“ in Oakland (USA) bezogen. WI2 ist die Abkürzung für „WIBR-2 human Fosmid library“.

**Tabelle 3.4.2.1. Fosmid-Klone aus der Region 10q26.13**

<b>Fosmid</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Position und Länge (bp)</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
W12-1000B7	G248P84525A4	126.464.666 – 126.515.801 Länge: 46136	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA
W12-1769G4	G248P86962D2	126.521.353 – 126.564.645 Länge: 43296	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA
W12-2903I6	G248P89226E3	126.550.887 – 126.592.512 Länge:41626	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA
W12-2567C2	G248P82594B1	126.588.627 – 126.627.255 Länge: 39229	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA
W12-469L15	G248P8537F8	126.604.538 – 126.644.780 Länge: 40243	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA
W12-3810H20	G248P89903D10	126.623.302 – 126.660.292 Länge: 36991	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA

**Tabelle 3.4.2.2. Fosmid-Klone aus der Region 22q13.32**

<b>Fosmid</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Position und Länge (bp)</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
W12-917M14	G248P8558G7	47.518.874 – 47.561.068 Länge: 42195	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA
W12-1528E18	G248P84070C9	47.558.324 – 47.598.977 Länge: 40654	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA
W12-1341J1	G248P83857E1	47.592.377 – 47.631.601 Länge:39225	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA
W12-1479L20	G248P85823F10	47.615.493 – 47.658.169 Länge: 42677	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA
W12-429I5	G248P81516E3	47.643.928 – 47.684.336 Länge: 40409	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA
W12-1815F9	G248P87929C5	47.667.864 – 47.711.495 Länge: 43632	BACPAC Resource Center (BPRC), Oakland, USA

### 3.4.3. Isolierung von BAC- und Fosmid-DNA aus *E. coli*

Material:

- NucleoBond Xtra Midi kit (Firma Macherey/Nagel, Düren)
- Ethanol 100% (Firma J.T. Baker, Deventer, NL)
- 2-Propanol (Firma Fluka, Buchs, CH)
- LB-Medium:
  - 10 g Trypton (BD, Heidelberg)
  - 5 g Hefeextrakt (Oxoid, Wesel)
  - 10 g Natriumchlorid (J.T. Baker, Deventer, NL)
  - add 1000 ml Aqua dest. pH 7
- Agar für Festmedien 15 g/l Agar (Invitrogen, Karlsruhe)
- Chloramphenicol 1 ml pro 1 l Stock: 50 mg/ml Chloramphenicol (Sigma Aldrich, Taufkirchen) in 100% Ethanol

Durchführung:

Die BAC- und Fosmid-Klone von *Escherichia coli* wurden auf chloramphenicolhaltigen Agarplatten ausplattiert und einzelne Kolonien für die Anzucht von Flüssigkulturen gewonnen. Für die DNA-Präparation mit dem *NucleoBond Xtra Midi Kit* der Firma Macherey/Nagel wurden 200 ml chloramphenicolhaltiges LB-Medium mit 2 ml einer Vorkultur der entsprechenden Klone angeimpft und unter Standardbedingungen inkubiert. Nach ca. 18 Stunden wurden die Bakterien geerntet und die BAC- oder Fosmid-DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Methode basiert auf der Immobilisierung von DNA an einer Anionenaustauschersäule bei gleichzeitiger Entfernung von Proteinen und RNA durch Waschen mit einer schwach konzentrierten Salzlösung. Anschließend wird die DNA mit einer hoch konzentrierten Salzlösung eluiert. Die isolierte DNA wurde mit Isopropanol präzipitiert und das Pellet in 100 µl HPLC-Wasser aufgenommen. Um die Qualität der bei der Midipräparation isolierten DNA zu überprüfen und die DNA-Menge abzuschätzen, wurden die isolierten DNAs mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt (Smith und Birnstiel, 1976). Die DNA-Präparationen wurden bei -20°C gelagert.

### 3.4.4. Synthese und Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten BAC- und Fosmid-DNA-Sonden

Für die Fluoreszenzmarkierung der DNA Sonden wurde das CGH Nick Translation Kit der Firma Vysis Downers Grove, USA verwendet. Hierbei spielen die im Nick-Translationsansatz vorhandenen Enzyme DNase I und DNA-Polymerase I die Hauptrolle. DNase I fügt Einzelstrangbrüche, sogenannte *nicks*, in einen vorhandenen DNA-Doppelstrang ein. Dadurch entstehen freie 3'-OH-Enden, die von DNA-Polymerase I als Primer für die 5'→3'-DNA-Synthese benutzt werden. Im Markierungsansatz ist neben den DNA-Bausteinen dCTP, dGTP, dTTP und dATP auch dUTP vorhanden, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff Spectrum Red markiert ist. Das markierte dUTP ersetzt im Reaktionsmix zu 50% den DNA-Baustein dTTP und wird von der DNA-Polymerase I als Substrat verwendet. Die DNA-Polymerase I hat neben ihrer 5'→3' Polymerase-Aktivität noch eine 5'→3'-Exonuclease-Aktivität. Mit Hilfe dieser beiden Aktivitäten werden, beginnend an den *nicks*, während einer 3-4stündigen Inkubationzeit bei 15°C die ursprünglichen Stränge abgebaut und fortlaufende neue Stränge mit fluoreszierendem dUTP synthetisiert.

#### Material:

- Nick Translations-Reaktionansatz:

2,75 – 6,75 µl	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O
2,0 – 6,0 µl	DNA (0,5-1 µg)
1,25 µl	SpectrumRed dUTPs (0,2 mM)
2,5 µl	dTTP (0,1 mM)
5,0 µl	dNTP Mix ohne dTTP (0,1 mM)
2,5 µl	10x Nick Translationspuffer
5,0 µl	Nick Translation Enzymmix*
25,0 µl	Gesamtvolumen

\* DNA-Polymerase I, DNase I in 50%-igem Glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH7,2, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA

- Hybridisierungspuffer: Formamid 50%, Dextransulphat 2% in 2× SSC
- Humane Cot-1 DNA 1 mg/ml (Invitrogen, Karlsruhe)

Der Nick Translations-Reaktionansatz wurde 3-4 Stunden bei 15°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch zehnmütiges Erhitzen bei 70°C gestoppt. Nach Abkühlen und Zugabe von 5 µg Cot1-DNA wurde der Ansatz für 30 Minuten im Rotation-Verdampfer getrocknet. Cot-1-DNA enthält eine Mischung von DNAs mit repetitiven Sequenzen und wird aus Plazentagewebe angereichert. Das Sediment wurde in 10 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Vor der Hybridisierung wurde der Ansatz für 10 min bei 94°C denaturiert und anschließend zur Absättigung der repetitiven SONDENSEQUENZEN durch Cot-1-DNA noch für 90 min bei 37°C inkubiert, sodass nach Hybridisierung mit der Cot-1-DNA nur noch die *single copy* Sequenzen der Sonden einzelsträngig vorliegen und eine spezifische Detektion chromosomaler Zielsequenzen möglich wird.

## 4. FALLBESCHREIBUNG UND ZYTOGENETISCHE DIAGNOSTIK

### 4.1 Patientin 1 [P1]

#### 4.1.1 Anamnese

Im Februar 2007 wurde in der humangenetischen Sprechstunde im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf ein 4-jähriges Mädchen mit deutlicher Entwicklungsverzögerung und multiplen congenitalen Auffälligkeiten vorgestellt. Die Patientin 1 (im Folgenden als P1 bezeichnet) wurde als erstes Kind nicht-konsanguiner Eltern im Juli 2003 geboren. Die Geburt verlief spontan in der 42. SSW aus Hinterhauptslage. Zum Zeitpunkt der Geburt wog das Mädchen 2960 g (~3. P), bei einer Länge von 49 cm (25. P), und einem Kopfumfang von 33,5 cm (25. P), Apgar 7/10/10. An Dysmorphiezeichen wurden kleine trichterförmige und abstehende Ohren mit eingerollten Ohrmuscheln, Epikanthus, Strabismus und ein flacher Occiput festgestellt. Auffallend waren außerdem ein kleines spitzes Kinn, ein langes Philtrum sowie ein schmales Lippenrot.

Der Mutter sei schon früh eine schlaffe Muskulatur bei P1 aufgefallen. Im Alter von acht Monaten sei eine Spitzfußstellung bei beinbetonter Spastik bemerkt worden. In ihrer motorischen Entwicklung sei P1 von Anfang an zurück gewesen. Sitzen und Krabbeln habe sie im Alter von zwölf Monaten erlernt, Laufen im Alter von 1 ½ Jahren. Zum Zeitpunkt der Untersuchung konnte das Mädchen nur einzelne Schritte frei, bzw. an einer Hand der Eltern machen. Bei der Bestimmung der aktuellen Körpermaße wurde ein Kleinwuchs (ca. 90 cm, <3. P, Gewicht 13 kg, <3. P) und eine Mikrozephalie (45,5 cm, <3. P) festgestellt.

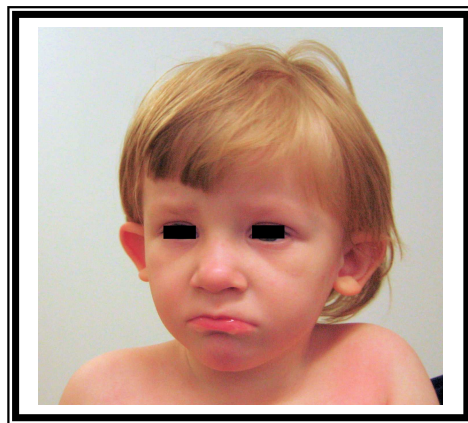
Das Mädchen zeigte keinerlei Sprachvermögen sondern konnte nur lautieren. Nach Aussage der Eltern würde sie jedoch auf Geräusche reagieren und einfache Aufforderungen verstehen.

Eine Kernspintomographie des Gehirns zeigte einen altersentsprechenden unauffälligen Befund. Bis auf eine auffällige Nervenleitgeschwindigkeit (vereinbar mit einer motorischen, rein axonalen Neuropathie) zeigten die neurophysiologischen Untersuchungen (EEG und SEP) keine Pathologien. In der isoelektrischen Fokussierung fand sich kein

Hinweis auf ein CDG-Syndrom. Neben einem Strabismus convergens konnte in der ophthalmologischen Untersuchung eine Hyperopie festgestellt werden.

**Zusammenfassung der auffälligen Merkmale bei P1:**

- Globale Entwicklungsverzögerung
- Expressive und rezeptive Sprachentwicklungsstörung
- Mentale Retardierung
- Beinbetonte spastische Zerebralparese
- Mikrozephalie
- Strabismus
- Faziale Dysmorphien (kleine Ohren mit verbreiteter äußerer Helix, Epikanthus, breite Nase, breites Philtrum und schmale Oberlippe, Mikrognathie)



**Abb 4.2. Patientin 1.** Die Fotos zeigen die Patientin im Alter von 4 Jahren.



## 4.1.2. Zytogenetische Untersuchung der Patientin1 (P1)

### 4.1.2.1. Karyotypisierung von P1 mittels konventioneller Chromosomenanalyse

Die Analyse von Metaphase-Chromosomen mittels GTG-Bänderung ergab einen weiblichen numerisch unauffälligen Chromosomensatz, wobei am langen Arm eines Chromosoms 10 eine minimal auffällige Strukturaberration am terminalen Ende gesehen wurde. Außerdem wurde eine als Normvariante zu bewertende perizentrische Inversion an einem Chromosom 9 nachgewiesen (Abb.4.3.).

Nach der international gültigen Nomenklatur für Zytogenetik (ISCN 2009) wurde der Karyotyp für P1 zunächst wie folgt beschrieben: 46,XX,inv(9)(p11q13),del(10)(q26.1).



**Abb. 4.3. Komplettes Karyogramm.** Weiblicher Karyotyp mit strukturell auffälligem qter eines Chromosoms 10 und der als Normvariante bewerteten Inversion 9 (GTG-Bänderung; Auflösung ca. 450 bphs).

#### 4.2.2.2. Verifizierung und Verfeinerung des zytogenetischen Befundes mittels molekularzytogenetischen Subtelomerscreening an Metaphase-Chromosomen bei P1

Um nachzuweisen, ob es sich bei der putativen minimalen Strukturaberration an 10qter um eine reine terminale Deletion oder um ein komplexeres Rearrangement handelt, wurde an den Metaphase-Chromosomen aus stimulierten Lymphozyten von P1 eine Subtelomeranalyse mit dem kompletten Satz des ToTelVysionMulticolor DNA Probenmix von der Firma Abbott/Vysis durchgeführt. Hierbei zeigten sich unter Verwendung der Mischung 10 (#10: TelVysion 10p SpectrumGreen, TelVysion 10q SpectrumOrange, TelVysion 15q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI PML (15q22) SpectrumAqua) 2 regelrechte grüne Signale mit der 10pter-Sonde, aber nur ein spezifisches rotes Signal mit der 10qter-Sonde, entsprechend einer Deletion dieser Region auf einem der beiden Chromosomen 10. Für die ebenfalls in dieser Mischung enthaltene Sonde der Subtelomeregion am langen Arm von Chromosom 15 und der für das *PML*-Gen in 15q22 lokusspezifischen Sonde zeigten sich jeweils 2 regelrechte blaue, bzw. rote/grüne Signale (Abb. 4.4a.).

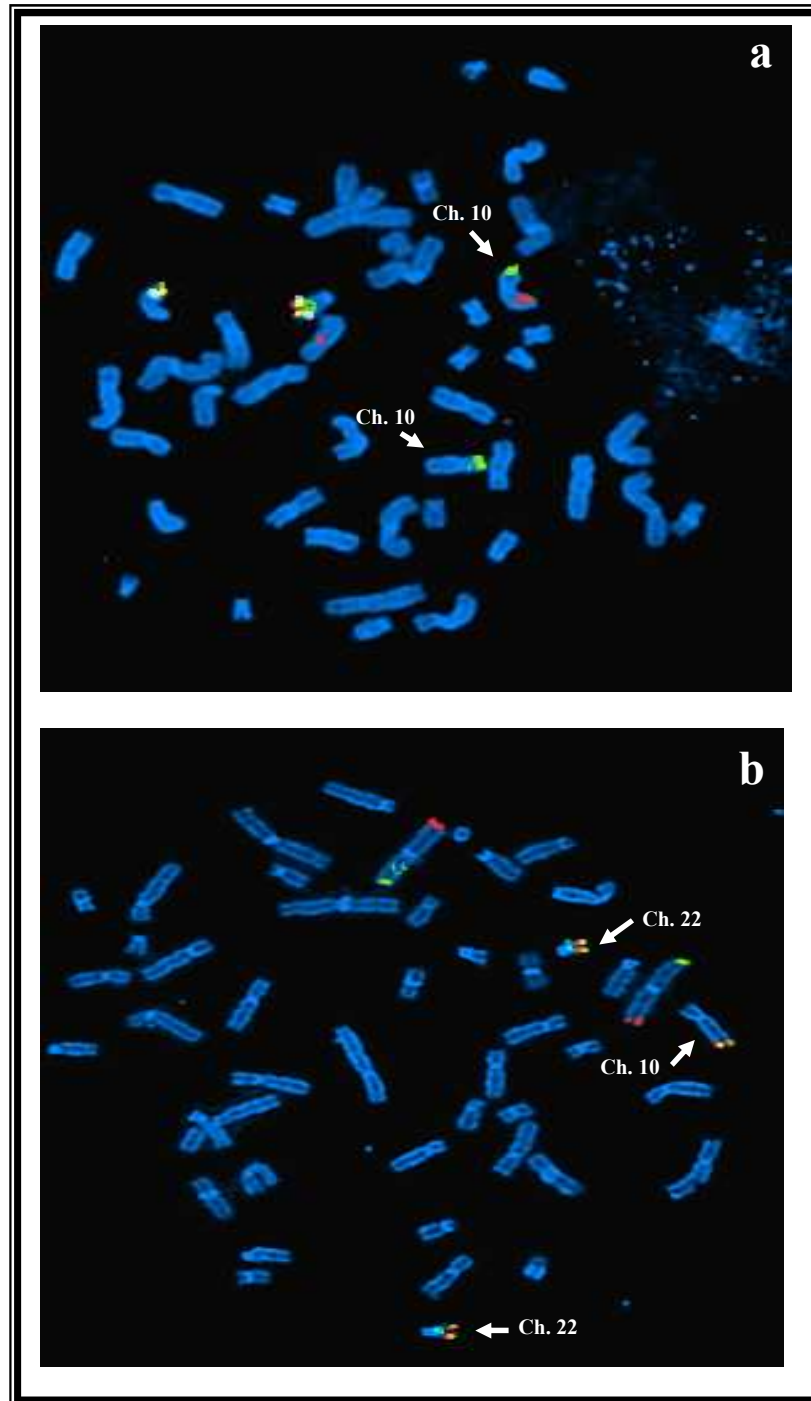
Bei der Untersuchung der Chromosomen 22 unter Verwendung der Mischung 3 (#3: TelVysion 3p SpectrumGreen, TelVysion 3q SpectrumOrange, TelVysion 22q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI bcr (22q11) SpectrumAqua) fand ich für die Sonde 22qter jeweils ein rote/grünes Signal auf den beiden homologen Chromosomen 22 und ein zusätzliches Signal auf dem langen Arm eines Chromosoms 10 (Abb. 4.4.b.). Es zeigten sich 2 regelrechte blaue Signale für das *BCR*-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 22 in der Bande 22q11.2.

Die Untersuchungen mit den übrigen 13 Proben-Mischungen des ToTelVysionMulticolor DNA-Probenpanels zeigten ein unauffälliges Ergebnis.

Zusammenfassend zeigte die Subtelomeranalyse, dass P1 ein derivatives Chromosom 10 trägt, das aus einer Translokation der Chromosomen 10 und 22 hervorgegangen ist. Somit liegt bei P1 ein unbalancierter Zustand mit einer partiellen Trisomie für den Subtelomerbereich von 22qter und eine partielle Monosomie für den Bereich 10q26.1->qter vor.

Die durch die weiterführende FISH-Analyse korrigierte Karyotypformel nach ISCN 2009 lautet:

46,XX,der(10)t(10;22)(q26.1;q13).ish.der(10)t(10;22)(q26.1;q13)(10pter+,10qter-,22qter+)



**Abb. 4.4. Subtelomeranalyse. (a)** FISH-Analyse der Mischung 10 zeigt zwei regelrechte grüne Signale in 10pter. Das rote Signal der 10qter-Sonde ist nur an einem Chromosom 10 zu sehen. Co-Lokalisation von rot/grün/gelbe Signale zeigen die beiden homologen Chromosomen 15. **(b)** FISH-Analyse der Mischung 3 zeigt, dass ein rot/gelbes Signal in 22qter die zwei homologen Chromosomen 22 und zusätzlich das terminale Ende des langen Armes eines Chromosoms 10 markiert. Die beiden Chromosomen 3 zeigen je zwei regelrechte grüne bzw. rote Signale an pter und qter.

## 4.2. Patient 2 [P2]

### 4.2.1. Anamnese

Bei dem zweiten Patient P2 handelt es sich um den im Alter von 4-Wochen untersuchten Bruder von P1. Er wurde bei Beckenendlage in der 39. SSW durch primäre Sectio mit einem Geburtsgewicht von 2830 g (10. P), einer Länge von 47 cm (3. P) und einem Kopfumfang von 34 cm (50. P), Apgar 8/10/10 geboren. Die klinisch-genetische Untersuchung zeigte ein kleines Kinn, eine 4-Finger-Furche bds., einen Kryptorchismus und einen Atrium Septum Defekt (ASD), bei dem ein Spontanverschluss unwahrscheinlich ist. Die unteren Extremitäten waren zur Behandlung einer Pes equinovarus-Konfiguration bds. eingegipst. Weiterhin auffällige Befunde des Säuglings waren ein lang ausgezogenes Hinterhaupt, eine breite Nasenspitze, ein kurz wirkender Hals sowie eine akzessorische Mamille rechts. P2 zeigt eine Gedeihstörung und Trinkschwäche.

Die Körpermaße im Alter von 4 Wochen lagen für Körpergewicht (2960 g) und Körperlänge (48 cm) unter der 3er Percentile, während sich der Kopfumfang mit 35,5 cm im Normbereich befand. Aktuell (im Alter von 11 Monaten) liegen das Körpergewicht (4626g) und die Körperlänge (56 cm) sowie der Kopfumfang (39,5 cm) unter der 3er Percentile.

#### **Zusammenfassung der auffälligen Merkmale:**

- Mikrozephalie
- Atrialer septum defekt (ASD) Typ II
- Gedeihstörung, alle Körpermaße betreffend
- Entwicklungsverzögerung
- Kryptorchismus
- Faziale Dysmorphien (Hypertelorismus, tiefsitzende Ohren, schmale Oberlippe, leichte Mikrognathie)
- Vierfingerfurche bds.
- Pes equinovarus bds. (Klumpfuß)

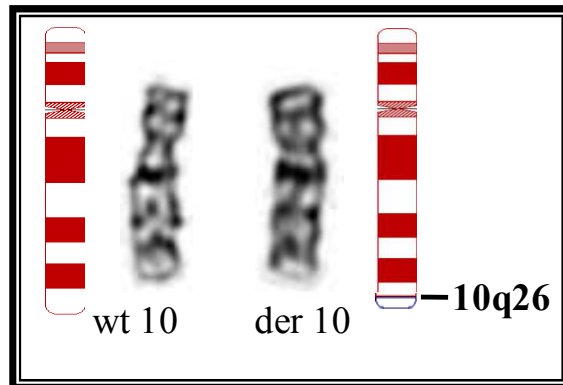


**Abb. 4.5. Patient 2.** Die Fotos zeigen den Patienten P2 im Alter von 4 Wochen. Zu den Dysmorphiezeichen gehören die 4-Finger-Furche und eine akzessorische Mamille rechts (c und d).

## 4.2.2. Zytogenetische Untersuchung des Patienten (P2)

### 4.2.2.1. Karyotypisierung von Patient 2 mittels konventioneller Chromosomenanalyse

Die konventionelle zytogenetische Untersuchung von Metaphasen aus stimulierten Blutlymphozyten ergab bei P2 wie bei seiner Schwester P1 einen numerisch unauffälligen, strukturell aber auffälligen männlichen Karyotyp mit einer minimalen Deletion am langen Arm eines Chromosoms 10 (Abb.4.6.). Aufgrund des Vorbefundes bei der Schwester wurde angenommen, dass es sich hier ebenfalls um ein derivatives Chromosom 10 handelt.



**Abb. 4.6. Karyogramm Patient 2.** Ideogramm und partielles Karyogramm (GTG gebändert, ~500 bphs) mit einem normalen (links) und einem derivativen (rechts) Chromosom 10.

#### 4.2.2.2. Verifizierung des zytogenetischen Befundes mittels molekularzytogenetischer Untersuchung an Metaphase-Chromosomen von P2

Um den zytogenetischen Befund bei P2 auch molekularzytogenetisch zu bestätigen, wurden FISH-Analysen mit den subtelomerspezifischen Sonden für Chromosom 10p (TelVysion Lokus Z96139), 10q (TelVysion Lokus D10S2490) und für Chromosom 22 (TelVysion Lokus D22S1726) ausgewählt. Für die Sonde 22qter war jeweils ein Signal auf den beiden homologen Chromosomen 22 und ein zusätzliches Signal auf dem langen Arm eines Chromosoms 10 zu sehen. Mit der 10pter-Sonde zeigten sich an beiden homologen Chromosomen 10 regelrechte Signale. Mit der 10qter Sonde zeigte sich nur an einem Chromosom 10 ein regelrechtes Signal am Ende des langen Armes, auf dem derivativen Chromosom 10 war kein Signal nachzuweisen. Da die Signalkonstellationen der FISH-Analyse identisch mit den Ergebnissen bei der Schwester waren, wird hier keine FISH-Abbildung gezeigt.

Zusammenfassend zeigte die konventionelle und molekulare zytogenetische Untersuchung an stimulierten Blut-Lymphozyten, dass P2 ebenso wie seine Schwester ein derivatives Chromosom 10 trägt, das aus einer Translokation der Chromosomen 10 und 22 hervorgegangen ist. Somit liegt bei P2 ebenfalls ein unbalancierter Zustand mit einer partiellen Trisomie für den Subtelomerbereich von 22q und eine partielle Monosomie für den Bereich 10q26.1-qter vor.

Die Karyotypformel nach ISCN 2009 lautet: 46,XY,der(10)t(10;22)(q26.1;q13).

ish. der(10)t(10;22)(q26.1;q13)(10pter+,10qter-, 22qter+)

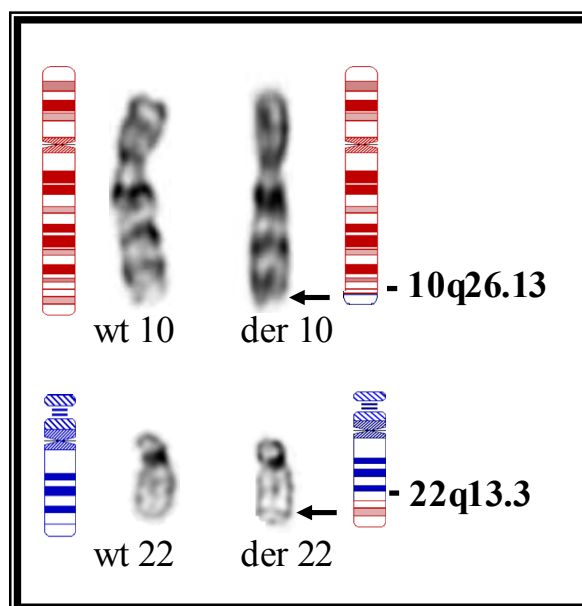
### 4.3. Zytogenetische Untersuchung der Eltern

#### 4.3.1. Karyotypisierung mittels konventioneller Chromosomenanalyse

Da die bei der Tochter (P1), sowie dem Sohn (P2) identifizierten unbalancierten Zustände Folge einer elterlichen balancierten reziproken Translokation sein könnten, wurde eine entsprechende zytogenetische bzw. molekularzytogenetische Analyse an Lymphozytensuspension der Eltern durchgeführt.

Die konventionelle Chromosomenanalyse zeigt bei dem Vater einen unauffälligen männlichen Karyotyp 46,XY und es wurden daher bei ihm auch keine weiteren FISH-Analysen durchgeführt.

Die konventionelle zytogenetische Untersuchung von Metaphase-Chromosomen bei der Mutter ergab einen weiblichen Karyotyp mit einer minimalen Deletion am langen Arm eines Chromosoms 10 sowie einer kleinen Verlängerung am langen Arm eines Chromosoms 22. Außerdem wurde auch bei ihr die Normvariante an Chromosom 9 nachgewiesen. Aufgrund der molekularzytogenetischen Vorbefunde bei den beiden untersuchten Kindern wurde diese strukturelle Chromosomenänderung als eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 10 und 22 gewertet (Abb.4.10.). Der Karyotyp nach GTG-Bänderung lautet: 46,XX,inv(9)(p11q13),t(10;22)(q26.1;q13)



**Abb. 4.10. Karyogramm der Mutter.** Ideogramm und partielles Karyogramm (GTG gebändert, 550 bphs) und entsprechende Ideogramme der Mutter mit je einem normalen (links) und einem derivativen (rechts) Chromosom 10 bzw. 22.

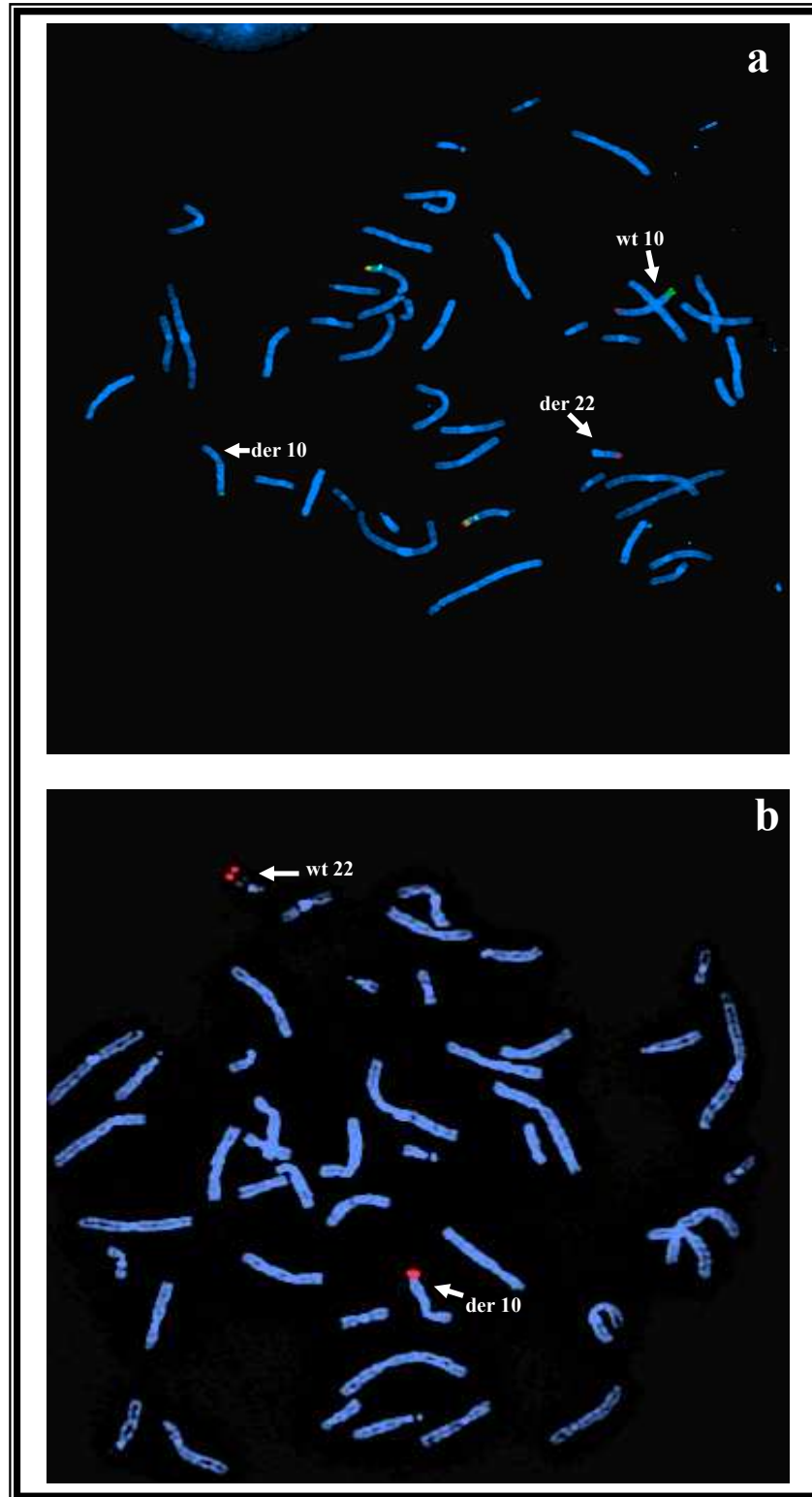
### 4.3.2. Verifizierung des zytogenetischen Befundes der Mutter mittels molekularzytogenetischer Analyse

Um die vermutete Translokation bei der Mutter der Patienten P1 und P2 zu bestätigen, wurden folgende subtelomerspezifischen Sonden für die FISH-Analyse verwendet (TelVysion 10p [Lokus Z96139], TelVysion 10q [Lokus D10S2490], TelVysion 22q [Lokus D22S1726], Kontrollsonde *BCR* 22q11.2. Bei der subtelomerspezifischen Sonde für den kurzen Arm von Chromosom 10 (ToTelVysion 10p [Lokus Z96139]) ergaben sich erwartungsgemäß zwei regelrechte Signale auf den beiden homologen Chromosomen 10. Mit der für das *BCR*-Gen spezifischen Kontrollsonde in 22q11.2 waren ebenso zwei regelrechte Signale zu sehen. Mit der subtelomerspezifischen Sonde für den langen Arm von Chromosom 10 fehlte das regelrechte Signal am langen Arm eines Chromosoms 10, während ein 10qter-spezifisches Signal am Ende des langen Arms eines Chromosoms 22 gesehen wurde. Mit der subtelomerspezifischen Sonde 22qter fehlte ein Signal an einem Chromosom 22, stattdessen fand sich ein Signal am Ende des langen Arms eines Chromosoms 10 (Abb. 4.11). Somit bestätigte die molekularzytogenetische Untersuchung das Vorliegen einer maternalen reziproken Translokation zwischen den terminalen Enden der langen Arme von Chromosom 10 und 22.

Der molekularzytogenetische Karyotyp nach ISCN 2009 lautet:

ish. t(10;22)(q26.1;q13)(10qter-, 22qter+;10qter+,22qter-)





**Abb. 4.11. FISH-Analyse an Metaphasenchromosomen der Mutter. (a)** Verwendung der Sonden-Mischung ToTelVysion#10 [10p=grün, 10q=rot, 15q=rot/grün, LSI *PML* (15q22) = hellblau (aqua)]. Nur ein normales Chromosom 10 mit jeweils einem grünen und einem roten Signal am kurzen bzw. langen Ende des Chromosoms. Das derivative Chromosom 10 zeigt nur ein grünes Signal am p-Arm, das rote Signal fehlt am Ende des q-Arms, hybridisiert aber am Ende des q-Arms vom derivativen Chromosom 22. **(b)** FISH mit ST22qter=rot. Ein Signal ist auf dem Wildtyp-Chromosom 22 lokalisiert, das zweite Signal zeigt sich am derivativen Chromosom 10.

## 4.4. Patientin 3 [P3]

### 4.4.1. Anamnese

Aufgrund einer stark ausgeprägten Sprachentwicklungsverzögerung und der Ergebnisse der zytogenetischen Diagnostik bei den beiden Geschwistern und der Mutter wurde Patientin 3, die drei Jahre alte Schwester von P1 und P2, in der humangenetischen Sprechstunde vorgestellt.

P3 wurde nach einer unauffälligen Schwangerschaft in der 42. Schwangerschaftswoche spontan mit folgenden Maßen geboren: Geburtsgewicht 3970 g (75-90. P), Länge 53 cm (~75. P), Kopfumfang 34 cm (~50. P), Apgar 9/10/10. Bei der U2 fiel ein Systolikum auf, das durch einen kleinen nicht operationsbedürftigen perimembranösen Ventrikelseptumdefekt (VSD) verursacht wurde.

Zum Zeitpunkt der klinisch-genetischen Untersuchung wurden das Körpergewicht mit 14,6 kg (50. P), die Körperlänge mit 92 cm (25. P) und der Kopfumfang mit 47,9 cm (25. P) angegeben. Auffällig waren eine lange Lidspalte, lange Wimpern, Ptosis, Hypotelorismus, Epikanthus, leicht abstehenden Ohren, eine kleine Ohrenkerbe bds., eine breite und flache Nasenwurzel, eine abgeflachte Nasenspitze, ein langes Philtrum sowie, auffallend volle Lippen. Ebenfalls wurden Knick-Hackenfüße diagnostiziert.

In der motorischen Entwicklung zeigte P3 eine leichte Verzögerung (Sitzen und Krabbeln mit 8 Monaten, Stehen mit 16 Monaten, Laufen mit 17 Monaten). Das Kind zeigte keine sprachliche Entwicklung, habe nie lautiert und mache sich nur durch Geräusche verständlich. Sie verstand nur kurze Aufforderungen in Form von Zweiwortsätzen.

EEG zeigte eine verlangsamte Grundaktivität im Sinne einer diffusen Hirnfunktionsstörung, aber kein epilepsietypisches Muster. P3 war weder tagsüber noch nachts trocken. Soweit das bei einem unkooperativem Kind in der Untersuchungssituation zu beurteilen war, erschien die Feinmotorik retardiert zu sein.

#### **Zusammenfassung der auffälligen Merkmale:**

- Sprachbetonte Entwicklungsstörung
- VSD
- Knick-Hackenfuß (Pes calcaneus et valgus)
- Faziale Dysmorphien (Ptosis, Hypotelorismus, Epikanthus, leicht abstehenden Ohren, eine breite und flache Nasenwurzel, langes Philtrum und volle Lippen)



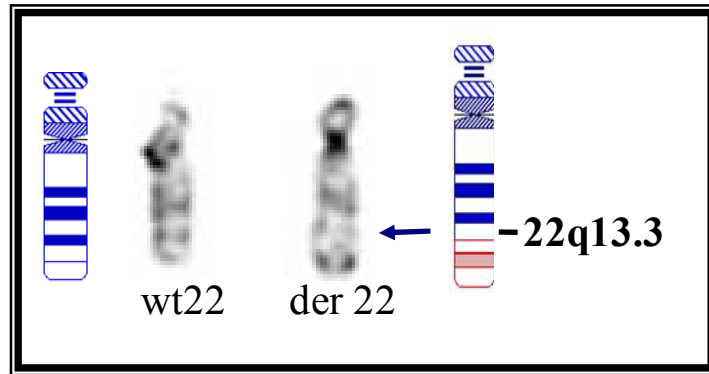
**Abb. 4.7. Patientin 3.** Die Fotos zeigen die Patientin im Alter von 3 Jahren.

#### **4.4.2. Zytogenetische Untersuchung der Patientin 3 (P3)**

##### **4.4.2.1. Karyotypisierung der Patientin 3 mittels konventioneller Chromosomenanalyse**

Die konventionelle zytogenetische Untersuchung von Metaphasen ergab bei P3 einen strukturell auffälligen weiblichen Karyotyp mit einer Verlängerung am langen Arm eines Chromosom 22 (Abb. 4.8.). Aufgrund der Vorbefunde bei der Mutter nahm man an, dass dieser zusätzliche Teil von qter eines Chromosoms 10 stammt. Anhand des G-Bandenmusters wurde der Bruchpunkt zunächst der Bande 22q13 zugeordnet und der Karyotyp nach ISCN für Patientin3 wie folgt definiert:

46,XX,der(22)t(22;10)(q13;q26.1)



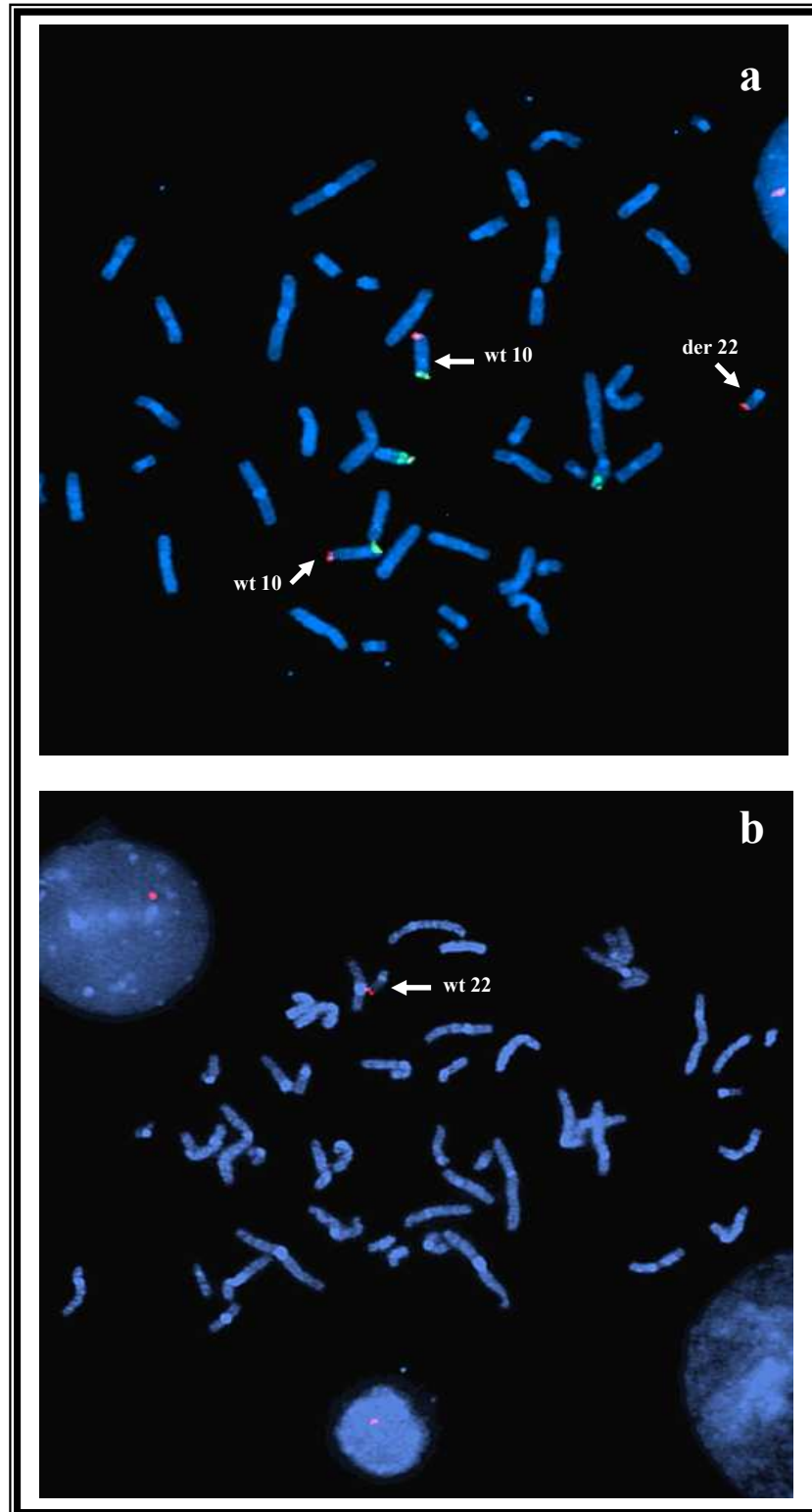
**Abb. 4.8. Karyogramm Patientin 3.** Ideogramm und Partielles Karyogramm (GTG gebändert, 500 bphs) der Patientin 3 mit einem normalen (links) und einem derivativen (rechts) Chromosom 22.

#### 4.4.2.2. Molekularzytogenetische Untersuchung von P3 mittels FISH-Analysen

Aufgrund der Vorbefunde beider Geschwister wurden für die FISH-Analysen die subtelomerspezifischen Sonden von Chromosomen 10 für pter (Telvysion 10p Z96139) und 10qter (Telvysion 10q D10S2490) sowie für den langen Arm des Chromosoms 22, 22qter (ToTelvysion 22q D22S1726) ausgewählt. Für die Sonde 10qter waren jeweils ein Signal auf den beiden homologen Chromosomen 10 und ein zusätzliches Signal auf dem langen Arm eines Chromosom 22 zu sehen. Mit der 10pter Sonde zeigten sich an beiden homologen Chromosomen 10 regelrechte Signale. Mit der 22qter Sonde zeigte sich nur an einem Chromosom 22 ein Signal, auf dem derivativen Chromosom 22 war kein Signal zu sehen (Abb.4.9.) womit eine, den Subtelomerbereich von 22q betreffende Deletion nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend zeigte die konventionelle und die molekulare zytogenetische Untersuchung an stimulierten Blut-Lymphozyten, dass P3 eine zweite Form eines unbalancierten Karyotyps mit einem derivativen Chromosom 22, hervorgegangen aus einer Translokation zwischen den Chromosomen 10 und 22, trägt. Somit liegt bei P3 ein unbalancierter Zustand mit einer partiellen Trisomie für den Subtelomerbereich von 10q und einer partiellen Monosomie für den Bereich 22q13-qter vor.

Der durch die molekularzytogenetische Analyse bestätigte Karyotyp lautet nach ISCN:  
ish. der(22)t(22;10)(q13;q26.1)(22pter+,22qter-, 10qter+)



**Abb. 4.9. FISH-Analyse an Metaphasenchromosomen von P3. (a)** FISH mit ToTelVysion Mischung #10 [grün=10p, rot=10q, rot/grün=15q, aqua=LSI PML(15q22)]. Zwei normale Chromosomen 10 und ein derivatives Chromosom 22 sind zu sehen. **(b)** FISH mit der 22qter-Sonde der (rot) ergab nur ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 22. Hier wurde keine Kontrollsonde mithybridisiert. Die Chromosomen wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Bruchpunktbestimmung anhand der mütterlichen Chromosomen

In dieser Arbeit sollte anhand der mütterlichen Translokation eine genauere Identifizierung der Bruchpunkte auf Chromosom 10qter und 22qter erfolgen.

Um die Bruchpunktregionen feiner zu kartieren, wurden zunächst an den Metaphasechromosomen der Mutter mit Hilfe von klonierten DNA-Fragmenten (BAC- und Fosmid-Klone) serielle Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) mit dem Ziel durchgeführt, auf den beiden derivativen Chromosomen 10 und 22 bruchpunktüberspannende Klone zu identifizieren. Ein bruchpunktüberspannender Klon hybridisiert in der FISH-Analyse mit dem für ihn kartierten Bereich auf dem unveränderten Wildtyp-Chromosom und auf beiden derivativen Chromosomen, wobei sich hier das Signal aufspaltet. Deshalb wird der bruchpunktüberspannende Klon auch als „*split-Klon*“ bezeichnet. Die für die FISH-Analyse eingesetzten BAC- und Fosmid Klone wurden mithilfe von Datenbankrecherchen (NCBI, UCSC, ENSEMBL) ausgewählt.

Die Bruchpunktregionen wurden durch FISH-Analysen der überlappenden BAC-Klone auf ca. 200 kb eingegrenzt. Nach der Identifizierung von *split*-BAC-Klonen wurden für die entsprechenden Regionen überlappende Fosmid-Klone ausgesucht. Damit konnte die Bruchregion weiter auf ca. 40 kb eingegrenzt werden. In Abbildung 5.1. ist die Vorgehensweise schematisch dargestellt.

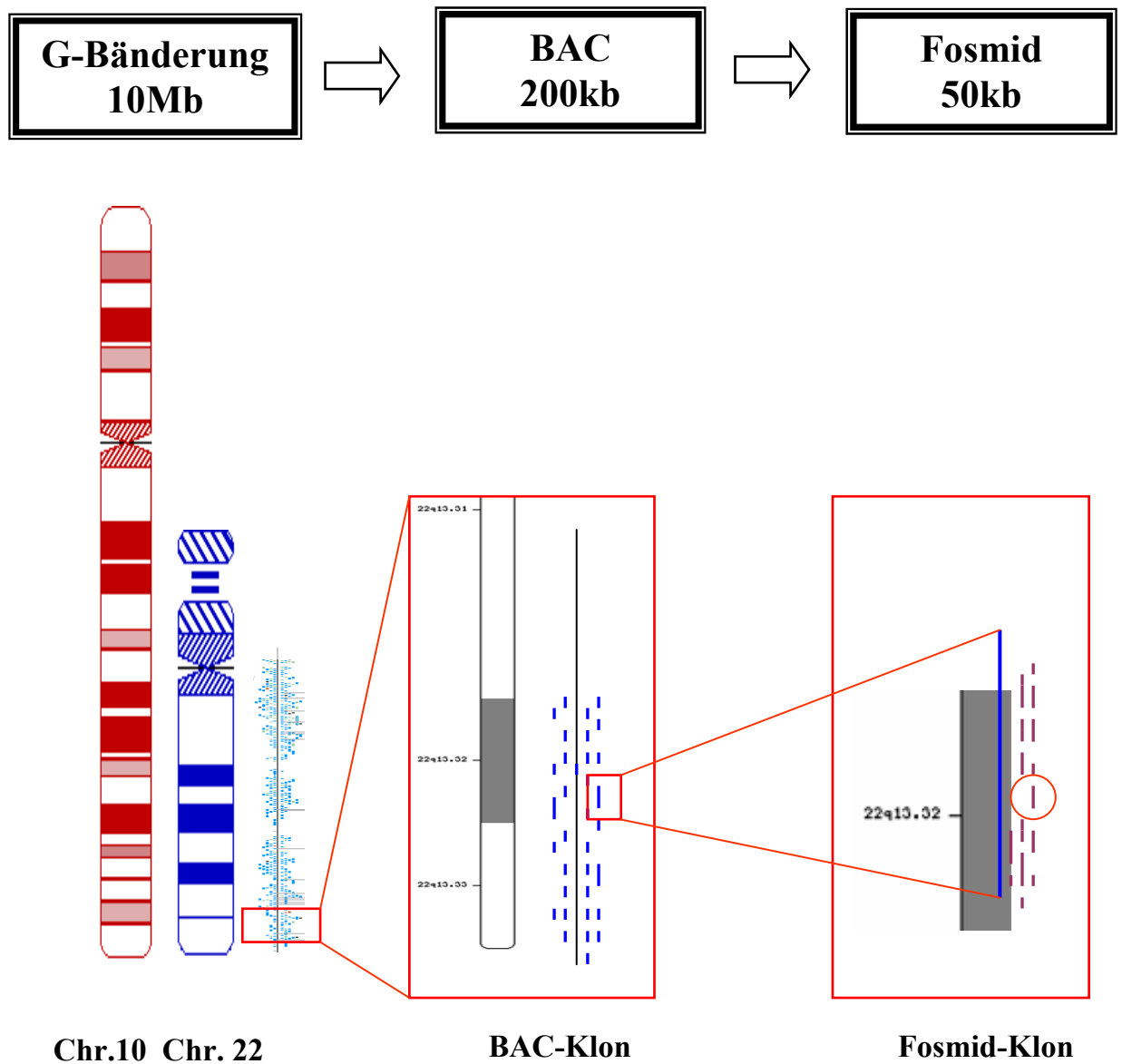


Abb. 5.1. schematische Darstellung der Arbeitsprozedur.

## 5.2. Bruchpunktbestimmung mit Hilfe von BAC-Klonen auf Chromosom 10

Bei der Mutter der hier vorgestellten Patienten liegt eine balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 10 und 22 vor [46,XX,t(10;22)(q26.1;q13)]. Aufgrund des in der GTG-Bänderung methodisch begrenzten Auflösungsvermögens von ca. 5 - 8 Mb kann die Lokalisation der Bruchpunkte auch nur in dieser entsprechenden Größenordnung angegeben werden. Zur Eingrenzung dieser Bruchpunktregion wurde zunächst der proximal zu dem mutmaßlichen Bruchpunkt gelegene BAC-Klon RP11-317F25 in 10q25.3 (physikalische Lokalisation bei 116.2 Mb) ausgewählt. Von dieser Position ausgehend wurden serielle FISH-Analysen mit weiteren telomerwärts gelegenen Klonen durchgeführt (die Reihenfolge der verwendeten Klone ist in Tabelle 5.1. zu sehen).

Die zuerst verwendeten Klone RP11-317F25, RP11-88I10 und RP11-47G11 ergaben Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und auf dem derivativen Chromosom 10. Der BAC-Klon RP11-57G20 zeigte ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und auf dem derivativen Chromosom 22. Die korrekte chromosomenspezifische Anbindung jedes BAC-Klons wurde vorher mit entsprechenden Centromer-spezifischen Sonden überprüft. Hierbei wurde entdeckt, dass der BAC-Klon RP11-295O23 obwohl er laut Angaben im UCSC-Browser auf Chromosom 10 lokalisiert sein sollte, in meiner Analyse auf beiden homologen Chromosomen 1 hybridisierte und somit für die Untersuchungen nicht geeignet war.

Durch die Analysen mit den BAC-Klonen wurde die Bruchpunktregion auf einen Abschnitt von etwa 2 Mb eingegrenzt, der proximal durch den BAC-Klon RP11-47G11 und distal durch den BAC-Klon RP11-57G20 flankiert wurde und in der Bande 10q26.13 liegt.

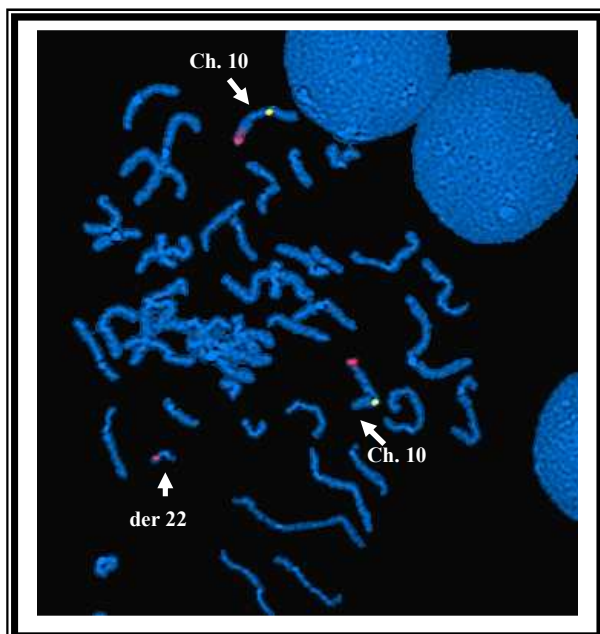
Aus diesem Abschnitt wurden nun für weitere FISH-Analysen überlappende BAC-Klone ausgewählt.



BAC-Klon (cen→tel)	Position	Signale	
RP11-317F25	116,2 Mb, 10q25.3	wt 10q	der(10q)
RP11-295O23	118,2 Mb, 10q26.11	Chr 1	Chr 1
RP11-88I10	121,5 Mb, 10q26.12	wt 10q	der(10q)
RP11-47G11	125,8 Mb, 10q26.13	wt 10q	der(10q)
RP11-113M14	126,1 Mb, 10q26.13	wt 10q	der(10q)
RP11-937K22	126,3 Mb, 10q26.13	wt 10q	der(10q)
RP11-1080O18	126,6 Mb, 10q26.13	wt 10q	der (10q) + der (22q)
RP11-57G20	127,4 Mb, 10q26.13	wt 10q	der (22q)

**Tab. 5.1. Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des 10p26.1-Bruchpunktes mit BAC-Klone.**  
 In der Reihenfolge von oben nach unten sind die BAC-Klone in der Orientierung Centromer in Richtung Telomer aufgelistet. Die Klone, die aufwärts vom Bruchpunkt in der Richtung zum Centromer liegen, zeigen typischerweise ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und das andere Signal auf dem derivativen Chromosom 10. Der Klon RP11-57G20, der abwärts vom Bruchpunkt in der Richtung zum Telomer liegt, zeigt ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und das andere Signal auf dem derivativen Chromosom 22. Der *Split*-Klon RP11-1080O18 zeigt insgesamt drei Signale: eins auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und jeweils eins auf den derivativen Chromosomen 10 und derivativen Chromosom 22. Der BAC-Klon RP11-295O23 hybridisiert auf beiden homologen Chromosomen 1 und kann für die Fragestellung dieser Arbeit nicht herangezogen werden. **wt** = Wildtyp-Chromosom; **der** = derivatives Chromosom.

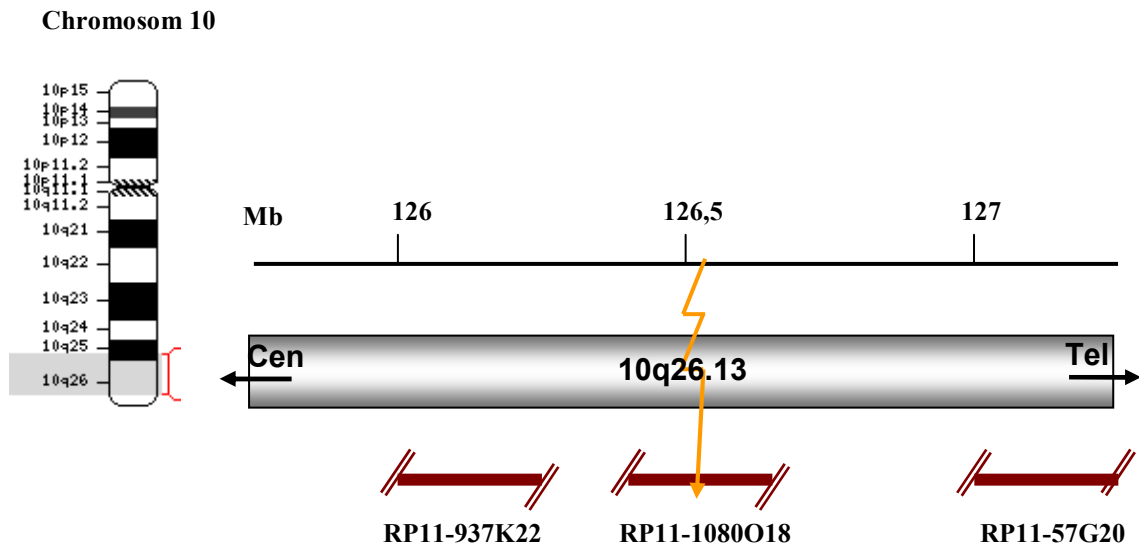
Mit Hilfe dieser FISH-Analysen konnte der BAC-Klon RP11-1080O18 als bruchpunktüberspannender Klon identifiziert werden, da sich das Signal aufspaltet und man ein starkes Signal auf Chromosom 10 und jeweils ein schwaches Signal auf den beiden derivativen Chromosomen 10 und 22 erkennt (Abb.5.2.). Somit konnte die Bruchpunktregion auf etwa 200 kb in 10q26.13 eingegrenzt werden. Die Ergebnisse dieser FISH-Analysen sind in der Tabelle 5.1. zusammengefasst.



**Abb. 5.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem BAC-Klon RP11-1080O18 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Mutter .**

Die rot-fluoreszierende Sonde RP11-1080O18 ergab ein Signal auf dem Wildtyp- Chromosom 10 und dem derivativen Chromosom 10, die in der DAPI-Färbung nicht voneinander zu unterscheiden sind. Außerdem zeigte der Klon ein Signal auf dem derivativen Chromosom 22. Die gelbe Markierung zeigt das Centromer auf Chromosom 10. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Eine schematische Zusammenfassung der Ergebnisse aus den FISH-Analysen für den Bruchpunkt auf dem Chromosom 10 ist in Abb. 5.3. dargestellt.



**Abb. 5.3. Schematische Darstellung der BAC-Klone in Bruchpunktregion 10p26.13.**

Durch einen blassgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 10p26.13 mit der darüber liegenden Größeneinteilung in Megabasen (Mb) dargestellt, außerdem ist die Orientierung von Centromer (Cen) nach Telomer (Tel) angegeben. Die BAC-Klone sind durch einen braunen Balken dargestellt. Der BAC-Klon RP11-1080O18 ist ein bruchpunktüberspannender-Klon. Der Klon RP11-937K22 liegt aufwärts und der Klon RP1-57G20 abwärts von der Bruchpunktregion. Der mutmaßliche Bruchpunkt ist mit einem gelben Pfeil gekennzeichnet.

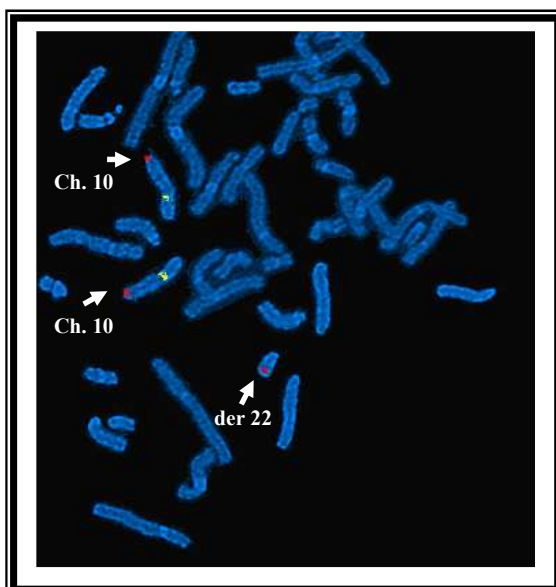
### **5.3. Weitere Eingrenzung der Bruchpunktregion in 10q26.13 mittels FISH-Analyse mit Fosmid-Klonen**

Zur weiteren Eingrenzung des Bruchpunktes in 10q26.13 wurden sechs überlappende Fosmid-Klone ausgewählt, mit denen die gesamte Länge des bruchpunktüberspannenden BAC-Klones RP11-1080O18 abgedeckt werden konnte. Die Fosmid-Klone sind in Tabelle 5.2. von oben nach unten entsprechend der Orientierung Centromer zu Telomer aufgelistet.

Fosmid-Klon (cen→tel)	Position 10q26.13	Signale	
W12-1000B7	126,464 - 126,515 Mb	wt 10q	der(10q)
W12-1769G4	126,521 - 126,564 Mb	wt 10q	der(10q)
W12-2903I6	126,550 - 126,592 Mb	wt 10q	der(10q)
W12-2567C2	126,588 - 126,627 Mb	wt 10q	der(10q)
W12-469L15	126,604 - 126,644 Mb	wt 10q	<b>und</b> der (10q) + der (22q)
W12-3810H20	126,623 - 126,660 Mb	wt 10q	der(22q)

**Tab. 5.2. Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des 10p26.13-Bruchpunktes mit Fosmid-Klonen.** In der Reihenfolge von oben nach unten sind die Fosmid-Klone in der Orientierung Centromer zu Telomer aufgelistet. Die Klone, die aufwärts vom Bruchpunkt in Richtung zum Centromer liegen, zeigen typischerweise ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und das andere Signal auf dem derivativen Chromosom 10. Der Klon W12-469L15 ist der *Split*-Klon und zeigt drei Signale, eins auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und jeweils eins auf den derivativen Chromosomen 10 und 22. Der Klon W12-3810H20, der abwärts vom Bruchpunkt in Richtung zum Telomer liegt, zeigt ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und ein Signal auf dem derivativen Chromosom 22. **wt** = Wildtyp-Chromosom; **der** = derivatives Chromosom.

Die Fosmid-Klone W12-1000B7, W12-1769G4, W12-2903I6 und W12-2567C2 konnten anhand der FISH-Analysen als centromerwärts vom Bruchpunkt gelegen identifiziert werden. Sie ergaben Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und dem derivativen Chromosom 10. Der Fosmid-Klon W12-3810H20 zeigte je ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und dem derivativen Chromosom 22 und liegt telomerwärts der Bruchpunktregion. Der Fosmid-Klon W12-469L15 zeigte ein starkes Signal auf einem Chromosom 10 und jeweils ein schwaches Signal, auf einem Chromosom 10 auf dem derivativen Chromosom 22. Somit sollte der Fosmid-Klon W12-469L15 ein bruchpunktüberspannender Klon sein (Abb.5.4.).

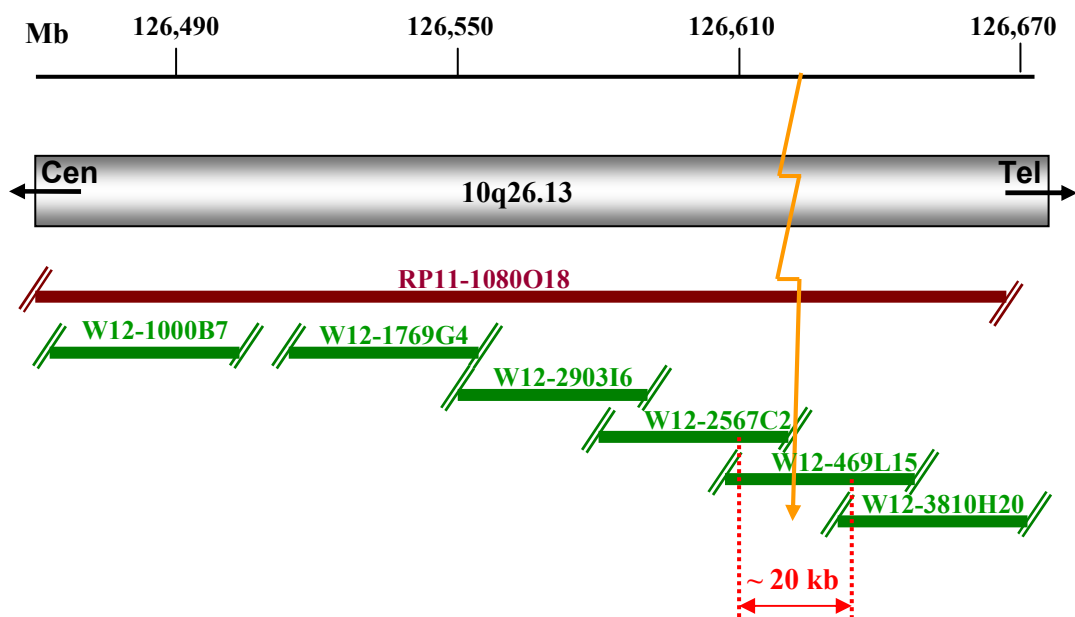


**Abb. 5.4. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem Fosmid-Klon W12-469L15 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Mutter.**

Die rot-fluoreszierende Sonde **W12-469L15** ergab je ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und dem derivativen Chromosom 10. Außerdem zeigte den Klon ein Signal auf dem derivativen Chromosom 22 [der(22)]. Die gelbe Markierung zeigt das Centromer auf Chromosom 10. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Der benachbart zu dem bruchpunktüberspannende Fosmid-Klon W12-469L15 liegende Klon W12-2567C2 (siehe Tabelle 4.2) zeigte in allen untersuchten Metaphasen je ein starkes und ein deutlich abgeschwächtes Signal auf den beiden Chromosomen 10.

Aufgrund der Signal-Konstellation für die Fosmid-Klone W12-2567C2 und W12-469L15 konnte die Bruchpunktregion auf ca. 20 kb in Position 126,610-126,630 Mb eingegrenzt werden (Abb.5.5.).



**Abb. 5.5. Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone in der Bruchpunktregion 10q26.13.** Die Abbildung zeigt einen als dunkelgrauen Balken dargestellten Ausschnitt der Bruchpunktregion 10q26.13 auf dem Chromosom 10, mit darüber angegebener Größeneinteilung in Megabasen (Mb). Die Orientierung von Centromer (Cen) nach Telomer (Tel) ist angegeben. Der *Split* BAC-Klon PR11-1018O18 ist durch einen braunen Balken dargestellt. Die grünen Balken geben die überlappenden Fosmid-Klone an. Der Fosmid-Klon W12-469L15 ist ein bruchpunktüberspannender Fosmid-Klon. Die rot gestrichelten, vertikalen Linien zeigen den Bruchpunktbereich mit einer Größe von etwa 20 kb an.

## 5.4. Bruchpunktbestimmung mit Hilfe von BAC-Klonen auf Chromosom 22

Aufgrund der GTG-Bänderung wurde der zweite an der Translokation beteiligte Bruchpunkt auf Chromosom 22 nahe am Telomer des langen Armes in Bande q13.3 vermutet. Auch hier sollte zunächst mit Hilfe von BAC-Klone die Bruchpunktregion auf dem Chromosom 22 auf eine Größe von ca. 200 kb eingegrenzt werden. Zur ersten Orientierung wurden 2 terminal liegende BAC-Klone, RP11-494O16 und RP11-255N20 in 22q13.3 ausgewählt.

Die FISH-Analyse mit RP11-494O16 ergab je ein Signal auf Chromosom 22 und auf dem derivativen Chromosom 10. RP11-255N20 zeigte je ein Signal auf dem wt-Chromosom 22 und auf dem derivativen Chromosom 22, die allerdings in der DAPI-Färbung nicht voneinander unterschieden werden könnten. Mit Hilfe der FISH-Analysen unter Verwendung der beschriebenen Klone konnte man die Bruchpunktregion zunächst weiter auf ca. 2,4 Mb eingrenzen.

Zur feineren Kartierung des Bruchpunktes in 10q13.3, wurden für weitere FISH-Analysen überlappende BAC-Klone ausgewählt die in Tabelle 5.3. aufgelistet sind.

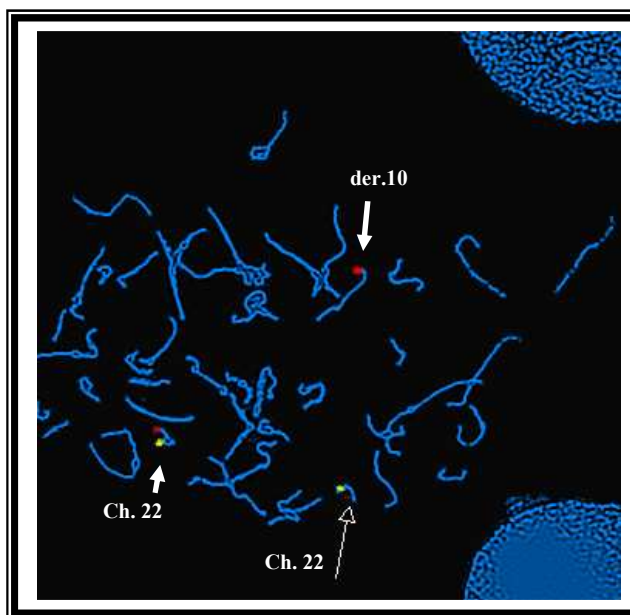
BAC-Klon (cen→tel)	Position	Signale	
RP11-255N20	46,1 Mb, 22q13.31	wt 22q	der(22q)
RP11-1035C10	47,7 Mb, 22q13.32	wt 22q	der (22q) + der(10q)
RP11-636D2	47,9 Mb, 22q13.32	wt 22q	der(10q)
RP11-46J14	48,0 Mb, 22q13.32	wt 22q	der(10q)
RP11-350L11	48,2 Mb, 22q13.33	wt 22q	der(10q)
RP11-732O9	48,3 Mb, 22q13.33	wt 22q	der (10q)
RP11-494O16	48,5 Mb, 22q13.33	wt 22q	der (10q)

**Tab. 5.3. Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des 22p13.3-Bruchpunktes mit BAC-Klone.** In der Reihenfolge von oben nach unten sind BAC-Klone in der Orientierung Centromer zu Telomer aufgeführt. Klon RP11-255N20, der centromerwärts vom Bruchpunkt liegt, zeigt jeweils ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 22 und auf dem derivativen Chromosom 22. Der Klon RP11-1035C10 zeigt drei Signale: eins auf dem Wildtyp-Chromosom 22 und jeweils eins auf den derivativen Chromosomen 10 und 22. Die Klone, die telomerwärts vom mutmaßlichen Bruchpunkt liegen, zeigen je ein Signal auf dem wt-Chromosom 22 und auf dem der-Chromosom 10. wt: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom.

Die FISH Analysen wurden systematisch ausgehend vom Telomer in Richtung Centromer durchgeführt. Die zuerst verwendete Klone RP11-723O9, RP11-350L11, RP11-46J14 und RP-636D2 ergaben jeweils ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 22 und auf dem derivativen Chromosom 10.

Der BAC-Klon RP11-1035C10 zeigte ein starkes Signal auf Chromosom 22 und jeweils ein schwaches Signal auf den derivativen Chromosomen 10 und 22. Somit wurde der Klon RP11-1035C10 als bruchpunktüberspannender *split*-Klon identifiziert, und die Bruchpunktregion konnte auf etwa 200 kb in der physikalischen Lokalisation 47.517.250 – 47.708.096 Mb eingegrenzt werden (Abb.5.6.).

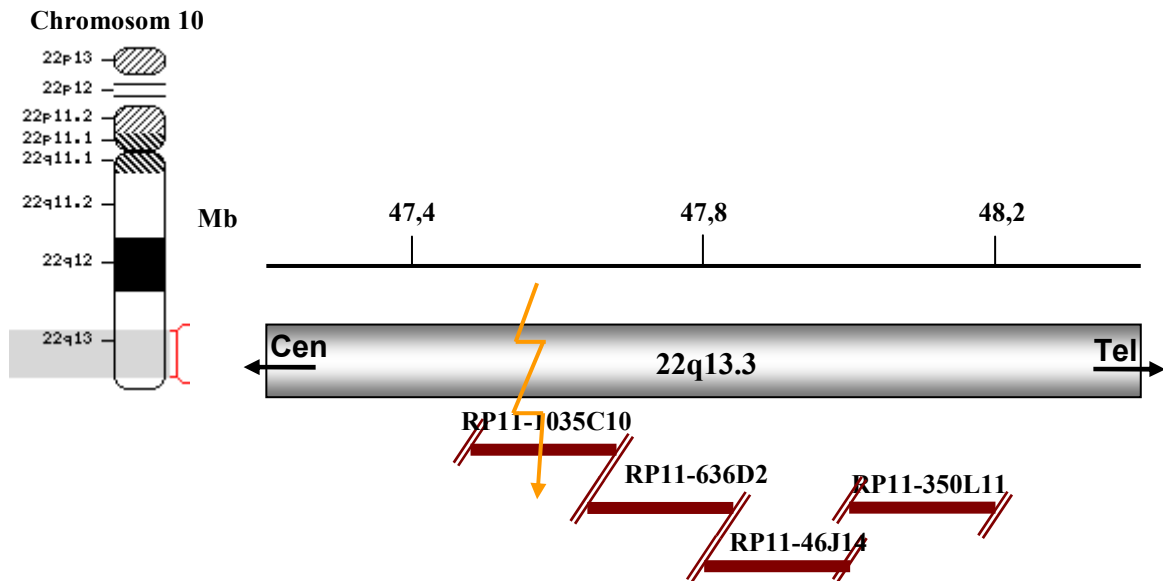
Der zytogenetische Bruchpunkt kann daher auch genauer mit 22q13.32 angegeben werden, so dass die korrigierte Karyotypformel nun wie folgt lautet: 46,XX,t(10;22)(q26.13;q13.32).



**Abb. 5.6. Floreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit dem BAC-Klon RP11-1035C10 als DNA-Sonde für Chromosom 22 an Metaphasechromosomen der Mutter.**

Die rot-fluoreszierende Sonde RP11-1035C10 ergab jeweils ein Signal auf dem wt-Chromosom 22 und dem der-Chromosom 22 (können anhand der blauen DAPI-Färbung nicht voneinander unterschieden werden). Außerdem zeigt der Klon ein Signal auf dem derivativen Chromosom 10. Die gelbe Markierung zeigt das Centromer von Chromosom 22.

Eine schematische Zusammenfassung der Ergebnisse aus den FISH-Analysen für den Bruchpunkt auf dem Chromosom 22 ist in Abb. 5.7. gezeigt.



**Abb. 5.7. Schematische Darstellung der BAC-Klone in Bruchpunktregion 22q13.32-q13.33.**

Der blassgrauen Balken zeigt ein Ausschnitt der Region 22q13.32-13.33 auf Chromosom 22. Darüber ist die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) dargestellt, außerdem ist die Orientierung von Centromer (Cen) nach Telomer (Tel) angegeben. Die BAC-Klone sind durch einen braunen Balken dargestellt. Der BAC-Klon RP11-1035C10 ist ein bruchpunktüberspannender-Klon. Die überlappende BAC Klone RP11-636D2, RP11-46J14 und RP11-350L11 liegen telomerwärts von der Bruchpunktregion.

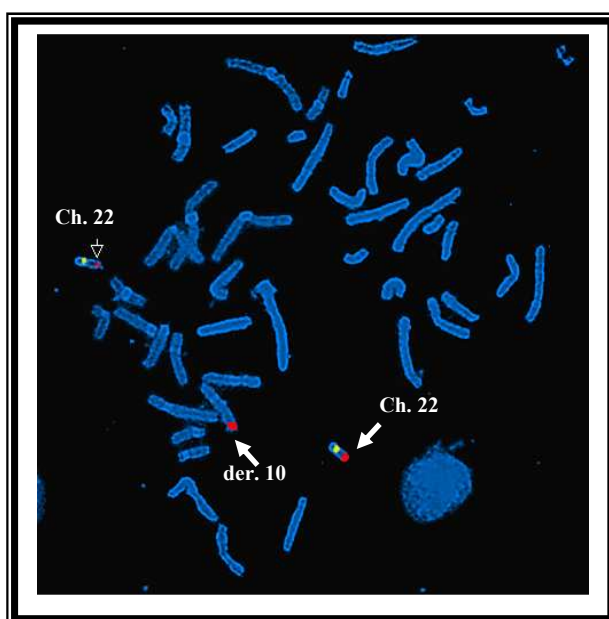
## 5.5. Weitere Eingrenzung der Bruchpunktregion in 22q13.32 mittels FISH-Analyse mit Fosmid-Klonen

Zur weiteren Eingrenzung des Bruchpunktes in 22q13.32 wurden sechs überlappende Fosmid-Klone ausgewählt, mit denen die gesamte Länge des bruchpunktüberspannenden BAC-Klones RP11-1035C10 abgedeckt werden konnte. Die Fosmid-Klone sind in Tabelle 5.4. von oben nach unten entsprechend der Orientierung Centromer in Richtung Telomer aufgelistet.

Fosmid-Klon (cen→tel)	Position 22q33.32	Signale	
W12-917M14	47,518 - 47,561 Mb	wt 22q	der (10q) + der (22q)
W12-1528E18	47,558 - 47,598 Mb	wt 22q	der(10q)
W12-1341J1	47,592 - 47,631 Mb	wt 22q	der(10q)
W12-1479L20	47,615 - 47,658 Mb	wt 22q	der(10q)
W12-429I5	47,643 - 47,684 Mb	wt 22q	<b>und</b> der(10q)
W12-1815F9	47,667 - 47,711 Mb	wt 22q	der(10q)

**Tab. 5.4. Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des 22q13.32-Bruchpunktes mit Fosmid-Klonen.** In der Reihenfolge von oben nach unten sind die verwendeten Fosmide-Klon in der Orientierung Centromer zu Telomer aufgelistet. Der bruchpunktüberspannende Klon W12-917M14 zeigt ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 22 und jeweils eins auf den derivativen Chromosomen 10 und 22. Die andere Klone liegen telomerwärts vom Bruchpunkt und zeigen jeweils ein Signal auf dem wt-Chromosom 22 und eins auf dem derivativen Chromosom 10. **wt**: Wildtyp-Chromosom; **der**: derivatives Chromosom.

Die seriellen FISH-Analysen mit den Fosmid-Klonen ausgehend von dem am weitesten telomerwärts liegenden Klon in Richtung zum Centromer zeigten, dass die Fosmid-Klone W12-1815F9, W12-429I5, W12-1479L20, W12-1341J1 und W12-1528E18 jeweils auf dem Wildtyp-Chromosom 22 und dem derivativen Chromosom 10 hybridisieren. Somit liegen diese Fosmid Klone telomerwärts von dem mutmaßlichen Bruchpunkt. Mit dem Fosmid-Klon W12-917M14 zeigte sich ein starkes Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 22 und jeweils ein schwaches Signal auf den derivativen Chromosomen 22 und 10 (Abb.5.8.).



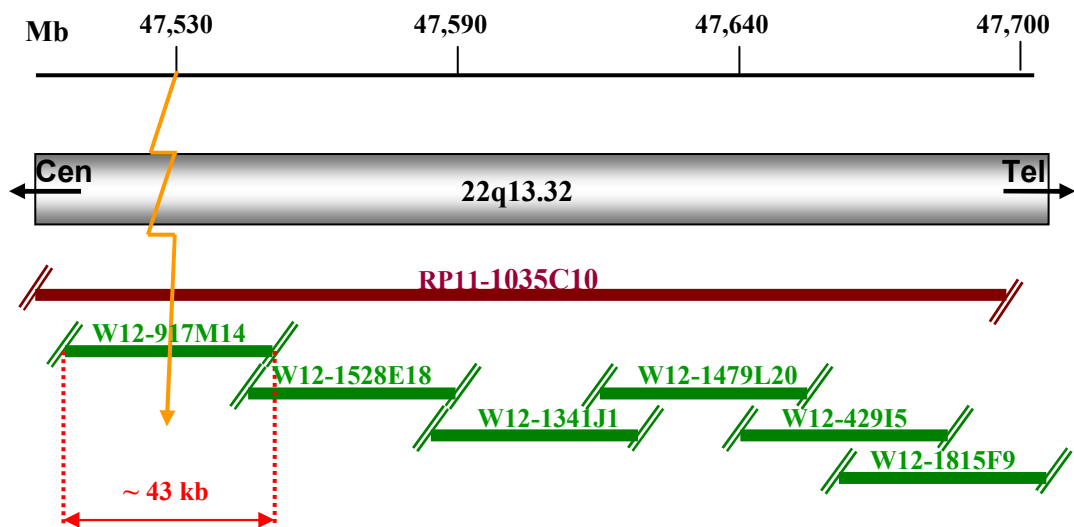
**Abb. 5.8. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem Fosmid-Klon W12-917M14 als DNA-Sonde für Chromosom 22 an Metaphasechromosomen der Mutter.**

Die rot-fluoreszierende Sonde W12-917M14 ergab ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 22 und dem derivativen Chromosom 22. Außerdem zeigte der Klon ein Signal auf dem derivativen Chromosom 10 [der (10)]. Die gelbe Markierung zeigt das Centromer von Chromosom 22. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.



Mit Hilfe dieser Analysen konnte die Bruchpunktregion auf eine Größe von 43 kb [47,518 - 47,561 Mb] in der Chromosomenbande 22q13.32 eingrenzen werden.

Die Position der Fosmid-Klone auf Chromosom 22 ist in Abb. 5.9. schematisch dargestellt.



**Abb. 5.9. Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 22q13.32 mit den verwendeten BAC- und Fosmid-Klonen.** Der hellgraue Balken stellt einen Ausschnitt der Region 22q13.32 mit der darüber liegenden Größeneinteilung in Megabasen (Mb) da. Die Orientierung von Centromer (Cen) nach Telomer (Tel) ist angegeben. Der BAC-Klon ist als brauner Balken dargestellt. Die Fosmid-Klone sind als grüne Balken dargestellt. Der Fosmid-Klon W12-917M14 konnte als bruchpunktüberspannend identifiziert werden. Die rot gestrichelten, vertikalen Linien markieren die Bruchpunktregion mit einer Größe von etwa 40 kb.

## 5.6. Bestätigung der Bruchpunktlokalisierung bei den Patienten P1, P2 und P3

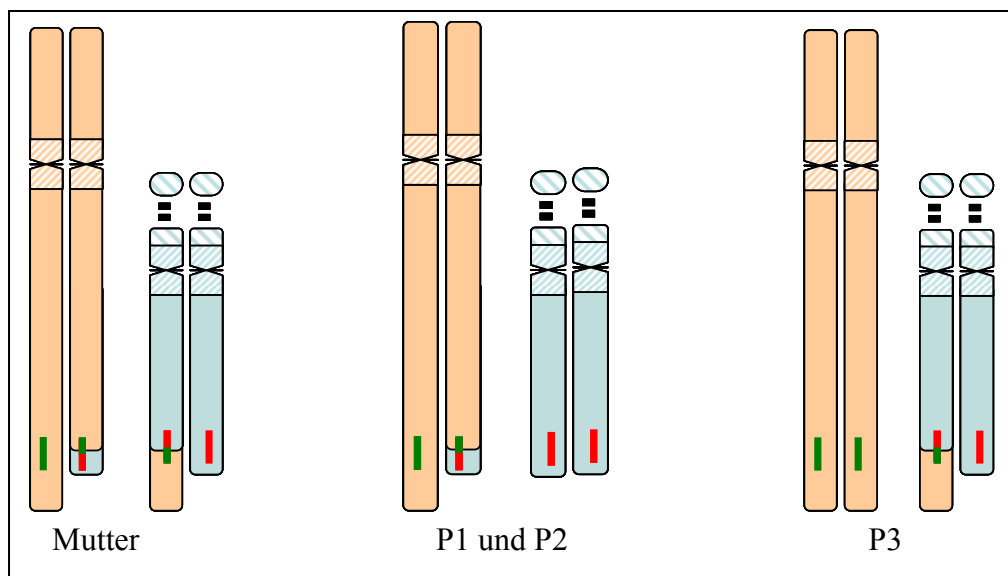
Da die zytogenetischen Imbalancen bei den drei Patienten P1-P3 in der mütterlichen Meiose durch eine Adjacent-1-Verteilung der an der Translokation beteiligten Chromosomen entstanden sind, konnte angenommen werden, dass bei den Kindern die gleichen Bruchpunkte in den derivativen Chromosomen vorliegen, wie bei der Mutter (Abb. 5.10.) Zur Bestätigung dieser Annahme wurden die Metaphase-Chromosomen der Kinder mit den im Vorfeld identifizierten bruchpunktüberspannenden BAC- und Fosmid-Klonen hybridisiert.

P1 und P2 zeigen eine partielle Monosomie für Chromosom 10qter und eine partielle Trisomie für Chromosom 22qter. Erwartungsgemäß zeigte die Hybridisierung der für Chromosom 10 spezifischen *Split*-Klone RP11-1080O18 und W12-469L15 bei P1 und P2 nur jeweils ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 10 und ein schwächeres Signal auf dem derivativen Chromosom 10 (Abb. 5.11.a und b).

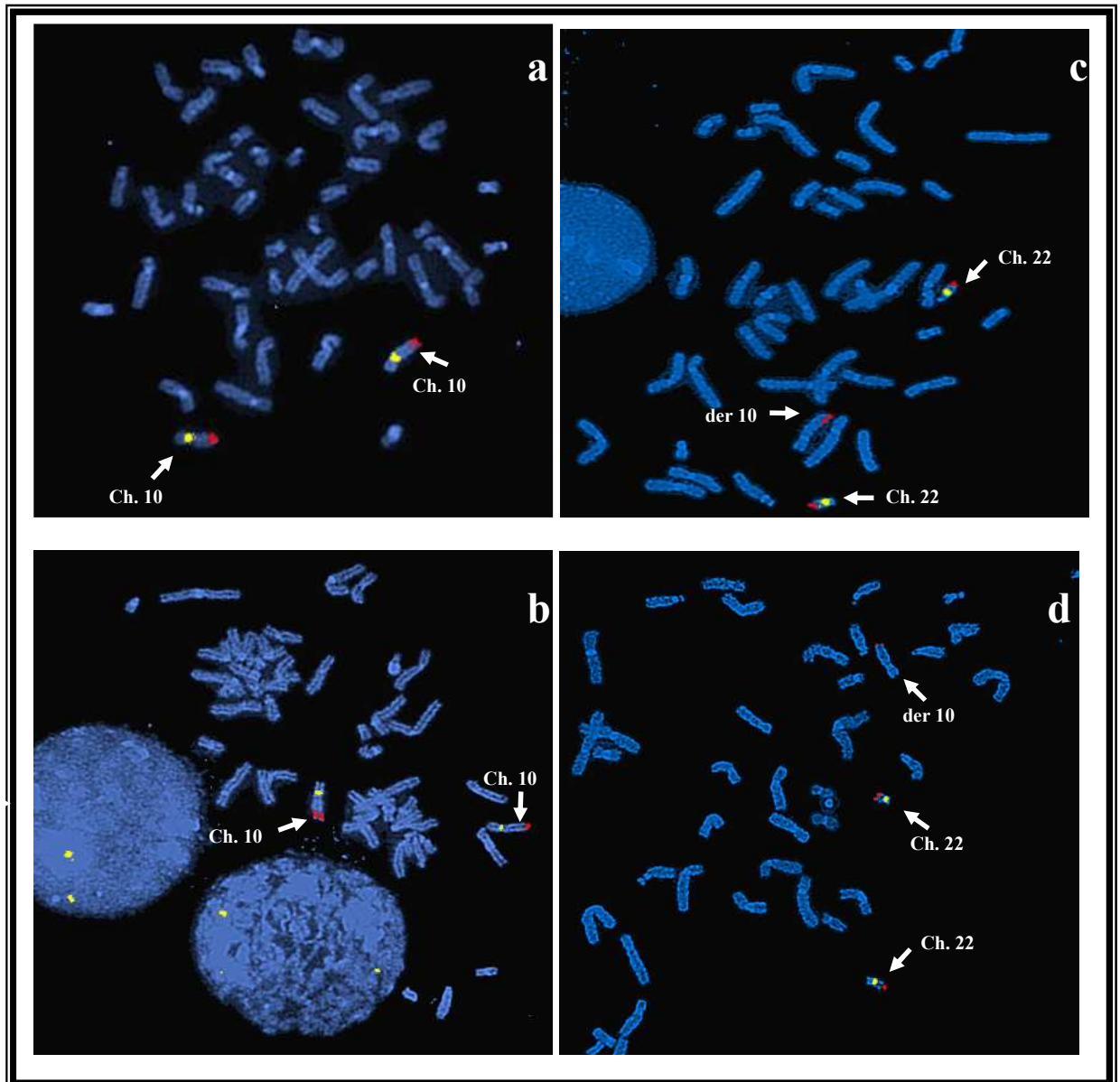
Die für Chromosom 22 spezifischen *Split*-Klone RP11-1035C10 und W12-917M14 zeigen bei P1 und P2 aufgrund der hier vorliegenden partiellen Trisomie 22qter jeweils ein Signal auf den beiden Wildtyp-Chromosomen 22 und ein zusätzliches Signal auf dem derivativen Chromosom 10 (Abb. 5.11.c und d).

Bei P3 liegt eine umgekehrte Konstellation vor. Passend zu der hier bestehenden partiellen Trisomie 10 erhielt ich an Metaphasenchromosomen dieser Patientin mit den für Chromosom 10 spezifischen *Split*-Klonen RP11 1080O18 und W12-469L15 je ein Signal auf den beiden Wildtyp-Chromosomen 10 und ein zusätzliches Signal auf dem derivativen Chromosom 22 (Abb. 5.12.a und b).

Da bei P3 gleichzeitig auch eine partielle Monosomie für 22qter vorliegt, waren erwartungsgemäß für die *Split*-Klone RP11-1035C10 und W12-917M14 je ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 22 und eins auf dem derivativen Chromosom 22 zu sehen (Abb. 5.12 c und d). Die Signal-Konstellation der *Split*-Klone ist in Abb. 5.10. schematisch dargestellt.

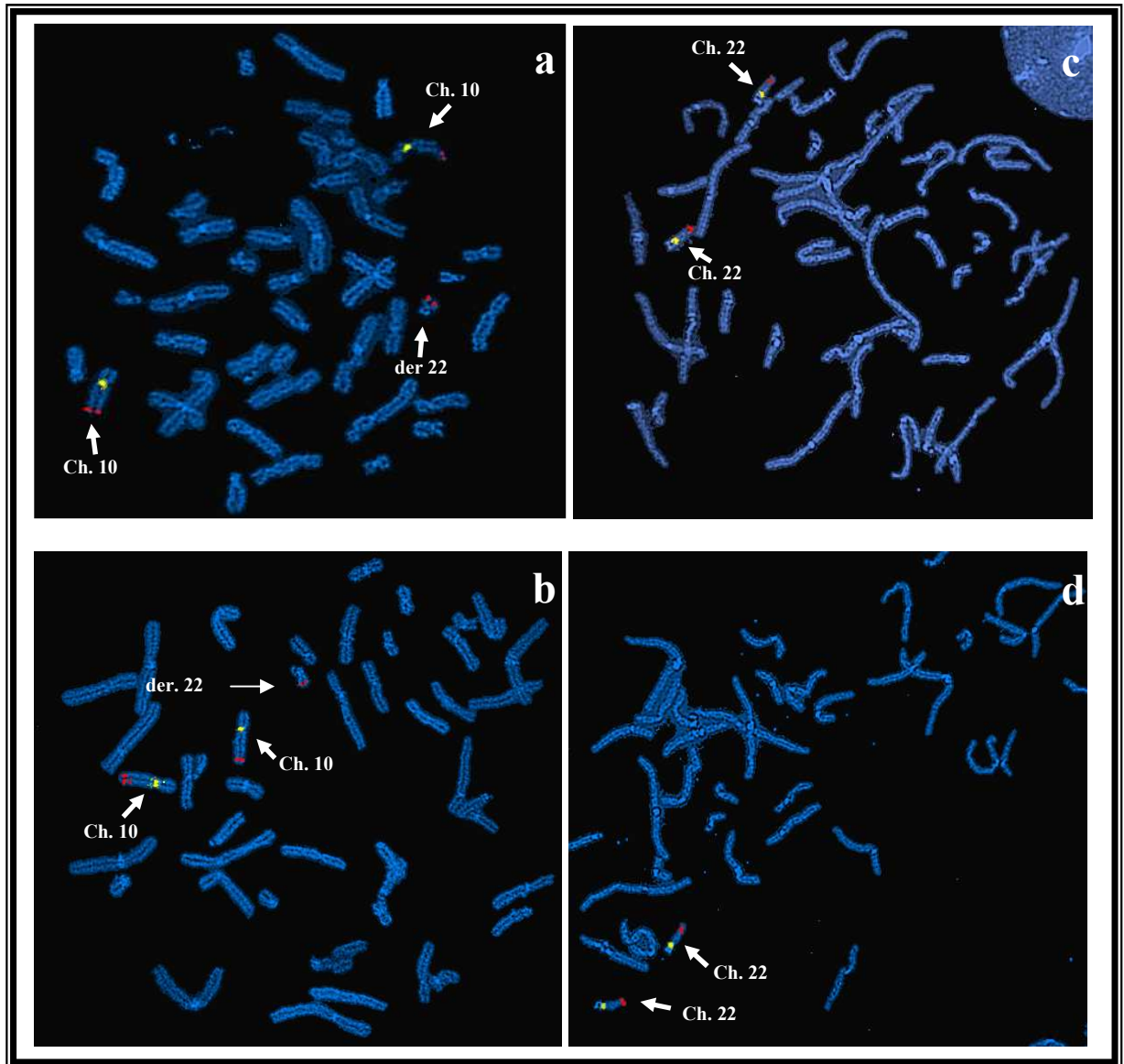


**Abb. 5.10. Schematische Darstellung der Signal-Konstellation.** Die Chromosomen 10 sind orange, die Chromosomen 22 hellblau dargestellt. Die bruchpunktüberspannende Sonde für Chromosom 10 ist grün und die für Chromosom 22 rot markiert.



**Abb. 5.11. FISH mit bruchpunktüberspannenden BAC- und Fosmid-Klonen für die Chromosomen 10 und 22 an Metaphasechromosomen von P1 und P2.**

(a) BAC-Klon RP11-1080O118 von Chromosom 10q zeigt je ein rotes Signal auf dem wt-Chromosom 10 und auf dem der-Chromosom 10. Die gelbe Markierung zeigt das Centromer der Chromosomen 10. (b) Fosmid-Klon W12-469L15 von Chromosom 10 zeigt je ein rotes Signal auf dem wt-Chromosom 10 und auf dem der-Chromosom 10. Die gelbe Markierung zeigt das Centromer der Chromosomen 10. (c) BAC-Klon RP11-1035C10 von Chromosom 22q zeigt je ein Signal auf den beiden wt-Chromosomen 22 und ein schwaches zusätzliches Signal auf dem langen Arm des derivativen Chromosom 10 (markiert durch einen Pfeil). Das Centromer der beiden Chromosomen 22 zeigt mit der spezifischen Centromersonde ein gelbes Signal. (d) Fosmid Klon W12-917M14 von Chromosom 22q zeigt je ein Signal auf den beiden wt-Chromosomen 22 und schwaches zusätzliches Signal auf dem langen Arm des derivativen Chromosom 10 (markiert durch einen Pfeil). Das Centromer der beiden Chromosomen 22 zeigt mit der spezifischen Centromersonde ein gelbes Signal.



**Abb. 5.12. FISH mit bruchpunktüberspannenden BAC- und Fosmid-Klonen für die Chromosomen 10 und 22 an Metaphasechromosomen von P3.**

(a) BAC-Klon RP11-1080O118 von Chromosom 10q zeigt je ein rotes Signal auf den beiden Wildtyp-Chromosomen 10 und ein zusätzliches schwächeres Signal auf dem derivativen Chromosom 22. Die gelben Signale markieren jeweils das Centromer von Chromosom 10. (b) Fosmid-Klon W12-469L15 von Chromosom 10 zeigt je ein rotes Signal auf den beiden Wildtyp-Chromosomen 10 und ein zusätzliches schwächeres Signal auf dem derivativen Chromosom 22. Die gelben Signale markieren jeweils das Centromer von Chromosom 10. (c) BAC-Klon RP11-1035C10 von 22q zeigt bei P3 je ein Signal auf dem wt-Chromosom 22 und eins auf dem derivativen Chromosom 22. Die gelben Signale markieren jeweils das Centromer von Chromosom 22. (d) Fosmid Klon W12-917M14 von Chromosom 22 zeigt je ein Signal auf dem wt-Chromosom 22 und eins auf dem derivativen Chromosom 22. Die gelben Signale markieren jeweils das Centromer von Chromosom 22.

## 6. DISKUSSION

### 6.1. Zwei Formen eines unbalancierten Zustandes hervorgegangen aus einer maternalen reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 22 und 10

Es wird beschrieben, dass ca. 2,5% der Patienten mit mentaler Retardierung eine Aberration im Subtelomerbereich unterschiedlicher Chromosomen zeigen (Piccione *et al.* 2008, Ravnan *et al.* 2006, Ballif *et al.* 2007, Ledbetter und Martin 2007). Seit der Identifizierung von submikroskopischen subtelomerischen Aberrationen als eine wichtige Ursache mentaler Retardierung (Flint *et al.* 1995), gehört die Suche nach derartigen Veränderungen bei Patienten mit mentaler Retardierung mit zu den wichtigsten diagnostischen Verfahren. Zur Indikation für eine subtelomerische Untersuchung wurde folgende Checkliste vorgeschlagen (De Vries *et al.* 2001):

1. mentale Retardierung in der Familie
2. pränatale Wachstumsretardierung
3. postnatale Wachstumsabnormalität
4. mehr als 2 faziale Dysmorphien
5. ein oder mehrere nicht faziale Merkmale und/oder kongenitale Abnormalität

Da für die in dieser Arbeit beschriebenen Familie alle 5 Punkte zutrafen, wurden bei den Geschwistern zytogenetische und molekularzytogenetische Analysen in stimulierten Blutlymphozyten durchgeführt. Die Analyse von Metaphase-Chromosomen mittels GTG-Bänderung bei der 4-jährigen Indexpatientin P1, zeigte numerisch einen unauffälligen weiblichen Chromosomensatz, wobei in Metaphasen mit einer hohen Auflösung (600 bphs) am langen Arm eines Chromosoms 10 eine minimale Strukturaberration am terminalen Ende vermutet wurde. Außerdem wurde eine als Normvariante zu bewertende perizentrische Inversion an einem Chromosom 9 festgestellt (Wyandt und Tonk 2004). Um nachzuweisen, ob es sich bei der putativen minimalen Strukturaberration an 10qter um eine reine terminale Deletion oder um ein komplexeres Rearrangement handelt, wurde an den Metaphase-Chromosomen aus stimulierten Lymphozyten von P1 eine Subtelomeranalyse mit dem kompletten Probenpanel des ToTelVysionMulticolor-DNA-Probenmix von der Firma Abbott/Vysis durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Signalkonstellation passend zu einer Deletion 10qter auf einem der beiden Chromosomen 10 und einer

submikroskopischen partiellen Trisomie für den Subtelomerbereich von 22qter. Während der Verdacht auf eine minimale Strukturveränderung an 10q bereits in der konventionellen zytogenetischen Analyse gestellt wurde, konnte die submikroskopische Veränderung an 22qter nur mittels FISH nachgewiesen werden. Basierend auf den Ergebnissen der konventionellen Chromosomenanalyse und weiterführenden molekularzytogenetischen Subtelomeranalyse wurde folgende Karyotypformel erstellt: 46,XX, inv(9)(p11q13),der(10)t(10;22)(q26.1;q13.3).

Die zytogenetische und molekularzytogenetische Analyse in stimulierten Blutlymphozyten von P2 spiegelte den gleichen unbalancierten Zustand wider wie bei P1. Die perizentrische Inversion an Chromosom 9 wurde bei P2 nicht beobachtet. Dementsprechend lautet der Karyotyp für P2: 46,XY,der(10)t(10;22)(q26.1;q13.3).

Da die gleiche unbalancierte Translokation zwischen Chromosom 10 und 22 bei beiden Kindern nachgewiesen werden konnte, lag es nahe, dass es sich hier um eine familiär vererbte Translokation handelt. Zu Bestätigung dieser Hypothese wurden stimulierte Blutlymphozyten der Eltern mittels zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden untersucht. Die Analysen zeigten in der Tat eine mütterliche balanciert erscheinende reziproke Translokation zwischen je einem Chromosom 10 und 22. Auch bei der Mutter war zusätzlich die Inversion-Normvariante an einem Chromosom 9 nachzuweisen: Karyotyp: 46,XX,inv(9)(p11q13),t(10;22)(q26.1;q13.3).

Nachdem der Befund über die mütterliche reziproke Translokation vorlag, wurde schließlich auch das dritte Kind (P3) wegen starker sprachbetonter Entwicklungsstörung in unserer genetischen Sprechstunde vorgestellt.

Die Chromosomen-Analyse und FISH-Untersuchungen mittels Subtelomersonden zeigten bei P3 eine andere Form der Imbalance von den Chromosomen 10 und 22. Bei P3 wurden eine partielle Trisomie von 10qter und eine partielle Monosomie von 22qter festgestellt. Der Karyotyp lautet: 46,XX,der(22)t(22;10)(q13.3;q26.1).

Wenn schon zu einem früheren Zeitpunkt die Diagnose bei dem ältesten Kind und der Mutter gestellt worden wäre, hätte man die Eltern über das erhöhte Risiko für unbalancierte Nachkommen aufklären und z.B. eine pränatale Diagnostik anbieten können.

## 6.2. Eingrenzung der Bruchpunktregionen auf den Chromosomen 10 und 22

Eine wichtige Voraussetzung für die Einschätzung der Auswirkung von unbalancierten Zuständen sowie für den Versuch einer Phänotyp-Genotyp-Korrelation ist die Bestimmung der Größe und der physikalischen Lokalisation der betroffenen Chromosomenabschnitte. Ziel war es daher eine genauere physikalische Kartierung der Bruchpunktregionen auf den Chromosomen 10 und 22 durchzuführen. Durch serienhafte FISH-Analysen mit Hilfe von überlappenden BAC- und Fosmid-Klonen konnte ich auf den beiden maternalen, durch eine reziproken Translokation entstandenen derivativen Chromosomen 10 und 22 die bruchpunktüberspannenden (*split*-) Klone identifizieren. Der BAC-Klon RP11-1080O18 wurde als ein *split*-Klon auf Chromosom 10 bestimmt. Der Klon liegt in 10q26.13 (physikalische Position ~126,463 – 126,680 Mb). Die weitere Eingrenzung mit Hilfe von FISH-Analysen mit den kleineren Fosmid-Klonen zeigte den Klon W12-469L15 (~126,604 - 126,644 Mb) als *split*-Klon. Dieser Klon zeigte auf beiden derivativen Chromosomen etwa gleich starke Signale. Außerdem ergab die Hybridisierung mit dem Fosmid-Klon W12-2567C2 (126,588 - 126,627 Mb), der proximal überlappend zu W12-469L15 Klon liegt, jeweils ein starkes und ein schwächeres Signal auf den beiden Chromosomen 10. Man kann postulieren, dass das starke Signal das Resultat der Hybridisierung der Sonde mit dem Wildtyp-Chromosom 10 und das schwache Signal durch die Hybridisierung mit dem derivativen Chromosom 10 zustande gekommen ist. Der distale Bereich dieses Klons hybridisiert vermutlich auf dem derivativen Chromosom 22, ist aber kleiner als die notwendige Mindestgröße, um mit der FISH-Methode ein nachweisbares Signal zu geben. Aufgrund der Signal-Konstellation der Fosmid-Klone W12-2567C2 und W12-469L15 konnte die Bruchpunktregion auf Chromosom 10 auf ca. 20 kb in Position 126,610 - 126,630 Mb eingegrenzt werden. Da die Länge von Chromosom 10 etwa 135,400 Mb (UCSC Genome Bioinformatics 2006) beträgt, liegt dieser mutmaßliche Bruchpunkt ca. 8,8 Mb entfernt vom terminalen Ende des langen Armes (10q), so dass für die bei den Geschwistern gefundenen Imbalance auf Chromosom 10 eine entsprechende Größe angenommen werden kann.

Auf Chromosom 22 ergab die FISH-Analyse mit RP11-494O16 je ein Signal auf Chromosom 22 und auf dem derivativen Chromosom 10. Somit wurde deutlich, dass die Bruchpunktregion centromerwärts von diesem Klon liegen musste. RP11-255N20 zeigte je

ein Signal auf dem wt-Chromosom 22 und auf dem derivativen Chromosom 22, woraus man schließen konnte, dass die Bruchpunktregion telomerwärts von diesem Klon liegen müsste. Damit sollte die Bruchpunktregion dazwischen, in einer Region mit ca. 2,4 Mb Länge liegen.

Bei systematischen FISH-Analysen, ausgehend vom Telomer in Richtung Centromer, zeigte der BAC-Klon RP11-1035C10 ein starkes Signal auf Chromosom 22 und jeweils ein schwaches Signal auf den derivativen Chromosomen 10 und 22. Aufgrund dieser Signalkonstellation konnte man annehmen, dass der BAC-Klon RP11-1035C10 in Bande 22q13.32 in Position 47,517 - 47,708 Mb ein bruchpunktüberspannender Klon ist. Bei der weiteren Eingrenzung der Bruchpunktregion mittels FISH-Analysen mit überlappenden Fosmid-Klonen zeigte der Fosmid-Klon W12-917M14 eine ähnliche Signalkonstellation, d. h. ein starkes Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 22 und jeweils ein schwaches Signal auf den derivativen Chromosomen 22 und 10. Somit wurde dieser Fosmid-Klon als *split*-Fosmid identifiziert und die Bruchpunktregion auf den Abschnitt 47,518 - 47,561 Mb, entsprechend dem Hybridisierungsziel von Fosmid-Klon W12-917M14, eingegrenzt. Da die Signal-Konstellation des distal liegenden überlappenden Fosmid-Klons W12-28E18 (47,558 - 47,598) keinen Hinweis auf eine Beteiligung in der Bruchpunktregion zeigt, kann man davon ausgehen, dass die Bruchpunktregion eher in dem proximalen Teil des Klons W12-917M14 lokalisiert ist. Damit beträgt, in anbetracht der Länge der Chromosom 22 (~ 49,7 Mb, UCSC Genome Bioinformatics 2006), die angenommene Größe der translozierten und damit auch der bei den Kindern unbalanciert vorliegenden Region in 22qter ca. 2,2 Mb.

### 6.3. Phänotypische Auswirkung der Bruchereignisse

Träger einer balancierten Translokation sind in der Regel phänotypisch unauffällig. Eine Ausnahme stellen die Fälle dar, bei denen durch einen Bruchpunkt oder beide Bruchpunkte ein Gen unterbrochen wird oder aus seiner regulatorischen Umgebung entfernt wird. Führt der Verlust eines Allels des betroffenen Gens bereits zu einem klinischen Phänotyp, so ist in diesem Fall aufgrund von Haploinsuffizienz die Translokation Ursache einer Erkrankung. So zum Beispiel führt bei dem Träger einer balancierten Translokation von Chromosomen 2 und 7 die Unterbrechung des Gens *GPD2* in Chromosomenbande 2q24.1 zur mentalen Retardierung (Daoud *et al.* 2009). Es gibt auch andere reziproke



Translokationen, die zu der Aufdeckung von krankheitsrelevanten Genen geführt haben (Balci *et al.* 2004, Tegay *et al.* 2009). Hierbei handelt es sich in der Regel um *de novo* Translokationen und nur selten um familiäre Fälle (Hussain *et al.* 2000).

In der in dieser Arbeit identifizierten Bruchpunktregion auf Chromosom 10, in 10q26.13, liegt das Gen *ZRANI* (Zinc finger RAN-binding domain containing 1, Position 126,620 - 126,665 Mb). *ZRANI* ist in die Regulation des Transkriptionsfaktors *NF-κB* (nuclear factor κB) bei inflammatorischen Prozessen beteiligt (Evans *et al.* 2001).

Offensichtlich hat der DNA-Bruch im Gen *ZRANB1* auf Chromosom 10 keine gravierende Auswirkung, da die Mutter als Träger dieses Chromosomenbruchs zumindest zum jetzigen Zeitpunkt keine offensichtlichen klinischen Auffälligkeiten zeigt.

Die Datenbankrecherchen zeigten, dass die Bruchpunktregion auf Chromosom 22 in einem nicht kodierenden Bereich der DNA liegt.

#### **6.4. Zwei Formen einer Imbalance durch Adjacent-1-Segregation**

Die Untersuchung von 1159 Familien mit einer Translokation ergab für die unbalancierten Zustände bei den Nachkommen ca. 71% Adjacent-1 und ca. 4% Adjacent-2-Segregation und 25% andere Formen (Cohen *et al.* 1994).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei Formen einer unbalancierten Translokation zwischen Chromosom 22 und 10 innerhalb einer Familie beobachtet. Diese chromosomalen Imbalancen sind durch eine 2:2 Adjacent-1-Segregation bei Vorliegen einer mütterlichen reziproken Translokation zwischen je einem Chromosom 10 und 22 hervorgegangen.

In der Literatur findet man aufgrund umfangreicher Datensammlungen für bestimmte Chromosomenaustausche die Angabe von Wahrscheinlichkeiten, mit denen ein Kind mit einer entsprechenden Imbalance lebensfähig aber in seiner körperlichen und geistigen Entwicklung beeinträchtigt sein wird. Aus dieser Zusammenstellung kann man entnehmen, dass das spezifische Risiko für die Geburt eines Kindes mit einer segmentalen Imbalance für den Bereich 10q25-q26 etwa 14% und für 22q11-q13 <2,6% ist (Midro *et al.* 1992). Bei diesen Berechnungen werden jedoch nur die einfach vorkommenden Formen in Betracht gezogen. Das gleichzeitige Vorkommen von zwei segmentalen Imbalancen und noch dazu

in zwei Formen nach Adjacent-1 Segregation bei drei Kindern in einer Familie ist ein eher seltenes und damit sehr interessantes Ereignis.

Während man für jede der 4 Konditionen (partielle Monosomie 10 oder 22 und partielle Trisomie 10 und 22) vergleichbare Fälle in der Literatur findet, wurde die Kombination der in dieser Arbeit nachgewiesenen Imbalancen bislang noch nicht beschrieben.

Der einzige Bericht über eine Translokation von Chromosomen 10 und 22 wurde von Chih-Ping Chen et. al. veröffentlicht. In diesem Artikel wird berichtet, dass 3 Mitglieder einer Familie Träger einer balancierten Translokation mit dem Karyotyp:  $t(10;22)(q24.1;p11.2)$  aber klinisch unauffällig sind. In 5 Schwangerschaften wurden eine partielle Trisomie  $10q24.1 \rightarrow qter$  und eine partielle Monosomie  $22p11.2 \rightarrow qter$  festgestellt. Ein Kind starb direkt nach der Geburt, drei Schwangerschaften endeten mit frühen Abortgeschehen und von einer Schwangerschaft wird berichtet, dass sie in 24. SSW beendet wurde (Chen *et al.* 2008 und 2005). Wie man aus der Lage der putativen Bruchpunkte sehen kann, war hier das Ausmaß der Imbalancen so groß, dass sie nicht mit dem Leben vereinbar waren.

## **6.5. Klinische Merkmale bei Trägern einer partiellen Trisomie 22qter und die Gemeinsamkeiten mit P1 und P2**

P1 und P2 tragen die gleiche Form der Imbalance. Beide weisen eine partielle Trisomie für  $22q13.32 \rightarrow qter$  und eine partielle Monosomie für  $10q26.12 \rightarrow qter$  auf.

Über den klinischen Phänotyp der partiellen Trisomie  $22q13.3$  ist sehr wenig bekannt. Bis jetzt findet man in der Literatur nur 9 Fälle, in denen über einer Trisomie  $22q13.3$  berichtet wird (Peeters 2008, Jamsheer 2008). Folgende Abnormalitäten wurden für eine partielle Trisomie  $22q13 \rightarrow qter$  beschrieben: intrauterine Wachstumsretardierung, kleine Statur, Mikrozephalie, kongenitale Herzfehler, Gaumenspalte, Fütterungsschwierigkeiten mit Gedeihstörung, Entwicklungsverzögerung, muskuläre Hypotonie und faziale Dysmorphien.

Während Mentale Retardierung, Entwicklungsverzögerung und Wachstumsretardierung/kleine Statur in allen geschriebenen Patienten, und auch bei P1 und P2 zu sehen sind, kommen andere Merkmale nicht obligatorisch vor. Abgesehen von häufigen Merkmalen wie Mikrozephalie in 4, Herzfehler in 4 und muskuläre Hypotonie in 5 Fällen wurden andere Anomalien wie z. B. Gaumenspalte nur in 2 Fällen beobachtet.

Während die Mikrozephalie sowohl in P1 als auch in P2 vorkommt, findet sich nur bei P2 eine kardiale Anomalie. Muskuläre Hypotonie macht sich in der neonatalen Phase durch eine schlechte Kopfkontrolle, schwaches Weinen und geringe Saugkraft bemerkbar. Bei P1 sei der Mutter schon früh eine schlaffe Muskulatur aufgefallen und auch bei P2 zeigt sich die ausgeprägte Trinkschwäche als wichtiges Problem.

Die fazialen Dysmorphien, die für Trisomie 22q13 beschrieben werden sind die folgenden: rundes Gesicht, prominente Stirn, Hypertelorismus, breite Nasenwurzel, flaches Philtrum, tiefsitzende dysplastische Ohren und Mikro/Retrogenie (Peeters 2008, Jamsheer 2008, Okamoto 2007).

Während Hypertelorismus, breite Nasenwurzel und tiefsitzende dysplastische Ohren fast bei allen beschriebenen Patienten und auch bei unseren Patienten P1 und P2 vorkommen, wurde von Mikro-/Retrogenie, die auch bei P1 und P2 zu sehen ist, nur in 3 Fällen berichtet.

## **6.6. Klinische Merkmale bei Trägern einer partiellen Monosomie 10qter und die Gemeinsamkeiten mit P1 und P2**

P1 und P2 zeigen beide auch eine partielle Monosomie für 10q26.12->qter. Literaturrecherchen zeigen, dass manche submikroskopische subtelomerische Deletionen einen spezifischen Phänotyp verursachen, welcher unmittelbar zu einer Diagnose führen kann. Die klinischen Auffälligkeiten bei Vorliegen von subtelomerischen Deletionen in 1p, 4p, 5p, 9p, 22q sind jeweils fast immer konstant, wobei mentale Retardierung ein obligatorisches Merkmal ist (De Vries *et al.* 2001).

Obwohl bei Patienten mit einer 10qter Deletion eine große phänotypische Variabilität beobachtet wird, gibt es einige charakteristische konstante Merkmale. Deshalb schlagen einige Autoren vor, die 10q-Deletion als ein eigenes Syndrom anzuerkennen (Piccione 2008, Irving 2003). Die typischen Merkmale sind: psychomotorische Verzögerung, Wachstumsretardierung (pre- und postnatal), Mikrozephalie, urogenitale Anomalien (z.B. Kryptorchidismus) und faziale Dysmorphien (dreieckiges Gesicht, Hypertelorismus, Strabismus, prominenter Nasenrücken, dysplastische nach hinten rotierte Ohren, dünne Oberlippe, Mikrognathie, kurzer Hals).

Interessanterweise können auch klinisch unauffällige Menschen (mindesten 1% der Bevölkerung, Ledbetter und Martin 2007) Träger einer subtelomeren Aberration wie 10qter-Deletion sein (Balikova *et al.* 2007, Ravnan *et al.* 2006).

Mögliche Erklärungen für die phänotypische Differenz zwischen klinisch auffälligen im Vergleich zu klinisch unauffälligen Individuen könnten sein:

1. einige wiederkehrende chromosomale Deletionen, wie das Mikrodeletion-22q11.2-Syndrom zeigen eine variable Expressivität (McDonald-McGinn *et al.* 2001).
2. die Präsenz eines nicht maskierten krankheitsverursachenden rezessiven Allels in den betroffenen Patienten könnte bei chromosomaler Imbalance ins Gewicht fallen (Lesnik Oberstein *et al.* 2006).
3. somatischer Mosaicismus mit normalen Zelllinien in nicht betroffenen Personen
4. epigenetische Modifikationen

Der Schweregrad des klinischen Phänotyps bei 10qter Deletionen ist von der Größe des deletierten Bereiches abhängig. Während die Mikrozephalie, kongenitale Herzfehler, anogenitale und urogenitale Anomalien überwiegend bei größeren Deletionen vorkommen, wird Strabismus häufiger bei Patienten mit kleiner Deletionen gefunden (Courtens *et al.* 2006).

Eine kleine 10q26 Deletion ohne zusätzlich vorkommende zweite Imbalance, wurde in mehr als 50 Fällen beschrieben (Piccione *et al.* 2008, Courtens *et al.* 2006). Irving (*et al.* 2003) berichtet über 15 Patienten in 8 Familien mit einer ähnlichen kleinen reinen 10q Deletion mit dem Bruchpunkt 10q26.2 oder 10q26.3. Der Schweregrad der mentalen Retardierung (MR) ist in diesen Patienten sehr variabel und reicht von normal, mild, moderat bis schwer. Da die Ausprägung der mentalen Retardierung mit der gleichen Deletion innerhalb einer Familie variiert, kann diese Variabilität bei Betroffenen nicht allein von der Größe der Deletion abhängig sein.

P1 ist deutlich retardiert, zu P2 kann man zum jetzigen Zeitpunkt in Bezug auf die geistige Entwicklung noch keine Aussage treffen. Hier wäre eine Verlaufbeobachtung interessant.

Eine Monosomie der distalen 10q Region ist häufig mit urogenitalen Anomalien wie vesicoureteralen Reflux (VUR), renale Hypoplasie, Mikropenis, Hypospadias, Kryptorchismus und hypoplastischen *labia majore* assoziiert (Ogata *et al.* 2000, Waggoner *et al.* 1999). Das zeigt, dass in 10q26 vermutlich ein oder mehrere wichtige Gene für die

urogenitale Entwicklung lokalisiert sind und Haploinsuffizienz von diesem Bereich zur urogenitale Abnormalität führt.

Es wurde bis jetzt keine molekulare Forschung bei Patienten mit einer Monosomie 10q durchgeführt, um die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp zu untersuchen und die möglichen beteiligten Gene zu identifizieren. Die Bestimmung dieser Korrelation wird in Patienten wie P1 und P2 natürlich dadurch erschwert, dass außer der partiellen Monosomie 10q noch eine partielle Trisomie 22q13.3 vorliegt.

Die deutlichste Übereinstimmung der Eigenschaften von beschriebenen Fällen mit vorliegender Deletion 10q26 und die Patienten, P1 und P2, bieten Strabismus und Kryptorchismus. In mehr als 60% der beschriebenen Patienten kommt ein Strabismus vor und in mehr als 95% der männlichen Patienten liegt ein Kryptorchismus vor.

Anomalien im Zusammenhang mit solchen segmentalen Aneuploidien sind primär auf zwei Faktoren zurückzuführen. Zum einen kann ein Dosis-Effekt eines spezifischen Gens in der betroffenen Chromosomenregion von Bedeutung sein. In diesem Fall kann eine geänderte Kopienzahl eines solchen dosis-sensitiven entwicklungsrelevanten Gens zu Malformationen führen, die für die entsprechende segmentale Aneuploidie charakteristisch ist (Epstein 1986).

Als weiterer Faktor kommt eine übergeordnete chromosomale Imbalance in verschiedenen segmentalen Aneuploidien in Betracht. Diese allgemeine Imbalance stört die Entwicklungshomeostase und dadurch können gemeinsame nichtspezifische Anomalien durch ganz verschiedene segmentale Aneuploidien entstehen (Gilbert und Opitz 1982).

Obwohl die genitalen Anomalien als nichtspezifische Merkmale in verschiedenen segmentalen Aneuploidien beobachtet werden und möglicherweise durch beide Faktoren (chromosomale Imbalance und Gen-Dosis-Effekt) bedingt werden, zeigen aber die niedrige Prävalenz von genitalen Anomalien in anderen segmentalen Aneuploidien im Vergleich zur 10q Monosomie, dass die genitale Anomalie primär durch Gen-Dosis Effekte verursacht werden (Jones 1997, Wilkie *et al.* 1993).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Strabismus in P1 und Kryptorchismus in P2 eine Folge der partiellen Monosomie 10q26 und nicht der Trisomie 22q13.3 sind, da Strabismus und Kryptorchismus eine hohe Prävalenz in 10q26 Monosomie-Patienten zeigen und kaum in Patienten mit Trisomie 22q13.3 beobachtet werden.

Für die kardiovaskulären Anomalien kann man annehmen, dass sie primär durch eine chromosomale Imbalance zustande kommen, weil sie als gemeinsame nicht spezifische Anomalie in den meisten segmentalen Aneuploidien zu beobachten sind. Hingegen sind die spezielle Aortenisthmusstenose beim Ullrich-Turner Syndrom (Xp-betreffende Monosomie) und der Endokardkissendefekt beim Down Syndrom (Trisomie 21) einem Dosis-Effekt spezifischer Gene zuzuordnen. Diese Auffälligkeiten findet man daher seltener bei anderen segmentale Aneuploidien (Ogata *et al.* 2000).

Kardiale Defekte sind für beide Aberrationen Monosomie 10q26 und Trisomie 22q13.3 beschrieben. Obwohl unsere beiden Patienten P1 und P2 Träger der gleichen chromosomalen Veränderungen sind, hat nur P2 einen ASD und P1 zeigt keinerlei kardiale Anomalien.

Hier kann man postulieren, dass bei P1 trotz chromosomaler Imbalance, eine Homeostase für die kardiale Entwicklung, z. B. durch Kompensation anderer Genomanteile gegeben ist, was für P2 nicht zutrifft.

Es gibt einige Patienten mit einer 10q Deletion, die eine Verhaltensstörung in der Pubertät z. B. in Form eine bipolaren affektiven Störung, Aggression und Hyperaktivität zeigen. Es wurden einige Kandidatengene in 10q26->qter postuliert, die bei bipolaren affektiven Störungen beteiligt sein könnten:

- *CTBP2* (C-terminal binding protein 2) kodiert für 2 unterschiedliche Proteine: ein Protein mit Transkriptionsrezeptor-Funktion und eine Komponente von speziellen Synapsen (Zhao *et al.* 2006).
- *DPYSL4* (Dihydropyrimidinase – like 4) spielt eine Rolle bei der neuronalen Differenzierung (Weitzdoerfer *et al.* 2001).
- *DRDIIP* (Dopamin receptor D1 interacting protein) kodiert für ein Transmembran-Protein, das mit dem Dopaminrezeptor D1 reagiert. Dopamine modulieren durch D1 Rezeptoren die synaptische Transmission in neuronalen Kreisen, welche am Lernen und Gedächtnis beteiligt sind (Laurin *et al.* 2005).

Bei P1 ist bereits jetzt im Kleinkinderalter eine Verhaltensstörung aufgefallen. Auch für diese Verhaltensstörung wäre eine langfristige Verlaufsbeobachtung und Untersuchung der Patienten sinnvoll.

Als ein zusammenfassender Überblick sind in Tabelle 6.1 die am häufigsten beobachteten klinischen Merkmale bei Trägern einer partiellen Trisomie 22q13.3->qter sowie einer

partiellen Monosomie 10q26.13->qter aufgelistet. Um zu verdeutlichen, welche klinischen Merkmale auch in Patienten P1 und P2 vorkommen wurden verschiedenfarbige Symbole gewählt.

Anhand dieser Übersicht wird deutlich, dass sehr wahrscheinlich der bei P1 vorliegende Strabismus und der bei P2 diagnostizierte Kryptorchismus auf die partielle Monosomie 10q26 zurückzuführen sind. Zwar werden mentale Retardierung, Entwicklungsverzögerung sowie Wachstumsretardierung im Zusammenhang mit beiden Aberrationen beschrieben, jedoch hat es den Anschein, dass die zur Trisomie-22q13 passenden Merkmale wie Mikrozephalie, kleine Statur und Hypotonie bei P1 bzw. P2 dominieren. Nierenfehlbildungen, wie sie bei Patienten mit einer 10q26-Deletion beschrieben wurden, liegen bei unseren Patienten nicht vor.

<b>22q13-&gt;qter Trisomie</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>10q26-&gt;qter Monosomie</b>
<b>Entwicklungsstörung</b>			
Psychomotorische Retardierung	+	+	Psychomotorische Verzögerung
Mentale Retardierung	+	+	Mentale Retardierung
Wachstumsretardierung	+	+	Wachstumsretardierung
<b>Kleine Statur (Kleinwuchs)</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	
<b>Mikrozephalie (100 %)</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	Mikrozephalie (40-50%)
<b>Hypotonie</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	
<b>Thorakale, Viszerale und Genitale Anomalien</b>			
Kongenitale Herzfehler	+	+	Kongenitale Herzfehler
		+	<b>Kryptorchismus (80-100%)</b>
			Urenale Anomalien
<b>Faziale Dysmorphien</b>			
	+		<b>Strabismus (80-100%)</b>
Hypertelorismus	+	+	Hypertelorismus (80%)
<b>Lidspalt Achsenneigung nach unten</b>			
Breiter oder flacher Nasenwurzel	+	+	Breiter oder flacher Nasenwurzel
			<b>Spitz oder prominente Nase</b>
Tief ansetzend / Dysplastische Ohren	+	+	Tief ansetzend / Dysplastische Ohren
<b>Retro-/mikrognathie</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	
<b>Lippen- /Gaumenspalte</b>			
<b>Prominente Oberlippe</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Schmale Oberlippe</b>
<b>Andere Abweichungen</b>			
	Spastische Parese		
		Vierfinger- furche	
		Klumpfuß	

**Tab.6.1. Die klinischen Auffälligkeiten von P1 und P2 und deren Gemeinsamkeiten mit den häufigsten klinischen Merkmalen einer partiellen Trisomie 22q13 sowie einer partiellen Monosomie 10q26.**

Klinische Merkmale bei partieller Monosomie 10q26->qter sind in blau, die von partiellen Trisomie 22q13->qter in rot und die gemeinsame Merkmale in schwarz aufgelistet. Wenn ein bei P1/P2 beobachtetes klinisches Merkmal sowohl im Zusammenhang mit der partiellen Trisomie als auch mit der partiellen Monosomie beschrieben wurde, wurde dieses mit einem schwarzen Kreuz (+) gezeichnet. Ein blaues Kreuz markiert die dominierenden Eigenschaften passend zu einer 10q26-Monosomie und das rote Kreuz diejenigen passend zu einer 22q13-Trisomie. Die Auffälligkeiten, die spezifisch nur bei P1 bzw. P2 gefunden wurden, jedoch nicht im Zusammenhang mit den entsprechenden Imbalancen beschrieben wurden, sind grün markiert.



## 6.7. Klinische Merkmale bei Trägern einer partiellen Monosomie 22 und die Gemeinsamkeiten mit P3

Bei der dritten Patientin P3 liegt nun komplementär zu ihren Geschwistern eine partielle Monosomie 22q13.3->qter und eine partielle Trisomie 10q26.12->qter vor.

Die Analyse der gesammelten Daten von subtelomerischen Untersuchung zeigten, dass die Deletion 22q13 nach der Deletion 1p36 die zweithäufigste terminale Deletion darstellt, die zu einer klinisch signifikanten chromosomalen Störung führt (Ravnan *et al.* 2006, Heilstedt *et al.* 2003).

Aus diesem Grund wird dieses Mikrodeletion-Syndrom als 22q13.3-Syndrom oder Phelan-McDermid-Syndrom bezeichnet. Während nur minimale Dysmorphie-Zeichen beobachtet werden, zeigen sich die klinischen Charakteristika wie schwere neonatale Hypotonie (>97%), globale Entwicklungsverzögerung (>98%), normal bis beschleunigtes Wachstum (>95%), Sprachverlust oder schwere Sprachverzögerung (>98%) als wichtige diagnostische Merkmale (Phelan 2008). Die gemeinsamen äußeren Auffälligkeiten sind: lange Wimpern, große oder auffällige Ohren, relativ lange Hände, dysplastische Zehennägel, volle Augenbrauen, Dolichocephalie, volle Backen, knollige Nase und spitzes Kinn.

Terminale 22q-Deletionen wurden bisher in keinem Fall bei klinisch unauffälligen Kontrollpersonen beobachtet (Cusmano *et al.* 2007).

Bei der Geburt und in der Neugeborenen-Phase sind die Merkmale des Syndroms eher unauffällig. Hypotonie, Fütterungsprobleme und globale Entwicklungsverzögerung sind die ersten Symptome. Die neonatale Hypotonie könnte zunächst einziger Indikator sein. Bei P3 wurde auch in der neonatalen Phase eine Trinkschwäche als Zeichen einer Hypotonie beobachtet.

Die Entwicklungsverzögerung, die moderat bis schwer sein kann, betrifft vor allem die sogenannten großen Meilensteine der Entwicklung. Zum Beispiel liegt das durchschnittliche Alter für eigenständiges Drehen erst bei 8 Monaten (im Vergleich zu 4-5 Monaten bei normaler Entwicklung) für das Krabbeln bei 16 Monaten und für das freie Laufen bei 3 Jahren (im Vergleich zu 12 Monaten). Hypotonie ist ein wichtiger Faktor für die Verzögerung beim Erreichen dieser Meilensteine (Cusmano *et al.* 2007).

P3 zeigt zwar eine vergleichsweise milde Verzögerung der Meilensteine (Sitzen und Krabbeln mit 8 Monaten, Laufen mit 17 Monaten), aber man kann deutlich die charakteristischen Merkmale des Phelan-Syndroms, wie starke Sprachverzögerung nahe am

Sprachverlust, Entwicklungsverzögerung in Begleitung eines normalen Wachstums erkennen.

Bei den meisten Patienten mit einem Phelan-Syndrom findet man die diagnostischen Kriterien für Autismus und Verhaltensauffälligkeiten wie mangelnder Augenkontakt, stereotypes Verhalten, Selbst-Stimulation, inadäquates Kauverhalten, Bruxismus, Beißen, Schlagen und abnormale Schlafmuster sowie gesteigerte Toleranz für Schmerzen.

Assoziation von chromosomalen Aberrationen mit Autismus wird in 3-6% der Fälle beschrieben. Die Deletion von 22q13 ist eine von diesen. (Phelan 2008, Heilstedt *et al.* 2003).

In Hinsicht auf autistisches Verhalten könnte keine Aussage zu P3 getroffen werden, da keine speziellen Untersuchungen in dieser Richtung erfolgten und die Eltern diese auch nicht wünschten.

Der Verlust von Genen in 22q13.33 kann z.B. durch Deletion, Translokation oder auch Bildung eines Ring-Chromosoms zustande kommen. Eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit der für die 22q13.3-Deletion typischen sprachlichen Defizienz nimmt das Gen *SHANK3* ein. *SHANK3* kodiert für ein strukturelles Protein in der postsynaptische Dichte. Zu den Funktionen gehören die Verbindung von Ionen-Kanälen und Rezeptoren in der postsynaptischen Membran an das Zytoskelett und die Signaltransduktionswege. Die Unterbrechung des *SHANK3*-Gens durch ein balanciertes Rearrangement und Mutationen, die zu Leserasterverschiebungen führen, wurden als Ursache beschrieben, die zu Sprachdefiziten und autistischen Merkmalen beim Phelan-Syndrom führt (Manning *et al.* 2004).

Die Größe der deletierten Region variiert beim Phelan-Syndrom von 100 kb bis 9 Mb und beinhaltet immer den Verlust von *SHANK3*. Wilson untersuchte die Rolle von *SHANK3* beim 22q13 Deletionssyndrom in 56 Patienten. Alle Patienten zeigen eine mentale Retardierung (mit unterschiedlichem Schweregrad) und einen Sprachverlust oder schwere Sprachverzögerung. Der Vergleich zwischen den klinischen Merkmalen und der Deletiongröße zeigte keine signifikante Korrelation, was die Schlussfolgerung nahe legte, dass Haploinsuffizienz des *SHANK3* Gens der Grund für die neurologischen Auffälligkeiten beim 22q13-Deletionssyndrom ist (Wilson *et al.* 2003).

Es scheint so, dass nicht nur die Haploinsuffizienz des *SHANK3* Gens für die neurologischen Defizite beim Phelan-Syndrom verantwortlich ist, sondern dass auch die Überexpression des *SHANK3*-Gens in der partiellen Trisomie 22q13 für die neurologischen Merkmale dieser Mikroduplikation zuständig ist (Jamsheer *et al.* 2008, Okamoto *et al.*

2007). Somit kann man sagen dass die korrekte Dosis des *SHANK3*-Gens für die neurologische Entwicklung ein wichtiger Faktor ist und wahrscheinlich auch bei den Patienten P1 und P2 eine übergeordnete Rolle spielt.

## **6.8. Klinische Merkmale bei Trägern einer partiellen Trisomie 10q26 und die Gemeinsamkeiten mit P3**

P3 trägt außer einer Monosomie 22q13 gleichzeitig eine partielle Trisomie 10q26.

Während kaum über eine partielle Trisomie 10q26 berichtet wurde und weniger als 20 Patienten mit einer partiellen Trisomie 10q25 beschrieben sind, gibt es viele Berichte über die größere partielle Trisomie 10q24->qter, die häufig unbalanciertes Resultat einer elterlichen reziproken Translokation ist.

Abgesehen von einigen Ausnahmen ist die Duplikation von 10q mit einer partiellen Monosomie anderer Chromosomen-Segmente assoziiert. Obwohl viele verschiedene Chromosomen als Translokationspartner beteiligt sind, erscheint der Phänotyp bei einer Trisomie 10q24->qter relativ einheitlich. Zu den typischen Merkmalen zählen pre- und postnatale Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, schwere mentale Retardierung, renale -, kardiale - und okkuläre Anomalien, Extremitäten-Abnormalität, Blepharophimose, Ptosis, absteigende Lidspalte, flaches Gesicht mit langer Stirn, bogenförmige Augenbrauen und Mund, tiefansetzende malformierte Ohren, Mikrognathie und Hypertelorismus.

Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die gleichzeitig zur partiellen Trisomie 10q vorhandenen partiellen Monosomien normalerweise keinen großen Einfluss auf die klinischen Merkmale haben. Ausgenommen hiervon sind Translokationen unter Beteiligung eines akrozentrischen Chromosoms, wenn der Bruchpunkt hier im Centromer liegt (Bartholdi *et al.* 2008, Schinzel 2001).

Bei P3 dominieren dagegen deutlich die für die 22q13-Deletion typischen Eigenschaften, wobei berücksichtigt werden muss, dass die hier vorliegende 10qter-Trisomie wesentlich kleiner ist als in den meisten beschriebenen Fällen. Außerdem wurde die Region 10q24-10q26, die nicht bei P3 betroffen ist, als wichtigste Region in Verbindung mit den klinischen Merkmalen der distalen 10q-Trisomie eingeschätzt (Aglan *et al.* 2008).

In Tabelle 6.2 werden die klinischen Auffälligkeiten von P3 mit den Patienten mit einer partiellen Monosomie 22q13 und einer partiellen Trisomie 10q26 verglichen. Bei P3

können die Sprachentwicklungsstörung, und faziale Auffälligkeiten überwiegend dem Einfluss der 22q13->qter-Monosomie zugeordnet werden. Da für die 10qter-Trisomie nur Vergleichsfälle mit einer deutliche größeren Imbalance (10q24->qter) zur Verfügung stehen, ist die Beurteilung des Einflusses der 10q26->qter-Trisomie eher schwierig. Allerdings kann man für P3 postulieren, dass Ptosis und VSD offensichtlich durch die 10q26-Trisomie bedingt sind.

<b>22q13-&gt;qter Monosomie</b>	<b>P3</b>	<b>10q24-&gt;qter Trisomie</b>
<b>Entwicklungsstörung</b>		
Entwicklungsverzögerung	+	Psychomotorische Verzögerung
Mentale Retardierung	+	Mentale Retardierung
<b>Normal bis beschleunigte Wachstum</b>	<b>+</b>	<b>Wachstumsretardierung</b>
		<b>Mikrozephalie</b>
<b>Hypotonie</b>	<b>+</b>	Hypotonie
<b>Sprachverlust oder starke Sprechverzögerung</b>	<b>+</b>	
<b>Thorakale, Viszerale und Genitale Anomalien</b>		
	<b>+</b>	<b>Kongenitale Herzfehler</b>
		<b>Renale Anomalien</b>
<b>Faziale Dysmorphien</b>		
		<b>Okuläre Anomalien</b>
	<b>+</b>	<b>Ptosis</b>
	<b>+</b>	<b>Flache/bereite Gesicht, Lange Stirn</b>
<b>Volle Augenbraue</b>	<b>+</b>	<b>Bogenförmige Augenbraue</b>
Lidspalt Achsenneigung nach unten	+	Lidspalt Achsenneigung nach unten
<b>Lange Wimpern</b>	<b>+</b>	
<b>Volle Backen</b>	<b>+</b>	
<b>Knollige Nase</b>	<b>+</b>	
Tief ansetzend / Dysplastische Ohren	+	Tief ansetzend / Dysplastische Ohren
	<b>+</b>	<b>Bogenförmiger Mund</b>
		<b>Mikrognathie</b>
<b>Andere Abweichungen</b>		
<b>Extremitäten Anomalien</b>	<b>+</b>	
<b>Verhaltenstörung</b>	<b>?</b>	

**Tab.6.2. Die klinischen Auffälligkeiten von P3 und deren Gemeinsamkeiten mit den häufigsten klinischen Merkmalen einer partiellen Trisomie 10q24 sowie einer partiellen Monosomie 22q13.**

Klinische Merkmale bei partieller Trisomie 10q26->qter sind in blau, die von partiellen Monosomie 22q13->qter in rot und die gemeinsame Merkmale in schwarz aufgelistet. Wenn ein bei P3 beobachtetes klinisches Merkmal sowohl im Zusammenhang mit der partiellen Trisomie als auch mit der partiellen Monosomie beschrieben wurde, wurde dieses mit einem schwarzen Kreuz (+) gezeichnet. Ein blaues Kreuz markiert die dominierenden Eigenschaften passend zu einer 10q26-Trisomie und die rote Kreuz diejenigen passend zu einer 22q13-Monomie.

Zusammengefasst werden in dieser Arbeit das erste Mal zwei Formen einer unbalancierten Translokation zwischen Chromosom 10 und 22 in drei klinisch gut charakterisierten Patienten vorgestellt. Die genaue Kartierung der Bruchpunkte ermöglicht es uns gleichzeitig die Duplikation und die Deletion einer bestimmten Region auf Chromosom 10 und 22 und die offensichtlich dadurch verursachten klinischen Merkmalen mit entsprechenden publizierten Fällen zu vergleichen. Wenn bei vergleichbaren Fällen ebenfalls detaillierte Bruchpunkt-Bestimmungen durchgeführt werden, die eine genaue physikalische Bestimmung des Ausmaßes der Imbalancen ermöglichen, könnte dies helfen, spezifische klinisch relevante Loci zu identifizieren.

Methodisch hat sich bei der Suche nach sehr kleinen Aberrationen, die je nach Größe in der konventionellen Chromosomenanalyse nicht sichtbar sind oder zumindest leicht übersehen werden können, zunehmend die sogenannte molekulare Karyotypisierung (z.B. Array-CGH-Analyse) etabliert. In der Regel wird diese noch sehr kostenintensive Untersuchung in der klinischen Diagnostik derzeit vor allem bei der Analyse von Patienten mit geistiger Behinderung und multiplen Anomalien unbekannter Ursache durchgeführt. Vor einer solchen Untersuchung sollte eine konventionell-zytogenetisch sichtbare Aberration oder eine kryptische subtelomerische Aberration ausgeschlossen werden. Auf diese Weise können in rund 10% solcher Fälle mittels molekularer Karyotypisierung chromosomale Mikroaberrationen nachgewiesen werden. Hierbei können diese Aberrationen dann auch physikalisch sehr genau eingegrenzt werden, so dass zunehmend neue Mikrodeletions- und -Duplikationssyndrome charakterisiert werden können (Hoyer *et al.* 2007).

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Kinder mit einer partiellen Monosomie oder Trisomie der Chromosomen 10 oder 22 haben zwar je nach Größe und Lage der betroffenen Chromosomenabschnitte eine Überlebenschance, weisen aber meist schwerwiegende körperliche und geistige Behinderungen auf. In dieser Arbeit wurden die zwei Formen einer unbalancierten Translokation zwischen den Chromosomen 10 und 22 in drei klinisch gut charakterisierten Geschwistern vorgestellt. Hervorgegangen sind diese chromosomalen Imbalancen aus einer mütterlichen Translokation zwischen je einem Chromosom 10 und 22 [Karyotyp: 46,XX,t(10,22)(q26.1;q13.3)]. Bei der 5-Jahre alten P1 und dem 11-Monate alten Bruder P2 wurde eine partielle Monosomie 10qter und eine partielle Trisomie 22qter festgestellt. Bei dem dritten Geschwisterkind, einem 4-jährigen Mädchen, wurde eine partielle Trisomie von Chromosom 10qter und eine partielle Monosomie von 22qter nachgewiesen. Durch serienhafte FISH-Analysen von überlappenden BAC- und Fosmid-Klonen wurde der Bruchpunkt auf Chromosom 10 in Bande 10q26.13 (Position ~126,6 Mb) eingegrenzt. Somit ist die bei den Geschwistern gefundene Imbalance auf Chromosom 10 ca. 8,8 Mb groß. Der Bruchpunkt auf Chromosom 22 lokalisiert in Bande 22q13.32, in Position ~47,5 Mb. Damit beträgt die angenommene Größe der translozierten bzw. der bei den Kindern unbalanciert vorliegenden Region in 22qter ca. 2,2 Mb. Anhand der Literaturrecherche zur Untersuchung der Korrelation zwischen Phänotyp und den translozierten Regionen sind der bei P1 vorliegende Strabismus und der bei P2 diagnostizierte Kryptorchismus sehr wahrscheinlich auf die partielle Monosomie 10q26 zurückzuführen. Zwar werden mentale Retardierung, Entwicklungsverzögerung sowie Wachstumsretardierung im Zusammenhang mit verschiedenen Aberrationen beschrieben, jedoch hat es den Anschein, dass die zur Trisomie 22q13 passenden Merkmale wie Mikrozephalie, kleine Statur und Hypotonie bei Patienten P1 und P2 dominieren. Bei P3 können die Sprachentwicklungsstörung und faziale Auffälligkeiten überwiegend dem Einfluss der 22q13->qter-Monosomie zugeordnet werden. Da für die 10qter-Trisomie nur Vergleichsfälle mit einer deutlich größeren Imbalance (10q24->qter) zur Verfügung stehen, ist die Beurteilung des Einflusses der 10q26->qter-Trisomie eher schwierig. Allerdings kann man für P3 postulieren, dass Ptosis und VSD durch die 10q26-Trisomie bedingt sind. Die Publikation weiterer vergleichbarer Fälle mit ebenfalls detaillierten Bruchpunkt-Bestimmungen könnte dazu beitragen, spezifische klinisch relevante Loci zu identifizieren und zu einem besseren Verständnis von Phänotyp-Genotyp-Korrelationen führen.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

**Aglan MS, Kamel AK, Helmy NA (2008).** Partial trisomy of the distal part of 10q: a report of two Egyptian cases. *Genet Couns.* 19(2):199-20.

**Ambrosini A, Paul S, Hu S, Riethman H (2007).** Human subtelomeric duplicon structure and organization. *Genome Biol.* 8(7):R151.

**Aviv A, Levy D, Mangel M (2003).** Growth, telomere dynamics and successful and unsuccessful human aging. *Mech Ageing Dev,* 124:829-837.

**Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D (2003).** Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet.* 33:203-207.

**Balci S, Aypar E, Son YA, Beksaç MS (2004).** Balanced de novo translocation t(6;7)(p25;q31) and cleft palate as an isolated finding. *Genet Couns.* 15(3):317-20.

**Balikova I, Menten B, de Ravel T, Le Caignec C, Thienpont B, Urbina M, Doco-Fenzy M, de Rademaeker M, Mortier G, Kooy F, van den Ende J, Devriendt K, Fryns JP, Speleman F, Vermeesch JR (2007).** Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals. *Hum Mutat.* 28(10):958-67.

**Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG (2007).** The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet A.* 15:143A(16):1850-7.

**Bartholdi D, Toelle SP, Steiner B, Boltshauser E, Schinzel A, Riegel M (2008).** Blepharophimosis and mental retardation (BMR) phenotypes caused by chromosomal rearrangements: description in a boy with partial trisomy 10q and monosomy 4q and review of the literature. *Eur J Med Genet.* 51(2):113-23.

**Boehm D, Herold S, Kuechler A, Liehr T, Laccione F (2004).** Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. *Hum Mutat.* 23: 368-78.

**Britt-Compton B, Rowson J, Locke M, Mackenzie I, Kipling D, Baird DM (2006).** Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis-acting determinants in humans. *Hum Mol Genet.* 15:725-733.

**Chen CP, Chang TY, Tzen CY, Wang W, Lee CC (2005).** Recurrent fetal pyelectasis in a family with fetuses associated with partial trisomy 10q (10q24.1->qter). *Prenat Diagn.* 25(3):263-4.

**Chen CP, Chen YJ, Tsai FJ, Chern SR, Wang W (2008).** NFkappaB2 gene duplication is associated with fetal pyelectasis in partial trisomy 10q (10q24.1 -> qter). *Prenat Diagn.* 28(4):364-5.

**Cohen O, Cans C, Mermet MA, Demongeot J, Jalbert P (1994).** Viability thresholds for partial trisomies and monosomies. A study of 1159 viable unbalanced reciprocal translocations. *Hum Genet.* 93(2):188-94.

- Colleaux L, Rio M, Heuertz S, Moindrault S, Turleau C, Ozilou C, Gosset P, Raoult O, Lyonnet S, Cormier-Daire V, Amiel J, Le Merrer M, Picq M, de Blois MC, Prieur M, Romana S, Cornelis F, Vekemans M, Munnich A (2001).** A novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Eur J Hum Genet.* 9: 319-27.
- Courtens W, Wuyts W, Rooms L, Pera SB, Wauters J (2006).** A subterminal deletion of the long arm of chromosome 10: a clinical report and review. *Am J Med Genet A.* 15;140(4):402-9.
- Cusmano OK, Manning MA, Hoyme HE (2007).** 22q13.3 deletion syndrome: a recognizable malformation syndrome associated with marked speech and language delay. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 145C(4):393-8.
- Daoud H, Gruchy N, Constans JM, Moussaoui E, Saumureau S, Bayou N, Amy M, Védrine S, Vu PY, Rötig A, Laumonnier F, Vourc'h P, Andres CR, Leporrier N, Briault S (2009).** Haploinsufficiency of the GPD2 gene in a patient with nonsyndromic mental retardation. *Hum Genet.* 124(6):649-58.
- De Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM (2001).** Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet.* 38(3):145-50.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM (2004).** Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:17312-17315.
- Epstein CJ (1986).** The consequences of chromosome imbalance: Principles, Mechanisms, and Models. Cambridge, *Cambridge University Press.*
- Evans PC, Taylor ER, Coadwell J, Heyninck K, Beyaert R, Kilshaw PJ (2001).** Isolation and characterization of two novel A20-like proteins. *Biochem J.* 1;357(Pt 3):617-23.
- Flint J, Wilkie AO (1996).** The genetics of mental retardation. *Br Med Bull.* 52: 453-64.
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE (1995).** The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet.* 9(2):132-40.
- Gardner RJM, Sutherland GR (2004).** Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. *Oxford University Press.* Third edition.
- Gilbert EF, Opitz JM (1982).** Developmental and other pathologic changes in syndromes caused by chromosome abnormalities. *Perspect Pediatr Pathol.* 7:1-63.
- Graumann W und Baur R (2004).** Compact Lehrbuch Anatomie, Schattauer GmbH.
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG (2003).** Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet.* 64(4):310-6.



- Hoyer J, Dreweke A, Becker C, Göhring I, Thiel CT, Peippo MM, Rauch R, Hofbeck M, Trautmann U, Zweier C, Zenker M, Hüffmeier U, Kraus C, Ekici AB, Rüschemdorf F, Nürnberg P, Reis A, Rauch A (2007).** Molecular karyotyping in patients with mental retardation using 100 K SNP arrays. *J Med Genet.* 44:629-36.
- Hussain SZ, Evans AL, Ahmed OA, Jones D, McDermot KD, Svennevik EC, Hastings RJ (2000).** Non-syndromic mental retardation segregating with an apparently balanced t(1;17) reciprocal translocation through three generations. *Am J Med Genet.* 13;95(2):99-104.
- Iafate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004).** Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 36:949-951.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004).** Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 431(7011):931-45.
- Irving M, Hanson H, Turnpenny P, Brewer C, Ogilvie CM, Davies A, Berg J (2003).** Deletion of the distal long arm of chromosome 10; is there a characteristic phenotype? A report of 15 de novo and familial cases. *Am J Med Genet A.* 1;123A(2):153-63.
- Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H (1992).** Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet.* 29(2):103-8.
- Jamsheer A, Smyk M, Wierzba J, Kołowska J, Woźniak A, Skołozdrzy J, Fischer M, Latos-Bieleńska A (2008).** Subtle familial translocation t(11;22)(q24.2;q13.33) resulting in Jacobsen syndrome and distal trisomy 22q13.3: further details of genotype-phenotype maps. *J Appl Genet.* 49(4):397-405.
- Jones KL (1997).** Smith's Recognizable Patterns of Human Malformations. *Philadelphia, W. B. Saunders.*
- Knight SJL, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DLN, Flint J, Kearney L (1997).** Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet.* 5:1-8.
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, Sistermans EA (2004).** Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet.* 41: 892-9.
- Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R, de Leeuw N, Knight SJ, Regan R, Kooy RF, Reyniers E, Romano C, Fichera M, Schinzel A, Baumer A, Anderlid BM, Schoumans J, Knoers NV, van Kessel AG, Sistermans EA, Veltman JA, Brunner HG, de Vries BB (2006).** A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet.* 38(9):999-1001.
- Laurin N, Misener VL, Crosbie J, Ickowicz A, Pathare T, Roberts W, Malone M, Tannock R, Schachar R, Kennedy JL, Barr CL (2005).** Association of the calcyon gene (DRD1IP) with attention deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry.* 10(12):1117-25.

- Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM (2005).** Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet.* 42: 121-8.
- Ledbetter DH, Martin CL (2007).** Cryptic telomere imbalance: a 15-year update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* Nov 15;145C(4):327-34.
- Lesnik Oberstein SA, Kriek M, White SJ, Kalf ME, Szuhai K, den Dunnen JT, Breuning MH, Hennekam RC (2006).** Peters Plus syndrome is caused by mutations in B3GALTL, a putative glycosyltransferase. *Am J Hum Genet.* 79(3):562-6.
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC (1988).** Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet.* 80(3):224-34.
- Liehr T, Heller A, Starke H, Claussen U (2002).** FISH banding methods: applications in research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2:217-25.
- Liehr T, Claussen U (2002).** Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr. Mol. Med.* 2:217-225.
- Liehr T, Claussen U (2002).** Multicolor-FISH approaches for the characterization of human chromosomes in clinical genetics and tumor cytogenetics. *Curr Genomics.* 3: 213-235.
- Linardopoulou EV, Williams E M, Fan Y, Cynthia Friedman C, Young J M and Trask BJ (2005).** Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature.* 1; 437(7055): 94–100.
- Manning MA, Cassidy SB, Clericuzio C, Cherry AM, Schwartz S, Hudgins L, Enns GM, Hoyne HE (2004).** Terminal 22q deletion syndrome: a newly recognized cause of speech and language disability in the autism spectrum. *Pediatrics.* 114(2):451-7.
- McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH (2001).** Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet Med.* 3(1):23-9.
- Mefford HC, Trask BJ (2002).** The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet.* 3:91-102.
- Midro AT, Stengel-Rutkowski S, Stene J (1992).** Experiences with risk estimates for carriers of chromosomal reciprocal translocations. *Clin. Genet.* 41(3):113-22.
- Murphy WJ, Larkin DM, Everts-van der Wind A, Bourque G, Tesler G, Auvil L, Beever JE, Chowdhary BP, Galibert F, Gatzke L, et al. (2005).** Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science.* 309:613-617.
- Ogata T, Muroya K, Sasagawa I, Kosho T, Wakui K, Sakazume S, Ito K, Matsuo N, Ohashi H, Nagai T (2000).** Genetic evidence for a novel gene(s) involved in urogenital development on 10q26. *Kidney Int.* 58(6):2281-90.

- Okamoto N, Kubota T, Nakamura Y, Murakami R, Nishikubo T, Tanaka I, Takahashi Y, Hayashi S, Imoto I, Inazawa J, Hosokai N, Kohsaka S, Uchino S (2007).** 22q13 Microduplication in two patients with common clinical manifestations: a recognizable syndrome? *Am J Med Genet A.* 1;143A(23):2804-9.
- Peeters H, Vermeesch J, Fryns JP (2008).** A cryptic duplication 22q13.31 to qter leads to a distinct phenotype with mental retardation, microcephaly and mild facial dysmorphism. *Genet Couns.* 19(4):365-71.
- Phelan MC (2008).** Deletion 22q13.3 syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 27;3:14.
- Piccione M, Antona V, Piro E, Cavani S, Malacarne M, Pierluigi M, Corsello G (2008).** 10qter deletion: a new case. *Am J Med Genet A.* 15;146A(18):2435-8
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL (2006).** Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet.* Jun;43(6):478-89.
- Riethman H, Ambrosini A, Castaneda C, Finklestein J, Hu XL, Mudunuri U, Paul S, Wei J (2004).** Mapping and initial analysis of human subtelomeric sequence assemblies. *Genome Res.* 14:18-28.
- Riethman H (2008).** Human subtelomeric copy number variations. *Cytogenet Genome Res.* 123(1-4): 244–252.
- Rio M, Molinari F, Heuertz S, Ozilou C, Gosset P, Raoul O, Cormier-Daire V, Amiel J, Lyonnet S, Le Merrer M, Turleau C, de Blois MC, Prieur M, Romana S, Vekemans M, Munnich A, Colleaux L (2002).** Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet.* 39: 266-70.
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF (2005).** Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat.* 25: 513-24.
- Rooney DE and Czepulkowski BH (1992).** Human Cytogenetics: A Practical Approach, Volume 1: Constitutional Analysis (second edition). *IRL Press at Oxford University Press.*
- Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G (1992).** The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;89(11):4913-7.
- Schinzel A (2001).** Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. 2nd Edition, *Walter de Gruyter*, New York.
- Schröck E, Frensel A, Gerlach E, Stadler A, Hackmann K, Tinschert S und Werner W (2008).** Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der humangenetischen Diagnostik. *Medgen.* 20:361-366.
- Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie CM (1998).** Chromosome translocations: segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn.* 18(13):1437-49.

- Sismani C, Armour JA, Flint J, Girgalli C, Regan R, Patsalis PC (2002).** Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur J Hum Genet.* 9: 527-32.
- Stankiewicz P, Lupski JR (2002).** Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* 18:74-82.
- Tamura T (2002).** A guide to molecular cell genetics. 22. Chromosome. 14. Forming frequency of chromosomal aberration. *Modern Medical Laboratory.* 30 (11):1226-7.
- Tegay DH, Chan KK, Leung L, Wang C, Burkett S, Stone G, Stanyon R, Toriello HV, Hatchwell E (2009).** Toriello-Carey syndrome in a patient with a de novo balanced translocation [46,XY,t(2;14)(q33;q22)] interrupting SATB2. *Clin Genet.* 75(3):259-64.
- Van Dyke DL, Weiss L, Roberson JR, Babu VR (1983).** The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age. *Am J Hum Genet.* 35(2):301-8.
- Van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, Hennekam RC, Hoovers JM (2002).** Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet.* 39: 546-53.
- Waggoner DJ, Chow CK, Downton SB, Watson MS (1999).** Partial monosomy of distal 10q: three new cases and a review. *Am J Med Genet.* 86(1):1-5.
- Weitzdoerfer R, Fountoulakis M, Lubec G (2001).** Aberrant expression of dihydropyrimidinase related proteins-2,-3 and -4 in fetal Down syndrome brain. *J Neural Transm Suppl.* (61):95-107.
- White SJ, Breuning MH, den Dunnen JT (2004).** Detecting copy number changes in genomic DNA: MAPH and MLPA. *Methods Cell Biol.* 75: 751-68.
- Wilkie AO, Campbell FM, Daubeney P, Grant DB, Daniels RJ, Mullarkey M, Affara NA, Fitchett M, Huson SM (1993).** Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases and literature review. *Am J Med Genet.* 46(5):597-600.
- Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, Phelan MC, Hu S, Marshall J, McDermid HE (2003).** Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J Med Genet.* 40(8):575-84.
- Wyandt HE, Tonk VS (2004).** Atlas of Human Chromosome Heteromorphisms. *Kluwer Academic Publishers.* Dordrecht, Boston, London.
- Yao-Shan Fan (2002).** Molecular Cytogenetics Protocols and Applications. *Humana Press,* Totowa, New Jersey.
- Zech L (1979).** Chromosome banding methods. *Acta Histochem Suppl.* 2:121-125.

**Zhao LJ, Subramanian T, Zhou Y, Chinnadurai G (2006).** Acetylation by p300 regulates nuclear localization and function of the transcriptional corepressor CtBP2. *J Biol Chem.* 281(7):4183-9.

## DANKSAGUNG

Vor allem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Andreas Gal danken für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die kontinuierliche Betreuung dieser Arbeit und die verständnisvolle Unterstützung während des gesamten Zeitraums.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Sigrid Fuchs für Ihre sympathische und verlässliche Art mit der sie meine Doktorarbeit betreut hat. Danke für die konstruktive Kritik und die Ideen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Der größte Dank aber für alle die Anregungen und Gespräche, die über die sachlichen Themen hinausgingen.

Frau Dr. Monika Rehbein möchte ich bedanken für die freundliche Unterstützung.

Frau Karin Ziegler und Frau Anette Stryczek danke ich für die Chromosomenpräparate, Tipps und Tricks sowie für die nette und freundliche Atmosphäre im cytogenetischen Labor.

Allen Mitgliedern des Institutes für Humangenetik danke ich für ihre ständige freundliche Offenheit und die große Hilfsbereitschaft.

Mein ganz großer Dank gilt natürlich meiner Familie, aus der Nähe und Ferne, für die vielen liebevollen und vielseitigen Unterstützungen.

## **LEBENS LAUF**

## **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.

Ferne 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.

Hamburg, den 17.01.2011