

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin
Institut für Humangenetik

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

Molekularzytogenetische Analyse von sechs chromosomalen Rearrangements bei Patienten mit Intelligenzminderung und weiteren klinischen Auffälligkeiten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Angela Fritsch
aus Göttingen

Hamburg 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.02.2013**

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

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Kerstin Kutsche

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. René Santer

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. Axel Neu

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	VII
II	Abbildungsverzeichnis.....	IX
III	Tabellenverzeichnis.....	XII
1	Ziel der Arbeit	1
2	Einleitung	2
2.1	Intelligenzminderung	2
2.2	Epilepsie.....	4
2.3	Arten von Mutationen	5
2.3.1	Genommutationen.....	5
2.3.2	Genmutationen.....	6
2.3.3	Chromosomenmutationen: Deletion, Duplikation, Inversion und Translokation	6
2.4	Identifizierung neuer Krankheitsgene mithilfe chromosomaler Rearrangements	10
2.5	Allgemeine Vorgehensweise bei der Identifizierung von Krankheitsgenen mit Hilfe molekularzytogenetischer Charakterisierung von Translokationen.....	10
2.5.1	Konventionelle Chromosomenanalyse.....	12
2.5.2	Array-basierte komparative Genomhybridisierung (Array-CGH) zur Analyse submikroskopischer Chromosomenaberrationen.....	12
2.5.3	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) zur Analyse von Chromosomenanomalien	14
2.5.4	Suche nach Kandidatengenen mittels Datenbankrecherche	15
2.5.5	Positionseffekte	16
2.5.6	Bestätigung des Kandidatenkrankheitsgens mittels Mutationsanalyse	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Patienten	19
3.2	Klone.....	19
3.2.1	BAC-Klone.....	19
3.2.2	Fosmid-Klone	23
3.3	Kits, Enzyme und Nukleinsäuren.....	26
3.4	Chemikalien und Lösungsmittel.....	26
3.5	Puffer, Medien und Lösungen.....	26
3.5.1	Medien für molekularbiologische Arbeiten	26

3.5.2	Medien für zellbiologische Arbeiten.....	27
3.5.3	Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....	27
3.5.4	Puffer und Lösungen für die Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	27
3.5.5	Sonstige Puffer	27
3.6	Verbrauchsmaterial und Gerätschaften	27
3.7	Datenbanken und Computerprogramme	29
3.8	Zellbiologische Methoden	30
3.8.1	Lymphoblastoide Zellen	30
3.8.2	Blutkulturen.....	31
3.8.3	Ernten der lymphoblastoiden Zellen bzw. Blutkulturen	31
3.9	Molekularbiologische Methoden.....	32
3.9.1	Anzucht von Bakterien	32
3.9.2	Midipräparation von BAC- und Fosmid-DNA aus <i>E.coli</i>	32
3.9.3	Restriktionsanalyse von DNA.....	32
3.9.4	Agarose-Gelelektrophorese	33
3.9.5	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	34
3.10	Vorgehensweise bei der Datenbankrecherche	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Restriktionsenzymatische Spaltung der isolierten BAC- und Fosmid-DNAs zur Herstellung von Sonden für Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung	38
4.2	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 2;8-Translokation bei Patientin 1	39
4.2.1	Patientenbeschreibung.....	39
4.2.2	Vorarbeiten	39
4.2.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 2q13 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche	40
4.2.4	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 8q23.3 und anschließende Datenbankrecherche	41
4.3	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 9;13-Translokation bei Patient 2.....	43
4.3.1	Patientenbeschreibung.....	43
4.3.2	Vorarbeiten	44
4.3.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 9q31.1 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche	44
4.3.4	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 13q14.3 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche	47

4.4	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 2;15-Translokation bei Patientin 3	48
4.4.1	Patientenbeschreibung	48
4.4.2	Vorarbeiten	48
4.4.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 2q14.2 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche	49
4.4.4	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 15q26.3 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche	51
4.5	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 4;14-Translokation bei Patient 4	54
4.5.1	Patientenbeschreibung	54
4.5.2	Vorarbeiten	54
4.5.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 14q32.13 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche	55
4.6	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 16;17-Translokation bei Patient 5-1	57
4.6.1	Patientenbeschreibung	57
4.6.2	Vorarbeiten	58
4.6.3	Bestätigung des bruchpunktüberspannenden Klons RP11-77E6 und anschließende Datenbankrecherche	59
4.6.4	Bestätigung der Deletion in 17q12 und Eingrenzung der Bruchpunktregion in 17q11.2 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche	60
4.7	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer X;13-Translokation bei Patientin 6	64
4.7.1	Patientenbeschreibung	64
4.7.2	Vorarbeiten	64
4.7.3	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 13q22 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche	65
4.7.4	Eingrenzung der Bruchpunktregion in Xq25 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche	66
5	Diskussion	69
5.1	Eingrenzung der Bruchpunkte der 2;8-Translokation bei Patientin 1 auf 40 bzw. 80 Kb	69
5.1.1	Der Phänotyp der Patientin 1 ist vermutlich unabhängig von der 2q13-Bruchpunktregion	69
5.1.2	CSMD3 ist das Kandidatengen für den Phänotyp von Patientin 1	70

5.2	Eingrenzung der Bruchpunkte der 9;13-Translokation bei Patient 2 auf 20 bzw. 10 Kb	73
5.2.1	<i>GRIN3A</i> als mögliches Kandidatengen für den Phänotyp von Patient 2	73
5.2.2	<i>PCDH8</i> ist ein weiteres Kandidatengen für den Phänotyp von Patient 2	77
5.3	Eingrenzung der Bruchpunkte der 2;15-Translokation bei Patientin 3 auf 15 bzw. 25 Kb	79
5.3.1	<i>DBI</i> und <i>SCTR</i> – zwei Kandidatengene für klinische Merkmale von Patientin 3	79
5.3.2	Ein Positionseffekt auf <i>IGF1R</i> könnte ursächlich für den Kleinwuchs und die Intelligenzminderung von Patientin 3 sein	82
5.4	Bestätigung der 6,1 Mb großen Deletion in 4q31.1q31.22 und Eingrenzung des Bruchpunktes in 14q32.13 der 4;14-Translokation bei Patient 4 auf 80 Kb	84
5.4.1	Das klinische Bild von Patient 4 ist vermutlich unabhängig vom Bruchereignis in 14q32.13	84
5.4.2	Der Phänotyp des Patienten 4 ist wahrscheinlich auf die Deletion in 4q31.1q31.22 zurückzuführen	85
5.5	Eingrenzung beider Bruchpunkte der 16;17-Translokation bei Patient 5-1 auf 40 Kb und Bestätigung der 85 Kb großen Deletion in 17q12 auf dem Wildtyp-Chromosom	87
5.5.1	Der Phänotyp des Patienten 5-1 ist wahrscheinlich unabhängig von der 17q12-Deletion und dem 17q11.2-Translokationsbruchpunkt	87
5.5.2	Die Disruption von <i>GRIN2A</i> in 16p13.2 ist höchstwahrscheinlich kausal für den Phänotyp von Patient 5-1	88
5.6	Eingrenzung des Bruchpunktes der X;13-Translokation bei Patientin 6 in 13q22.1 auf 160 Kb und Detektion einer Mikroduplikation von 860 Kb in der Bruchregion Xq25	90
5.6.1	Vermutlich besteht kein Zusammenhang zwischen den klinischen Merkmalen von Patientin 6 und dem 13q22.1-Bruchpunkt	90
5.6.2	In der Bruchpunktregion mit der Mikroduplikation in Xq25 sind mehrere Kandidatengene für die klinischen Merkmale der Patientin 6 lokalisiert	91
6	Zusammenfassung	98
7	Literaturverzeichnis	100
8	Danksagung	122
9	Eidesstattliche Erklärung	123

I Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c/s	<i>cycles per second</i> , Zyklen pro Sekunde
ca.	circa
CCT	<i>cranial computed tomography</i> , kraniale Computertomographie
cen	Zentromer
CGH	<i>comparative genomic hybridisation</i> , komparative Genomhybridisierung
cm	Zentimeter
CNV	<i>copy number variation</i> , Kopienzahlveränderung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
der	derivativ
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>EcoRI</i>	Escherichia coli 1 RY-13 I
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalografie
et al.	et alii bzw. et aliae
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm
HCNE	<i>highly conserved non-coding element</i> , hochkonservierte nicht-kodierende DNA-Elemente
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IQ	Intelligenzquotient
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
LB	Luria-Broth
Mb	Megabasen
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter

MRO	<i>minimal region of overlap</i>
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pH	potentia hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
sog.	sogenannt
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
tel	Telomer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPS	Tricho-rhino-phalangeales Syndrom
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
z.T.	zum Teil

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Übersicht struktureller Chromosomenanomalien sowie dazugehöriger Bruchereignisse.	7
Abb. 2:	Schema zur Entstehung und den Folgen von Deletionen	8
Abb. 3:	Schema zur Entstehung und den Folgen von Duplikationen.....	8
Abb. 4:	Schema zur Entstehung und den Folgen von Inversionen	9
Abb. 5:	Schema zur Entstehung und den Folgen von Translokationen.....	9
Abb. 6:	Flussdiagramm, wie Krankheitsgene mithilfe molekularzytogenetischer Charakterisierung von Translokationen identifiziert werden.....	11
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Array-CGH-Technik.	13
Abb. 8:	Schematische Darstellung der FISH-Technik.....	14
Abb. 9:	Schematische Darstellung einer reziproken Translokation sowie der entsprechenden Fluoreszenzsignale verschiedener Sonden.....	15
Abb. 10:	Schematische Darstellung der Suche nach Kandidatengenen.	16
Abb. 11:	Mögliche Mechanismen, die zu einem Positionseffekt führen können.....	17
Abb. 12:	Repräsentatives Agarosegel mit <i>EcoRI</i> -Restriktionsfragmenten von verschiedenen BAC-DNAs.....	38
Abb. 13:	Schematische Darstellung der Wildtyp- und der rearrangierten Chromosomen der 2;8-Translokation.	39
Abb. 14:	FISH mit den BACs RP11-625K21 (A) und RP11-281B16 (B) als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen der Patientin 1.....	40
Abb. 15:	Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 2q13 mit BAC-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen <i>ACOXL</i> und <i>BUB1</i>	41
Abb. 16:	FISH mit den BACs RP11-47H9 (A) und RP11-928D21 (B) als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Patientin 1.....	42
Abb. 17:	Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 8q23.3 mit BAC-Klonen sowie dem dort lokalisierten Gen <i>CSMD3</i>	43
Abb. 18:	Schematische Darstellung der Wildtyp- und der rearrangierten Chromosomen der 9;13-Translokation.	44
Abb. 19:	FISH mit dem Fosmid G248P87537F5 und dem BAC RP11-784G11 als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen des Patienten 2.....	46
Abb. 20:	Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 9q31.1 mit BAC- und Fosmid-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen.	46
Abb. 21:	FISH mit dem Fosmid G248P81955E7 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Patienten 2.	47
Abb. 22:	Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 13q14.3 mit Fosmid-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen <i>LECT1</i> und <i>PCDH8</i>	48

Abb. 23:	Schematische Darstellung der Wildtyp- und der derivativen Chromosomen der 2;15-Translokation von Patientin 3	49
Abb. 24:	FISH mit dem BAC RP11-960L12 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Patientin 3.	49
Abb. 25:	FISH mit dem Fosmid G248P84441D8 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Patientin 3	50
Abb. 26:	Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 2q14.2 mit BAC- und Fosmid-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen <i>C2orf76</i> , <i>DBI</i> , <i>TMEM37</i> und <i>SCTR</i>	51
Abb. 27:	FISH mit den BACs RP11-802L22 (A) und RP11-1025G10 (B) als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen der Patientin 3.	52
Abb. 28:	FISH mit dem Fosmid G248P86056G6 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Patientin 3.	52
Abb. 29:	Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 15q26.3 mit BAC- und Fosmid-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen.	53
Abb. 30:	Schematische Darstellung der Wildtyp- und der rearrangierten Chromosomen der 4;14-Translokation.	54
Abb. 31:	Schematische Darstellung der Deletion in 4q31.1q31.22 mit BAC-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen.	55
Abb. 32:	FISH mit dem BAC RP11-1070N10 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Patienten 4.	56
Abb. 33:	Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 14q32.13 mit BAC-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen.	57
Abb. 34:	Schematische Darstellung der Wildtyp- und der rearrangierten Chromosomen der 16;17-Translokation.	58
Abb. 35:	Familienstammbaum über drei Generationen des Patienten 5-1	59
Abb. 36:	FISH mit dem BAC RP11-77E6 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Patienten 5-1.	59
Abb. 37:	Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 16p13.2 mit BAC-Klonen sowie dem dort lokalisierten Gen <i>GRIN2A</i>	60
Abb. 38:	FISH mit den Fosmiden G248P81921A8 (A), G248P80628F7 (B), G248P84939H3 (C) und G248P85774A8 (D) als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen von Patient 5-1.	61
Abb. 39:	Schematische Darstellung des Deletionsbereichs in 17q12 mit den ausgewählten Fosmiden sowie den dort lokalisierten Genen.	62
Abb. 40:	FISH mit dem BAC RP11-348E14 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Patienten 5.	62
Abb. 41:	Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 17q11.2 mit BAC-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen.	64
Abb. 42:	Schematische Darstellung der Wildtyp- und der rearrangierten Chromosomen der X;13-Translokation.	65

Abb. 43: FISH mit dem BAC RP11-157E11 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Patientin 6.	66
Abb. 44: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 13q22 mit BAC-Klonen sowie dem dort lokalisierten Gen <i>BC043259</i>	66
Abb. 45: FISH mit dem BAC CTD-3168N18 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen von Patientin 6.	67
Abb. 46: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion und Mikroduplikation in Xq25 sowie den dort lokalisierten Genen.	68
Abb. 47: Schematische Darstellung des CSMD3-Proteins.	70
Abb. 48: Schematische Darstellung eines Ausschnitts von 8q23.3 mit den dort lokalisierten Genen <i>CSMD3</i> , <i>TRPS1</i> und <i>EXT1</i> sowie Fallbeschreibungen aus der Literatur.	72
Abb. 49: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen zwischen den Genen <i>CSMD3</i> und <i>TRPS1</i> in 8q23.3.	73
Abb. 50: Schematische Darstellung von Chromosom 9, der Lokalisation der Bruchpunktregion in 9q31.1 von Patient 2, weiteren strukturellen Chromosomenanomalien in 9q31.1 und Angabe, ob die phänotypischen Eigenschaften des Patienten 2 bei den Betroffenen bestehen.	74
Abb. 51: Schematische Darstellung der Inhibition der chondrogenen Differenzierung durch D-Serin an NMDA-Rezeptoren.	76
Abb. 52: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen distal des Bruchpunktes in 9q31.1.	77
Abb. 53: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen proximal des Gens <i>PCDH8</i> in 13q14.3.	78
Abb. 54: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen um den Bruchpunkt in 2q14.2.	81
Abb. 55: Schematische Darstellung des IGF1-Rezeptors.	82
Abb. 56: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen zwischen den Genen <i>IGF1R</i> und <i>DJ031154</i> in 15q26.3.	84
Abb. 57: Schematische Darstellung von Chromosom 4, der Lokalisation der Deletion in 4q31.1q31.22 bei Patient 4 sowie bereits bekannte interstitielle Deletionen in dieser chromosomalen Region, jeweils unter Angabe der phänotypischen Eigenschaften.	86
Abb. 58: Schematische Darstellung des X-Chromosoms, der Lokalisation der Bruchpunktregion und der Mikroduplikation in Xq25 bei Patientin 6 sowie bereits bekannte Duplikationen in dieser chromosomalen Region unter der Angabe der damit assoziierten phänotypischen Eigenschaften.	92
Abb. 59: Schema zur X-Inaktivierung bei Trägerinnen einer reziproken X-autosomalen Translokation mit einer Duplikation eines X-chromosomalen Bereiches.	95

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	ICD-10-Kategorien der Intelligenzminderung.	2
Tab. 2:	Übersicht über verschiedene Arten genetischer Ursachen einer Intelligenzminderung.	3
Tab. 3:	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 2.	20
Tab. 4:	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 8.	20
Tab. 5:	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 9.	21
Tab. 6:	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 13.	21
Tab. 7:	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 14.	22
Tab. 8:	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 15.	22
Tab. 9:	Verwendeter BAC-Klon für das Chromosom 16.	22
Tab. 10:	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 17.	23
Tab. 11:	Verwendete BAC-Klone für das Chromosom X.	23
Tab. 12:	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 2.	24
Tab. 13:	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 9.	24
Tab. 14:	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 13.	25
Tab. 15:	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 15.	25
Tab. 16:	Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 17.	25
Tab. 17:	Verwendete Datenbanken.	29
Tab. 18:	Verwendete Computerprogramme.	29
Tab. 19:	Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 2q13.	40
Tab. 20:	Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 8q23.3.	42
Tab. 21:	Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 9q31.1.	45
Tab. 22:	Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 13q14.3.	47
Tab. 23:	Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 2q14.2.	50
Tab. 24:	Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 15q26.3.	53
Tab. 25:	Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 14q31.13.	56
Tab. 26:	Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 17q11.2 und Bestätigung der 17q12-Deletion.	63
Tab. 27:	Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des 13q22.1-Bruchpunktes.	65
Tab. 28:	Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Xq25-Bruchpunktes und Bestimmung der Mikroduplikation in Xq25.	67

1 Ziel der Arbeit

Lern- und Verhaltensstörungen in Verbindung mit einem Intelligenzquotienten unter 70 kommen bei etwa 1-3% der Bevölkerung vor und werden als Intelligenzminderung bezeichnet. Die Ursachen für Intelligenzminderung sind vielfältig, man geht jedoch davon aus, dass in den meisten Fällen eine genetische Ursache vorliegt.

Aktuell werden mehr als 450 verschiedene Gene mit Intelligenzminderung assoziiert (van Bokhoven 2011). Allerdings ist davon auszugehen, dass die Mehrzahl der Krankheitsgene bislang noch unbekannt ist. Ziel dieser Doktorarbeit war es, weitere Kandidatengene für Intelligenzminderung auszumachen.

Eine etablierte Methode zur Identifizierung von Krankheitsgenen für die monogen erbliche Intelligenzminderung, die die Grundlage für die vorliegende Arbeit war, ist die molekularzytogenetische Charakterisierung chromosomaler Aberrationen. Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurden Metaphasechromosomenpräparate von sechs Patienten mit einer anscheinend balancierten Chromosomentranslokation und einer Intelligenzminderung unbestimmter Ätiologie analysiert. Auf diese Weise sollten bruchpunktüberspannende DNA-Klone ermittelt werden, die eine Eingrenzung der Bruchpunktregionen auf wenige Kilobasen zulassen. Für die in den ermittelten Bruchpunktregionen lokalisierten Gene sollten anschließend Online-Datenbankrecherchen durchgeführt werden, um unter Berücksichtigung von Proteinfunktion, Expressionsmuster, Tiermodellen und bereits beschriebenen krankheitsassoziierten chromosomalen Rearrangements neue Kandidatengene für Intelligenzminderung ausfindig zu machen.

2 Einleitung

2.1 Intelligenzminderung

In der von der Weltgesundheitsorganisation [*World Health Organization* (WHO)] erarbeiteten Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme [*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD)] wird unter Intelligenzminderung ein Zustand von verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten verstanden, wobei besonders Fertigkeiten beeinträchtigt sind, die sich in der Entwicklungsperiode manifestieren und die zum Intelligenzniveau beitragen, etwa Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten. Eine Intelligenzminderung kann allein oder zusammen mit jeder anderen psychischen oder körperlichen Störung auftreten (Dilling und World Health Organization 2011).

Eine Einteilung erfolgt nach dem Schweregrad der Intelligenzminderung. Die folgende Tabelle gibt Überblick über die verschiedenen Kategorien der Klassifikation:

ICD-10-Kategorie	Bezeichnung	Intelligenzbereich (IQ-Bereich)
F70	Leichte Intelligenzminderung	50-69
F71	Mittelgradige Intelligenzminderung	35-49
F72	Schwere Intelligenzminderung	20-34
F73	Schwerste Intelligenzminderung	< 20
F74	Dissoziierte Intelligenz	Diskrepanz > 15 z.B. zwischen Handlungs- und Sprach-IQ
F78	Andere Intelligenzminderung	Beurteilung mit Standardtests nicht möglich
F79	Nicht näher bezeichnete Intelligenzminderung	Informationen nicht ausreichend

Tab. 1: ICD-10-Kategorien der Intelligenzminderung. Angegeben ist der ICD-10-Code, die Bezeichnung des entsprechenden Schweregrades der Intelligenzminderung sowie der dazugehörige IQ-Bereich bzw. weitere erforderliche Kriterien.

Je nach Quelle und Erfassungsmethode (Saß und American Psychiatric Association 2003) beträgt die Gesamtprävalenz von Personen mit geistiger Behinderung 1-3% (Roeleveld et al. 1997; Szymanski und King 1999; World Health Organization und ebrary Inc 2001; Saß und American Psychiatric Association 2003; Winnepeninckx et al. 2003). Die Prävalenzrate einer schweren geistigen Behinderung wird mit 3-5% angegeben (World Health Organization 1985; Kiely 1987). Andere Zahlen besagen, dass bei einer Gesamtprävalenz von 1% in 85% der Fälle eine milde Intelligenzminderung diagnostiziert wird (Szymanski und King 1999). Das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich liegt ungefähr bei 1,2-1,7:1 (Murphy et al. 1995;

Roeleveld et al. 1997; Saß und American Psychiatric Association 2003; Winnepenninckx et al. 2003), wahrscheinlich aufgrund geschlechtsabhängiger Vererbung (Herbst und Miller 1980; Fishburn et al. 1983; Roeleveld et al. 1997).

Die Intelligenz eines Menschen ist multifaktoriell beeinflusst, d.h. für die Intelligenzentwicklung spielen sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren eine bedeutende Rolle. Einerseits werden 50% der Varianz durch genetische Faktoren bestimmt, andererseits wird die Intelligenzentwicklung durch ein deprivierendes Milieu deutlich gehemmt und durch intellektuell anregende Lebensverhältnisse gefördert (Shaffer und Kipp 2007). In einer Adoptionsstudie stellte man fest, dass Kinder, die von Eltern mit einem höheren sozioökonomischen Status adoptiert wurden, eine höhere IQ-Zahl erreichten als Kinder, die bei Adoptiveltern aus einer niedrigeren sozialen Herkunftsgruppe aufwuchsen (Capron und Duyme 1989).

Die Ursachen einer Intelligenzminderung sind vielfältig (Armatas 2009). Es kann zwischen genetisch bedingter und nicht-genetisch bedingter Intelligenzminderung unterschieden werden. Beispiele für nicht-genetisch bedingte Intelligenzminderung sind: Einfluss toxischer Substanzen wie Alkohol oder Drogen, fetale Infektionen, Mangelernährung, peri- und postnatale Traumen, Asphyxie und postnatale Infektionen. Für diese Arbeit werden allein genetische Ursachen für Intelligenzminderung betrachtet. Man unterscheidet bei genetischen Ursachen für Intelligenzminderung folgende Arten: chromosomal, monogen, polygen und mitochondrial (Tab. 2).

Chromosomenstörungen
Numerische Chromosomenstörungen
Strukturelle partielle Chromosomenstörungen wie Deletionen, Insertionen, Inversionen und Translokationen
Submikroskopische Mikrodeletionen (interstitielle Deletionen, subtelomerische Deletionen)
Monogene Ursachen
Autosomal-dominant
Autosomal-rezessiv
X-chromosomal
Polygene Ursachen
Mitochondrial vererbte Ursachen

Tab. 2: Übersicht über verschiedene Arten genetischer Ursachen einer Intelligenzminderung. Angegeben sind die verschiedenen Arten von genetischen Ursachen sowie deren weiteren Einteilungsmöglichkeiten [Tabelle modifiziert nach Winnepenninckx et al. (2003)].

In ungefähr der Hälfte aller Fälle von Intelligenzminderung ist eine Aussage über die Ätiologie möglich (Curry et al. 1997; Saß und American Psychiatric Association 2003). Die milde Intelligenzminderung ist in erster Linie auf soziale Umstände und Umweltfaktoren zurückzuführen, während bei der schweren Intelligenzminderung häufig genetische Ursachen feststellbar sind (Moser 1995; Stromme und Hagberg 2000; Moser

2004). Bezogen auf alle Schweregrade der Intelligenzminderung geht man davon aus, dass genetische Ursachen einen Anteil von 50-60% ausmachen (Moser 1995; Winnepeninckx et al. 2003).

Die meisten bislang bekannten Gene für Intelligenzminderung sind X-chromosomal lokalisiert, obwohl die Anzahl der identifizierten autosomal-rezessiven Krankheitsgene zunehmend steigt (Chelly et al. 2006). Die steigenden Zahlen sind u.a. auf die Gründung von Forschungsnetzwerken zurückzuführen, die klinisches und molekulares Wissen bündeln (Ropers et al. 2003). Derzeit werden über 450 Gene mit Intelligenzminderung in Verbindung gebracht (van Bokhoven 2011). Allerdings besagt eine grobe Schätzung, dass allein auf den Autosomen mindestens 1400 Krankheitsgene für Intelligenzminderung existieren (Raymond 2010). Somit ist die Mehrzahl der für Intelligenzminderung ursächlichen Gene bislang unbekannt (Ropers 2007). Eine beispielhafte Zusammenstellung von identifizierten Krankheitsgenen ist bei Raymond (2010) zu finden.

2.2 Epilepsie

Die Internationale Liga gegen Epilepsie [*International League against epilepsy* (ILAE)] unterscheidet zwischen einem epileptischen Anfall und Epilepsie wie folgt: Ein epileptischer Anfall ist ein vorübergehendes Auftreten von Zeichen und/oder Symptomen aufgrund abnormer exzessiver oder synchroner neuronaler Aktivität im Gehirn. Epilepsie ist eine Erkrankung des Gehirns, die durch eine dauerhafte Neigung zu epileptischen Anfällen und durch die neurobiologischen, kognitiven, psychischen und sozialen Folgen dieser Bedingungen gekennzeichnet ist. Die Definition von Epilepsie erfordert das Auftreten von mindestens einem epileptischen Anfall. Epilepsie ist kein einzelnes Krankheitsbild, sondern eine Gruppe von Erkrankungen, denen eine Fehlfunktion des Gehirns aus unterschiedlichsten Gründen zugrunde liegt (Fisher et al. 2005).

Epilepsie ist eine der häufigsten Erkrankungen des Gehirns (Dua et al. 2005). Weltweit erleidet jeder Zehnte während seines Lebens mindestens einen epileptischen Anfall, jeder Dritte davon entwickelt Epilepsie (Engel und Pedley 2008). Die Inzidenz eines epileptischen Anfalls liegt bei 26 bis 70 pro 100.000 Personen pro Jahr, die der Epilepsie bei 24 bis 53 pro 100.000 Personen pro Jahr (Engel und Pedley 2008). Die Prävalenz von Epilepsie liegt in industrialisierten Ländern bei 4-8‰ (Pfäfflin und May 2000). Bei Personen mit Intelligenzminderung ist die Prävalenz von Epilepsie deutlich höher als in der Allgemeinbevölkerung. Schätzungen gehen von 18% bis über 60% bei Menschen mit Intelligenzminderung aus (Engel und Pedley 2008).

Die Ätiologie wird in drei Gruppen eingeteilt: idiopathisch, symptomatisch und kryptogen. Die ILAE empfiehlt, die drei Ausdrücke durch die Begriffe genetisch, strukturell/metabolisch und unbekannt zu ersetzen (Berg et al. 2010). In den letzten Jahren konnten bereits zahlreiche Krankheitsgene für Epilepsie identifiziert werden (von Spiczak et al. 2011), von denen die meisten für Ionenkanäle kodieren. Eine tabellarische Aufzählung bereits identifizierter Krankheitsgene für Epilepsie ist bei Kullman (2002) und bei von Spiczak et al. (2011) zu finden. Bei weiteren Genen, die für Ionenkanäle kodieren, wird ein Zusammenhang mit Epilepsie vermutet (Kullmann 2002).

Nicht nur die bereits identifizierten Gene geben Hinweise darauf, dass bei Epilepsie genetische Faktoren eine große Rolle spielen. Auch Zwillingsstudien zeigen, dass die Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen durchweg höher sind als bei zweieiigen Zwillingen (Ottman 1997; Vadlamudi et al. 2004). Daher wird davon ausgegangen, dass nur ein Bruchteil der genetischen Ursachen für Epilepsie bekannt ist (Zimprich 2006).

2.3 Arten von Mutationen

In der Regel werden die Chromosomen und damit die darauf liegenden Gene unverändert von einer Generation an die nächste Generation weitergegeben. Dennoch sind spontane Mutationen die Voraussetzung für evolutionäre Selektion (Buselmaier und Tariverdian 2007). Für die Evolution ist wichtig, dass es zu zufälligen Mutationen kommt und unter Selektionsdruck gewisse Individuen einen Überlebensvorteil entwickeln.

Wenn in allen Zellen eines Organismus eine genetische Veränderung nachweisbar ist, spricht man von einer konstitutionellen Mutation. Entsteht eine Veränderung jedoch erst im Laufe der menschlichen Entwicklung, so bezeichnet man diese als somatische Mutation (Buselmaier und Tariverdian 2007; Strachan und Read 2011).

Mutationen lassen sich in drei Gruppen einteilen: Genommutationen, Chromosomenmutationen und Genmutationen.

2.3.1 Genommutationen

Bei Genommutationen liegt eine Veränderung der Chromosomenzahl vor. Zellen, die ein oder mehrere Chromosomen zu viel haben, werden als hyperploid bezeichnet. Ein klassisches Beispiel ist das Down-Syndrom (Trisomie 21). Zellen, denen ein oder mehrere Chromosomen fehlen, werden als hypoploid bezeichnet. Ein Beispiel hierfür ist das Turner-Syndrom (Monosomie X). Bei der Polyploidisierung kommt es zur Vervielfältigung des ganzen Chromosomensatzes (Buselmaier und Tariverdian 2007).

2.3.2 Genmutationen

Genmutationen sind submikroskopische, molekulare Veränderungen auf Nukleotid-ebene. Punktmutationen sind die häufigsten Mutationen und betreffen nur ein Basen-paar. Es können aber auch mehrere Basenpaare betroffen sein. Eine Einteilung in Punktmutationen (Nonsense-Mutation, Missense-Mutation, stille Mutation, Spleißstellenmutation und Promotormutation), kleine Rearrangements (Deletion, Insertion, Duplikation) und Trinukleotidexpansionen ist möglich (Murken et al. 2006; Buselmaier und Tariverdian 2007).

2.3.3 Chromosomenmutationen: Deletion, Duplikation, Inversion und Translokation

Auf die Chromosomenmutationen wird ausführlicher eingegangen, da diese Mutationen eine wichtige Rolle bei der Identifizierung von Krankheitsgenen spielen. Chromosomen-mutationen werden auch als chromosomale Rearrangements oder strukturelle Chromosomenanomalien bezeichnet. Ihnen liegen Veränderungen in der Chromosomenstruktur zugrunde. Zwischen 0,5% und 0,6% aller Neugeborenen weisen eine chromosomale Anomalie auf (Jacobs et al. 1992; Shaffer und Lupski 2000). Prinzipiell können Chromosomenmutationen an beliebiger Stelle auftreten. Sie werden in Deletionen, Duplikationen, Translokationen und Inversionen eingeteilt (Griffiths 1999). Deletionen und Duplikationen stellen unbalancierte Rearrangements dar, während Translokationen und Inversionen häufig balancierte Chromosomenanomalien sind. Folgendes Schaubild gibt Übersicht über strukturelle Chromosomenanomalien sowie die jeweiligen Bruchereignisse:

Strukturelle Chromosomenanomalien unter Beteiligung von Chromosomenbrüchen	Ein Bruch in einem Chromosom	Terminale Deletion (Abb. 2A) Ein azentrisches Bruchstück geht verloren.
	Zwei Brüche in einem Chromosom	Interstitielle Deletion (Abb. 2B) Der Bereich zwischen den Bruchstellen geht verloren, die Endstücke fusionieren miteinander.
		Ringchromosom (Abb. 2C) Die Bruchstellen fusionieren miteinander und der Bereich zwischen den Bruchstellen schließt sich zu einem Ring.
		Duplikation (Abb. 3A, B und C) Der Bereich zwischen den Bruchstellen wird verdoppelt.
		Inversion (Abb. 4A und B) Der Bereich zwischen den Bruchstellen wird um 180° gedreht.
	Zwei Brüche in verschiedenen Chromosomen	Reziproke Translokation (Abb. 5B) Es findet ein balancierter Austausch azentrischer Bruchstücke statt.
		Robertson'sche Translokation (Abb. 5C) Die zentrischen Bruchstücke zweier akrozentrischer Chromosomen verschmelzen miteinander.
Drei Brüche, davon mindestens zwei in einem Chromosom	Insertionstranslokation Der Bereich zwischen zwei Bruchstellen eines Chromosoms wird herausgeschnitten und an einer dritten Stelle – entweder in demselben oder einem anderen Chromosom – eingebaut.	

Abb. 1: Übersicht struktureller Chromosomenanomalien sowie dazugehöriger Bruchereignisse. In der zweiten Spalte sind die Anzahl und die Lokalisation der Bruchereignisse aufgeführt. Die dritte Spalte gibt die verschiedenen Möglichkeiten an, welche Chromosomenmutationen aus dem jeweiligen Ereignis hervorgehen können [Abbildung modifiziert nach Strachan und Read (2011)].

Deletion

Als Deletion bezeichnet man den Verlust eines Chromosomenstücks. Dabei sind terminale von interstitiellen Deletionen zu unterscheiden. Bei terminalen Deletionen geht ein Endfragment verloren und es entsteht ein verkürztes Chromosom (Abb. 2A). Die interstitielle Deletion setzt zwei Doppelstrangbrüche voraus. Hier wird der Verlust eines Chromosomenfragments aus der Mitte des Chromosomenarms beschrieben. Die Folge ist ebenfalls ein verkürztes Chromosom (Abb. 2B). Eine weitere Möglichkeit ist ein Chromosomenstrangbruch an beiden Armen mit Verlust beider Chromosomenendstücke und der Ausbildung eines Ringchromosoms (Abb. 2C) (Moore und Best 2001; Murken et al. 2006; Buselmaier und Tariverdian 2007). Eine Deletion kann eine Haploinsuffizienz von einem oder mehreren der betroffenen Gene verursachen. Dies bedeutet, dass die Funktion einer Genkopie nicht ausreicht (Fölsch et al. 2000). Häufig führt dies frühzeitig zum Abort. Bei Neugeborenen mit einer lichtmikroskopisch sichtbaren Deletion treten sehr häufig Fehlbildungen und Intelligenzminderung auf (Moore und Best 2001).

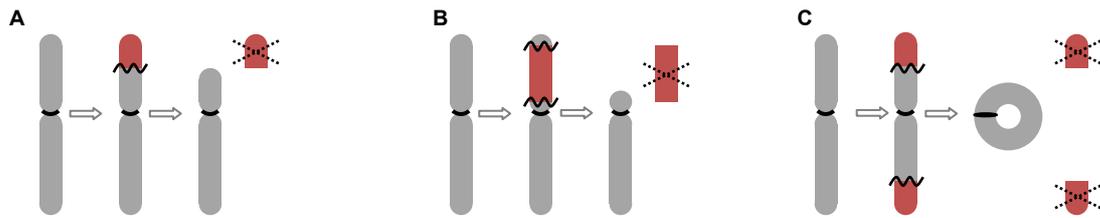


Abb. 2: Schema zur Entstehung und den Folgen von Deletionen: terminale Deletion (A), interstitielle Deletion (B) und Deletion mit Ausbildung eines Ringchromosoms (C). Die Chromosomen sind grau dargestellt, die deletierten Fragmente eines Chromosoms rot. Das schwarz-gestrichelte Kreuz zeigt den Verlust des Chromosomenfragments. Die Wellenlinien zeigen die Lokalisation der Chromosomenbrüche an.

Duplikation

Als Duplikation bezeichnet man die Verdoppelung eines bestimmten Abschnitts eines Chromosoms. Die duplizierten Chromosomensegmente können direkt nebeneinander liegen. Dies wird als Tandem-Duplikation bezeichnet (Abb. 3A). Alternativ kann das duplizierte Chromosomenstück an einer anderen Stelle in das gleiche Chromosom (Abb. 3B) oder in ein nicht-homologes Chromosom (Abb. 3C) integriert werden (Griffiths 1999). Duplikationen sind unbalancierte Rearrangements, die zu einer partiellen Trisomie führen. Die klinischen Auswirkungen von Deletionen und Duplikationen sind im Allgemeinen sehr ähnlich, wobei Duplikationen dazu neigen, in ihrer Wirkung milder zu sein (Moore und Best 2001).

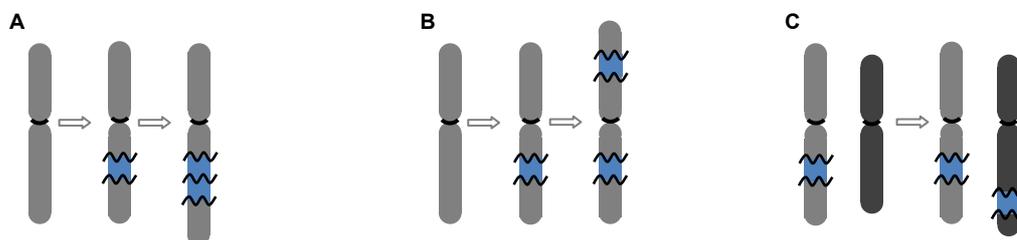


Abb. 3: Schema zur Entstehung und den Folgen von Duplikationen: Tandem-Duplikation (A), Duplikation mit dupliziertem Bereich an anderer Position in dem gleichen Chromosom (B) und Duplikation mit Integration des duplizierten Bereiches in ein nicht-homologes Chromosom (C). Die Chromosomen sind hell- bzw. dunkelgrau dargestellt, die duplizierten Fragmente eines Chromosoms blau. Die Wellenlinien zeigen die Lokalisation der Chromosomenbrüche an.

Inversion

Eine Inversion entspricht der Drehung eines Chromosomensegments um 180°. Ist ein Chromosomenarm involviert, liegt eine parazentrische Inversion vor (Abb. 4A). Ist das Zentromer betroffen, spricht man von einer perizentrischen Inversion (Abb. 4B) (Griffiths 1999; Murken et al. 2006). Heterozygote Träger einer parazentrischen als auch einer perizentrischen Inversion zeigen in der Regel keine phänotypischen Auffälligkeiten (Moore und Best 2001).

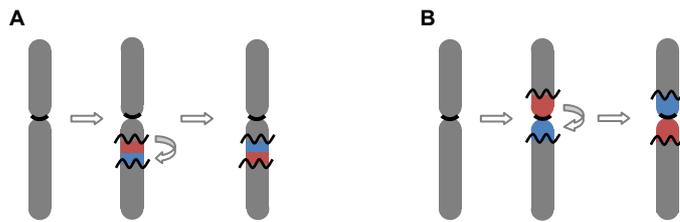


Abb. 4: Schema zur Entstehung und den Folgen von Inversionen: parazentrische Inversion (A), perizentrische Inversion (B). Die Chromosomen sind grau dargestellt. Die invertierten Chromosomenstücke sind rot-blau gefärbt. Die Wellenlinien zeigen die Lokalisation der Chromosomenbrüche an.

Translokation

Unter einer Translokation versteht man eine chromosomale Strukturveränderung, bei der entweder ein Chromosomenstück in das gleiche Chromosom in neuer Lage eingebaut wird oder auf ein anderes Chromosom übertragen wird. Sind zwei verschiedene Chromosomen beteiligt, muss zwischen einer nicht-reziproken und einer reziproken Translokation unterschieden werden. Als nicht-reziproke Translokation bezeichnet man einen Chromosomenbruch und die anschließende Anlagerung des Chromosomenfragments an ein nicht-homologes Chromosom (Abb. 5A) (Buselmaier und Tariverdian 2007). Bei der reziproken Translokation, die bei 0,1% aller Neugeborenen vorliegt (van Assche et al. 1996), müssen zwei Chromosomenstücke abbrechen. Die Chromosomenfragmente werden dann zwischen den beteiligten Chromosomen wechselseitig ausgetauscht (Abb. 5B) (Buselmaier und Tariverdian 2007). Der Träger einer reziproken Translokation hat in der Regel keine phänotypischen Merkmale; allerdings besteht ein erhöhtes Risiko für Unfruchtbarkeit, Fehlgeburten und phänotypisch auffällige Nachkommen (Moore und Best 2001). Schließlich gibt es noch die Robertson'sche-Translokation, die auch als zentrische Fusion bezeichnet wird. Hierbei brechen bei zwei akrozentrischen Chromosomen die kurzen p-Arme ab und gehen verloren, während die zwei langen q-Arme miteinander fusionieren (Abb. 5C) (Buselmaier und Tariverdian 2007).

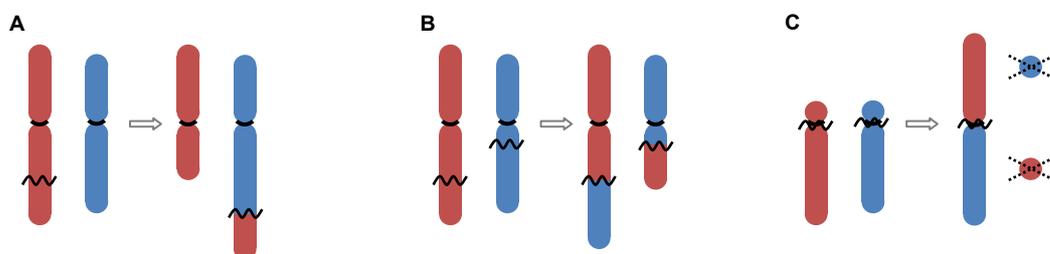


Abb. 5: Schema zur Entstehung und den Folgen von Translokationen: nicht-reziproke Translokation (A), reziproke Translokation (B) und Robertson'sche-Translokation (C). Die Chromosomen sind rot bzw. blau dargestellt. Die Wellenlinien zeigen die Lokalisation der Chromosomenbrüche an. Das schwarz-gestrichelte Kreuz zeigt den Verlust des Chromosomenfragments.

2.4 Identifizierung neuer Krankheitsgene mithilfe chromosomaler Rearrangements

Eine etablierte Methode, um monogene Krankheitsgene zu identifizieren, ist die molekulare Charakterisierung chromosomaler Aberrationen (Tommerup 1993), wie sie erstmals für die Muskelerkrankung Typ Duchenne beschrieben wurde (Greenstein et al. 1977; Lindenbaum et al. 1979). Bemerkenswerterweise bestehen nur bei rund 6% der Träger einer balanciert erscheinenden reziproken *de novo* Translokation phänotypische Auffälligkeiten (Warburton 1991); im Vergleich dazu beträgt das Risiko für einen auffälligen Phänotyp in der Allgemeinbevölkerung immerhin 2-3% (Warburton 1991; Moore und Best 2001).

Wenn bei einer klinisch auffälligen Person eine scheinbar balancierte Translokation vorliegt, bestehen drei Möglichkeiten: Erstens, es könnte bloße Koinzidenz bestehen (Strachan und Read 2011); die genetische Ursache des Phänotyps ist unabhängig von den Bruchpunkten. Zweitens, es könnte sich um ein unbalanciertes Rearrangement handeln (Strachan und Read 2011), da eine submikroskopische Duplikation oder Deletion nicht detektiert wurde (Wirth et al. 1999; Astbury et al. 2004; Gribble et al. 2005; Baptista et al. 2008). Diese Imbalancen liegen häufig im Bruchpunktbereich (Kumar et al. 1998; Borg et al. 2002; Cox et al. 2003; Gribble et al. 2005) oder in der Nähe eines der Bruchpunkte (Page et al. 1990; Gribble et al. 2005). Die dritte Möglichkeit ist, dass tatsächlich einer der Bruchpunkte den Phänotyp verursacht hat (Strachan und Read 2011). Bei den Möglichkeiten zwei und drei gewinnt man durch die Identifizierung des Bruchpunktes der Translokation wertvolle Hinweise auf die physikalische Position des putativen Krankheitsgens. Eine besondere Bedeutung bei der Identifizierung von Genen, die Intelligenzminderung verursachen, kommt solchen balancierten Translokationen zu, die ein Gen direkt unterbrechen (Vandeweyer und Kooy 2009).

2.5 Allgemeine Vorgehensweise bei der Identifizierung von Krankheitsgenen mithilfe molekularzytogenetischer Charakterisierung von Translokationen

Bei der typischen Symptomtrias aus Intelligenzminderung, Dysmorphiezeichen und Organfehlbildungen wird in der Praxis eine Chromosomenanalyse durchgeführt (Buselmaier und Tariverdian 2007). Bei Nachweis einer mikroskopisch detektierbaren Veränderung wird üblicherweise eine Chromosomenanalyse bei den Eltern durchgeführt, um z.B. zu überprüfen, ob einer der Elternteile Träger der beim Kind

diagnostizierten Translokation ist (Shaffer 2005). Außerdem muss sichergestellt werden, dass keine submikroskopischen Imbalancen, z.B. im Bereich der Bruchpunkte, vorliegen, die ebenfalls ursächlich für den Phänotyp sein könnten. Diese Untersuchung erfolgt heutzutage mittels Array-basierter komparativer Genomhybridisierung (Array-CGH). Die genaue Eingrenzung der Bruchpunkte auf wenige Kilobasen ermöglicht die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Der nächste Schritt ist eine ausführliche Datenbankrecherche, um unter Berücksichtigung der Untersuchungsergebnisse putative Krankheitsgene zu identifizieren. Nicht nur die Gene, die genau im Bruchpunkt liegen, sondern auch Gene, die bis zu einer Megabase entfernt liegen, können unter Berücksichtigung des Phänotyps des Patienten und der Eigenschaften des jeweiligen Gens aufgrund eines Positionseffektes als Kandidatengen in Frage kommen. Zuletzt muss das Kandidatengen durch eine Mutationsanalyse bei phänotypisch ähnlichen Patienten, deren Karyogramm unauffällig ist, gescreent werden, um das Krankheitsgen zu bestätigen. Die beschriebene Vorgehensweise wird durch das folgende Flussdiagramm veranschaulicht (Abb. 6):

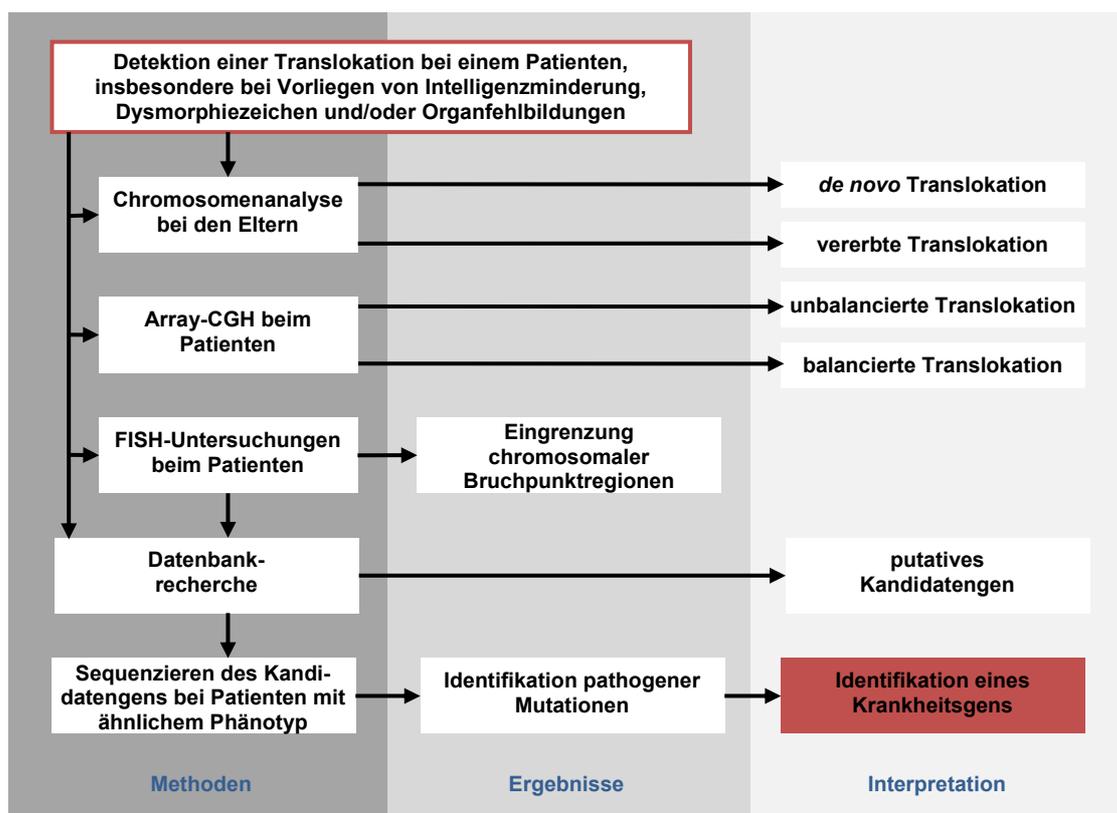


Abb. 6: Flussdiagramm, wie Krankheitsgene mithilfe molekularzytogenetischer Charakterisierung von Translokationen identifiziert werden. Gezeigt sind die verschiedenen Schritte, die zur Identifikation eines Krankheitsgens führen. Hierfür sind klinischen Daten, Laborergebnisse sowie Datenbankrecherchen notwendig.

2.5.1 Konventionelle Chromosomenanalyse

Mit der heute angewandten GTG (*G-banding by trypsin using Giemsa*)-Bänderung (Seabright 1971) sind strukturelle Veränderungen ab einer Größe von 5-10 Mb sichtbar (Uhrig et al. 1999; de Ravel et al. 2007). Für ein höheres Auflösungsvermögen und um zusätzliche Information bezüglich des chromosomalen Rearrangements, wie z.B. hinsichtlich dessen Komplexität, zu gewinnen, muss auf andere Techniken wie die FISH- (Batista et al. 1994) (siehe 2.5.3) oder die Array-CGH-Technik (siehe 2.5.1), die beide zur molekularen Zytogenetik gehören, zurückgegriffen werden.

2.5.2 Array-basierte komparative Genomhybridisierung (Array-CGH) zur Analyse submikroskopischer Chromosomenaberrationen

Über die Array-CGH, eine Weiterentwicklung der komparativen Genomhybridisierung (Kallioniemi et al. 1992), wurde erstmals 1997 berichtet (Solinas-Toldo et al. 1997). Bei dieser Methode handelt es sich um ein Verfahren, mit dem chromosomale Imbalancen wie Duplikationen und Deletionen im gesamten Genom detektiert werden können. Bei der Array-CGH ist die genomische Auflösung abhängig vom Abstand der verwendeten DNA-Fragmente sowie von deren Länge. Für BAC-Klone liegt die Auflösung zwischen 80 und 200 Kb (Ballif et al. 2006), für Oligonukleotide bei maximal 30 Bp (Feuk et al. 2006; Coe et al. 2007). Für die Array-CGH wird jeweils eine gleiche Menge der Patienten-DNA und Referenz-DNA unterschiedlich fluoreszenzmarkiert. Diese und die DNA-Fragmente auf dem Mikroarray werden denaturiert und anschließend kohybridisiert. Nach verschiedenen Waschschrritten werden die Fluoreszenzsignale mithilfe eines Scanners detektiert. Das Verhältnis der Fluoreszenzsignale zeigt, ob Imbalancen vorliegen und ob es sich dabei um einen Gewinn oder Verlust von DNA-Abschnitten handelt (Abb. 7).

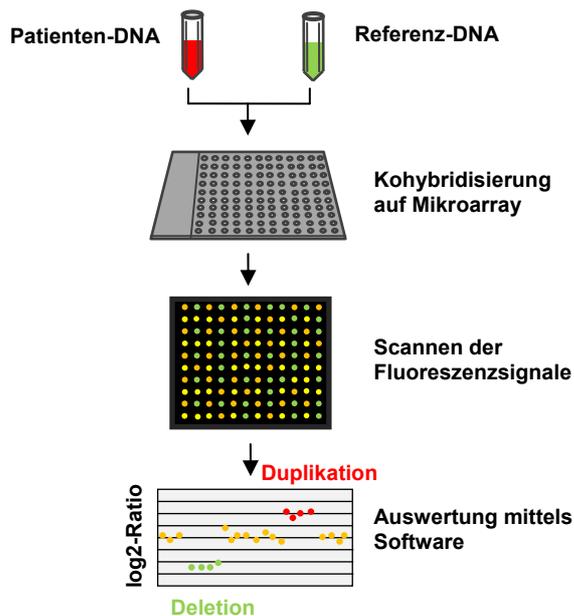


Abb. 7: Schematische Darstellung der Array-CGH-Technik. Patienten- und Referenz-DNA werden rot bzw. grün fluoreszenzmarkiert. Auf einem Mikroarray mit kurzen definierten DNA-Fragmenten des humanen Genoms werden gleiche Mengen der Patienten-DNA und der Referenz-DNA kohybridisiert. Die Fluoreszenzsignale werden mittels eines Scanners detektiert. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität wird mittels Software ausgewertet [Abbildung modifiziert nach Lapierre und Tachdjian (2005)].

Mit der Array-CGH werden auch die sog. *copy number variations* (CNVs) detektiert (Sanlaville et al. 2005), die ungefähr 12% des humanen Genoms ausmachen (Carter 2007). CNVs sind DNA-Abschnitte >1 Kb im Genom (Feuk et al. 2006; Freeman et al. 2006), die sich in ihrer Kopienzahl (eine oder drei Kopien) zwischen zwei Individuen innerhalb einer Spezies unterscheiden (Schrider und Hahn 2010). Es ist ein schwieriges und kontrovers diskutiertes Thema, ob diese CNVs eine Normvariante darstellen, Krankheiten verursachen, oder ob sie mit einem Phänotyp assoziiert sind (Feuk et al. 2006; Lee und Lupski 2006; Lee et al. 2007; Scherer et al. 2007).

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Array-CGH als ergänzende Methode zur konventionellen Chromosomenanalyse eingesetzt, um submikroskopische Imbalancen zu detektieren. In 25-40% der Fälle werden Imbalancen bei Personen mit anscheinend balancierten Translokationen und phänotypischen Auffälligkeiten mittels der Array-CGH aufgedeckt (de Gregori et al. 2007; Baptista et al. 2008; Sismani et al. 2008; Schluth-Bolard et al. 2009). Beim Vorliegen eines unauffälligen Array-CGH-Befundes kann eine Kausalität zwischen der balanciert vorliegenden reziproken Translokation und dem klinischen Bild angenommen werden.

2.5.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zur Analyse von Chromosomenanomalien

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurde in der Art, wie sie heute verwendet wird, erstmals 1986 beschrieben und an menschlichen Chromosomen angewandt (Pinkel et al. 1986). Das Prinzip basiert auf der spezifischen Anlagerung von einzelsträngigen Nukleinsäuren an deren komplementäre DNA-Sequenz (Abb. 8).

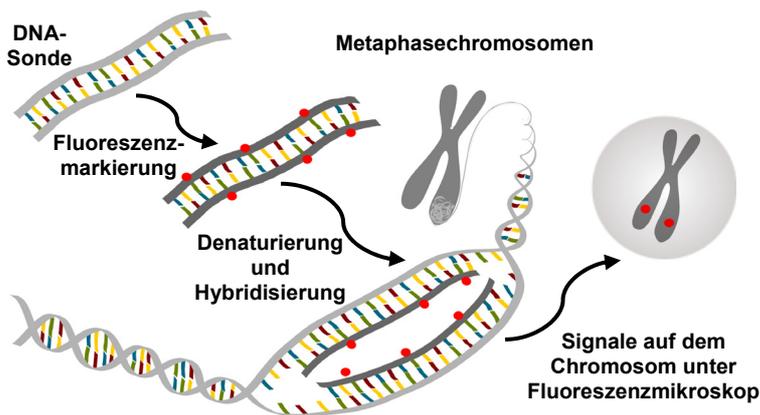


Abb. 8: Schematische Darstellung der FISH-Technik. Die DNA-Sonde wird fluoreszenzmarkiert. Anschließend werden die markierte Sonden-DNA und die Metaphasechromosomen denaturiert und hybridisiert. Bei Betrachtung der Chromosomen unter einem entsprechenden Fluoreszenzmikroskop sind fluoreszierende Signale zu detektieren [Abbildung modifiziert nach Smeets (2004)].

Für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung muss sowohl die Ziel-DNA (z.B. Metaphasechromosomen) als auch die zuvor fluoreszenzmarkierte Sonden-DNA (z.B. BAC- oder Fosmid-DNA) thermisch und chemisch denaturiert werden. Das Vorliegen der DNA-Einzelstränge ermöglicht die rekombinante Bindung der einzelsträngigen fluorochrommarkierten Sonde an die Ziel-DNA. Überschüssiges Sondenmaterial wird entfernt und zurück bleiben die spezifisch an die komplementäre Ziel-DNA gebundenen Sonden. Die Detektion der Hybridisierung erfolgt mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops und Bildverstärkungssoftware.

Das Auflösungsvermögen der FISH liegt mit etwa 10 bis 50 Kb (Liehr 2009) zwischen der Auflösung der DNA- und der Chromosomenanalyse (Volpi und Bridger 2008). Zu beachten ist, dass FISH nur Aufschluss über eine genetische Veränderung geben kann, wenn die passende Sonde ausgewählt wurde (Shaffer und Bejjani 2006).

In dieser Arbeit wurden die zytogenetisch kartierten Bruchpunktregionen der jeweiligen Translokation mittels serieller FISH eingegrenzt. Ziel war es, bruchpunktüberspannende Klone zu identifizieren. Ein solcher bruchpunktüberspannender Klon zeigt in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung sog. *split signals*. Er hybridisiert einerseits in dem für ihn kartierten Bereich auf dem Wildtyp-Chromosom, andererseits auf beiden rearrangierten [derivativen (der)] Chromosomen. Das Signal ist deshalb aufgespalten (Abb. 9).

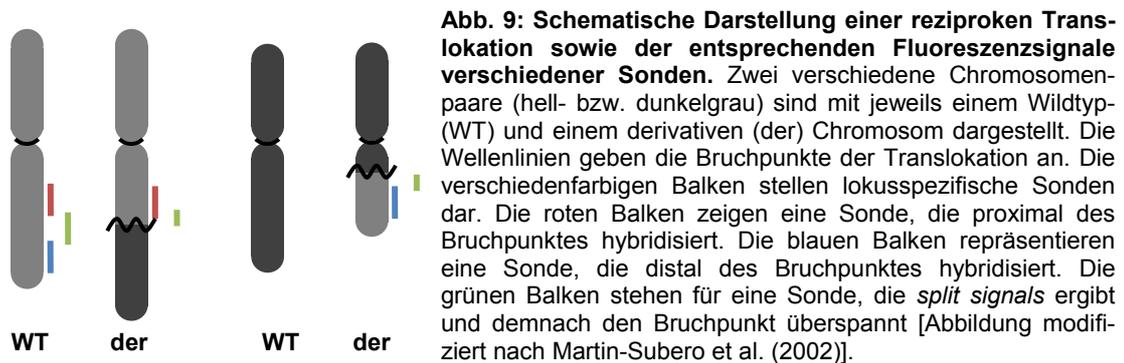


Abb. 9: Schematische Darstellung einer reziproken Translokation sowie der entsprechenden Fluoreszenzsignale verschiedener Sonden. Zwei verschiedene Chromosomenpaare (hell- bzw. dunkelgrau) sind mit jeweils einem Wildtyp-(WT) und einem derivativen (der) Chromosom dargestellt. Die Wellenlinien geben die Bruchpunkte der Translokation an. Die verschiedenfarbigen Balken stellen lokusspezifische Sonden dar. Die roten Balken zeigen eine Sonde, die proximal des Bruchpunktes hybridisiert. Die blauen Balken repräsentieren eine Sonde, die distal des Bruchpunktes hybridisiert. Die grünen Balken stehen für eine Sonde, die *split signals* ergibt und demnach den Bruchpunkt überspannt [Abbildung modifiziert nach Martin-Subero et al. (2002)].

Die Auswahl der für die FISH-Analysen eingesetzten DNA-Klone erfolgte zunächst anhand der zytogenetisch bestimmten Bruchpunktbereiche mithilfe von Datenbankrecherchen. War der Bruchpunkt durch distal und proximal hybridisierende BAC-Klone (Inserts von etwa 100-200 Kb) definiert, wurden Klone innerhalb dieses eingegrenzten Bereiches ausgewählt. Konnte ein bruchpunktüberspannender BAC-Klon identifiziert werden, so wurde zur Feinkartierung auf die Fosmid-Klone (Inserts von etwa 40 Kb) zurückgegriffen. Durch diese Vorgehensweise war eine relativ genaue Eingrenzung der Bruchpunkte möglich.

2.5.4 Suche nach Kandidatengenens mittels Datenbankrecherche

Für die Auswahl der aussichtsreichsten Kandidatengene sind bei der Datenbankrecherche insbesondere die folgenden Kriterien heranzuziehen (Banfi und Ballabio 2001):

1. Das Kandidatengenprodukt besitzt eine funktionelle Domäne, die mit einem biochemischen Defekt in Verbindung gebracht werden kann, der bei der Erkrankung identifiziert wurde oder vermutet wird.
2. Das Kandidatengen wird im entsprechenden Entwicklungsstadium oder im Gewebe, das durch die Erkrankung betroffen ist, exprimiert.
3. Das Kandidatengen ist ein Ortholog eines Gens, das mit einem ähnlichen Phänotyp in anderen Organismen (z. B. Maus, Zebrafisch, Drosophila, Hefe, usw.) assoziiert ist.

Folgende Abbildung gibt Aufschluss über wichtige Punkte, die zwischen dem Kandidatengen und der Erkrankung verglichen werden sollten:

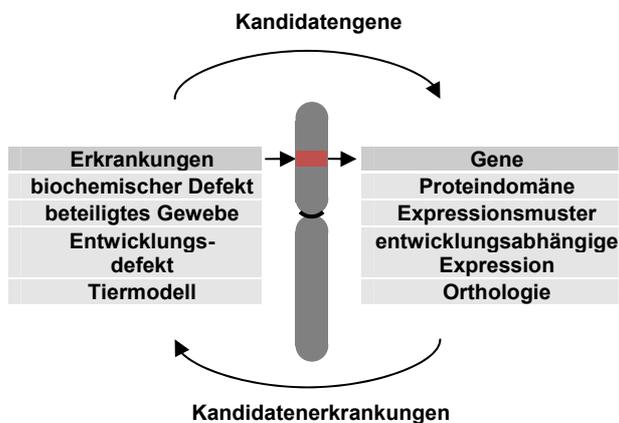


Abb. 10: Schematische Darstellung der Suche nach Kandidatengen. Wenn eine Erkrankung einer bestimmten chromosomalen Region zugeordnet werden kann, werden Gene aus dieser Region (rote Region) analysiert. Die Eigenschaften dieser Gene (rechte Spalte) werden mit den Eigenschaften der Erkrankung (linke Spalte) verglichen. Das Gen, dessen Eigenschaften das Erkrankungsbild am besten erklärt, wird dann als Kandidatengen deklariert [Abbildung modifiziert nach Ballabio (1993) bzw. Banfi und Ballabio (2001)].

Unabhängig davon, ob ein Gen direkt unterbrochen ist, müssen die Gene mit einer Entfernung zum Bruchpunkt von bis zu einer Megabase als potentielle Kandidatengene betrachtet und mithilfe der oben genannten Kriterien in Beziehung zur vorliegenden Erkrankung gesetzt werden. Für diese Gene könnte ein sog. Positionseffekt zutreffen.

2.5.5 Positionseffekte

Beim Vorliegen einer balancierten Translokation kann der Phänotyp entweder durch die direkte Unterbrechung eines Gens oder durch einen Positionseffekt bedingt sein. Chromosomale Rearrangements können zur Veränderung der Genumgebung führen, was sich in einer veränderten Expression widerspiegeln kann. Nach Kleinjan und van Heyningen (1998) ist ein Positionseffekt eine nachteilige Veränderung der Genexpression aufgrund einer Positionsveränderung des Gens in Bezug zur chromosomalen Umgebung.

Nach Kleinjan und van Heyningen (1998) können verschiedene Mechanismen zur veränderten Genexpression führen (Abb. 11):

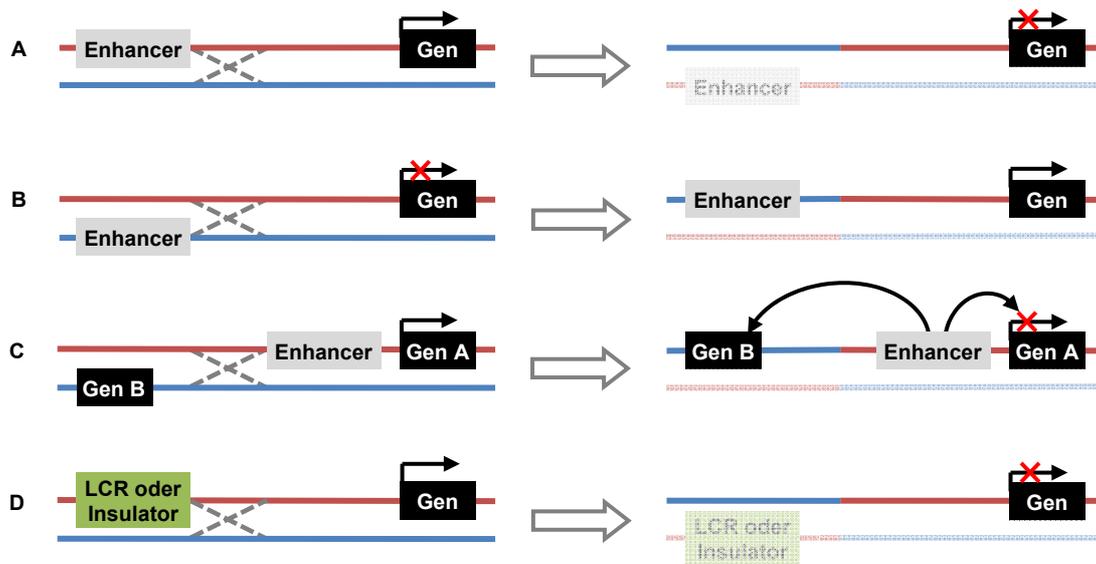


Abb. 11: Mögliche Mechanismen, die zu einem Positionseffekt führen können. Durch rote und blaue Balken sind jeweils Anteile von zwei Chromosomen dargestellt. Das schwarze Rechteck stellt ein Gen dar, das graue steht für ein Enhancer-Element. Das grüne Rechteck zeigt eine *locus control region* (LCR) bzw. einen Insulator. Die ursächliche Translokation wird durch ein gestricheltes graues Kreuz angedeutet. Der schwarze Pfeil symbolisiert die Transkription der Gene, der rot durchgestrichene Pfeil zeigt eine verringerte oder fehlende Transkription an. Rechts ist die funktionelle Auswirkung des chromosomalen Rearrangements auf einem derivativen Chromosom schematisch veranschaulicht. Der Ausschnitt des anderen derivativen Chromosoms ist aufgehellt. Die Beschreibung der Abbildungen A-D erfolgt im nachfolgenden Text [Abbildung modifiziert nach Kleinjan und van Heyningen (1998)].

- A. Eine Translokation führt zur Trennung von regulatorischer Einheit und Gen. Die Abwesenheit eines Enhancers kann zu einer verminderten oder fehlenden Transkription führen, während das Fehlen eines Silencers zu einer vermehrten Expression des Gens führen kann.
- B. Ein chromosomales Rearrangement fügt ein Gen mit der regulatorischen Einheit eines anderen Gens zusammen. Bei Beteiligung eines Enhancers resultiert daraus eine gesteigerte Expression des Gens, bei Beteiligung eines Silencers eine verminderte Expression.
- C. Bei einer Translokation wird ein Gen mit seiner regulatorischen Einheit in die Nähe eines anderen Gens platziert. Ein Wettbewerb um die regulatorische Einheit zwischen dem Krankheitsgen und einem zweiten Gen kann zu einer Verringerung der Expression führen.
- D. Eine Translokation führt zur Trennung von *locus control region* (LCR) bzw. Insulator und Gen. Die Abwesenheit einer LCR oder eines Insulators kann zur verminderten Expression eines Gens führen.

Die Expression vieler Gene wird durch sog. *cis*-regulatorische Elemente reguliert (Howard und Davidson 2004). Ein *cis*-regulatorisches Element ist definiert als DNA-Sequenz mit Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Zu den *cis*-regulatorischen Elementen gehören Enhancer, Silencer, Promotor, LCRs und Insulatoren (Jeziorska et al. 2009). Sie können stromauf- und/oder -abwärts eines Gens, innerhalb eines Introns der von ihnen regulierten Gene (Kleinjan und van Heyningen 2005), in Introns benachbarter Gene (Bulger und Groudine 2011) oder in einer kodierenden Sequenz liegen (Jeziorska et al. 2009). Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich bei regulatorischen Einheiten um nicht-kodierende, hochkonservierte DNA-Sequenzen [*highly conserved non-coding elements* (HCNEs)] handelt, die während der Evolution kaum verändert wurden und bei unterschiedlichen Säugetieren bzw. Wirbeltierklassen wiederzufinden sind. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, durch Vergleich von DNA-Sequenzen unterschiedlicher Spezies putative *cis*-regulatorische Elemente im Genom aufzuspüren (Kleinjan und van Heyningen 2005). *cis*-regulatorische Elemente können bis zu 1,5 Mb distal oder proximal von der Transkriptionseinheit entfernt liegen (Benko et al. 2009).

Bei bisher identifizierten Positionseffekten auf Krankheitsgene fällt auf, dass viele Gene eine Schlüsselrolle bei der Determination und Differenzierung von Geweben und Organen spielen (Kleinjan und van Heyningen 2005). Es kann hilfreich sein, dies bei der Auswahl von Kandidatengenomen als zusätzliches Kriterium zu berücksichtigen.

2.5.6 Bestätigung des Kandidatenkrankheitsgens mittels Mutationsanalyse

Sobald ein Kandidatengen bestimmt ist, sind weitere Untersuchungen erforderlich, um festzustellen, ob Mutationen dieses Gens tatsächlich die vorliegende Krankheit verursachen (Banfi und Ballabio 2001). Für die Suche nach Mutationen erfolgt die Rekrutierung von Patienten mit ähnlichem Phänotyp, jedoch unauffälligem Karyotyp. Mittels DNA-Sequenzierung können Mutationen, wie Nonsense- oder Missense-Mutationen detektiert werden. Der Nachweis von *de novo* Mutationen bei Patienten ist ein wichtiger Hinweis auf ihre ursächliche Rolle bei einer Krankheit (Robinson et al. 2011). Die Identifizierung von Mutationen bei mehreren nicht verwandten Betroffenen weist stark darauf hin, dass das richtige Kandidatengen ausgewählt wurde. Um die Möglichkeit eines Polymorphismus auszuschließen, soll, wenn möglich, sichergestellt werden, dass die Variation mit dem Krankheitsphänotyp in den Familien segregiert und/oder in einer signifikanten Stichprobe von gesunden Individuen fehlt (Strachan und Read 2011).

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Allen sechs untersuchten Patienten mit unterschiedlichen reziproken Translokationen ist gemeinsam, dass bei ihnen eine Intelligenzminderung vorliegt. Zusätzlich sind bei zwei der Patienten eine Epilepsieerkrankung bzw. epileptische Anfälle bekannt.

3.2 Klone

Klone sind DNA-Fragmente, die durch gentechnische Verfahren von einem Spender- in einen Empfängerorganismus mit Vektoren, Plasmiden oder Phagen übertragen wurden und beliebig vervielfältigt werden können (Pschyrembel und Witzel 2011). In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Arten von Klonen – BAC- und Fosmid-Klone – verwendet, die im Folgenden beschrieben werden:

3.2.1 BAC-Klone

Die hier verwendeten BAC-Klone wurden von *Invitrogen* (Karlsruhe), von *imaGenes* (Berlin) sowie von *BACPAC Resources Center* (CHORI) (Oakland, Kalifornien, USA) bezogen. Es wurden zwei Arten von BAC-Klonen verwendet. Zum einen wurden BAC-Klone mit der Anfangsbezeichnung „RP11-“ eingesetzt, deren kloniertes DNA-Material aus den Lymphozyten eines Mannes stammt. Die BAC-Inserts sind ungefähr 178 Kb groß (Osoegawa et al. 2001) und wurden in den Vector pBACe3.6 kloniert. Diese Klone sind in der Bibliothek *RPCI-11 Human Male BAC Library* des *Roswell Park Cancer Institute* erfasst. Zum anderen wurden einige BAC-Klone mit der Anfangsbezeichnung „CTD-“ verwendet. Das klonierte Material dieser Klone entstammt menschlichen Spermazellen. Die Größe der BAC-Inserts beträgt durchschnittlich 129 bis 202 Kb. Diese DNA-Fragmente wurden in den Vektor pBeloBAC11 kloniert. Sie sind in der *Cal Tech D* (CTD) Bibliothek des *California Institute of Technology* erfasst.

Die Angaben über die Klone beziehen sich auf die *Feb. 2009 (hg19) Assembly* der Datenbank *UCSC Human Genome Browser*. Die Daten des Klons, der mit einem Stern (*) versehen wurde, beziehen sich auf *Mar. 2006 (hg18) Assembly* der Datenbank *UCSC Human Genome Browser*.

BAC-Klon (cen→ tel)	Accession- Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
RP11-1104F7	AQ678146 AQ685502	2q13	110606484	111280177	Invitrogen
RP11-404O21*	AC123886	2q13	111008549	111171002	Invitrogen
RP11-625K21	AQ403750 AQ403832	2q13	111382274	111551451	Invitrogen
CTD-2533J6	AQ357615 AQ357616	2q13	111398458	111598891	Invitrogen
RP11-281B16	AQ507581 AQ507584	2q13	111460788	111668852	BACPAC
RP11-1018O23	AQ826038 AQ834649	2q13	111581778	111778604	BACPAC
CTD-3047O5	AQ099203 AQ126947	2q13	111670565	111821555	Invitrogen
RP11-957C9	AQ669848	2q14.2	119670025	119839181	Invitrogen
RP11-960L12	AQ743167 AQ739672	2q14.2	120068047	120239040	Invitrogen

Tab. 3: Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 2. Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

BAC-Klon (cen→ tel)	Accession- Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
RP11-238I10	AC025366	8q23.2	111606505	111713050	Invitrogen
RP11-946L20	AQ599989 AQ571568	8q23.2-8q23.3	111918470	112118729	Invitrogen
RP11-237I17	AQ485782 AQ485784	8q23.3	112543051	112705268	Invitrogen
RP11-36C1	AQ047300 AQ047290	8q23.3	113024942	113179991	Invitrogen
RP11-3A12	B48714 B48713	8q23.3	113177323	113328086	BACPAC
RP11-577G6	AQ333312 AQ332936	8q23.3	113258343	113447437	BACPAC
RP11-784N7	AQ492728 AQ492636	8q23.3	113387186	113542972	BACPAC
RP11-911F14	AQ569290 AQ563369	8q23.3	113578766	113751065	BACPAC
RP11-299J14	AQ506247 AQ506245	8q23.3	113799572	113966562	BACPAC
RP11-261F23	AQ484629 AQ484630	8q23.3	113994495	114171287	BACPAC
RP11-709P2	AQ615395 AQ518891	8q23.3	114261942	114432496	BACPAC
RP11-644M14	AQ400421 AQ402093	8q23.3	114453783	114630326	BACPAC
RP11-67H2	AQ198899 AZ518981	8q23.3	114575727	114723309	BACPAC
RP11-47H9	AQ200607 AQ200603	8q23.3	114721569	114877497	BACPAC
RP11-928D21	AQ570289 AQ565043	8q23.3	114726708	114895106	BACPAC
RP11-1140O6	AQ707235 AQ721249	8q23.3	114870261	115010644	BACPAC

Tab. 4: Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 8. Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

BAC-Klon (cen→ tel)	Accession- Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
RP11-784G11	AQ661711 AQ520242	9p23	9849208	10022778	BACPAC
RP11-1079C4	AQ745243 AQ740008	9q31.1	104550130	104748879	BACPAC
RP11-24A5	AQ014405 AQ014402	9q31.1	104713899	104891850	BACPAC
RP11-282B23	AQ505199 AZ519609	9q31.1	104891858	105078723	BACPAC
RP11-779O7	AQ495135 AQ756068	9q31.1	105078960	105281188	BACPAC
RP11-98J6	AQ320296 AQ320299	9q31.1	105201196	105371922	BACPAC
RP11-165A2	AQ381274 AQ381272	9q31.1	105356876	105518407	BACPAC
RP11-940E14	AQ691349 AQ810588	9q31.1	105629338	105807783	BACPAC
RP11-589C15	AQ337017 AQ335332	9q31.1	105792041	105979462	BACPAC
RP11-469P24	AQ630849 AQ630847	9q31.1	105947055	106128260	BACPAC
RP11-454A13	AQ586842 AQ586844	9q31.1	106749702	106964737	BACPAC
RP11-353D23	AQ534075 AQ534073	9q31.1	107923523	108112813	Invitrogen
RP11-722E1	AQ513471 AQ462177	9q31.2	108241152	108417000	Invitrogen
RP11-796L3	AQ664574 AQ492553	9q31.2	108438076	108624579	Invitrogen
RP11-633N4	AQ408079 AQ455773	9q31.2	108828231	109015101	Invitrogen

Tab. 5: Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 9. Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

BAC-Klon (cen→ tel)	Accession- Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
RP11-435I8	AQ585709 AQ553556	13q14.3	53208221	53411663	Invitrogen
RP11-431O22	B46445 B46446	13q14.3	53270611	53399430	Invitrogen
RP11-722C3	AQ513461 AQ462166	13q14.3	53362183	53562077	Invitrogen
RP11-778G13	AQ461422 AQ514431	13q14.3	53501270	53684283	Invitrogen
RP11-285E18	CL423194 CL423199	13q22.1	75056163	75213778	Invitrogen
RP11-157E11	AQ371495 AQ371497	13q22.1	75204052	75377588	Invitrogen
RP11-138N13	AL139375	13q22.2	75413894	75560501	Invitrogen

Tab. 6: Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 13. Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

BAC-Klon (cen→ tel)	Accession- Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
RP11-631H1	AQ403547 AQ441657	14q32.13	95614020	95817666	Invitrogen
RP11-892D10	AQ792749 AQ819436	14q32.13	95802370	96000338	Invitrogen
RP11-1070N10	AL133467	14q32.13	95962930	96163942	imaGenes
RP11-46J12	AQ203023 AQ203021	14q32.13- 14q32.2	96144718	96313167	BACPAC
RP11-952P19	AQ600690 AQ711731	14q32.13- 14q32.2	96222301	96414694	BACPAC

Tab. 7: Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 14. Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

BAC-Klon (cen→ tel)	Accession- Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
RP11-379D8	AQ533330 AQ533333	15q26.3	99161666	99357963	Invitrogen
RP11-114G13	AQ344801 AQ344798	15q26.3	99296945	99494077	Invitrogen
RP11-802L22	AQ752981 AQ556371	15q26.3	99417132	99596407	Invitrogen
RP11-1025G10	AQ670696 AQ679680	15q26.3	99517802	99691978	Invitrogen
RP11-104D18	AQ314536 AQ314534	15q26.3	99568082	99734354	Invitrogen
RP11-867D13	AQ827021 AQ815418	15q26.3	99691983	99878162	Invitrogen

Tab. 8: Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 15. Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

BAC-Klon	Accession- Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
RP11-77E6	AQ286860 AQ286861	16p13.2	9902439	10067702	Invitrogen

Tab. 9: Verwendeter BAC-Klon für das Chromosom 16. Die Bezeichnung des BAC-Klons sowie die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem dieser Klon bezogen wurde, ist angegeben.

BAC-Klon (cen→ tel)	Accession- Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
RP11-663N22	AQ611747 AQ511371	17q11.1	25363058	25571606	imaGenes
RP11-1145F2	AQ751952 AQ741897	17q11.2	25987738	26166999	imaGenes
RP11-449M14	AQ584090 AQ584086	17q11.2	26493411	26671285	imaGenes
RP11-348E14	AQ527842 AQ527844	17q11.2	26549762	26756633	BACPAC
RP11-915B21	AQ563877 AQ622757	17q11.2	26751807	26892561	BACPAC
RP11-832J20	AQ816491 AQ827145	17q11.2	27100014	27311847	BACPAC
RP11- 1007K22	AQ821749 AQ727060	17q11.2	28297065	28524093	BACPAC
RP11-1095J4	AQ697233 AQ682512	17q11.2	29603293	29850050	BACPAC

Tab. 10: Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 17. Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

BAC-Klon (cen→ tel)	Accession- Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
RP11-322B4	AQ537185	Xq25	121802724	121976937	Invitrogen
RP11-235J12	AQ478497 AQ478496	Xq25	122057223	122231741	Invitrogen
RP11-689O13	AQ511698 AQ406984	Xq25	122210828	122370585	Invitrogen
RP11-898G24	AQ835438 AQ835548	Xq25	122350698	122529099	Invitrogen
RP11-722M13	AQ513519 AQ462225	Xq25	122526584	122694309	BACPAC
RP11-803B16	AQ525536 AQ525235	Xq25	122605667	122775206	BACPAC
CTD-3168N18	AQ169731 AQ169534	Xq25	122800626	122942041	Invitrogen
RP11-60E17	AQ200987 AQ200989	Xq25	122942061	123087992	imaGenes
RP11-91F16	AQ285124 AQ285121	Xq25	123203647	123379846	imaGenes
RP11-434C8	AQ584566 AQ551454	Xq25	123284922	123457877	imaGenes
RP11-411L7	AQ552760 AQ552763	Xq25	123477227	123615888	BACPAC
RP11-103K12	AQ312431 AQ312428	Xq25	123664657	123845380	BACPAC

Tab. 11: Verwendete BAC-Klone für das Chromosom X. Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

3.2.2 Fosmid-Klone

Die Fosmid-Klone stammen aus der Bibliothek *WIBR-2* und wurden vom *BACPAC Resources Center* (Oakland, Kalifornien, USA) bezogen. Die Inserts dieser Klone sind mit ungefähr 40 Kb deutlich kleiner als die der BAC-Klone. Die DNA-Fragmente

stammen aus Lymphozyten einer Frau und wurden in den Vektor pEpiFOS5 kloniert. Die Bezeichnung vom Fosmid-Klonen beginnt mit „G248P8“.

Die angegebene Lokalisation mit Accession-Number, zytogenetischer Bande, Anfang und Ende bezieht sich auf die *Feb. 2009 (hg19) Assembly* der Datenbank *UCSC Human Genome Browser*.

Fosmid-Klon (cen→ tel)	Accession-Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
G248P85743F1	G248P85743RF1 G248P85743FF1	2q14.2	120090209	120133851	BACPAC
G248P84441D8	G248P84441FD8 G248P84441RD8	2q14.2	120121234	120160687	BACPAC
G248P89132D5	G248P89132RD5 G248P89132FD5	2q14.2	120145615	120183056	BACPAC
G248P8214B5	G248P8214FB5 G248P8214RB5	2q14.2	120157585	120198857	BACPAC
G248P87631G11	G248P87631FG11 G248P87631RG11	2q14.2	120216302	120254275	BACPAC

Tab. 12: Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 2. Die Fosmid-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

Fosmid-Klon (cen→ tel)	Accession-Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
G248P80470G2	G248P80470FG2 G248P80470RG2	9q31.1	105077715	105119057	BACPAC
G248P85834F8	G248P85834RF8 G248P85834FF8	9q31.1	105087374	105123376	BACPAC
G248P87537F5	G248P87537FF5 G248P87537RF5	9q31.1	105121884	105160010	BACPAC
G248P89573G3	G248P89573FG3 G248P89573RG3	9q31.1	105161165	105199654	BACPAC
G248P81471E2	G248P81471FE2 G248P81471RE2	9q31.1	105171609	105213490	BACPAC
G248P8307A3	G248P8307FA3 G248P8307RA3	9q31.1	105199008	105239572	BACPAC
G248P84563D12	G248P84563RD12 G248P84563FD12	9q31.1	105221098	105259176	BACPAC
G248P8396H6	G248P8396FH6 G248P8396RH6	9q31.1	105248246	105292339	BACPAC
G248P86150D2	G248P86150RD2 G248P86150FD2	9q31.1	107893840	107933417	BACPAC
G248P84730F7	G248P84730RF7 G248P84730FF7	9q31.1	107924586	107965550	BACPAC
G248P88388C6	G248P88388RC6 G248P88388FC6	9q31.1	107945583	107985136	BACPAC
G248P86675H3	G248P86675RH3 G248P86675FH3	9q31.1	107976738	108020173	BACPAC

Tab. 13: Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 9. Die Fosmid-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

Fosmid-Klon (cen→ tel)	Accession-Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
G248P86680B7	G248P86680FB7 G248P86680RB7	13q14.3	53287492	53328310	BACPAC
G248P87522D8	G248P87522RD8 G248P87522FD8	13q14.3	53310336	53347629	BACPAC
G248P81955E7	G248P81955RE7 G248P81955FE7	13q14.3	53332118	53374320	BACPAC
G248P87663A5	G248P87663FA5 G248P87663RA5	13q14.3	53363211	53405999	BACPAC
G248P85543H7	G248P85543FH7 G248P85543RH7	13q14.3	53391568	53435134	BACPAC

Tab. 14: Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 13. Die Fosmid-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

Fosmid-Klon (cen→ tel)	Accession-Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
G248P89849D1	G248P89849FD1 G248P89849RD1	15q26.3	99510487	99549199	BACPAC
G248P86056G6	G248P86056FG6 G248P86056RG6	15q26.3	97349070	97387322	BACPAC
G248P87669A11	G248P87669FA11 G248P87669RA11	15q26.3	99556281	99599109	BACPAC

Tab. 15: Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 15. Die Fosmid-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

Fosmid-Klon (cen→ tel)	Accession-Number	Zytogenetische Bande	Lokalisation auf dem Chromosom		Lieferfirma
			Anfang [Bp]	Ende [Bp]	
G248P81921A8	G248P81921FA8 G248P81921RA8	17q12	33632145	33675485	BACPAC
G248P80628F7	G248P80628RF7 G248P80628FF7	17q12	33689442	33729465	BACPAC
G248P84939H3	G248P84939RH3 G248P84939FH3	17q12	33723024	33760925	BACPAC
G248P85774A8	G248P85774FA8 G248P85774RA8	17q12	33754655	33796986	BACPAC

Tab. 16: Verwendete Fosmid-Klone für das Chromosom 17. Die Fosmid-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) sortiert. Angegeben ist die entsprechende Accession-Number, die zytogenetische Bande, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

3.3 Kits, Enzyme und Nukleinsäuren

CGH Nick Translation Kit	Abbott (Wiesbaden)
DNA-Standard (1 Kb-Leiter)	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
Exonuclease I, <i>E.coli</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
FastDigest® <i>EcoRI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Humane Cot-1 DNA [1 mg/ml]	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Nick Translation Enzymmix (DNase I, DNA Pol I)	Abbott (Wiesbaden)
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Nukleotidmix (dNTPs) (je 10 mM)	Abbott (Wiesbaden)
Vysis SpectrumGreen-dUTP	Abbott (Wiesbaden)
Vysis Spectrum Red-dUTP	Abbott (Wiesbaden)

3.4 Chemikalien und Lösungsmittel

Agar (Select)	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dextransulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe)
Fixogum	Marabu (Tamm)
Formamid, deionisiert	Qbiogene (Heidelberg)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Oxoid (Wesel)
high performance liquid chromatography (HPLC)	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	J.T. Baker (Deventer, NL)
Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)
2-Propanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)

3.5 Puffer, Medien und Lösungen

3.5.1 Medien für molekularbiologische Arbeiten

LB-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Natriumchlorid
	ad 1000 ml	Aqua dest.
	pH	7,0
Agar für Festmedien	15 g/l	Agar
TE-Puffer	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris-HCl
	pH	7,8
Chloramphenicol	1 ml für 1 l	Stock: 50 mg/ml (in 100% Ethanol)

3.5.2 Medien für zellbiologische Arbeiten

RPMI 1640-Medium + L-Glutamine	Invitrogen (Karlsruhe)
Fötales Rinderserum (FBS)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)

3.5.3 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

10x TBE	890 mM	Tris
	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
	pH	8,0
10x Ladepuffer für DNA	25 ml	Glycerin (100%)
	25 ml	1x TBE
	20 mg	Orange-G
Ethidiumbromid	0,05%	(in Aqua dest.)

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

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

3.5.5 Sonstige Puffer

10x Nick Translationspuffer	500 mM	Tris-HCl (pH 7.2)
	100 mM	MgSO ₄
	1 mM	DTT

Restriktionspuffer "FastDigest [®] "	Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionspuffer "FastDigest [®] " Green Buffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionspuffer „Multi-Core™“	Promega (Mannheim)

3.6 Verbrauchsmaterial und Gerätschaften

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Agarplatten	Sarstedt (Nürnbrecht)
Deckgläser	Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Einmal-Impfösen	Greiner Bio-One (Frickenhäusen)
Falcon Pipette 10 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
Falcon Pipette 25 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
Falcon Pipette 5 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
Micro Tubes 1,5 ml	Sarstedt (Nürnbrecht)
Objektträger	Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Objektträger Assistant Elka	Glaswarenfabrik Karl Hecht (Sondheim)
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik (Oldenburg)
Pipettenspitze 1000 µl	Sarstedt (Nürnbrecht)
Pipettenspitze 200 µl	Gilson (Middleton, Wisconsin, USA)

Rundbodenröhrchen 14 ml Falcon	Becton Dickinson (Heidelberg)
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) Burlingame, Kalifornien, USA)
Zellkulturflaschen T-75	Sarstedt (Nürnberg)
Zellkulturflaschen T-25	Sarstedt (Nürnberg)
Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden 15 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden 50 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Gerät	Hersteller
Autoklav	Tecnomara (Fernwald)
CO2 Water-Jacketed Incubator	NuAire Laboratory Equipment Supply (Plymouth, Minnesota, USA)
Digitalkamera	Olympus Europa (Hamburg)
Drucker Digital Graphic Printer UP-D895	Sony (Tokio, Japan)
Eismaschine HOSHIZAKI FM-1200E	Hoshizaki Europe B.V. (Amsterdam, Niederlande)
Eismaschine Scotsman AF-10	Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, Illinois, USA)
Fluoreszenz-Mikroskop „Leica DM RA“	Leica Microsystems (Wetzlar)
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories (München)
Heizblock (Typ: 50126101)	Gebr. Liebisch Labortechnik (Bielefeld)
Heizblock (Typ: 52526101)	Gebr. Liebisch Labortechnik (Bielefeld)
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf (Hamburg)
Inkubator Certomat® H B.Braun Biotech International	B. Braun Melsungen (Melsungen)
Inkubator Multitron Infors HT AG CH-4103	Infors (Bottmingen/Basel, Schweiz)
Inkubator Shaker Model G25	New Brunswick Scientific (Edison, New Jersey, USA)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Kunststoff-Tubes Falcon	Becton Dickinson (Heidelberg)
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke (Staufen i. Br.)
PIPETBOY acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten Finnpipetten	Thermo LabSystems (Dreieich)
Refrigerated Vapor Trap RVT 400	Savant Instruments (Farmingdale, New York, USA)
Schüttelapparat GFL 3006	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Spannungsgeber Electrophoresis power supply ST305	Life Technologies (Darmstadt)
Spannungsgeber <i>Power Pac 300</i>	Bio-Rad Laboratories (München)
SpeedVac® Plus SC110A	Savant Instruments (Farmingdale, New York, USA)
Sterilwerkbank HERA safe Typ 12/2, 1995	Heraeus (Hanau)
Sterilwerkbank Heraeus LaminAir Instruments HB 2448K	Heraeus (Hanau)
Sterilwerkbank Lamin Air® Instruments HB 2448 K	Heraeus (Hanau)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf (Hamburg)
Thermostat 5320 eppendorf	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge „Biofuge Pico“	Heraeus (Hanau)
UV-Transilluminator <i>UVT-28M</i>	Herolab (Wiesloch)
Vortex-Gerät „Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000“	Scientific Industries (Bohemia, New York, USA)
Waage „Sartorius ISO 9001“	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad „GFL 1083“	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Wasserbad Memmert	Memmert (Schwabach)
Vortex-Gerät „Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000“	Scientific Industries (Bohemia, New York, USA)
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)

3.7 Datenbanken und Computerprogramme

Datenbank	Organisation	Anwendungen	Internetadresse
MapView	NCBI (National Center for Biotechnology Information)	Auswahl der BAC- und Fosmid-Klone für FISH und physikalische Zuordnung	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&query=
Genome Browser	UCSC (University of California, Santa Cruz)	Auswahl der BAC- und Fosmid-Klone für FISH und physikalische Zuordnung	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway
PubMed	NCBI (National Center for Biotechnology Information)	Literaturrecherche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
VISTA Enhancer Browser	Lawrence Berkeley National Laboratory	Suche nach möglichen regulatorischen DNA-Elementen	http://enhancer.lbl.gov/
Database of Genomic Variants	The Centre for Applied Genomics	Recherche bezüglich <i>copy number variations</i>	http://projects.tcag.ca/variation/
Decipher (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources)	Wellcome Trust Sanger Institute	Recherche bezüglich Imbalancen, die mit Krankheitsphänotypen assoziiert sind	http://decipher.sanger.ac.uk
NCBI Genome Remapping Service	NCBI (National Center for Biotechnology Information)	Umrechnung von Positionsangaben von Array-CGH-Ergebnissen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/remap/

Tab. 17: Verwendete Datenbanken. Angegeben sind die Datenbank, die verantwortliche Organisation, der Anwendungsbereich sowie die Internetadresse.

Computerprogramm	Anwendung
Cytovision Applied Imaging (Grand Rapids Charter Township, Michigan, USA)	Dokumentation und Bearbeitung von Fluoreszenzaufnahmen
DIGI CAM Digital Camera Control	Dokumentation von Agarosegelen

Tab. 18: Verwendete Computerprogramme. Angegeben ist das Computerprogramm sowie die Anwendungsbereiche.

3.8 Zellbiologische Methoden

3.8.1 Lymphoblastoide Zellen

In Rahmen dieser Arbeit wurden humane immortalisierte B-Lymphozyten (Lymphoblastoide) kultiviert, deren Immortalisierung auf der Transformation mit Teilen des Epstein-Barr Virus (EBV)-Genoms beruht (Miller *et al.* 1971).

Kulturbedingungen von lymphoblastoiden Zellen

Die Zellen wurden in – mit 20% FBS (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) supplementiertem – RPMI 1640-Medium (+L-Glutamin) als Suspension kultiviert. Dafür wurden die Kulturflaschen T-25 und T-75 verwendet. Die Inkubation erfolgte im Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% relativer Feuchtigkeit und 5% CO₂. Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Der Wechsel des Mediums wurde bei Farbumschlag des Indikators nach gelb oder spätestens nach drei Tagen durchgeführt.

Auftauen von lymphoblastoiden Zellen

Die Langzeitlagerung von lymphoblastoiden Zellen erfolgte bei -150°C. Aufgetaut wurden diese Zellen für 15 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde die Suspension in 10 ml vorgewärmtes (37°C) Kulturmedium [RPMI 1640-Medium mit 20% FBS (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin (v/v)] aufgenommen und in 15 ml Falcons gegeben. Um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen, wurde die Suspension für 4 Min. bei 900 Upm zentrifugiert, das überstehende Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischem, vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine T-25 Zellkulturflasche überführt.

Passagieren von lymphoblastoiden Zellen

Um Chromosomenpräparate für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen herzustellen, mussten lymphoblastoide Zellen solange kultiviert werden, bis eine ausreichende Dichte (~10⁶ Zellen/ml) und Menge erreicht war. Zum Passagieren wurden die Zellen abzentrifugiert (900 Upm, 4 min), der Überstand abgesaugt und die Zellen in der doppelten Menge auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen. Die Suspension wurde dann auf zwei Zellkulturflaschen verteilt.

3.8.2 Blutkulturen

Bei der Kultivierung und Aufarbeitung von Blutkulturen wurden 0,3 ml heparinisiertes Venenblut in ein Kulturröhrchen mit 10 ml fertiger Nährlösung, die Phytohämatoglutinin als Stimulanz für die Zellteilung der Lymphozyten enthält, gegeben. Der Inhalt des Röhrchens wurde gut gemischt und für 72 Std. bei 37°C inkubiert.

3.8.3 Ernten der lymphoblastoiden Zellen bzw. Blutkulturen

Den angesetzten Blutkulturen bzw. den lymphoblastoiden Zellkulturen wurden 0,2 ml Colcemid hinzugegeben. Dieses diente als synthetisches Analog zu Cholchizin der Arretierung der Metaphasen oder Prämetaphasen. Danach wurden die Kulturröhrchen gut geschüttelt und für 45 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie 10 Min. bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Den sedimentierten Kulturen wurde unter Schütteln jeweils 7 ml 37°C warme KCl-Lösung tropfenweise hinzugegeben. Die Kulturen wurden dann für 13 Min. bei 37°C inkubiert. Im Folgenden wurden einige Tropfen Fixativ – bestehend aus drei Teilen Ethanol und einem Teil Eisessig – dazugegeben und gevortext. Die Kulturröhrchen wurden sodann erneut für 10 Min. bei 1000 Upm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Auf dem Rüttler wurden weitere 6 ml eiskalte Fixativ-Lösung tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurde das Röhrchen wieder für 10 Min. bei 1000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde noch zwei Mal mit Fixativ gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde so lange Fixativ abgesaugt, bis das aufgeschüttelte Sediment eine leichte Trübung zeigte. Die Suspension wurde kalt gestellt.

Zur Kontrolle der Quantität und Qualität der Ernte wurden ca. 80 µl der Suspension auf einen entfetteten und in Aqua dest. gespülten Objektträger aus ca. 40 cm Höhe aufgetropft und im Wärmeschrank bei ca. 80°C getrocknet. Der Objektträger mit den aufgetropften Chromosomen konnte nun unter dem Mikroskop beurteilt werden.

3.9 Molekularbiologische Methoden

3.9.1 Anzucht von Bakterien

Nach Eintreffen der ausgewählten Klone wurde ein Drei-Ösenausstrich auf Agarplatten, die Chloramphenicol enthielten, vorgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kultivierung der *E.coli* Bakterien für eine Midipräparation erfolgte durch Animpfen von 2 ml LB-Medium und 2 µl Chloramphenicol mit einer Einzelkolonie als Vorkultur für mindestens 6 Std. in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 200 Upm. Damit wurde anschließend 200 ml LB-Medium mit 200 µl Chloramphenicol angeimpft und über Nacht ebenfalls bei 220 Upm und 37° in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Diese Kultur wurde dann bei 6000 Upm für 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet stand zur DNA-Isolierung zur Verfügung.

3.9.2 Midipräparation von BAC- und Fosmid-DNA aus *E.coli*

Die Midipräparation zur Isolierung reiner BAC- und Fosmid-DNA für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurde mithilfe des *NucleoBond® Xtra Midi Kits* (Machery-Nagel) vorgenommen. Folgende Arbeitsschritte wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt: Zunächst wurden die Bakterien lysiert. Anschließend erfolgte eine Immobilisierung der DNA an einer Anionenaustauschersäule und die Entfernung der Proteine und der RNA durch Waschen mit einer schwach konzentrierten Salzlösung. Dann erfolgte die Elution der immobilisierten DNA mit einer hoch konzentrierten Salzlösung und die Präzipitation der isolierten DNA mit Isopropanol. Schließlich wurden die DNA-Pellets in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und die Lösung bei -20°C gelagert.

3.9.3 Restriktionsanalyse von DNA

Um die Qualität und Quantität der bei der Midipräparation isolierten DNA zu überprüfen, wurden Restriktionsanalysen mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* durchgeführt (Smith und Birnstiel 1976). Dieses Enzym gehört zu den Typ-II-Endonukleasen. Es erkennt und schneidet eine spezifische, palindromische Sequenz, wodurch sog. *sticky ends* entstehen.

Reaktionsansatz für <i>EcoRI</i>	
3 µl	DNA
2 µl	BSA (10x)
2 µl	Puffer (10x)
1 µl	<i>EcoRI</i> (6 U)
12 µl	HPLC-H ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

Reaktionsansatz für <i>Fast Digest EcoRI</i>	
3 µl	DNA
2 µl	BSA (10x)
2 µl	Puffer (10x)
0,5 µl	<i>EcoRI</i> (6 U)
12,5 µl	HPLC-H ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

Es wurden *EcoRI*-Enzyme der Hersteller *Promega* und *Fermentas* verwendet, die sich in der Anwendung voneinander unterscheiden. Bei der Verwendung des *EcoRI* von *Promega* wurde der dazugehörige Puffer Multi-Core™ (10x) eingesetzt. Der Ansatz wurde für 90 Min. bei 37°C im Heizblock inkubiert und anschließend mit 5 µl Orange G-Ladepuffer versetzt.

Beim FastDigest® *EcoRI* von *Fermentas* wurde der dazugehörige FastDigest® Puffer oder der Green Puffer verwendet. Die Inkubation erfolgte für 5 Min. bei 37°C im Heizblock. Während bei Verwendung des FastDigest® Puffers ebenfalls der Orange G-Ladepuffer hinzugefügt werden musste, konnte bei Verwendung des FastDigest® Green Puffers die Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.9.4) sofort vorgenommen werden.

Zur Restriktionsanalyse mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurde das Gel in beiden Fällen mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Anhand der Bandenstärke ließen sich die Menge und die Qualität der vorhandenen DNA abschätzen (siehe 4.1).

3.9.4 Agarose-Gelelektrophorese

Prinzip und Durchführung

Die Gelelektrophorese diente der Auftrennung fragmentierter DNA bzw. der Darstellung von PCR-Produkten. Innerhalb eines elektrischen Feldes wandert die negativ geladene DNA zum positiv geladenen Pol. Weil kleine Fragmente im elektrischen Feld schneller durch die Poren des Gels wandern als große, ist die Laufstrecke eines DNA-Fragments im Gel umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts. Dadurch ermöglicht die Agarose-Gelelektrophorese die Auftrennung von Fragmenten mit einer Größe von unter 20 Kb. Zur optimalen Darstellung werden für kleine DNA-Fragmente Gele mit viel Agarose und für große Fragmente Gele mit weniger Agarose eingesetzt.

Für die Herstellung eines 0,8%-igen Agarosegels für die Auftrennung fragmentierter DNA wurde zunächst die entsprechende Menge Agarose von 1,04 g in 130 ml Elektrophoresepuffer (1xTBE) aufgekocht. Anschließend wurde der auf ungefähr 50°C abgekühlte Ansatz in den mit Kämmen bestückten Gelschlitten gegossen. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Gels wurden die Kämmen wieder entfernt, wodurch Geltaschen entstanden.

In der Elektrophoresekammer wurde der Gelschlitten mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Anschließend wurden die Geltaschen mit einem Gemisch aus dem Restriktionsprodukt und dem Ladepuffer, der die optische Kontrolle der Elektrophorese

erlaubt, sowie einer 1 Kb-Leiter als Referenz beladen. Die angelegte Spannung und die Laufzeit sind von der Größe der zu trennenden Produkte abhängig. Für BAC-DNA als große DNA-Fragmente wurde eine Spannung von 120 V für die Dauer von 2,5 Std. angelegt.

Auswertung des Gels

Um die Auswertung vorzunehmen, wurde das Agarosegel nach Abschluss der Elektrophorese für ca. 20 Min. in einer 0,05%-igen Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und weitere 10 Min. gewässert.

Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare und leuchtet nach Anregung durch UV-Licht rot. Dadurch ist eine Analyse der PCR-Produkte bzw. Restriktionsfragmente unter UV-Durchleuchtung (312 nm) möglich. So kann die Größe von Fragmenten durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen Längenstandard abgeschätzt werden. Die Dokumentation erfolgte mit dem *DIGI CAM Digital Camera Control*-Programm.

3.9.5 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Herstellung der Chromosomenpräparate

Die für die FISH-Analysen verwendeten Chromosomenpräparate wurden gemäß dem Protokoll aus *Current Protocols in Human Genetics* (Dracopoli und Haines 1994) entweder aus heparinisiertem, peripherem Blut oder lymphoblastoiden Zellen hergestellt (siehe 3.8).

Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Für die Hybridisierung mit den DNA-Sonden mussten die Chromosomen einzelsträngig vorliegen. Daher war eine Vorbehandlung der Chromosomenpräparate erforderlich. Zunächst wurden die auf Objektträgern fixierten Chromosomenpräparate für 5 Min. in 2x SSC gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80% und 95%) für mindestens 2 Min. dehydriert.

Nach dem Trocknen der Objektträger wurden die darauf befindlichen Chromosomen in 70%-igem Formamid (in 2x SSC) für exakt 3 Min. denaturiert, wobei eine Temperatur der Formamidlösung zwischen 68°C und 72°C eingehalten wurde. Nach einem erneuten Waschen der Objektträger in eiskaltem 2x SSC erfolgte eine weitere Dehydrierung der Chromosomenpräparate in einer aufsteigenden, eiskalten Ethanolreihe (70%, 80% und 95%) für ebenfalls mindestens 2 Min.

Fluoreszenzmarkierung der DNA-Sonden

Zur Markierung der DNA-Sonden mit der *nick translation*-Methode wurde das *CGH Nick Translation Kit* der Firma *Abbott* (Wiesbaden) verwendet. Die Methode beruht darauf, dass die im Enzymgemisch enthaltene DNase I an zufälligen Stellen Einzelstrangbrüche – sog. *nicks* – in einen DNA-Doppelstrang einfügt. Die prokaryotische DNA-Polymerase I setzt an den entstandenen 3'-OH-Enden an und synthetisiert in 5'→3' Richtung einen komplementären DNA-Strang. Hierzu steht der Polymerase im Ansatz außer den DNA-Bausteinen dCTP, dGTP, dTTP und dATP auch der RNA-Baustein dUTP zur Verfügung. Dieser ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumGreen* bzw. *SpectrumRed* markiert. Das Verhältnis von dTTP zu dUTP beträgt 50%. Hierdurch wird gewährleistet, dass die Effektivität der DNA-Polymerase I durch das markierte dUTP nicht zu stark herabgesetzt wird, gleichzeitig aber genug markierte RNA-Bausteine eingebaut werden. Die DNA-Polymerase I hat zusätzlich eine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität, durch die in Syntheserichtung die Nukleotide entfernt werden, wodurch wiederum die DNA-Synthese mit zum Teil markierten Nukleotiden fortgesetzt werden kann.

Reaktionsansatz für die <i>nick translation</i>:	
2,75 – 6,75 µl	Nuklease-freies H ₂ O
2,0 – 6,0 µl	DNA (~500 ng)
1,25 µl	<i>SpectrumGreen</i> oder <i>SpectrumRed</i> dUTPs (0,2 mM)
2,5 µl	dTTP (0,1 mM)
5,0 µl	dNTP Mix (0,1 mM)
2,5 µl	10x <i>Nick Translation</i> puffer
5,0 µl	<i>Nick Translation</i> Enzymmix*
25,0 µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde kurz gevortext und für 2 bis 4 Std. bei 15°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme für 10 Min. bei 70°C inaktiviert und der Ansatz auf Eis abgekühlt. Danach wurden 10 µl humane Cot-1-DNA hinzugefügt und der Ansatz im *SpeedVac* für 40 Min. eingedampft.

Alternativ erfolgte eine Ethanol-fällung des Markierungsansatzes, um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen.

Ethanol-Fällung:	
3,0 µl	NaAc (3M) (pH 5,2)
4,0 µl	Humane Cot-1-DNA
0,5 µl	Lachssperma-DNA
75 µl	Ethanol
25 µl	dNTP Mix (0,1 mM)
107,5 µl	Gesamtvolumen

Nach Vortexen des Ansatzes wurde dieser für mindestens 1 Std. bei -20°C gefällt. Anschließend wurde der Mix für 20 Min. bei 4°C und 14.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol für 5 Min. bei 14.000 Upm gewaschen, danach wurde es im Heizblock für 10 Min. bei 37°C getrocknet.

Hybridisierung der Chromosomenpräparate

Die Hybridisierung der Sonden-DNA mit den vorbehandelten Chromosomenpräparaten erforderte, dass zunächst das DNA-Pellet in 12 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und für 10 Min. bei 95°C denaturiert wurde. Anschließend erfolgte für 90 Min. bei 37°C das sog. *Pre-Annealing*. Dabei handelt es sich um die Absättigung der repetitiven Sequenzen mit der hinzugefügten humanen Cot-1-DNA. Cot-1-DNA ist eine aus Plazenta-DNA gewonnene und angereicherte Mischung von repetitiven DNAs, die der Konkurrenz von repetitiven Sequenzen der Sonden-DNA dient.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Hybridisierungsansatz auf das vorbehandelte Chromosomenpräparat pipettiert, ein Deckgläschen (20x20 mm) aufgelegt und die Ränder mit Fixogum abgedichtet. Die betroffenen Chromosomenpräparate wurden über Nacht in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert.

Färben und Eindecken der Chromosomenpräparate

Die Chromosomenpräparate mit den hybridisierten DNA-Sonden wurden nach Entfernung des Deckgläschens für 5 Min. in 2x SSC gewaschen. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurden die Objektträger für wenige Sekunden in 42°C warmem 50%-igen Formamid (in 2x SSC) geschwenkt und erneut in 2x SSC für 5 Min. gewaschen.

Die Färbung des Präparats erfolgte für 5 Min. in 0,1% DAPI-Lösung. Anschließend wurde das Präparat für 5 Min. in Aqua dest. geschwenkt, zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals mit 20 µl *Vectashield Mounting Medium* überschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckt.

Auswertung der FISH-Experimente

Die Auswertung der FISH-Experimente wurde an einem *Leica*-Fluoreszenzmikroskop vorgenommen. Die erforderlichen Filter wurden entsprechend der Wellenlänge der DAPI-Färbung, des *SpectrumGreen* und des *SpectrumRed* ausgewählt. Zur Dokumentation wurde das Computerprogramm *Cytovision* der Firma *Applied Imaging* verwendet.

3.10 Vorgehensweise bei der Datenbankrecherche

Die Suche nach möglichen Kandidatengen für die jeweils vorliegende Erkrankung erfolgte mittels ausführlicher Datenbankrecherchen. Zunächst wurde die auf wenige Kilobasen bestimmte Bruchpunktregion mithilfe der Datenbank *UCSC Genome Browser* daraufhin untersucht, ob die jeweilige Translokation zu einer direkten Unterbrechung eines Gens führt. Bei einer direkten Genunterbrechung handelt es sich meistens um eine *loss-of-function*-Mutation, die in ihrer Auswirkung mit einer Deletion des ganzen Gens oder einzelner Teile davon vergleichbar ist. Es ist jedoch auch möglich, dass die Expression eines benachbarten Gens durch einen Positionseffekt verändert ist.

Sodann wurden mithilfe der Datenbank *PubMed* Informationen zu Funktion und Expression von Proteinen gesammelt, die im Bruchpunktbereich des jeweiligen Patienten kodiert werden. Korrelierte die Funktion eines Proteins mit dem Phänotyp des Patienten – Beispiel: ein Protein ist bei der Entwicklung des Nervensystems beteiligt und der Patient hat eine Intelligenzminderung – so wurde das entsprechende Gen als Kandidatengen in Betracht gezogen.

Ein weiterer Anhaltspunkt für ein putatives Krankheitsgen waren bereits beschriebene Imbalancen der jeweiligen Bruchpunktregion, die sowohl das Kandidatengen betreffen als auch mit einem Phänotyp assoziiert sind, der dem des Indexpatienten ähnelt. Das Auftreten von Imbalancen bei Gesunden spricht tendenziell für *copy number variations* (CNVs), die eher nicht mit einem Krankheitsphänotyp assoziiert sind. Die Suche nach Imbalancen erfolgte in den Datenbanken *PubMed*, *Decipher* und *Database of Genomic Variants*. Die Verwendung der Datenbank *Decipher* und die Interpretation der Daten erfolgte entsprechend der Informationen von Corpas et al. (2012). Die Datenbank *Database of Genomic Variants* wurde erstmals von lafrate et al. (2004) beschrieben, eine umfangreichere Einführung ist bei Zhang et al. (2006) zu finden.

Um einen möglichen Positionseffekt auf ein distal oder proximal des Bruchpunktes liegendes Gen zu verifizieren, wurde mithilfe der Datenbanken *UCSC Genome Browser* und *Vista Enhancer Browser* nach hochkonservierten nicht-kodierenden DNA-Elementen (HCNEs) mit regulatorischem Potential gesucht, die durch das Bruchereignis transloziert wurden. Die Identifizierung von translozierten HCNEs in der entsprechenden Region kann als weiterer Hinweis auf einen Positionseffekt interpretiert werden.

Alle genannten Gesichtspunkte stellen einzelne Puzzleteile dar, die in ihrer Gesamtheit betrachtet werden müssen, um beurteilen zu können, ob es sich um ein plausibles Kandidatengen handelt.

4 Ergebnisse

4.1 Restriktionsenzymatische Spaltung der isolierten BAC- und Fosmid-DNAs zur Herstellung von Sonden für Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Zur Herstellung der DNA-Sonden für die FISH-Experimente wurden zunächst anhand der zytogenetisch bestimmten Bruchpunktregionen geeignete BAC- und Fosmid-Klone mittels Recherche in einschlägigen Datenbanken (Tab. 17) ausgewählt und bei verschiedenen Anbietern bestellt. Die BAC- und Fosmid-DNA wurde nach Kultivierung der entsprechenden *E.coli*-Kolonien mithilfe eines Midi-Kits zur Plasmid-DNA-Präparation aus den Bakterien isoliert. Zu Kontrollzwecken wurde die DNA in eine restriktionsenzymatische Spaltung mit *EcoRI* eingesetzt und die entstandenen Spaltfragmente in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 3.9.4) (Abb. 12).

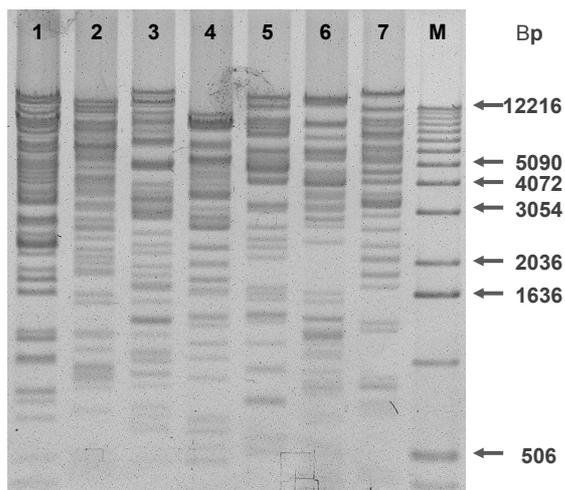


Abb. 12: Repräsentatives Agarosegel mit *EcoRI*-Restriktionsfragmenten von verschiedenen BAC-DNAs. Auf ein 0,8%-iges Agarosegel wurden die Restriktionsprodukte von BAC-DNAs (1-7) nach *EcoRI*-Verdau sowie als DNA-Größenstandard eine 1-Kb-Leiter (M) aufgetragen. In der Reihenfolge von 1-7 sind folgende BAC-Klone zu finden: RP11-480N23, RP11-911F14, RP11-1079C4, RP11-261F23, RP11-709P2, RP11-644M14, RP11-47H9.

Anhand der Intensität der Banden wurde die Menge der DNA für die anschließende Sondenmarkierung zur FISH-Analyse abgeschätzt. Wegen der sehr intensiven Banden in Spur 1 wurde von dieser DNA im Vergleich zu den anderen DNAs in den Spuren 2 bis 7 eine geringere Menge markiert (siehe 3.9.5).

4.2 Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 2;8-Translokation bei Patientin 1

4.2.1 Patientenbeschreibung

Die 65-jährige Patientin 1 zeigt eine schwere Intelligenzminderung. Des Weiteren weist sie Verhaltensauffälligkeiten mit autistischen Zügen auf. Seit der Kindheit traten generalisierte tonisch-klonische Krampfanfälle auf. Die Patientin ist unter der antikonvulsiven Therapie mit Phenobarbital seit 15 Jahren anfallsfrei.

4.2.2 Vorarbeiten

Eine zytogenetische Untersuchung bei der Patientin 1 hatte eine mikroskopisch balanciert erscheinende Translokation zwischen den Chromosomen 2 und 8 mit der Karyotypformel $46,XX,t(2;8)(q21;q24.3)$ ergeben. Bei einer erneuten zytogenetischen Untersuchung am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) wurden die Bruchpunkte in 2q13 und 8q23.3 bestimmt (Abb. 13).

Eine am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel, durchgeführte Array-CGH-Untersuchung zeigte keine genomischen Imbalancen und bestätigte daher das Vorliegen einer balancierten Translokation. In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche waren bereits serielle FISH-Analysen durchgeführt worden. Dadurch konnte die Bruchpunktregion auf dem Chromosom 2 durch die BAC-Klone RP11-528G9 und RP11-438K19 auf eine Größe von 1,4 Mb eingegrenzt werden. Serienhafte FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 8q23.3 bis 8q24.12 ergaben nur BAC-Klone, die distal vom Bruchpunkt hybridisierten (Lübker 2009).

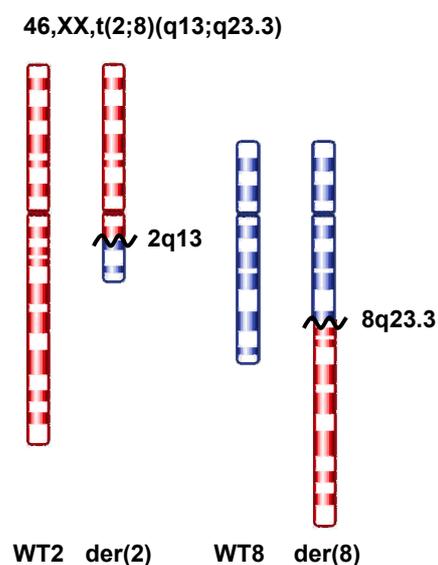


Abb. 13: Schematische Darstellung der Wildtyp- und der rearrangierten Chromosomen der 2;8-Translokation. Die Ideogramme der Wildtyp- (WT) und derivativen (der) Chromosomen 2 (rot) und 8 (blau) sind dargestellt. Die schwarze Wellenlinie markiert die zytogenetisch identifizierten Bruchpunktregionen in 2q13 und 8q23.3.

4.2.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 2q13 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche

Zur genauen Eingrenzung der Bruchpunktregion in 2q13 wurden sieben weitere BAC-Klone in FISH-Analysen eingesetzt. Zwei dieser BAC-Klone (RP11-1104F7 und RP11-404O21) hybridisierten proximal des Bruchpunktes, je auf dem Wildtyp- und dem derivativen Chromosom 2. Zwei andere Klone (RP11-1018O23 und CTD-3047O5) zeigten je ein Signal am Wildtyp-Chromosom 2 und am derivativen Chromosom 8 und liegen daher distal zum Bruchpunkt. Drei miteinander überlappende BAC-Klone (CTD-2533J6, RP11-625K21, RP11-281B16) ergaben *split signals*. Sie hybridisierten einerseits jeweils auf dem Wildtyp-Chromosom 2, andererseits auf beiden derivativen Chromosomen 2 und 8 (Abb. 14 und Daten nicht gezeigt). Diese drei BAC-Klone überspannen daher den Bruchpunkt.

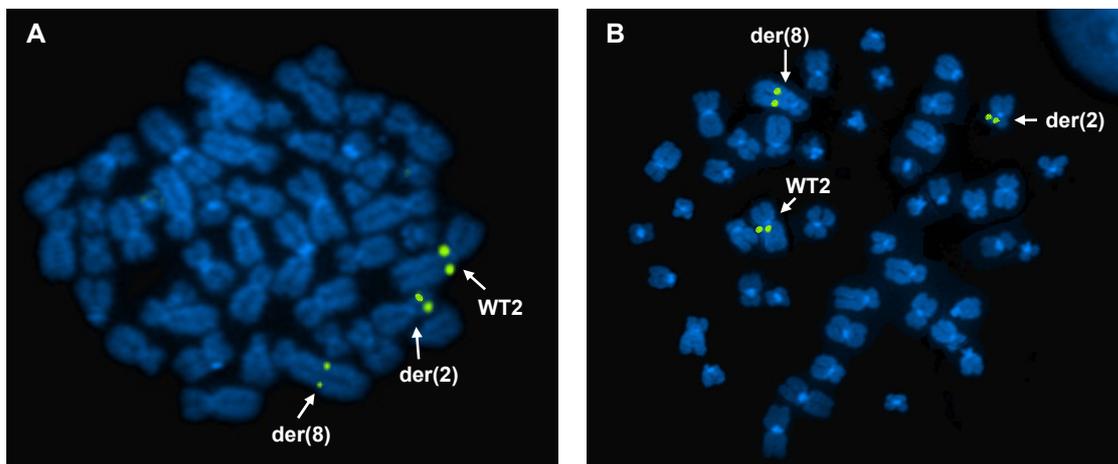


Abb. 14: FISH mit den BACs RP11-625K21 (A) und RP11-281B16 (B) als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen der Patientin 1. Die Sonden wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumGreen* markiert, die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die zwei Sonden zeigten jeweils Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 2 (WT2) sowie jeweils – mit unterschiedlichen Intensitäten – auf beiden derivativen Chromosomen 2 [der(2)] und 8 [der(8)].

Die Resultate der FISH-Analysen sind in Tab. 19 zusammengefasst.

BAC-Klon (cen→ tel)	Zytogenetische Bande	Signalzuordnung	Signalintensitäten der(2) zu der(8) in [%]
RP11-1104F7	2q13	WT2 + der(2)	-
RP11-404O21	2q13	WT2 + der(2)	-
RP11-625K21	2q13	WT2 + der(2) + der(8)	70 zu 30
CTD-2533J6	2q13	WT2 + der(2) + der(8)	80 zu 20
RP11-281B16	2q13	WT2 + der(2) + der(8)	30 zu 70
RP11-1018O23	2q13	WT2 + der(8)	-
CTD-3047O5	2q13	WT2 + der(8)	-

Tab. 19: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 2q13. Angegeben sind die Bezeichnungen der BAC-Klone, deren chromosomale Lokalisation, die chromosomale Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale sowie Werte zu Signalintensitäten. WT: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom; cen: Zentromer; tel: Telomer.

Aufgrund der o.g. FISH-Analysen konnte der Bruchpunkt in 2q13 auf etwa 40 Kb eingegrenzt werden. Datenbankrecherchen ergaben, dass in der Bruchpunktregion das Gen *ACOXL* (*acyl-Coenzyme A oxidase-like*) lokalisiert. Das Bruchereignis liegt direkt im Gen.

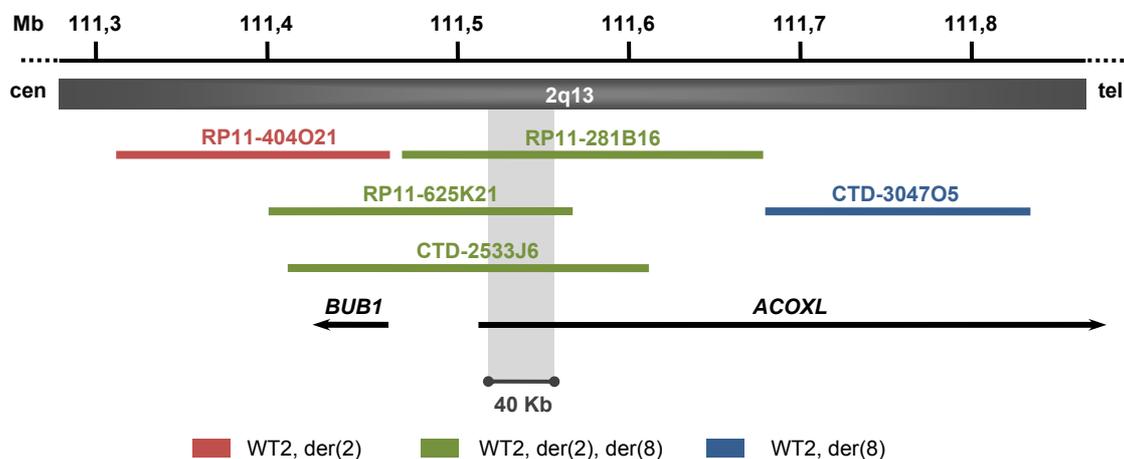


Abb. 15: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 2q13 mit BAC-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen *ACOXL* und *BUB1*. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 2q13 mit Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) dargestellt. Die Inserts der BAC-Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Der rot dargestellte BAC-Klon lokalisiert proximal zum Bruchpunkt, der blaue distal. Grün eingezeichnete Klone sind bruchpunktüberspannend. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion, deren Größe etwa 40 Kb beträgt. Die Gene sind durch einen schwarzen Pfeil in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

4.2.4 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 8q23.3 und anschließende Datenbankrecherche

Bisherige FISH-Analysen ergaben nur distal zum Bruchpunkt hybridisierende BAC-Klone. Deshalb wurden FISH mit 16 näher zum Zentromer gelegenen BAC-Klonen durchgeführt. Insgesamt 13 dieser Klone (RP11-238I10, RP11-946L20, RP11-237I17, RP11-36C1, RP11-3A12, RP11-577G6, RP11-784N7, RP11-911F14, RP11-299J14, RP11-261F23, RP11-709P2, RP11-644M14 und RP11-67H2) hybridisierten proximal des Bruchpunktes und zeigten Signale am Wildtyp-Chromosom 8 sowie am derivativen Chromosom 8. Ein BAC-Klon (RP11-1140O6) zeigte je ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 8 und derivativen Chromosom 2. Folglich liegt er distal zum Bruchpunkt. Zwei überlappende BAC-Klone (RP11-47H9 und RP11-928D21) ergaben *split signals*. Sie hybridisierten auf dem Wildtyp-Chromosom 8 und auf beiden derivativen Chromosomen 8 und 2 (Abb. 16). Die Resultate der FISH-Analysen sind in Tab. 20 zusammengefasst.

BAC-Klon (cen→ tel)	Zytogenetische Bande	Signalzuordnung	Signalintensitäten der(8) zu der(2) in [%]
RP11-238I10	8q23.2	WT8 + der(8)	-
RP11-946L20	8q23.2-q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-237I17	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-36C1	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-3A12	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-577G6	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-784N7	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-911F14	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-299J14	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-261F23	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-709P2	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-644M14	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-67H2	8q23.3	WT8 + der(8)	-
RP11-47H9	8q23.3	WT8 + der(8)+der(2)	75 zu 25
RP11-928D21	8q23.3	WT8 + der(8)+der(2)	75 zu 25
RP11-1140O6	8q23.3	WT8 + der(2)	-

Tab. 20: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 8q23.3. Angegeben sind die Bezeichnungen der BAC-Klone, deren zytogenetische Bande, die chromosomale Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale sowie Werte zu Signalintensitäten. WT: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom; cen: Zentromer; tel: Telomer.

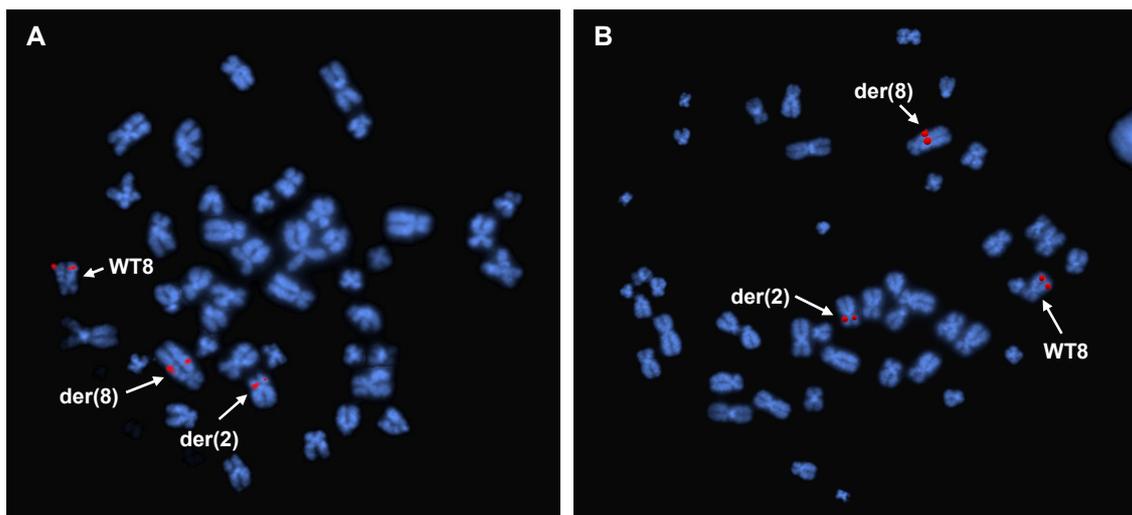


Abb. 16: FISH mit den BACs RP11-47H9 (A) und RP11-928D21 (B) als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Patientin 1. Die Sonden wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumRed* markiert, die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die zwei Sonden zeigten jeweils ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 8 (WT8) sowie jeweils – mit unterschiedlichen Intensitäten – auf beiden derivativen Chromosomen [der(8)] und [der(2)].

Mithilfe der durchgeführten FISH-Analysen konnte der Bruchpunktbereich in 8q23.3 auf ungefähr 80 Kb eingrenzt werden (Abb. 17). Datenbankrecherchen ergaben, dass durch die Translokation am Chromosom 8 kein Gen direkt unterbrochen ist. Das Gen *CSMD3* lokalisiert proximal zum Bruchpunkt. Es kodiert für das Protein *CUB and sushi multiple domains 3*. Zwischen dem Bruchpunkt und dem 5'-Ende des Gens liegen ungefähr 310 Kb.

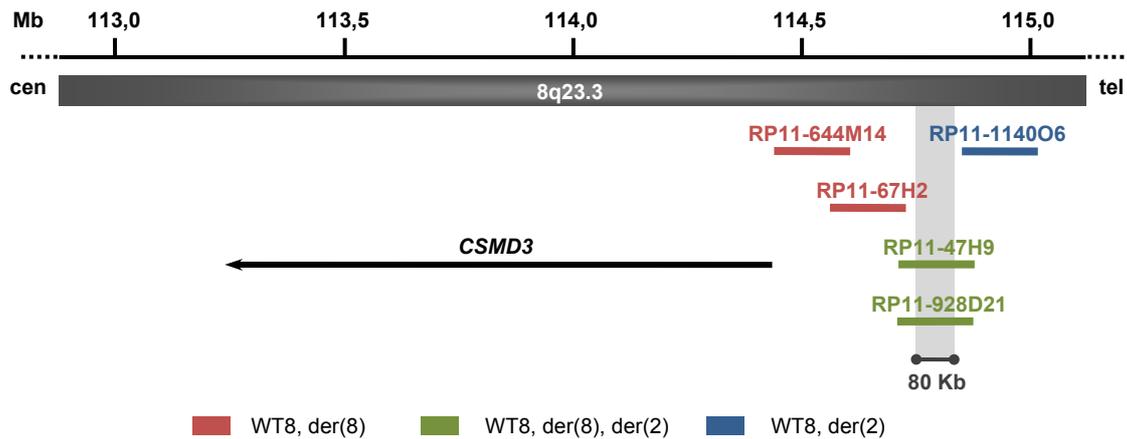


Abb. 17: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 8q23.3 mit BAC-Klonen sowie dem dort lokalisierten Gen CSMD3. Durch einen dunkelgrauen Balken wird ein Ausschnitt der Region 8q23.3 mit Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) dargestellt. Die Inserts der BAC-Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Die rot dargestellten BAC-Klone lokalisieren proximal zum Bruchpunkt, der blaue distal. Grün eingezeichnete Klone sind bruchpunktüberspannend. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion, deren Größe etwa 80 Kb beträgt. Das Gen CSMD3 ist durch einen schwarzen Pfeil in 5'→3-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly erstellt.

4.3 Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 9;13-Translokation bei Patient 2

4.3.1 Patientenbeschreibung

Patient 2 ist sechs Jahre alt und das dritte Kind nicht-konsanguiner Eltern. Bei der Mutter treten Krampfanfälle auf. Daher wurde sie in den Jahren vor der Schwangerschaft mit Patient 2 mit Lamotrigin behandelt. Während der Schwangerschaft mit Patient 2 nahm sie zuerst keine Medikamente ein, nach einem generalisierten Krampfanfall im fünften Schwangerschaftsmonat wurde die antikonvulsive Behandlung mit Lamotrigin jedoch fortgesetzt. Während der Schwangerschaft fiel der Mutter eine ausgeprägte Bewegungsarmut des Feten auf. Die Geburt erfolgte zum Termin, die Geburtsmaße waren unauffällig (Gewicht 3110 g, Länge 51 cm, Kopfumfang 36 cm). Ein Anhängsel am Mittelglied des linken Kleinfingers – möglicherweise eine postaxiale Hexadaktylie – wurde nach der Geburt abgetragen. Es enthielt derbes Bindegewebe, aber keine knöchernen Strukturen. Im Verlauf des ersten Lebensjahres blieb das Kopfwachstum kontinuierlich zurück, die Größenentwicklung war unauffällig. Mit zwei Jahren lag der Kopfumfang mit 47 cm auf der 3. Perzentile, die Körpergröße mit 98 cm im Normbereich. Es wurde eine Mikrozephalie festgestellt. Im ersten Lebensjahr des Patienten fiel der Mutter eine Bewegungsarmut der Arme auf. Mit zwei Jahren war das Gangbild unsicher, mit leicht angewinkelten Knien und Hüften. Bei Patient 2 besteht eine globale Entwicklungsverzögerung mit muskulärer Hypotonie, insbesondere der unteren Extremitäten.

4.3.2 Vorarbeiten

Eine im Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Lübeck, durchgeführte zytogenetische Diagnostik hatte bei dem Patienten eine mikroskopisch balanciert erscheinende *de novo* Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 13 ergeben. Der Karyotyp wurde mit $46,XY,t(9;13)(q22;q14)$ angegeben. Nach einer erneuten Chromosomenanalyse im Institut für Humangenetik des UKE wurden die Bruchpunktbereiche in 9q22.33 und 13q14.3 bestimmt (Abb. 18). Mittels Array-CGH-Untersuchung wurde im Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel, der balancierte Zustand der reziproken Translokation bestätigt.

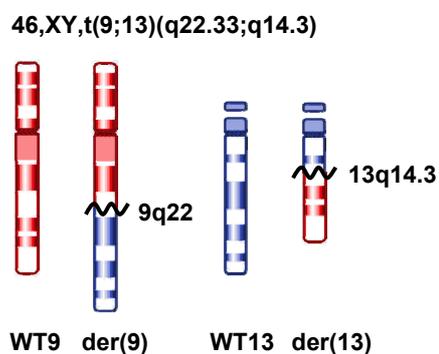


Abb. 18: Schematische Darstellung der Wildtyp- und der rearrangierten Chromosomen der 9;13-Translokation. Die Ideogramme der Wildtyp- (WT) und derivativen (der) Chromosomen 9 (rot) und 13 (blau) sind dargestellt. Die schwarze Wellenlinie markiert die zytogenetisch identifizierten Bruchpunktregionen in 9q22 und 13q14.3.

Die zur Eingrenzung des 9q22.33-Bruchpunktes bereits durchgeführten FISH-Analysen hatten nur BAC-Klone aufgedeckt, die auf dem Wildtyp- und dem derivativen Chromosom 9 hybridisierten. Der Bruchpunkt lag demnach distal zum BAC-Klon RP11-498P14. Die Bruchpunktregion auf Chromosom 13 konnte bereits in den Vorarbeiten durch die BAC-Klone RP11-997J13 (proximal) und RP11-370C1 (distal) auf 0,6 Mb eingegrenzt werden (Lübker 2009).

4.3.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 9q31.1 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche

Zur Eingrenzung des Bruchpunktes auf Chromosom 9 wurden weitere Klone für FISH-Untersuchungen ausgewählt. Vier BAC-Klone (RP11-1079C4, RP11-24A5, RP11-282B23 und RP11-779O7) hybridisierten proximal zum Bruchpunkt, je auf dem Wildtyp- und dem derivativen Chromosom 9. Insgesamt 14 Klone (RP11-98J6, RP11-165A2, RP11-940E14, RP11-589C15, RP11-469P24, RP11-454A13, G248P86150D2, RP11-353D23, G248P84730F7, G248P88388C6, G248P86675H3, RP11-722E1, RP11-796L3 und RP11-633N4) zeigten je ein Signal am Wildtyp-Chromosom 9 und am derivativen Chromosom 13. Infolgedessen liegen sie distal zum Bruchpunkt.

Zur Feinkartierung des Bruchpunktes im Bereich der BAC-Klone RP11-779O7 und RP11-98J6 wurden acht Fosmid-Klone ausgewählt. Zwei Fosmid-Klone (G248P8-0470G2 und G248P85834F8) hybridisierten proximal des Bruchpunktes, je auf dem Wildtyp- und dem derivativen Chromosom 9. Fünf der Klone (G248P89573G3, G248P8-1471E2, G248P8307A3, G248P84563D12 und G248P8396H6) zeigten je ein Signal am Wildtyp-Chromosom 9 und derivativen Chromosom 13. Sie liegen daher distal zum Bruchpunkt. Der Fosmid-Klon G248P87537F5 ergab *split signals* (Abb. 19). Dies war überraschend, da der BAC-Klon RP11-779O7, der das Insert des Fosmids G248P8-7537F5 vollständig überspannt, keine *split signals* zeigte (Abb. 20). Mögliche Erklärungen dafür wären, dass das Insert des BACs RP11-779O7 im distalen Bereich eine hohe Anzahl repetetiver Sequenzen aufweist, die nicht an die Metaphasechromosomen hybridisierten oder der BAC zwar auf dem langen Arm des Chromosom 9, aber nicht in der laut physikalischer Karte angegebenen Region 9q31.1 hybridisierte. Die Resultate der FISH-Analysen sind in Tab. 21 zusammengefasst.

BAC- und Fosmid-Klone (cen→ tel)	Zytogenetische Bande	Signalzuordnung	Signalintensitäten der(9) zu der(13) in [%]
RP11-1079C4	9q31.1	WT9 + der(9)	-
RP11-24A5	9q31.1	WT9 + der(9)	-
RP11-282B23	9q31.1	WT9 + der(9)	-
G248P80470G2	9q31.1	WT9 + der(9)	-
RP11-779O7	9q31.1	WT9 + der(9)	-
G248P85834F8	9q31.1	WT9 + der(9)	-
G248P87537F5	9q31.1	WT9 + der(9) + der(13)	60 zu 40
G248P89573G3	9q31.1	WT9 + der(13)	-
G248P81471E2	9q31.1	WT9 + der(13)	-
G248P8307A3	9q31.1	WT9 + der(13)	-
RP11-98J6	9q31.1	WT9 + der(13)	-
G248P84563D12	9q31.1	WT9 + der(13)	-
G248P8396H6	9q31.1	WT9 + der(13)	-
RP11-165A2	9q31.1	WT9 + der(13)	-
RP11-940E14	9q31.1	WT9 + der(13)	-
RP11-589C15	9q31.1	WT9 + der(13)	-
RP11-469P24	9q31.1	WT9 + der(13)	-
RP11-454A13	9q31.1	WT9 + der(13)	-
G248P86150D2	9q31.1	WT9 + der(13)	-
RP11-353D23	9q31.1	WT9 + der(13)	-
G248P84730F7	9q31.1	WT9 + der(13)	-
G248P88388C6	9q31.1	WT9 + der(13)	-
G248P86675H3	9q31.1	WT9 + der(13)	-
RP11-722E1	9q31.2	WT9 + der(13)	-
RP11-796L3	9q31.2	WT9 + der(13)	-
RP11-633N4	9q31.2	WT9 + der(13)	-

Tab. 21: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 9q31.1. Angegeben sind die Bezeichnungen der BAC- und Fosmid-Klone, deren zytogenetische Bande, die chromosomale Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale sowie Werte zu Signalintensitäten. WT: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom; cen: Zentromer; tel: Telomer.

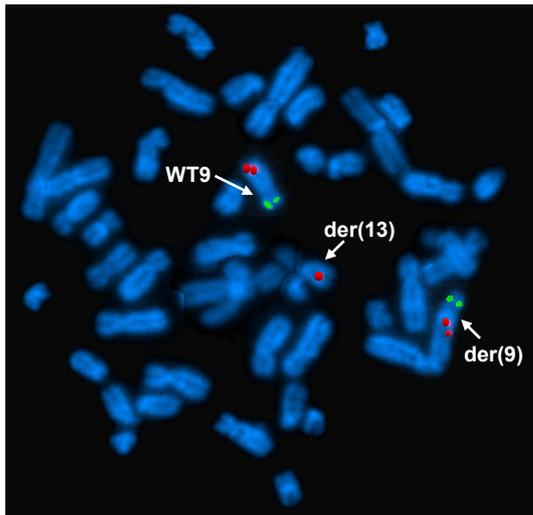


Abb. 19: FISH mit dem Fosmid G248P87537F5 und dem BAC RP11-784G11 als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen des Patienten 2. Die Sonde G248P87537F5 wurde mit *SpectrumRed*, die Sonde RP11-784G11 als Kontrolle mit *SpectrumGreen* markiert. Die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Sonde G248P87537F5 zeigte Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 9 (WT9) sowie auf beiden derivativen Chromosomen 9 [der(9)] und 13 [der(13)]. Die Kontrollsonde zeigte Signale auf dem kurzen Arm des Wildtyp-Chromosom 9 (WT9) und auf dem kurzen Arm des derivativen Chromosom 9 [der(9)].

Diese FISH-Analysedaten ermöglichten es, den Bruchpunkt in 9q31.1 auf etwa 20 Kb einzugrenzen. Datenbankrecherchen ergaben, dass in dem Bruchpunktbereich kein Gen liegt. Proximal zum Bruchpunkt, etwa 1 Mb entfernt, befinden sich jedoch zahlreiche Gene. Distal des Bruchpunktes, ebenfalls ca. 1 Mb entfernt, liegen zwei weitere Gene (Abb. 20).

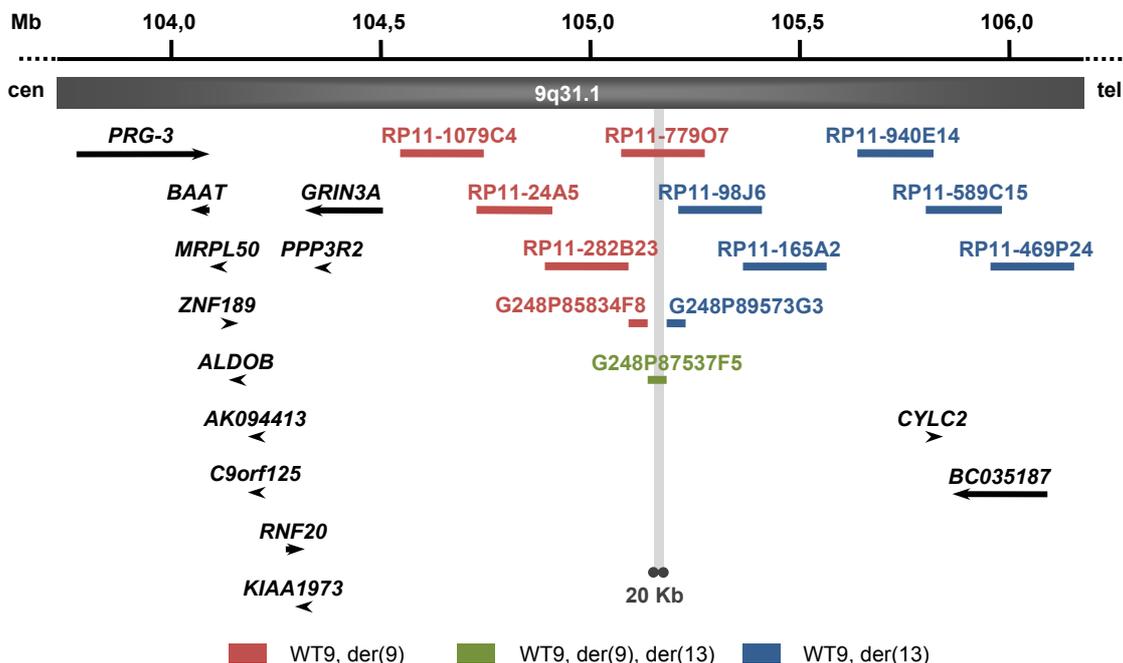


Abb. 20: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 9q31.1 mit BAC- und Fosmid-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Bande 9q31.1 mit Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Die Inserts der BAC- und Fosmidklone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Die rot dargestellten BAC-Klone lokalisieren proximal zum Bruchpunkt, die blauen distal. Der grün eingezeichnete Fosmidklon G248P87537F5 ist bruchpunktüberspannend. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion, deren Größe etwa 20 Kb beträgt. Die Gene sind durch schwarze Pfeile in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

4.3.4 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 13q14.3 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche

Für die präzisere Eingrenzung des auf 0,6 Mb eingeschränkten Bruchpunktbereiches wurden vier weitere BAC-Klone in FISH-Analysen verwendet. Der Klon RP11-435I8 hybridisierte proximal des Bruchpunktes. Er erzeugte Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 13 und derivativen Chromosom 13. Zwei BAC-Klone (RP11-722C3 und RP11-778G13) zeigten Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 13 und derivativen Chromosom 9 und liegen daher distal zum Bruchpunkt. Der BAC-Klon RP11-431O22 ergab *split signals*. Dieser BAC-Klon überspannt den Bruchpunkt.

Zur Feinkartierung wurden fünf Fosmid-Klone eingesetzt. Zwei von ihnen (G248P8-6680B7 und G248P87522D8) hybridisierten proximal des Bruchpunktes. Zwei weitere Fosmid-Klone (G248P87663A5 und G248P85543H7) hybridisierten distal des Bruchpunktes. Das Fosmid G248P81955E7 überspannt den Bruchpunkt (Abb. 21). Die Resultate der FISH-Analysen sind in Tab. 22 zusammengefasst.

BAC- und Fosmid-Klone (cen→ tel)	Zytogenetische Bande	Signalzuordnung	Signalintensitäten der(13) zu der(9) in [%]
RP11-435I8	13q14.3	WT13 + der(13)	-
RP11-431O22	13q14.3	WT13 + der(13) + der(9)	40 zu 60
G248P86680B7	13q14.3	WT13 + der(13)	-
G248P87522D8	13q14.3	WT13 + der(13)	-
G248P81955E7	13q14.3	WT13 + der(13) + der(9)	60 zu 40
RP11-722C3	13q14.3	WT13 + der(9)	-
G248P87663A5	13q14.3	WT13 + der(9)	-
G248P85543H7	13q14.3	WT13 + der(9)	-
RP11-778G13	13q14.3	WT13 + der(9)	-

Tab. 22: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 13q14.3. Angegeben sind die Bezeichnungen der BAC- und Fosmid-Klone, deren zytogenetische Bande, die chromosomale Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale sowie Werte zu Signalintensitäten. WT: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom; cen: Zentromer; tel: Telomer.

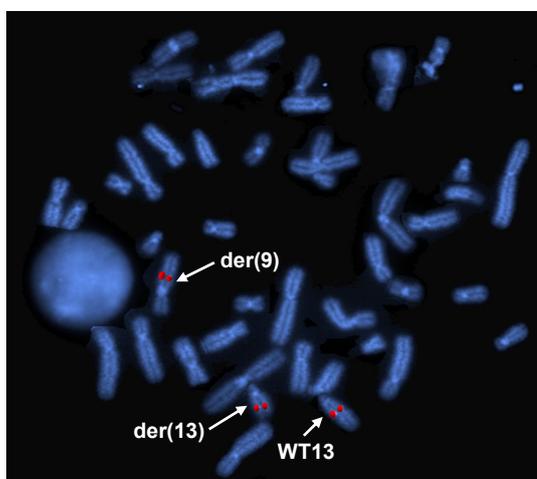


Abb. 21: FISH mit dem Fosmid G248P81955E7 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Patienten 2. Die Sonde wurde mit *SpectrumRed* markiert, die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Sonde zeigte ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 13 (WT13) sowie – mit unterschiedlichen Intensitäten – auf beiden derivativen Chromosomen 13 [der(13)] und 9 [der(9)].

In der mittels FISH-Analysen eingegrenzten Bruchpunktregion von 10 Kb liegt kein Gen. Proximal des Bruchpunktes liegt das *LECT1*-Gen (*leukocyte cell derived chemotaxin 1*), distal das Gen *PCDH8* (*proto α adherin 8*).

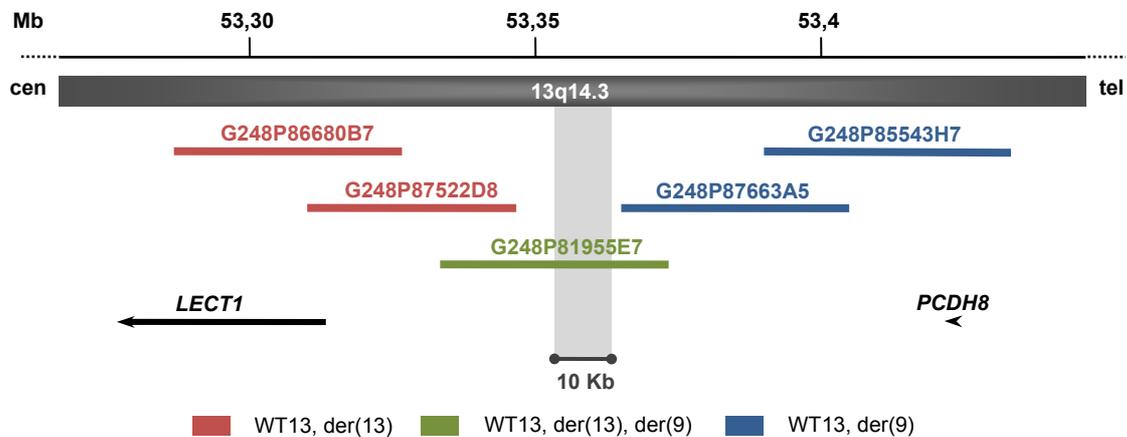


Abb. 22: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 13q14.3 mit Fosmid-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen *LECT1* und *PCDH8*. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 13q14.3 mit Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Die Inserts der Fosmid-Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Die zwei rot dargestellten Fosmid-Klone lokalisieren proximal zum Bruchpunkt, die blauen distal. Der grün eingezeichnete Fosmid-Klon ist bruchpunktüberspannend. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion, deren Größe etwa 10 Kb beträgt. Die Gene *PCDH8* und *LECT1* sind durch schwarze Pfeile in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

4.4 Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 2;15-Translokation bei Patientin 3

4.4.1 Patientenbeschreibung

Bei Patientin 3 handelt es sich um eine 48-jährige Frau. Sie ist kleinwüchsig und weist eine Intelligenzminderung sowie autistisches Verhalten auf.

4.4.2 Vorarbeiten

Durch eine zytogenetische Untersuchung war eine mikroskopisch balanciert erscheinende Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 2 und 15 bei Patientin 3 entdeckt worden. Die Karyotypformel wurde mit 46,XX,t(2;15)(q11;q24) angegeben. Bei einer Chromosomenanalyse am Institut für Humangenetik des UKE wurden die Bruchpunkte in 2q14.1 und 15q26.2 bestimmt. Eine Array-CGH-Untersuchung am Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel, zeigte keine genomischen Imbalancen.

Mittels FISH-Analysen war der Bruchpunkt in 2q14.2 mit den BAC-Klonen RP11-361N17 und RP11-713O9 auf 0,8 Mb eingegrenzt worden. Der Bruchpunktbereich auf

dem derivativen Chromosom 15 wurde in Vorarbeiten in der Region 15q26.3 mit den begrenzenden Klonen RP11-35O15 und RP11-616M17 auf 0,9 Mb eingengt (Abb. 23) (Lübker 2009).

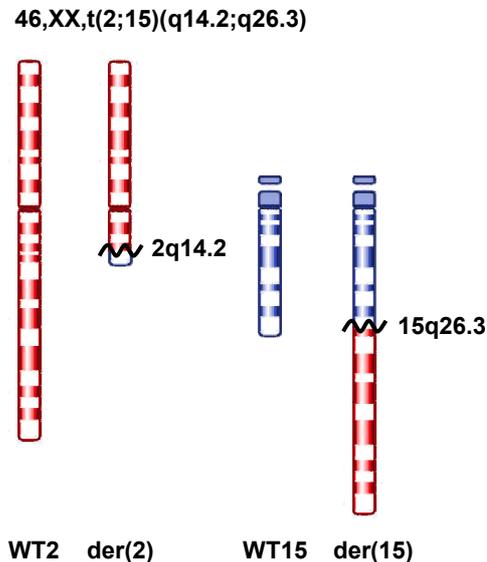


Abb. 23: Schematische Darstellung der Wildtyp- und der derivativen Chromosomen der 2;15-Translokation von Patientin 3. Die Ideogramme der Wildtyp- (WT) und derivativen Chromosomen 2 (rot) und 15 (blau) sind dargestellt. Die schwarze Wellenlinie markiert die durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bestimmte Bruchpunktregion in 2q14.2 und 15q26.3.

4.4.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 2q14.2 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche

Zur genaueren Bestimmung des Bruchpunktes wurden zwei BAC-Klone aus dem 0,8 Mb großen Bruchpunktbereich ausgewählt: RP11-957C9 und RP11-960L12. Der BAC-Klon RP11-957C9 hybridisierte proximal des Bruchpunktes mit einem Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 2 und einem Signal auf dem derivativen Chromosom 2. Der BAC-Klon RP11-960L12 zeigte *split signals* (Abb. 24), mit unterschiedlichen Intensitäten auf den beiden derivativen Chromosomen (Tab. 23).

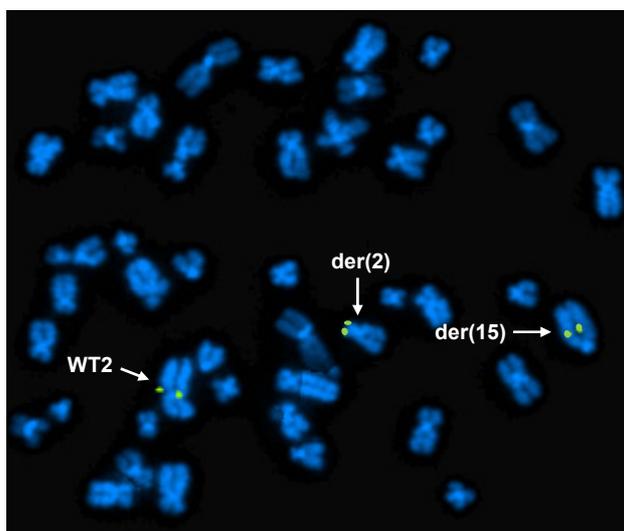


Abb. 24: FISH mit dem BAC RP11-960L12 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Patientin 3. Die Sonde wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumGreen* markiert, die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt. Die Sonde zeigte Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 2 (WT2) sowie – mit unterschiedlichen Intensitäten – auf beiden derivativen Chromosomen 2 [der(2)] und 15 [der(15)].

Zur Feinkartierung des Bruchpunktes wurden fünf Fosmid-Klone verwendet. Der Fosmid-Klon G248P85743F1 hybridisierte am Wildtyp- und derivativen Chromosom 2. Drei Fosmid-Klone (G248P89132D5, G248P8214B5 und G248P87631G11) zeigten jeweils Signale am Wildtyp-Chromosom 2 und am derivativen Chromosom 15. Das Fosmid G248P84441D8 ergab *split signals*. Dieses Fosmid überspannt den Bruchpunkt (Abb. 25).

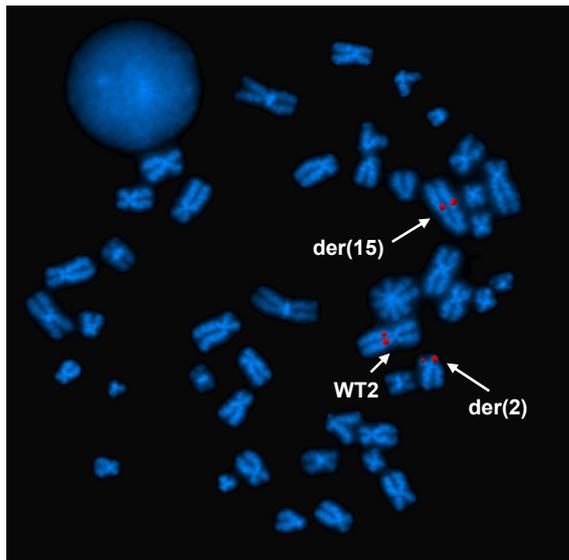


Abb. 25: FISH mit dem Fosmid G248P8-4441D8 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Patientin 3. Die Sonde wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Spectrum-Red* markiert, die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Sonde zeigte ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 2 (WT2) sowie jeweils – mit unterschiedlichen Intensität – auf beiden derivativen Chromosomen 2 [der(2)] und 15 [der(15)].

Die Resultate der FISH-Analysen sind in Tab. 23 zusammengefasst.

BAC- und Fosmid-Klone (cen→ tel)	Zytogenetische Bande	Signalzuordnung	Signalintensitäten der(2) zu der(15) in [%]
RP11-957C9	2q14.2	WT2 + der(2)	-
RP11-960L12	2q14.2	WT2 + der(2) + der(15)	30 zu 70
G248P85743F1	2q14.2	WT2 + der(2)	-
G248P84441D8	2q14.2	WT2 + der(2) + der(15)	20 zu 80
G248P89132D5	2q14.2	WT2 + der(15)	-
G248P8214B5	2q14.2	WT2 + der(15)	-
G248P87631G11	2q14.2	WT2 + der(15)	-

Tab. 23: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 2q14.2. Angegeben sind die Bezeichnungen der BAC- und Fosmid-Klone, deren zytogenetische Bande, die chromosomale Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale sowie Werte zu Signalintensitäten. WT: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom; cen: Zentromer; tel: Telomer.

Laut Datenbankrecherchen liegen nahe oder in dem eingegrenzten Bruchpunktbereich von etwa 15 Kb vier Gene (Abb. 26), nämlich *C2orf76* (*chromosome 2 open reading frame 76*), *DBI* (*diazepam binding inhibitor*), *TMEM37* (*transmembrane protein 37*) und *SCTR* (*secretin receptor*).

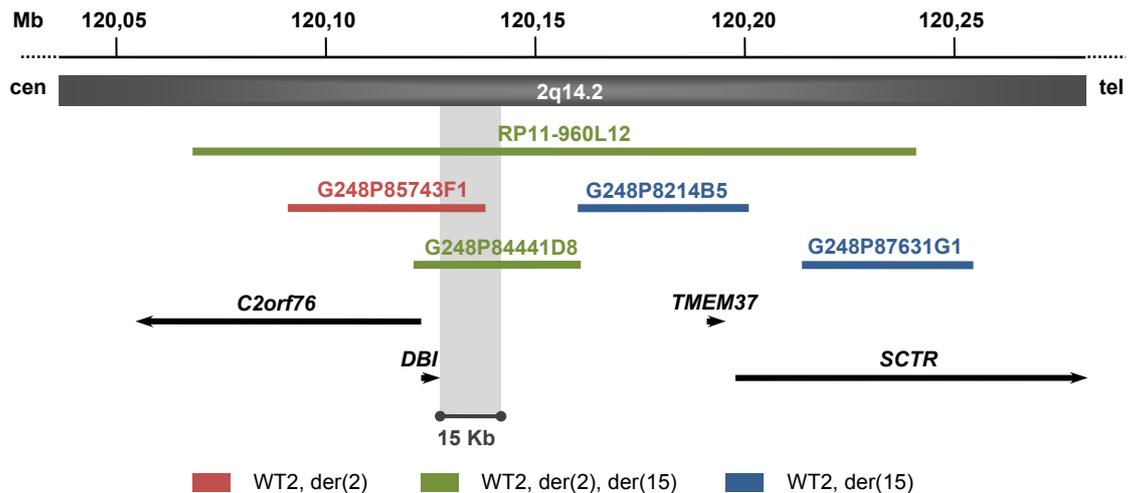


Abb. 26: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 2q14.2 mit BAC- und Fosmid-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen *C2orf76*, *DBI*, *TMEM37* und *SCTR*. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt aus der Region 2q14.2 mit Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Die Inserts der Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Die rot dargestellten Klone lokalisieren proximal zum Bruchpunkt, die blauen distal. Die grün eingezeichneten Klone sind bruchpunktüberspannend. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion, deren Größe etwa 15 Kb beträgt. Die Gene *C2orf76*, *DBI*, *TMEM37* und *SCTR* sind durch schwarze Pfeile in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

4.4.4 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 15q26.3 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche

Zur Kartierung des Bruchpunktes in 15q26.3 wurden sechs weitere BAC-Klone für FISH-Analysen verwendet. Zwei BAC-Klone (RP11-379D8 und RP11-114G3) hybridisierten proximal, zwei andere BAC-Klone (RP11-104D18 und RP11-867D13) hybridisierten distal des Bruchpunktes. Zwei überlappende BAC-Klone (RP11-802L22 und RP11-1025G10) erzeugten *split signals* (Abb. 27).

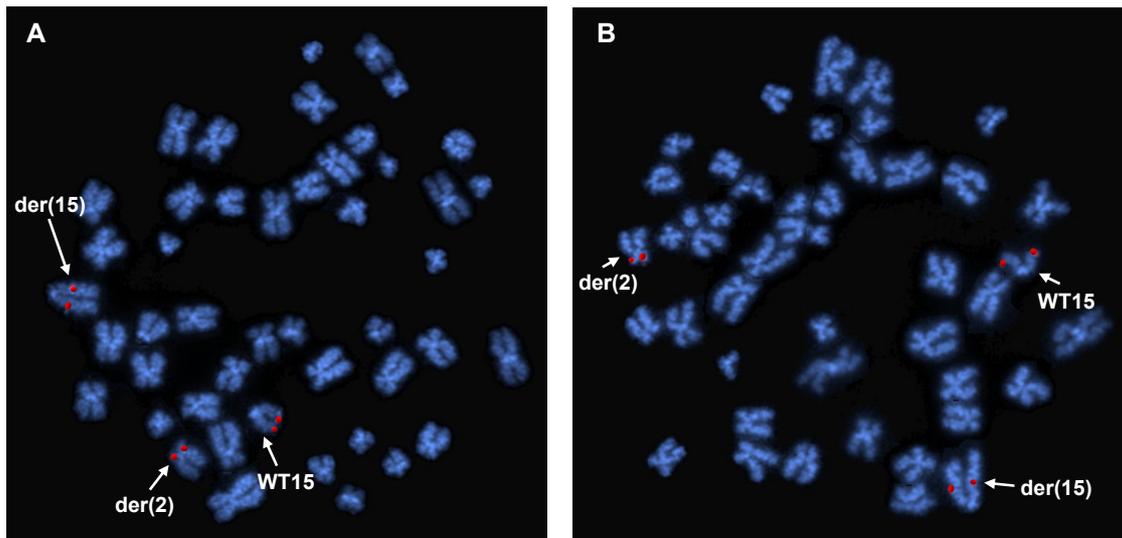


Abb. 27: FISH mit den BACs RP11-802L22 (A) und RP11-1025G10 (B) als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen der Patientin 3. Die Sonden wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumRed* markiert, die Chromosomen mit DAPI gegengefärbt. Die zwei Sonden zeigten jeweils Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 15 (WT15) sowieso jeweils – mit unterschiedlichen Intensitäten – auf beiden derivativen Chromosomen 15 [der(15)] und 2 [der(2)].

Zur Feinkartierung des Bruchpunktes wurden drei Fosmid-Klone verwendet. Ein Fosmid (G248P89849D1) hybridisierte proximal des Bruchpunktes auf dem Wildtyp-Chromosom und derivativen Chromosom 15. Ein anderes Fosmid (G248P87669A11) zeigte Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 15 und derivativen Chromosom 2. Es liegt daher distal des Bruchpunktes. Das Fosmid G248P86056G6 ergab *split signals*. (Abb. 28).

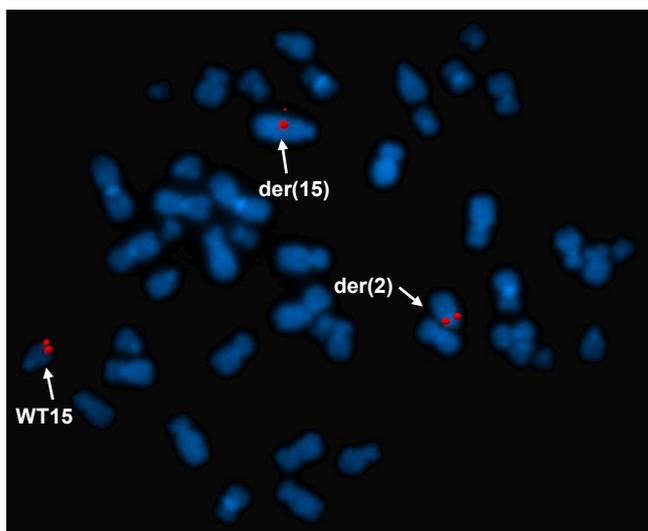


Abb. 28: FISH mit dem Fosmid G248P86056G6 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Patientin 3. Die Sonde wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumRed* markiert, die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Sonde zeigte Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 15 (WT15) sowie – mit unterschiedlichen Intensitäten – auf beiden derivativen Chromosomen 15 [der(15)] und 2 [der(2)].

Die Resultate der FISH-Analysen sind in Tab. 24 zusammengefasst.

BAC- und Fosmid-Klone (cen→ tel)	Zytogenetische Bande	Signalzuordnung	Signalintensitäten der(15) zu der(2) in [%]
RP11-379D8	15q26.3	WT15+der(15)	-
RP11-114G13	15q26.3	WT15+der(15)	-
RP11-802L22	15q26.3	WT15+der(15)+der(2)	80 zu 20
G248P89849D1	15q26.3	WT15+der(15)	-
RP11-1025G10	15q26.3	WT15+der(15)+der(2)	20 zu 80
G248P86056G6	15q26.3	WT15+der(15)+der(2)	40 zu 60
G248P87669A11	15q26.3	WT15+der(2)	-
RP11-104D18	15q26.3	WT15+der(2)	-
RP11-867D13	15q26.3	WT15+der(2)	-

Tab. 24: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 15q26.3. Angegeben sind die Bezeichnungen der BAC- und Fosmid-Klone, deren zytogenetische Bande, die chromosomale Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale sowie Werte zu Signalintensitäten. WT: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom; cen: Zentromer; tel: Telomer.

Die o.g. FISH-Analysen ermöglichen die Eingrenzung des Bruchpunktes in 15q26.3 auf 25 Kb. Das Gen *PGPEP1L* (*pyroglutamyl-peptidase 1 like*) könnte direkt rupturiert sein. Proximal sowie distal des Bruchpunktes befinden sich weitere Gene.

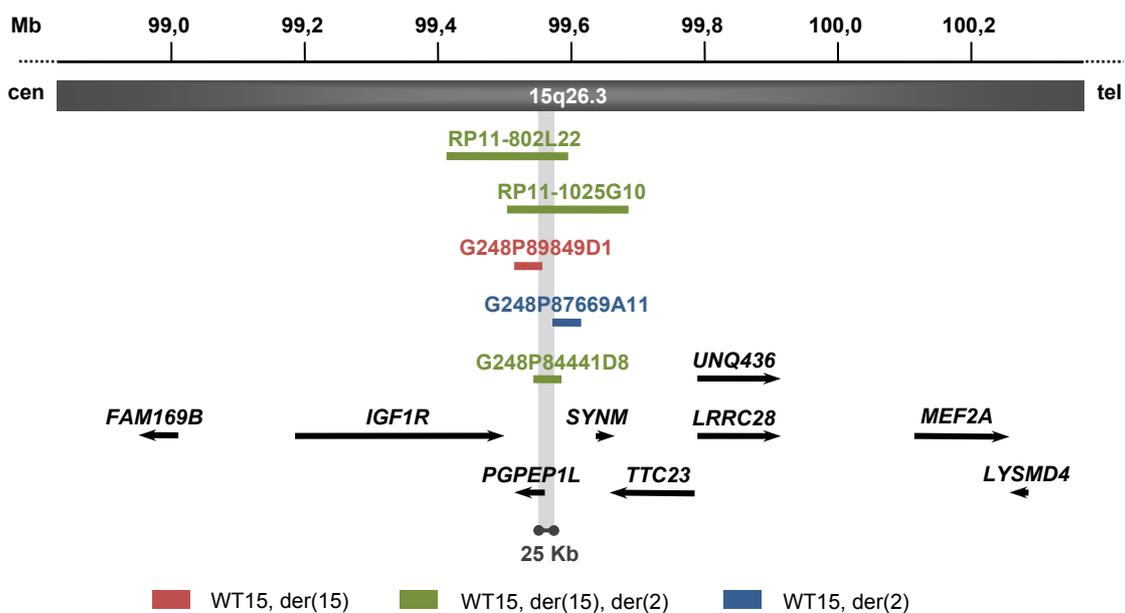


Abb. 29: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 15q26.3 mit BAC- und Fosmid-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 15q26.3 mit Größenangaben in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Die Inserts der BAC- und Fosmid-Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Der rot dargestellte Klon lokalisiert proximal zum Bruchpunkt, der blaue distal. Die grün eingezeichneten Klone sind bruchpunktüberspannend. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion, deren Größe etwa 25 Kb beträgt. Die Gene sind durch schwarze in 5'→3-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

4.5 Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 4;14-Translokation bei Patient 4

4.5.1 Patientenbeschreibung

Patient 4 zeigt eine milde Intelligenzminderung. Des Weiteren hat er einen Septumdefekt, einen Kryptorchismus, eine Hypospadie sowie milde faciale Dysmorphiezeichen mit einer mandibulären Retrognathie.

4.5.2 Vorarbeiten

Eine zytogenetische Diagnostik hatte bei dem Patienten eine balanciert erscheinende Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 4 und 14 [t(4;14)(q31.1;q32.1)] gezeigt. Durch eine erneute zytogenetische Untersuchung am Institut für Humangenetik des UKE wurden die Bruchpunkte bestätigt: t(4;14)(q31.1;q32.13) (Abb. 30).

46,XY,t(4;14)(q31.1;q32.13)

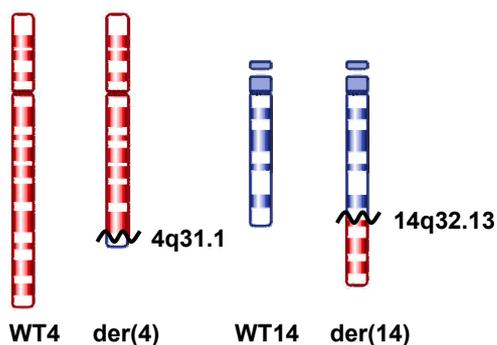


Abb. 30: Schematische Darstellung der Wildtyp- und der rearrangierten Chromosomen der 4;14-Translokation. Die Ideogramme der Wildtyp- (WT) und derivativen (der) Chromosomen 4 (rot) und 14 (blau) sind dargestellt. Die Wellenlinien markieren die zytogenetisch identifizierten Bruchpunktregionen in 4q31.1 und 14q32.13.

Eine Array-CGH-Untersuchung, durchgeführt im Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel, hatte eine 6,1 Mb große Deletion in 4q31 [arr cgh 4q31.1q31.22(140,829,077→146,931,678) Mb)x1] (GRCh37/hg19) aufgedeckt. Diese Deletion befindet sich vermutlich am Translokationsbruchpunkt auf Chromosom 4, so dass es sich in diesem Fall wahrscheinlich nicht um eine balancierte Translokation handelt.

Die Deletion wurde in Vorarbeiten bereits durch FISH-Analysen bestätigt. Die BAC-Klone RP11-102N12 und RP11-54P19 erzeugten nur ein Signal, nämlich auf dem Wildtyp-Chromosom 4 (Abb. 31). Eine weitere Eingrenzung des Bruchpunktes in 4q31.1 erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht.

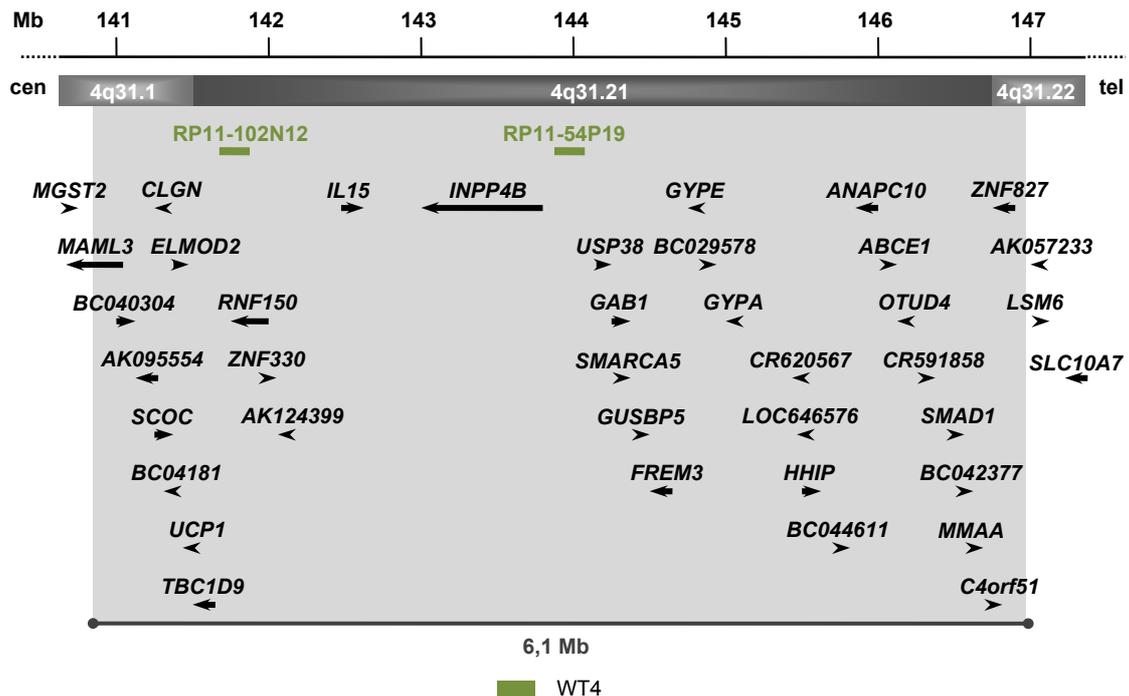


Abb. 31: Schematische Darstellung der Deletion in 4q31.1q31.22 mit BAC-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 4q31.21, durch die hellgrauen Balken sind Ausschnitte der Region 4q31.1 bzw. 4q31.22 mit Größenangaben in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Die Inserts der BAC-Klone sind durch farbige Balken gekennzeichnet. Die beiden grün dargestellten BAC-Klone ergaben nur ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 4. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die deletierte Region, deren Größe etwa 6,1 Mb beträgt. Die Gene sind durch schwarze Pfeile in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

In weiteren Vorarbeiten war die Bruchpunktregion in 14q32.13 auf ungefähr 650 Kb zwischen den Klonen RP11-725G5 und RP11-241N4 bestimmt worden (Lübker 2009).

4.5.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 14q32.13 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche

Für die weitere Eingrenzung des Bruchpunktes wurden insgesamt fünf BAC-Klone (RP11-631H1, RP11-892D10, RP11-1070N10, RP11-46J12 und RP11-952P19), die den Bruchpunktbereich von 650 Kb abdeckten, ausgewählt: Zwei der BAC-Klone (RP11-631H1 und RP11-892D10) erzeugten ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 14 und dem derivativen Chromosom 14. Sie liegen daher proximal zum Bruchpunkt. Zwei andere BAC-Klone (RP11-46J12 und RP11-952P19) hybridisierten distal des Bruchpunktes und ergaben Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 14 und derivativen Chromosom 4. Der BAC-Klon RP11-1070N10 erzeugte *split signals*. Er hybridisierte zum einen auf dem Wildtyp-Chromosom 14 und zum anderen auf beiden derivativen Chromosomen 14 und 4 (Abb. 32). Er überspannt den Bruchpunkt.

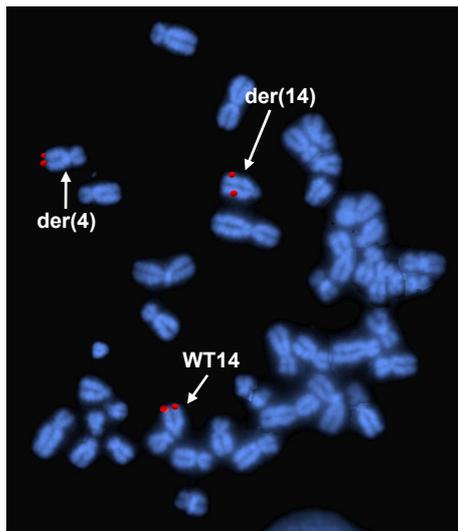


Abb. 32: FISH mit dem BAC RP11-1070N10 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Patienten 4. Die Sonde wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumRed* markiert, die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Sonde zeigte Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 14 (WT14) sowie – mit unterschiedlichen Intensitäten – auf beiden derivativen Chromosomen 14 [der(14)] und 4 [der(4)].

Die Resultate der FISH-Analysen sind in Tab. 25 zusammengefasst.

BAC-Klone (cen→ tel)	Zytogenetische Bande	Signalzuordnung	Signalintensitäten der(14) zu der(4) in [%]
RP11-631H1	14q32.13	WT14 + der(14)	-
RP11-892D10	14q32.13	WT14 + der(14)	-
RP11-1070N10	14q32.13	WT14 + der(14) + der(4)	80 zu 20
RP11-46J12	14q32.13-q32.2	WT14 + der(4)	-
RP11-952P19	14q32.13-q32.2	WT14 + der(4)	-

Tab. 25: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 14q31.13. Angegeben sind die Bezeichnungen der BAC-Klone, deren zytogenetische Bande, die chromosomale Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale sowie Werte zu Signalintensitäten. WT: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom; cen: Zentromer; tel: Telomer.

Aufgrund der durchgeführten FISH-Analysen konnte der Bruchpunkt in 14q32.13 auf ungefähr 80 Kb eingegrenzt werden (Abb. 33). Datenbankrecherchen ergaben, dass in dem eingegrenzten Bruchpunktbereich ein Gen lokalisiert ist: *TCL6* [*T-cell leukemia/lymphoma 6* (non-protein coding)].

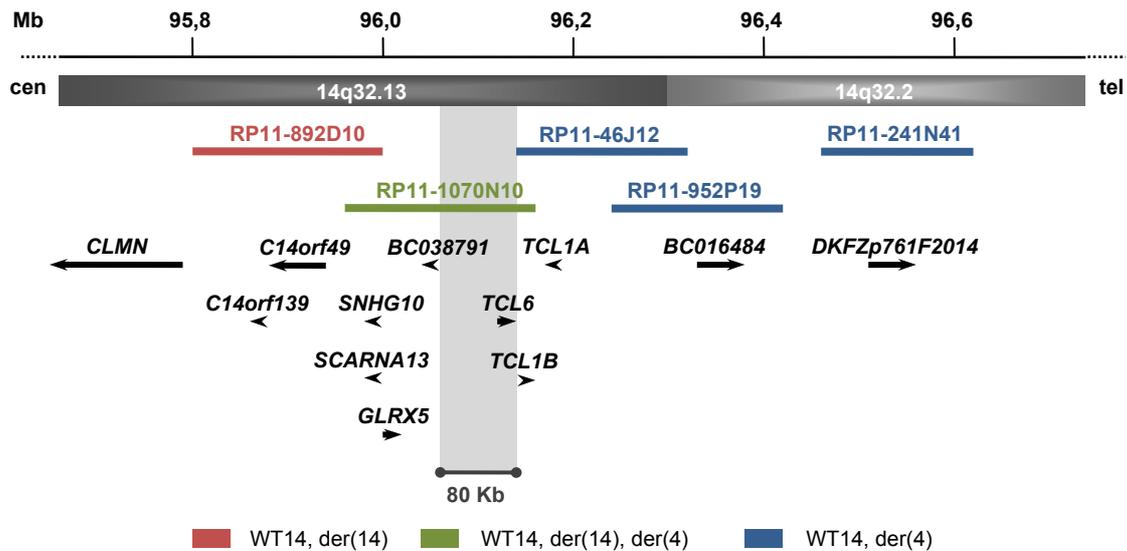


Abb. 33: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 14q32.13 mit BAC-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 14q31.13 dargestellt, durch den hellgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 14q32.2 mit Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Die Inserts der BAC-Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Der rot dargestellte BAC-Klon lokalisiert proximal zum Bruchpunkt, die blauen BAC-Klone lokalisieren distal. Der grün eingezeichnete Klon ist bruchpunktüberspannend. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion, deren Größe etwa 80 Kb beträgt. Die Gene sind durch schwarze Pfeile in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

4.6 Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 16;17-Translokation bei Patient 5-1

4.6.1 Patientenbeschreibung

Der 27-jährige Patient 5-1 ist kleinwüchsig (-3,5 Standardabweichung) und hat kurze Gliedmaßen. Sein Kopfumfang beträgt 55 cm und liegt damit auf der 50. Perzentile. Ferner wurden bei dem Patienten moderate Dysmorphiezeichen festgestellt: tiefliegende Augen, schmale und prominente Stirn, kleine Ohren, kurze Augenbrauen und kurze Nase. Er hat beidseits einen *Pes cavus* (Hohlfuß) sowie abgeschwächte Sehnenreflexe. Patient 5-1 hat eine schwere Intelligenzminderung (Intelligenzquotient <30) und spricht nur wenige Worte. Darüber hinaus weist er Verhaltensauffälligkeiten mit stereotypischen Bewegungen und repetitiven Sequenzen auf. Ab dem zehnten Lebensmonat traten Fieberkrämpfe auf, gefolgt von generalisierten tonisch-klonischen Krampfanfällen bis zum 17. Lebensjahr, seitdem ist er anfallsfrei. Es wurden mehrere pathologische EEGs aufgezeichnet. Sie lassen paroxysmale, diffuse bilaterale Spike-Wave-Komplexe (3-4 c/s) mit temporaler Prädominanz erkennen. Eine CCT-Untersuchung ergab eine Erweiterung der Seitenventrikel.

4.6.2 Vorarbeiten

Durch eine zytogenetische Untersuchung war eine mikroskopisch balanciert erscheinende Translokation zwischen den Chromosomen 16 und 17 [46,XY,t(16;17)(p13.1;q11.2)] identifiziert worden. Eine erneute zytogenetische Untersuchung im Institut für Human-genetik am UKE ergab, dass die Bruchpunkte in 16p13.2~p13.3 und 17q11.2 liegen (Abb. 34). Mithilfe einer Array-CGH-Untersuchung, durchgeführt im Institut für Human-genetik am UKSH, Campus Kiel, wurde eine 85 Kb große Deletion in 17q12 festgestellt [arr cgh 17q12(33,682,406→33,767,198 Mb)x1]. Die Deletion könnte möglicherweise im Translokationsbruchpunkt liegen; in diesem Fall würde es sich nicht um eine balancierte Translokation handeln.

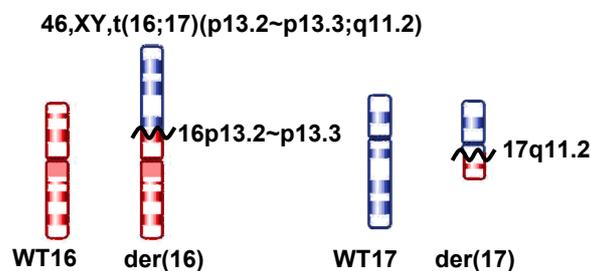


Abb. 34: Schematische Darstellung der Wildtyp- und der rearrangierten Chromosomen der 16;17-Translokation. Die Ideogramme der Wildtyp-(WT) und derivativen (der) Chromosomen 16 (rot) und 17 (blau) sind dargestellt. Die schwarzen Wellenlinien markieren die zytogenetisch identifizierten Bruchpunktregionen in 16p13.2~p13.3 und 17q11.2.

In der Familie von Patient 5-1 gibt es drei weitere Translokationsträger mit ähnlichen klinischen Merkmalen (Abb. 35): der Vater des Patienten (Patient 5-2), die Tante väterlicherseits (Patientin 5-3) sowie der Cousin (Patient 5-4). Der Vater des Patienten 5 und seine Tante weisen ebenfalls Verhaltensauffälligkeiten auf. Außerdem hatte der Vater vom neunten bis zum 18. Lebensjahr und die Tante vom 16. bis zum 25. Lebensjahr tonisch-klonische Krampfanfälle. Beide haben außerdem Lernschwierigkeiten. Der Cousin zeigt wie Patient 5-1 Verhaltensauffälligkeiten, eine schwere Intelligenzminderung (IQ 40) sowie tonisch-klonische Anfälle vom 8. bis zum 20. Lebensjahr. Zytogenetische Untersuchungen ergaben, dass alle betroffenen Familienmitglieder Träger der 16;17-Translokation sind; das bedeutet, dass der Krankheitsphänotyp mit der 16;17-Translokation segregiert. Die Großmutter väterlicherseits des Patienten 5-1 trug ebenfalls eine 16;17-Translokation. Über klinische Auffälligkeiten ist bei ihr nichts bekannt.

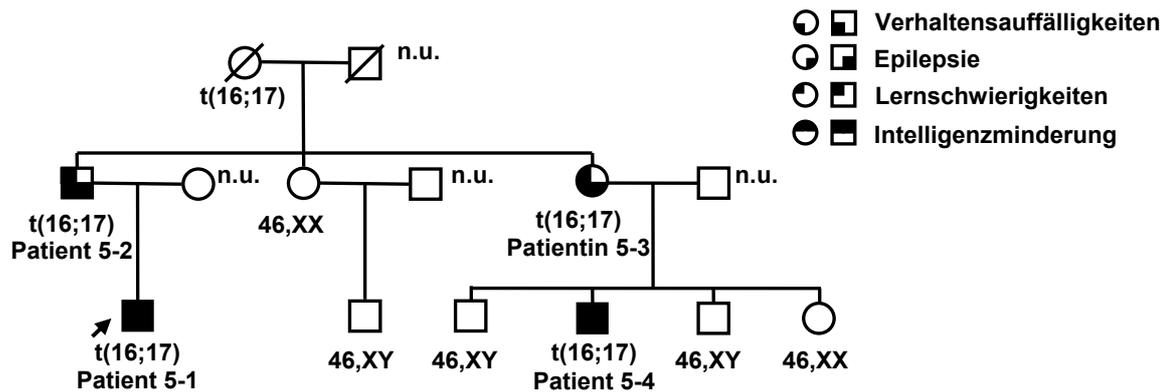


Abb. 35: Familienstammbaum über drei Generationen des Patienten 5-1. Der Krankheitsphänotyp segregiert mit der 16;17-Translokation. „t(16;17)“ markiert die Individuen mit einem chromosomalen Rearrangement, Individuen mit einem normalen Karyotyp sind durch die Angabe „46,XX“ bzw. „46,XY“ gekennzeichnet. Der Indexpatient (Patient 5-1) ist durch einen schwarzen Pfeil kenntlich gemacht. Die Abkürzung „n.u.“ steht für „zytogenetisch nicht untersucht“.

In den Vorarbeiten konnte bereits ein bruchpunktüberspannender BAC-Klon für den Bruch in 16p13.2 identifiziert werden: Die FISH mit RP11-77E6 ergab ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 16 sowie je ein Signal auf beiden derivativen Chromosomen 16 und 17 (Abb. 36) (Lübker 2009).

4.6.3 Bestätigung des bruchpunktüberspannenden Klons RP11-77E6 und anschließende Datenbankrecherche

Eine FISH mit dem bruchpunktüberspannenden BAC-Klon RP11-77E6 (Abb. 36) wurde im Rahmen dieser Arbeit wiederholt.

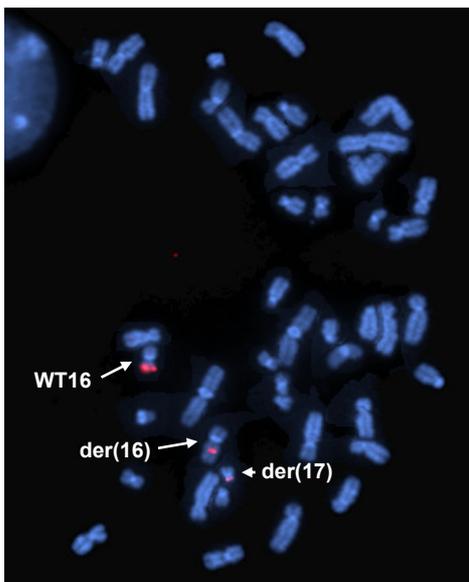


Abb. 36: FISH mit dem BAC RP11-77E6 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Patienten 5-1. Die Sonde wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumRed* markiert, die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Sonde zeigte Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 16 (WT16) sowie Signale mit einer Fluoreszenzintensität von 70% auf dem derivativen Chromosom 16 [der(16)] und 30% auf dem derivativen Chromosom 17 [der(17)].

Der identifizierte Bruchpunkt unterbricht das Gen *GRIN2A* (*glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A*) direkt (Abb. 37).

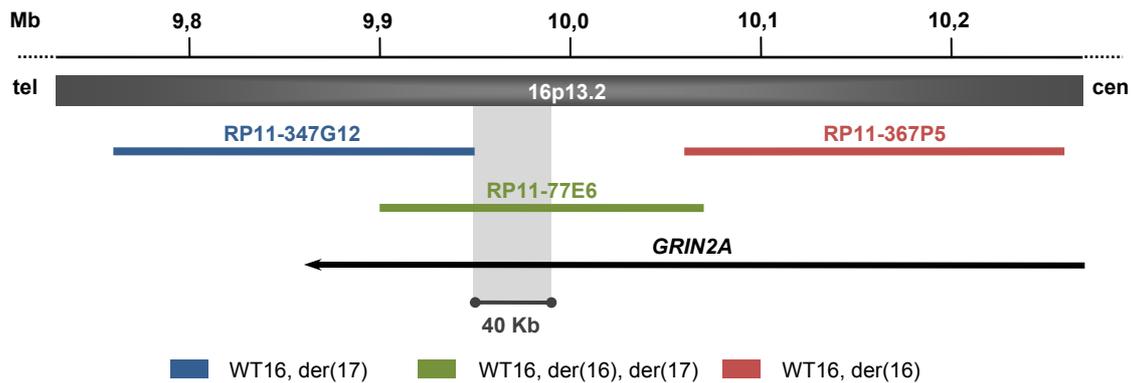


Abb. 37: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 16p13.2 mit BAC-Klonen sowie dem dort lokalisierten Gen *GRIN2A*. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 16p13.2 mit Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Telomer (tel) nach Zentromer (cen) angegeben. Die Inserts der BAC-Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Der rot dargestellte BAC-Klon lokalisiert proximal zum Bruchpunkt, der blaue distal. Der grün eingezeichnete Klon ist bruchpunktüberspannend. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion, deren Größe etwa 40 Kb beträgt. Das Gen *GRIN2A* ist durch einen schwarzen Pfeil in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

4.6.4 Bestätigung der Deletion in 17q12 und Eingrenzung der Bruchpunktregion in 17q11.2 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche

Es wurden vier Fosmide innerhalb einer 165 Kb großen Region, welche die 85 Kb große Deletion in 17q12 enthält, ausgewählt und hybridisiert. Zwei Fosmid-Klone (G248P81921A8 und G248P85774A8) hybridisierten am Wildtyp-Chromosom 17 und am derivativen Chromosom 16 (Abb. 38 A und D). Interessanterweise erzeugten die anderen zwei Klone (G248P80628F7 und G248P84939H3), welche zwischen den beiden o.g. hybridisieren sollten, nur ein Signal auf dem derivativen Chromosom 16 (Abb. 38 B und C). Demnach flankiert das Fosmid G248P81921A8 die Deletion proximal und das Fosmid G248P85774A8 die Deletion distal. Die zwei Fosmid-Klone, welche lediglich ein Signal erzeugten, liegen im deletierten Bereich. Da die Fosmide im deletierten Intervall auf dem derivativen Chromosom 16 hybridisierten, bedeutet das zum einen, dass die nun bestätigte 85 Kb große Deletion den 17q-Bruchpunkt nicht beinhaltet, zum anderen, dass die Deletion nicht auf dem derivativen Chromosom 17 vorliegt, sondern auf dem Wildtyp-Chromosom 17.

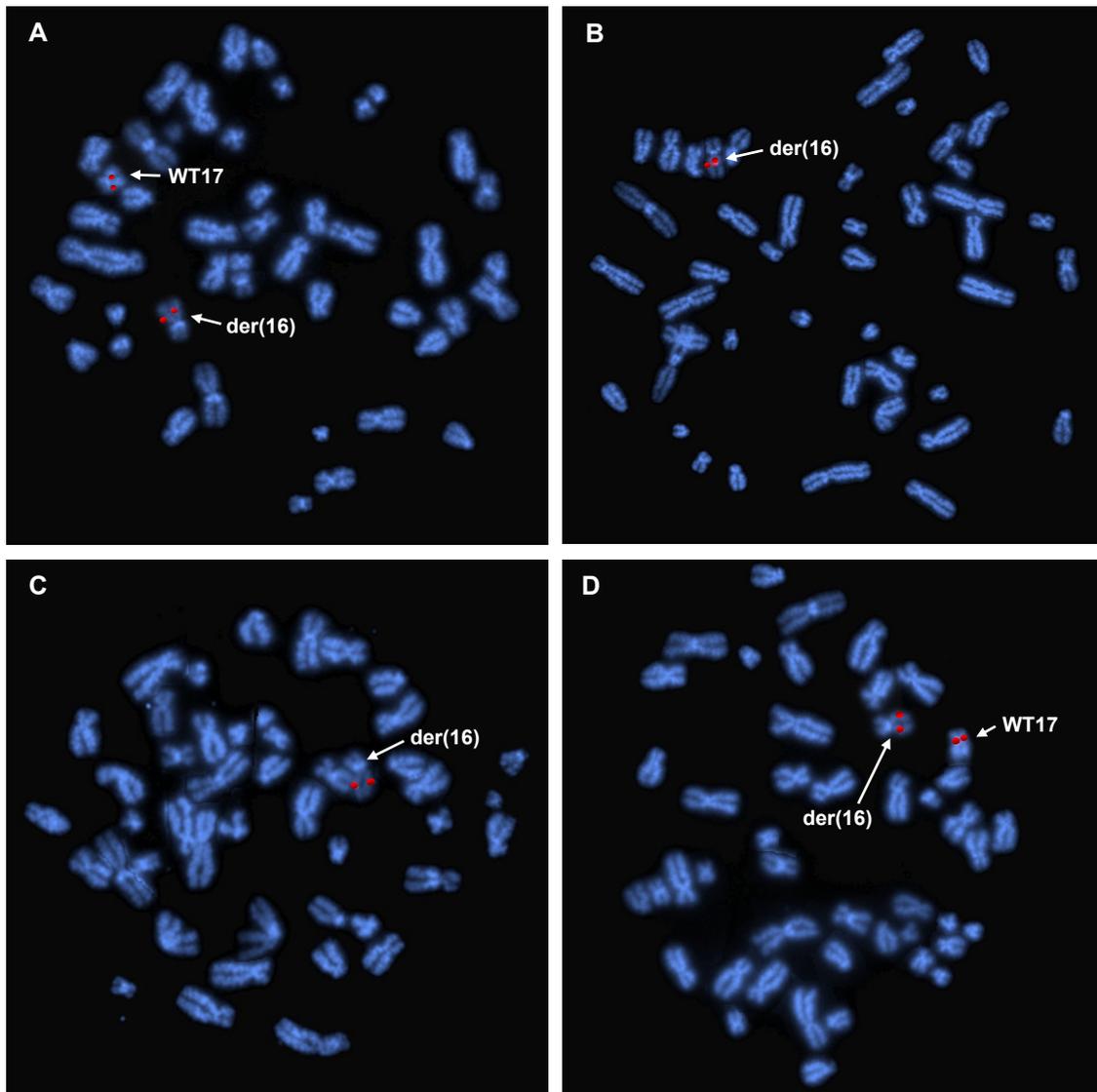


Abb. 38: FISH mit den Fosmiden G248P81921A8 (A), G248P80628F7 (B), G248P84939H3 (C) und G248P85774A8 (D) als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen von Patient 5-1. Die Sonden wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumRed* markiert, die Chromosomen mit DAPI gegengefärbt. Die Sonden G248P81921A8 und G248P85774A8 zeigten jeweils Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 17 (WT17) und derivativen Chromosom 16 [der(16)]. Die Sonden G248P80628F7 und G248P84939H3 zeigten nur Signale auf dem derivativen Chromosom 16 [der(16)].

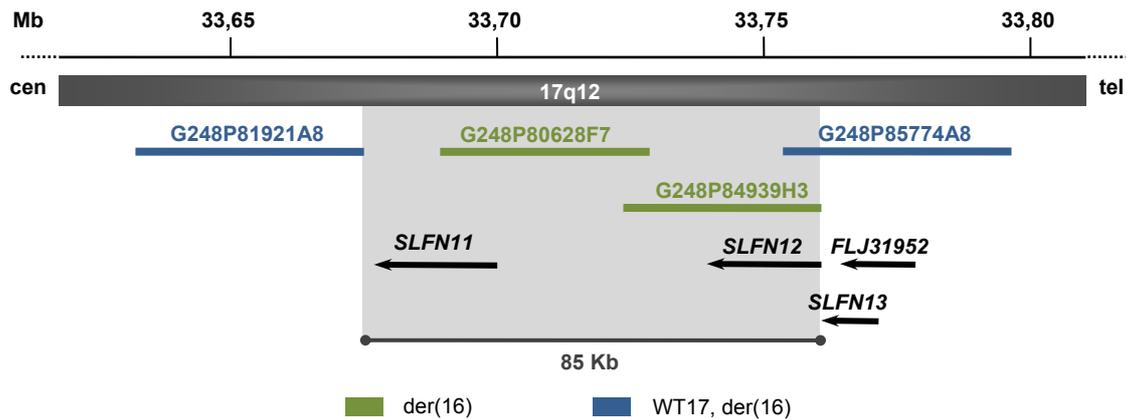


Abb. 39: Schematische Darstellung des Deletionsbereichs in 17q12 mit den ausgewählten Fosmiden sowie den dort lokalisierten Genen. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 17q12 dargestellt, mit Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel). Die Inserts der Fosmid-Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Die blau dargestellten Fosmid-Klone begrenzen die Deletion distal und proximal. Die hellgrün dargestellten Fosmid-Klone erzeugen nur ein Signal auf dem derivativen Chromosom 16, auf dem Wildtyp-Chromosom 17 ist dieser Bereich deletiert. Der hellgrau markierte Bereich zeigt den Deletionsbereich, dessen Größe etwa 85 Kb beträgt. Die Gene sind durch schwarze Pfeile in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

Durch die o.g. Analysen wurde die Translokationsbruchregion in 17q distal durch das Fosmid G248P81921A8 begrenzt. Daraufhin wurden FISH-Analysen mit acht weiteren BAC-Klonen (RP11-1095J4, RP11-1007K22, RP11-832J20, RP11-915B21, RP11-348E14, RP11-449M14, RP11-1145F2 und RP11-663N22) durchgeführt, mit dem Ziel, den Bruchpunkt auch proximal einzugrenzen. Vier dieser Klone (RP11-1095J4, RP11-1007K22, RP11-832J20 und RP11-915B21) ergaben je ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 17 und dem derivativen Chromosom 16. Dies bedeutet, dass der Bruchpunkt weiter proximal liegt. Drei Klone (RP11-449M14, RP11-1145F2 und RP11-663N22), die näher am Zentromer kartieren, hybridisierten auf dem Wildtyp-Chromosom 17 und dem derivativen Chromosom 17. Der BAC-Klon RP11-348E14 ergab *split signals* (Abb. 40).

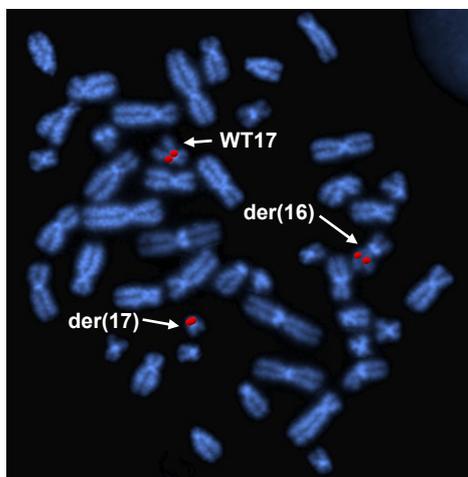


Abb. 40: FISH mit dem BAC RP11-348E14 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Patienten 5. Die Sonde wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumRed* markiert, die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Sonde zeigte Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 17 (WT17) und jeweils – mit unterschiedlichen Intensitäten – auf beiden derivativen Chromosomen 17 [der(17)] und 16 [der(16)].

Die beiden Translokationschromosomen 16 und 17 erbte Patient 5-1 von seinem Vater (Abb. 35). Folglich stammen das Wildtyp-Chromosom 16 und das Chromosom 17 mit der Deletion von der Mutter. Um zu überprüfen, ob die 17q12-Deletion auch bei der Mutter vorliegt oder beim Patienten 5-1 neu auftrat, wurden FISH mit den Fosmid-Klonen G248P80628F7 und G248P84939H3 (Abb. 38 B und C) an Metaphasechromosomen seiner Mutter durchgeführt: Die beim Patienten nachgewiesene Deletion trägt auch seine phänotypisch unauffällige Mutter (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich also um eine vererbte Deletion, die höchstwahrscheinlich keine klinische Relevanz hat. Die Ergebnisse der FISH-Analysen sind in folgender Tabelle aufgeführt:

BAC- und Fosmid-Klone (cen→ tel)	Zytogenetische Bande	Signalzuordnung	Signalintensitäten der(17) zu der(16) in [%]
RP11-663N22	17q11.1	WT17 + der(17)	-
RP11-1145F2	17q11.2	WT17 + der(17)	-
RP11-449M14	17q11.2	WT17 + der(17)	-
RP11-348E14	17q11.2	WT17 + der(17) + der(16)	60 zu 40
RP11-915B21	17q11.2	WT17 + der(16)	-
RP11-832J20	17q11.2	WT17 + der(16)	-
RP11-1007K22	17q11.2	WT17 + der(16)	-
RP11-1095J4	17q11.2	WT17 + der(16)	-
G248P81921A8	17q12	WT17 + der(16)	-
G248P80628F7	17q12	der(16)	-
G248P84939H3	17q12	der(16)	-
G248P85774A8	17q12	WT17 + der(16)	-

Tab. 26: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes in 17q11.2 und Bestätigung der 17q12-Deletion. Angegeben sind die Bezeichnungen der BAC- und Fosmid-Klone, deren zytogenetische Bande, die chromosomale Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale sowie Werte zu Signalintensitäten. WT: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom; cen: Zentromer; tel: Telomer.

Die Datenbankrecherche für den Chromosomenbruch in 17q11.2 ergab, dass in dem 40 Kb großen Bruchpunktbereich fünf Gene liegen: *TMEM97* (*transmembrane protein 97*), *IFT20* (*intraflagellar transport 20 homolog*), *TNFAIP1* [*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)*], *POLDIP2* (*polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2*), *TMEM199* (*transmembrane protein 199*); eins könnte direkt unterbrochen sein.

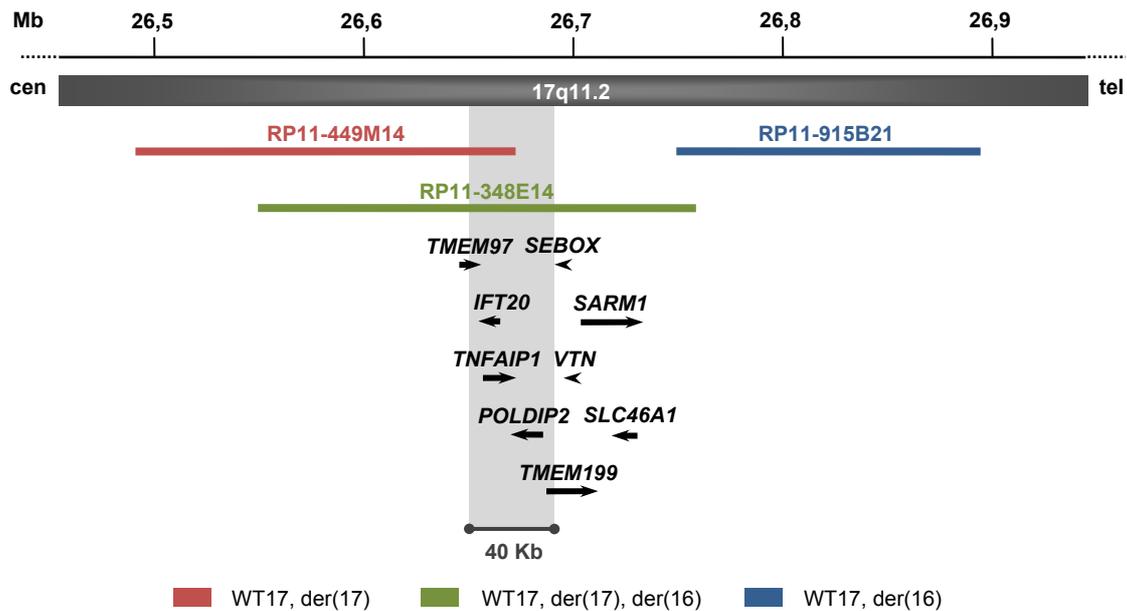


Abb. 41: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 17q11.2 mit BAC-Klonen sowie den dort lokalisierten Genen. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 17q11.2 mit Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Die Inserts der BAC-Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Der rot dargestellte BAC-Klon hybridisiert proximal zum Bruchpunkt, der blaue distal. Der grün eingezeichnete Klon ist bruchpunkt-überspannend. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion, deren Größe etwa 40 Kb beträgt. Die Gene sind durch schwarze Pfeile in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

4.7 Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer X;13-Translokation bei Patientin 6

4.7.1 Patientenbeschreibung

Bei der Patientin 6 wurde eine Entwicklungsverzögerung mit ausgeprägter Intelligenzminderung (IQ 45) festgestellt. Sie weist einige faziale Dysmorphiezeichen, wie eine Synophrys (zusammengewachsene Augenbrauen) und einen Dolichocephalus (schmäler, langer Schädel), auf. Darüber hinaus hat Patientin 6 eine überzählige Brustwarze.

4.7.2 Vorarbeiten

Eine zytogenetische Untersuchung hatte eine mikroskopisch balanciert erscheinende Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen X und 13 [46,XX,t(X;13)(q24;q22)] ergeben. Eine wiederholte Chromosomenanalyse am Institut für Humangenetik des UKE ergab den Karyotyp 46,XX,t(X;13)(q25;q22) (Abb. 42). Eine Array-CGH-Untersuchung, die am Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel, durchgeführt wurde, zeigte keine genomischen Imbalancen.

46,XX,t(X;13)(q25;q22)

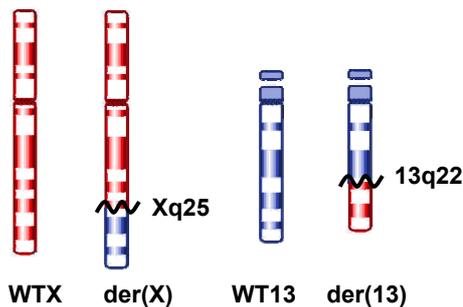


Abb. 42: Schematische Darstellung der Wildtyp- und der rearrangierten Chromosomen der X;13-Translokation. Die Ideogramme der Wildtyp- (WT) und derivativen (der) Chromosomen X (rot) und 13 (blau) sind dargestellt. Die schwarzen Wellenlinien markieren die zytogenetisch identifizierten Bruchpunktregionen in Xq25 und 13q22.

Der Bruchpunkt in 13q22 wurde bereits in Vorarbeiten mittels FISH-Analysen unter Verwendung der BAC-Klone RP11-459P23 und RP11-132L12 auf 800 Kb (in 13q22.1-q22.2) eingegrenzt. Auf dem X-Chromosom wurde mittels FISH vermutlich eine Mikroduplikation in der Bruchpunktregion identifiziert, da vier aufeinanderfolgende, teilweise überlappende BAC-Klone (RP11-1079G24, RP11-100L19, RP11-517O1 und RP11-91F16) *split signals* ergaben (Lübker 2009). Ein BAC-Klon, der die Duplikation und den Bruchpunkt proximal begrenzt, war bisher nicht identifiziert worden. Es wurde vermutet, dass die Duplikation und der Translokationsbruchpunkt auf dem X-Chromosom übereinstimmen.

4.7.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 13q22 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche

Zur weiteren Eingrenzung der Bruchpunktregion in 13q22 wurden insgesamt drei BAC-Klone verwendet. Ein BAC-Klon (RP11-285E18) hybridisierte proximal des Bruchpunktes, je auf dem Wildtyp- und dem derivativen Chromosom 13. Ein anderer Klon (RP11-138N13) zeigte ein Signal am Wildtyp-Chromosom 13 und am derivativen X-Chromosom. Folglich liegt er distal zum Bruchpunkt. Der BAC-Klon RP11-157E11 ergab *split signals* (Abb. 43). Die Resultate der FISH-Analysen sind in Tab. 27 zusammengefasst.

BAC-Klon (cen→ tel)	Zytogenetische Bande	Signalzuordnung	Signalintensitäten der(13) zu der(X) in [%]
RP11-285E18	13q22.1	WT13 + der(13)	-
RP11-157E11	13q22.1	WT13 + der(13) + der(X)	*
RP11-138N13	13q22.2	WT13 + der(X)	-

Tab. 27: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des 13q22.1-Bruchpunktes. Angegeben sind die Bezeichnungen der BAC-Klone, deren zytogenetische Bande, die chromosomale Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale sowie Werte zu Signalintensitäten. WT: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom; cen: Zentromer; tel: Telomer. * Keine Angabe aufgrund fehlender Unterscheidungskriterien für Wildtyp- und derivatives Chromosom 13.

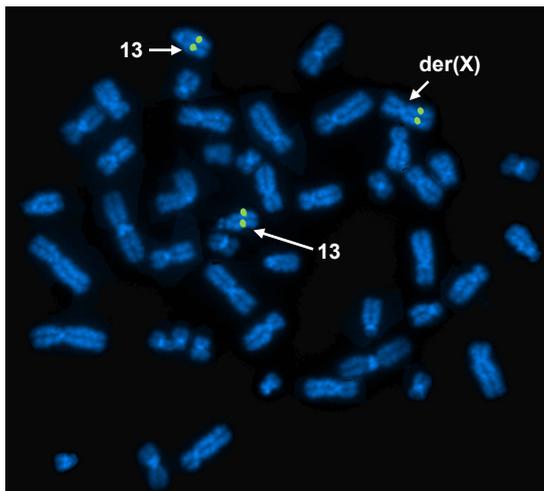


Abb. 43: FISH mit dem BAC RP11-157E11 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen der Patientin 6. Die Sonde wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumGreen* markiert, die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Sonde zeigte Signale auf dem Wildtyp-Chromosom 13, dem derivativen Chromosom 13 sowie dem derivativen X-Chromosom [der(X)]. Eine Unterscheidung zwischen Wildtyp- und derivativen Chromosom 13 ist aufgrund der ähnlichen Morphologie nicht möglich.

Der Bruchpunkt in 13q22.1 konnte mittels FISH-Analysen auf etwa 160 Kb eingegrenzt werden. Datenbankrecherchen zeigten, dass in dem Bruchpunktbereich selbst kein Gen liegt. Stromaufwärts, ungefähr 80 Kb vom Bruchpunktbereich entfernt, liegt das nicht-proteinkodierende Gen *BC043259* (Abb. 44).

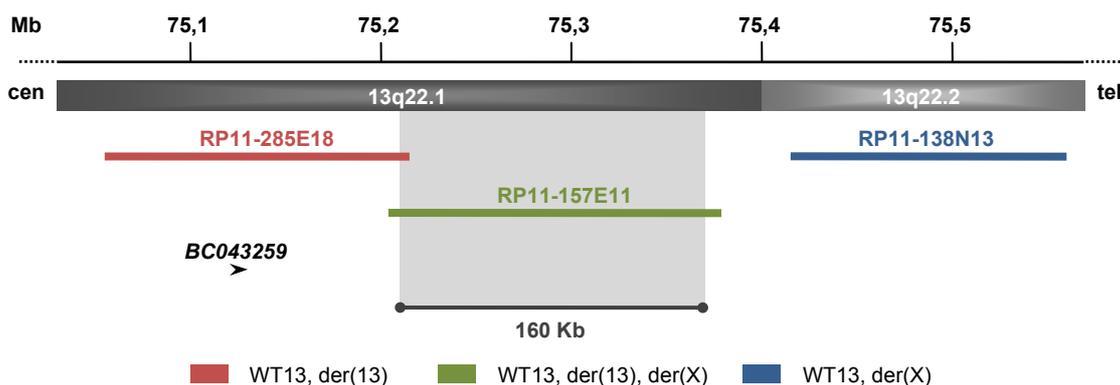


Abb. 44: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 13q22 mit BAC-Klonen sowie dem dort lokalisierten Gen *BC043259*. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 13q22.1 dargestellt, der hellere graue Balken stellt einen Ausschnitt der Region 13q22.2 dar. Die Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) ist angegeben. Die Inserts der BAC-Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Der rot dargestellte BAC-Klon lokalisiert proximal zum Bruchpunkt, der blaue distal. Der grün eingezeichnete Klon ist bruchpunktüberspannend. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion, deren Größe etwa 160 Kb beträgt. Das Gen *BC043259* ist durch einen schwarzen Pfeil in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

4.7.4 Eingrenzung der Bruchpunktregion in Xq25 mittels FISH und anschließende Datenbankrecherche

Ziel der weiteren FISH-Analysen war es, proximal des Bruchpunktes und der Mikroduplikation gelegene BAC-Klone zu identifizieren, sowie den Bereich von distal weiter einzugrenzen. Daher wurden insgesamt 11 Klone in FISH-Analysen eingesetzt. Von diesen hybridisierten sechs BAC-Klone (RP11-322B4, RP11-235J12, RP11-689O13, RP11-

898G24, RP11-722M13 und RP11-803B16) proximal des Bruchpunktes und der Duplikation, je auf dem Wildtyp- und dem derivativen X-Chromosom. Ein anderer Klon (RP11-103K12) zeigte ein Signal am Wildtyp-X-Chromosom und am derivativen Chromosom 13 (Abb. 45C). Dieser BAC-Klon hybridisierte also proximal der Mikroduplikation und gleichzeitig proximal der Bruchpunktregion. Fünf Klone (CTD-3168N18, RP11-60E17, RP11-91F16, RP11-434C8 und RP11-411L7) ergaben *split signals*. Sie hybridisierten auf dem Wildtyp-X-Chromosom sowie auf dem derivativen X-Chromosom und dem derivativen Chromosom 13. Diese Klone überspannen den Bruchpunkt bzw. liegen innerhalb des etwa 860 Kb großen duplizierten Bereiches (Abb. 46). Die Resultate der FISH-Analysen sind in Tab. 28 zusammengefasst.

BAC-Klon (cen→ tel)	Zytogenetische Bande	Signalzuordnung	Signalintensitäten der(X) zu der(13) in [%]
RP11-322B4	Xq25	WTX + der(X)	-
RP11-235J12	Xq25	WTX + der(X)	-
RP11-689O13	Xq25	WTX + der(X)	-
RP11-898G24	Xq25	WTX + der(X)	-
RP11-722M13	Xq25	WTX + der(X)	-
RP11-803B16	Xq25	WTX + der(X)	-
CTD-3168N18	Xq25	WTX + der(X) + der(13)	*
RP11-60E17	Xq25	WTX + der(X) + der(13)	*
RP11-91F16	Xq25	WTX + der(X) + der(13)	*
RP11-434C8	Xq25	WTX + der(X) + der(13)	*
RP11-411L7	Xq25	WTX + der(X) + der(13)	*
RP11-103K12	Xq25	WTX + der(13)	-

Tab. 28: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Xq25-Bruchpunktes und Bestimmung der Mikroduplikation in Xq25. Angegeben sind die Bezeichnungen der BAC-Klone, deren chromosomale Lokalisation, die chromosomale Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale sowie Werte zu Signalintensitäten. WT: Wildtyp-Chromosom; der: derivatives Chromosom; cen: Zentromer; tel: Telomer. * Keine Angabe aufgrund fehlender Unterscheidungskriterien für Wildtyp-X- und derivatives X-Chromosom.

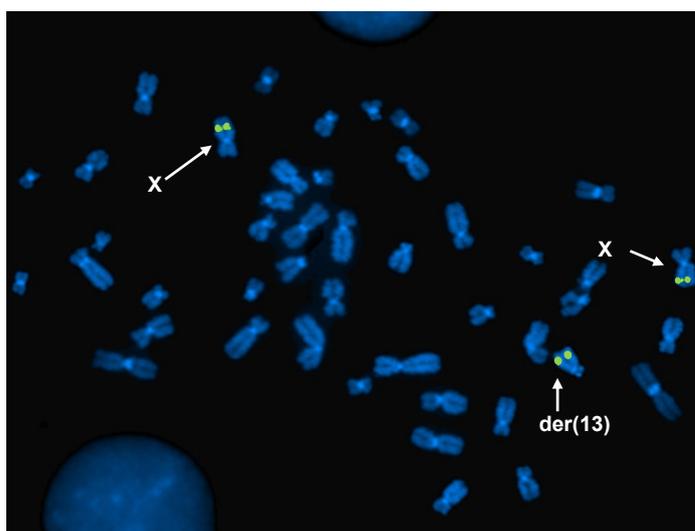


Abb. 45: FISH mit dem BAC CTD-3168N18 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen von Patientin 6. Die Sonden wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumGreen* markiert, die Chromosomen mit DAPI gegengefärbt. Die Sonde CTD-3168N18 zeigte Signale auf dem Wildtyp-X-Chromosom, auf dem derivativen X-Chromosom und dem derivativen Chromosom 13 [der(13)]. Eine Unterscheidung zwischen Wildtyp-X- und derivatem X-Chromosom ist aufgrund der ähnlichen Morphologie nicht möglich.

Im Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel, erfolgte eine Reanalyse der Array-CGH-Daten, welche die durch FISH-Analysen entdeckte Duplikation bestätigen konnte. Sie wurde folgendermaßen angegeben: X: 122,772,770-123,630,959; 858 Kb (GRCh37/hg19). Die durch FISH-Analysen und Array-CGH bestimmte Mikroduplikationsgröße im Bruchpunktbereich von 858 Kb bzw. 860 Kb stimmt nahezu überein.

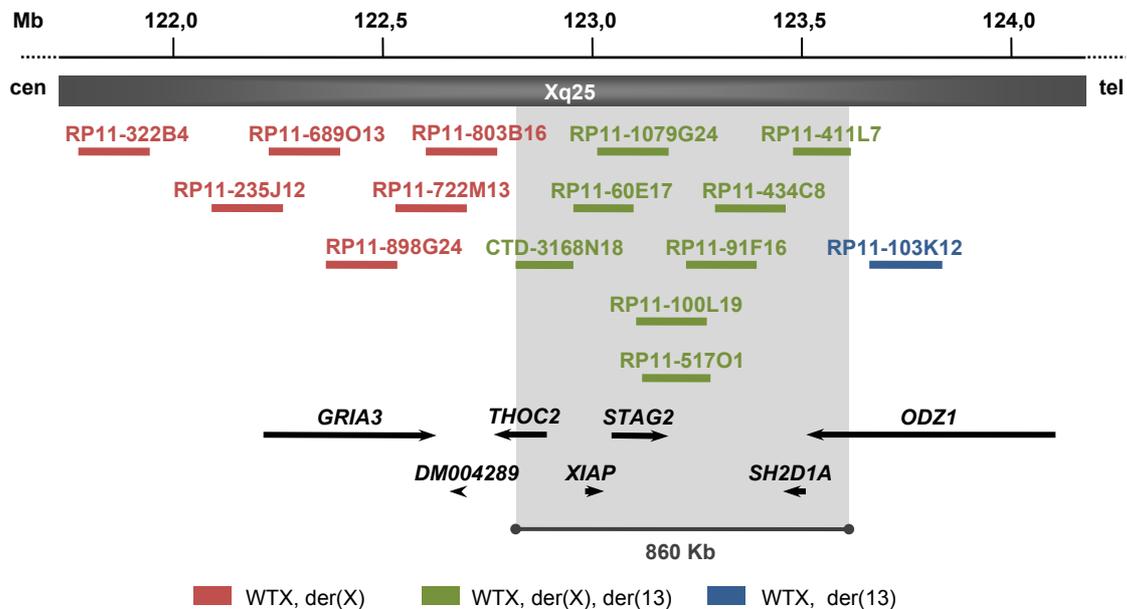


Abb. 46: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion und Mikroduplikation in Xq25 sowie den dort lokalisierten Genen. Durch einen dunkelgrauen Balken ist ein Ausschnitt der Region Xq25 mit Größeneinteilung in Megabasen (Mb) in Orientierung von Zentromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Die Inserts der BAC-Klone sind durch verschiedenfarbige Balken gekennzeichnet. Die rot dargestellten BAC-Klone lokalisieren proximal zum Bruchpunkt und zur Mikroduplikation, der blaue distal, und grün eingezeichnete Klone sind bruchpunktüberspannend bzw. liegen innerhalb des duplizierten Bereiches. Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Bruchpunktregion bzw. den duplizierten Bereich, dessen Größe etwa 860 Kb beträgt. Die Gene *GRIA3*, *DM004289*, *THOC2*, *XIAP*, *STAG2*, *SH2D1A* und *ODZ1* sind durch schwarze Pfeile in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

Datenbankrecherchen ergaben, dass sich fünf Gene innerhalb des duplizierten Bereiches bzw. der Bruchpunktregion befinden: *THOC2* (*THO complex 2*), *XIAP* (*X-linked inhibitor of apoptosis*), *STAG2* (*stromal antigen 2*), *SH2D1A* (*SH2 domain containing 1A*) und *ODZ1* (*odz, odd Oz/ten-m homolog 1*). Ein weiteres Gen liegt in der Nähe des Bruchpunktbereiches bzw. der Mikroduplikation: *GRIA3* (*glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3*).

5 Diskussion

5.1 Eingrenzung der Bruchpunkte der 2;8-Translokation bei Patientin 1 auf 40 bzw. 80 Kb

5.1.1 Der Phänotyp der Patientin 1 ist vermutlich unabhängig von der 2q13-Bruchpunktregion

Patientin 1 zeigt drei auffällige klinische Merkmale: schwere Intelligenzminderung, Verhaltensauffälligkeiten mit autistischen Zügen sowie Krampfanfälle. Serielle FISH-Analysen an den Metaphasechromosomen von Patientin 1 konnten den Bruchpunktbereich in 2q13 auf 40 Kb eingrenzen. Datenbankrecherchen ergaben, dass durch dieses Bruchereignis das *ACOXL* (*acyl-CoA oxidase-like*)-Gen direkt rupturiert ist.

Über das *ACOXL*-Gen und die Funktion des von diesem kodierten Proteins ist wenig bekannt. Das Genprodukt zeigt Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität und Acyl-CoA-Oxidase-Aktivität. Es ist am Prozess der β -Oxidation der Fettsäuren beteiligt (Gene Ontology). Polymorphismen in *ACOXL* sind mit einem erhöhten Risiko für die chronische lymphatische Leukämie (CLL) assoziiert (Di Bernardo et al. 2008; Lan et al. 2010; Slager et al. 2010; Slager et al. 2011).

Recherchen in der Datenbank *Decipher* ergaben 15 Personen, die im Bereich des Bruchpunktes eine Deletion oder Duplikation aufweisen. Neun dieser Imbalancen sind Deletionen, sechs sind Duplikationen. Sechs der Deletionen, die in ihrer Größe zwischen 1,44 bis 9,7 Mb variieren, verursachen keinen auffälligen Phänotyp. Auch zwei der nachgewiesenen Duplikationen, 1,93 und 17,65 Mb groß, wurden bei gesunden Personen detektiert. Jene Imbalancen, die bei phänotypisch auffälligen Patienten festgestellt wurden, umfassen sechs bis 181 Gene, so dass die Ursache des Phänotyps sehr viel wahrscheinlicher bei einem anderen Gen zu suchen ist. Hinzu kommt, dass eine Haploinsuffizienz des Gens *ACOXL* nach Informationen der Datenbank *Decipher* als sehr unwahrscheinlich einzuschätzen ist. Schließlich sind in der Datenbank *Database of Genomic Variants* in der Bruchpunktregion 2q13 zwei Deletionen und drei CNVs, davon zwei Duplikationen und eine Deletion, bei gesunden Individuen ausgewiesen.

Zusammengefasst scheint der Bruchpunkt in oder in der Nähe von *ACOXL* in keinem Zusammenhang mit dem Phänotyp von Patientin 1 zu stehen.

5.1.2 CSMD3 ist das Kandidatengen für den Phänotyp von Patientin 1

Durch FISH-Analysen konnte der Bruchpunkt in 8q23.3 auf etwa 80 Kb eingegrenzt werden. Datenbankrecherchen ergaben, dass durch die Translokation kein Gen disruptiert ist. Das Gen *CSMD3* (*CUB and Sushi multiple domains 3*) liegt etwa 310 Kb proximal zum Bruchpunkt. Es überspannt 1,2 Mb in 8q23, beinhaltet 73 Exons und kodiert für ein Transmembranprotein (Shimizu et al. 2003) (Abb. 47).

Über die Proteinfunktion von CSMD3 ist wenig bekannt. Es gibt allerdings Anhaltspunkte dafür, dass Proteine, welche eine CUB-Domäne beinhalten, in der Embryogenese und bei der Organentwicklung beteiligt sind (Bork und Beckmann 1993). Der CUB-Domäne werden Aufgaben bei Protein-Protein- bzw. Protein-Liganden-Interaktionen zugesprochen, so dass angenommen wird, dass CSMD3 entweder ein Transmembranrezeptor oder ein Adhäsionsprotein ist (Lau und Scholnick 2003). Humanes *CSMD3* wird im Gehirn und im Hoden exprimiert (Shimizu et al. 2003). Oeschger et al. (2012) haben bei Mäusen ein entwicklungsabhängiges Expressionsmuster von *Csmd3* im Kortex, insbesondere in der Subplatte, gezeigt. Daher wird angenommen, dass CSMD3 an grundlegenden neuronalen Funktionen beteiligt ist (Oeschger et al. 2012).

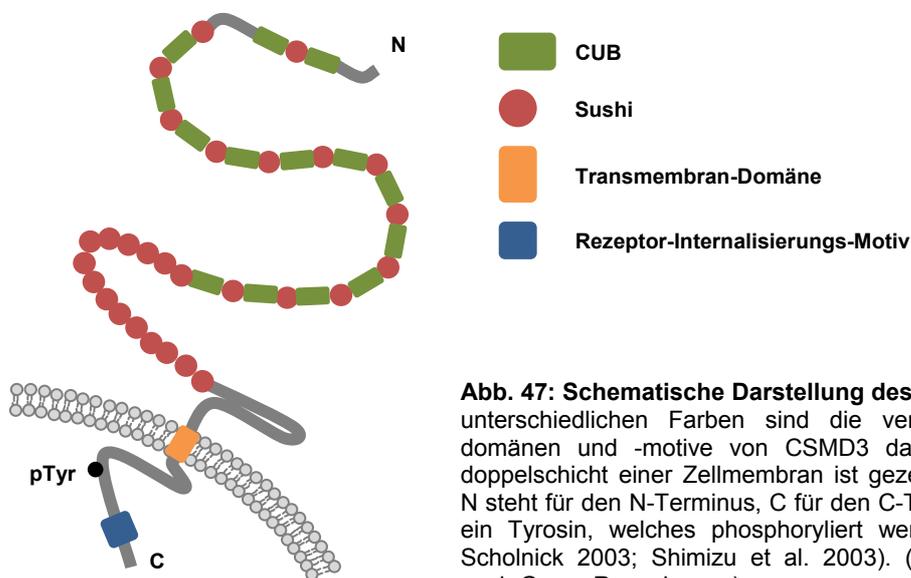


Abb. 47: Schematische Darstellung des CSMD3-Proteins. In unterschiedlichen Farben sind die verschiedenen Proteindomänen und -motive von CSMD3 dargestellt. Eine Lipiddoppelschicht einer Zellmembran ist gezeigt. Die Beschriftung N steht für den N-Terminus, C für den C-Terminus und pTyr für ein Tyrosin, welches phosphoryliert werden kann (Lau und Scholnick 2003; Shimizu et al. 2003). (Abbildung modifiziert nach Georg Rosenberger)

Zwei bekannte Krankheitsgene zentromerisch zu *CSMD3* sind *TRPS1* und *EXT1*. Eine Deletion oder Mutation des *TRPS1*-Gens führt zum Tricho-rhino-phalangealen Syndrom Typ I (TRPSI) (Momeni et al. 2000; Lüdecke et al. 2001). Für das TRPS sind kraniofaziale und skelletale Anomalien charakteristisch (Giedion 1966; Lüdecke et al. 2001). Mutationen oder Deletionen des *EXT1*-Gens verursachen multiple kartilaginäre Exosto-

sen (Kim et al. 2001). Sowohl Mutationen in *TRPS1* als auch solche in *EXT1* wurden mit Kleinwuchs assoziiert (Riedl et al. 2004). Eine etwas größere Deletion der Gene *TRPS1* und *EXT1* verursacht die Kombination der zwei verschiedenen Erkrankungsbilder und wird als TRPSII bezeichnet (Hou et al. 1995; Lüdecke et al. 1995). Patienten mit TRPS zeigen nicht generell eine Intelligenzminderung. Patienten mit TRPSI und einer submikroskopischen Deletion oder einer Punktmutation im *TRPS1*-Gen haben in der Regel eine normale Intelligenz (Brandt et al. 1997; Nardmann et al. 1997; Sasaki et al. 1997; Lüdecke et al. 1999). Allerdings ist bei vielen Patienten mit TRPSII sowie bei Patienten mit TRPSI und einer zytogenetisch sichtbaren Deletion in 8q23 eine Intelligenzminderung beschrieben (Yamamoto et al. 1989; Hamers et al. 1990). Die Intelligenzminderung scheint mit der Größe der interstitiellen 8q-Deletion zu korrelieren (Hamers et al. 1990; Lüdecke et al. 1991). Daher wird die Intelligenzminderung einiger Patienten mit einem TRPS auf die Deletion eines Gens, welches in der Nähe der Gene *TRPS1* und *EXT1* liegt, zurückgeführt (Nardmann et al. 1997; Lüdecke et al. 1999). Weiterführende Untersuchungen von Patienten mit TRPSII zeigten, dass bei Patienten mit normaler Intelligenz das Gen *CSMD3* immer intakt ist, während bei einem Teil der Patienten mit Intelligenzminderung *CSMD3* deletiert ist (Lüdecke et al. 1991). Daher wird angenommen, dass eine Haploinsuffizienz von *CSMD3* Intelligenzminderung verursachen kann (Riedl et al. 2004).

Bei einigen Patienten mit TRPSII wurden EEG-Veränderungen und Krampfanfälle beschrieben (Langer et al. 1984). Dies könnte darauf hindeuten, dass *CSMD3* auch für Krampfanfälle verantwortlich ist (Riedl et al. 2004). *CSMD3* wurde bereits als Kandidatengen für die benigne familiäre myoklonische Epilepsie (BAFME) vorgeschlagen, allerdings konnte bei sieben betroffenen Patienten keine Mutation in der proteinkodierenden Sequenz detektiert werden (Shimizu et al. 2003).

Zwei *de novo* Translokationen mit jeweils einem Bruchpunkt in 8q23 geben weitere Evidenz für eine Assoziation von *CSMD3* mit neurologischen Erkrankungen. Der Bruchpunkt lag hierbei 1,1 Mb proximal bzw. 2,8 Mb distal vom *CSMD3*-Gen. Bei beiden Patienten bestand eine Intelligenzminderung und Autismus, bei einem von ihnen zusätzlich auch Epilepsie (Floris et al. 2008). Ursächlich ist hier möglicherweise der Verlust eines *cis*-regulatorischen Elements durch die Translokationen, wodurch es zu einer Veränderung der zeitlichen, örtlichen und/oder quantitativen Expression von *CSMD3* gekommen sein könnte. Schließlich wurde in einer weiteren Studie bei einer Familie mit autosomal dominant vererbter Epilepsie der maximale *logarithm of the odds score* (LOD-Score) innerhalb des *CSMD3*-Gens nachgewiesen (Mikami et al. 1999) (Abb. 48).

Der LOD-Score gibt die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung an; ein sehr hoher LOD-Score gibt einen sicheren Hinweis darauf, dass das Krankheitsgen in der Nähe des Markers lokalisiert ist.

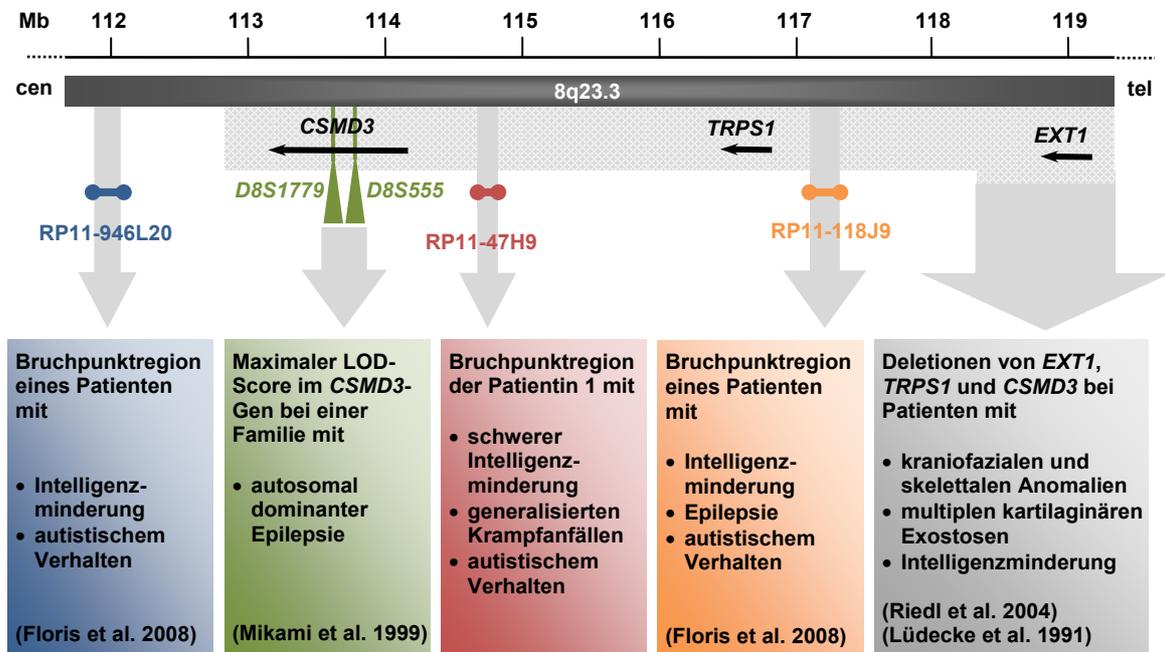


Abb. 48: Schematische Darstellung eines Abschnitts von 8q23.3 mit den dort lokalisierten Genen *CSMD3*, *TRPS1* und *EXT1* sowie Fallbeschreibungen aus der Literatur. Gezeigt ist ein etwa 7 Mb großer Ausschnitt aus 8q23.3. Die Gene sind durch schwarze Pfeile in ihrer 5'→3'-Orientierung dargestellt. Die drei BAC-Klone *RP11-946L20*, *RP11-47H9* und *RP11-118J9* sind bruchpunktüberspannende Klone von Translokationen, deren Träger die darunter aufgeführten phänotypischen Merkmale zeigen. Die zwei genetischen Marker *D8S1779* und *D8S555* begrenzen das Intervall des maximalen LOD-Scores bei einer Familie mit autosomal dominanter Epilepsie. Die grau schraffierte Fläche markiert die detektierte Deletion von *EXT1*, *TRPS1* und *CSMD3* bei Patienten mit entsprechend aufgelisteten klinischen Merkmalen. Die humangenetischen Untersuchungsergebnisse dieser Patienten weisen darauf hin, dass *CSMD3* ein Kandidatengen für neurologische Erkrankungen ist.

Die Translokation bei Patientin 1 führt nicht zu einer direkten Unterbrechung von *CSMD3*; daher müsste sich ein Positionseffekt auf dieses Gen auswirken. Durch die Translokation könnte es zur Entkopplung von regulatorischen Elementen und in Folge dessen zu einer veränderten Expression von *CSMD3* gekommen sein. Mithilfe der Datenbank *Vista Enhancer Browser* konnte ein HCNE, *hs919*, identifiziert werden, das vermutlich regulatorisches Potential hat. Das HCNE *hs919* wird in Mäuseembryonen in den Extremitäten exprimiert, weshalb es eher nicht die Expression von *CSMD3* reguliert. Weitere HCNEs konnten mithilfe der *UCSC* Datenbank detektiert werden (Abb. 49).

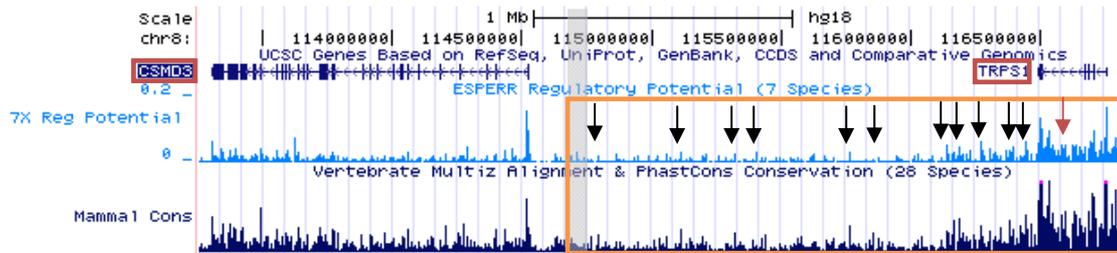


Abb. 49: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen zwischen den Genen *CSMD3* und *TRPS1* in 8q23.3. Gezeigt ist ein etwa 3,5 Mb großer Ausschnitt aus 8q23.3. Die Gene *CSMD3* und *TRPS1* sind rot umrandet. Die orange markierte Region beinhaltet die distal des Bruchpunktes gelegene Region. Die hellblauen „Peaks“ geben die *Regulatory Potential Scores* wieder, die aus Sequenzvergleichen von bekannten regulatorischen Einheiten von Mensch, Schimpanse, Makake, Maus, Ratte, Hund und Kuh abgeleitet werden. Die dunkelblauen „Peaks“ zeigen den Konservierungsgrad, der aus Sequenzvergleichen von 28 Spezies ermittelt wird. Der rote Pfeil zeigt auf die DNA-Sequenz hs919. Die schwarzen Pfeile zeigen auf weitere DNA-Sequenzen, die sowohl konserviert sind als auch regulatorisches Potential haben. Die graue Fläche gibt den Bruchpunkt bei der Patientin 1 an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Zusammenfassend ist ein Positionseffekt auf *CSMD3* – insbesondere aufgrund der oben genannten Fallbeschreibungen (Abb. 48) und des Expressionsmusters – als Ursache für den Phänotyp der Patientin 1 denkbar.

5.2 Eingrenzung der Bruchpunkte der 9;13-Translokation bei Patient 2 auf 20 bzw. 10 Kb

5.2.1 *GRIN3A* als mögliches Kandidatengen für den Phänotyp von Patient 2

Wie der klinischen Beschreibung (siehe 4.3.1) zu entnehmen ist, stehen die Mikrocephalie, globale Entwicklungsverzögerung mit muskulärer Hypotonie und eine wahrscheinlich postaxiale Hexadaktylie bei Patient 2 im Vordergrund. Serielle FISH-Analysen führten zu einer Eingrenzung des Bruchpunktes in 9q31.1 auf 20 Kb. Die sich anschließende Datenbankrecherche ergab, dass kein Gen direkt disruptiert wurde; dieser Bruchpunkt befindet sich in einer genarmen Region.

Bei 19 Individuen wurden interstitielle Deletionen und andere strukturelle Chromosomenanomalien die Region 9q31.1 betreffend beschrieben (Ying et al. 1982; Worsham et al. 1989; Farrell et al. 1991; Robb et al. 1991; Kroes et al. 1994; Shimkets et al. 1996; Kleyman et al. 1997; Paoloni-Giacobino et al. 2000; Coulomb L'Herminé et al. 2002; Olivieri et al. 2003; Haniffa et al. 2004; Midro et al. 2004; Chen et al. 2006; van Bon et al. 2008; de Ravel et al. 2009; Yamamoto et al. 2009). Die Betroffenen zeigen unterschiedliche phänotypische Eigenschaften; allerdings ist allen Patienten eine Intelligenzminderung unterschiedlichen Ausmaßes gemeinsam. Bei vielen finden sich eine muskuläre Hypotonie, ein Mikrozephalus sowie Auffälligkeiten der Hand- und Fußstrukturen (Abb. 50).

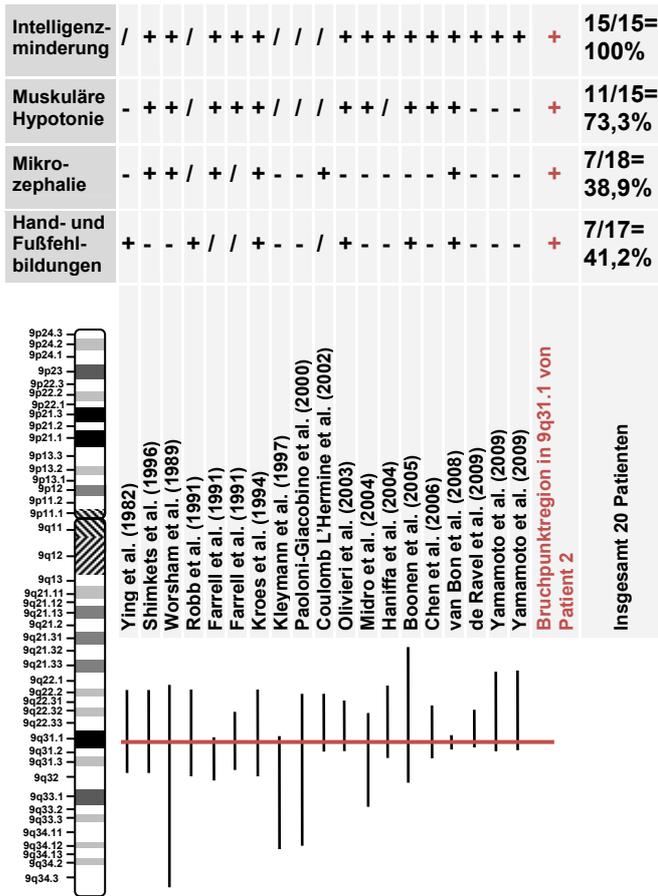


Abb. 50: Schematische Darstellung von Chromosom 9, der Lokalisation der Bruchpunktregion in 9q31.1 von Patient 2, weiteren strukturellen Chromosomenanomalien in 9q31.1 und Angabe, ob die phänotypischen Eigenschaften des Patienten 2 bei den Betroffenen bestehen. Das Ideogramm des Chromosoms 9 ist dargestellt. Durch den roten Strich ist die Bruchpunktregion des Patienten in 9q31.1 gekennzeichnet. Durch die schwarzen senkrechten Striche ist die Lokalisation von beschriebenen strukturellen Chromosomenanomalien angegeben. Darüber ist eine tabellarische Übersicht der phänotypischen Eigenschaften der betroffenen Individuen zu finden. In Prozentzahlen ist angegeben, wie viele eine Intelligenzminderung, eine muskuläre Hypotonie, eine Mikrozephalie sowie Hand- und Fußfehlbildungen zeigen. Die Rechnungen beziehen sich auf die Patientenanzahl mit entsprechender Angabe. „/“ steht für nicht angegeben, „+“ bedeutet, dass das klinische Merkmal beim Patienten nachweisbar war und „-“, dass dieses Merkmal nicht festgestellt werden konnte.

Durch Vergleich der phänotypischen Merkmale von Patienten mit unterschiedlichen 9q-Deletionen konnten bereits mehrere Kandidatengene für Krankheiten – z.B. das *INVS*-Gen für die Transposition der großen Arterien (van Bon et al. 2008) oder das *NBCCS*-Gen für das Gorlin-Syndrom (Shimkets et al. 1996) – identifiziert werden. Interstitielle Deletionen in 9q scheinen mit einer Intelligenzminderung assoziiert zu sein. Allerdings ist es bislang weder durch Erarbeitung der *minimal region of overlap* (MRO) (Midro et al. 2004; Kulharya et al. 2008; van Bon et al. 2008) noch durch Vergleich der individuellen phänotypischen Charakteristika (Kroes et al. 1994; Midro et al. 2004; Kulharya et al. 2008; Yamamoto et al. 2009) gelungen, ein Kandidatengen für Intelligenzminderung zu identifizieren.

Ein mögliches Kandidatengen in 9q31.1 ist *GRIN3A* (*glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3A*). Es kartiert etwa 620 Kb proximal zum Bruchpunkt von Patient 2 und kodiert für die NR3A-Untereinheit der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (siehe auch Patient 5). N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der Glutamat-Ionenkanäle. Sie sind in Neuronen des zentralen Nervensystem lokalisiert (Andersson et al. 2001). NMDA-Rezeptoren sind funktionell maßgeblich

beteiligt an der neuronalen Entwicklung (Perez-Otano und Ehlers 2004), an der synaptischen Plastizität (Cull-Candy und Leszkiewicz 2004), an der Lern- und Gedächtnisleistung des Gehirns (Malenka et al. 1999) sowie an der Neurodegeneration (Strijbos et al. 1996).

NR3A bildet entweder mit NR1- und NR2-Untereinheiten oder nur mit NR1 Heteromere (Al-Hallaq et al. 2002; Ulbrich und Isacoff 2008), einen sowohl liganden- als auch spannungsgesteuerten Ionenkanal, vor allem für Ca^{2+} -Ionen (Cull-Candy et al. 2001). NMDA-Rezeptoren können durch extrazellulär lokalisierte Mg^{2+} -Ionen blockiert werden (Dingledine et al. 1999). Durch Anwesenheit der NR3A-Untereinheit wird die Aktivität des Rezeptors verringert und die Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen sowie die Sensitivität für eine Blockade durch Mg^{2+} -Ionen herabgesetzt (Das et al. 1998; Perez-Otano et al. 2001; Sasaki et al. 2002; Tong et al. 2008).

In-situ-Hybridisierungen zeigten, dass humane *GRIN3A*-mRNA und *Grin3A*-mRNA von Nagetieren in weiten Teilen des ZNS exprimiert wird (Ciabarra et al. 1995; Sucher et al. 1995; Eriksson et al. 2001; Wong et al. 2002). Es wurde sowohl beim Menschen als auch bei Tieren ein entwicklungsabhängiges Expressionsmuster festgestellt. NR3A wird postnatal stark exprimiert und anschließend herunterreguliert (Ciabarra et al. 1995; Sucher et al. 1995; Sun et al. 1998; Al-Hallaq et al. 2002; Sasaki et al. 2002; Wong et al. 2002; Ishihama und Turman 2006; Perez-Otano et al. 2006; Henson et al. 2008). Daher soll NR3A eine besondere Rolle bei der frühkindlichen neuronalen Entwicklung spielen (Ciabarra et al. 1995; Sucher et al. 1995).

Untersuchungen an transgenen Mäusen gaben weitere Anhaltspunkte für die Bedeutung von NR3A bei der neuronalen Entwicklung. Eine verlängerte Expression von NR3A reduziert das Synapsenwachstum und die Ausbildung von dendritischen Dornen, so dass die Reifung von Synapsen verhindert wird (Roberts et al. 2009). Entsprechend wurde bei homozygoten Knockout-Mäusen eine verstärkte NMDA-Rezeptor-Antwort sowie eine erhöhte Anzahl an dendritischen Dornen in zerebrokortikalen Neuronen nachgewiesen (Das et al. 1998). Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass NR3A durch Modulieren der NMDAR-Aktivität an der Entwicklung von Synapsen beteiligt ist (Das et al. 1998; Wong et al. 2002).

Ein weiteres Indiz dafür, dass *GRIN3A* ein plausibles Kandidatengen für die klinischen Kennzeichen beim Patienten 2 ist, sind Ergebnisse von Untersuchungen an Rippenknorpeln von Ratten und Mittelfußknochen von Mäuseembryonen. Diese zeigen, dass die Entwicklung von Knochen- und Knorpelgewebe durch NR1/NR3A-Ionenkanäle reguliert wird (Abb. 51) (Takarada et al. 2009).

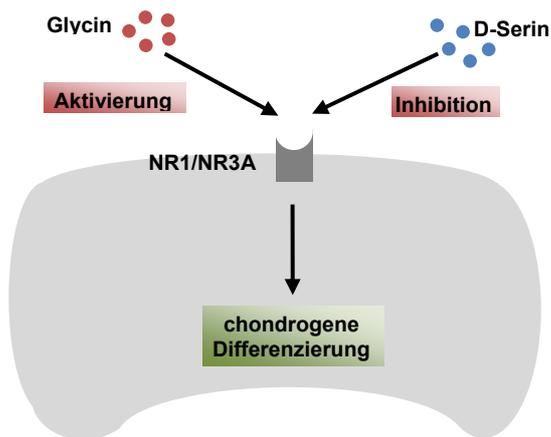


Abb. 51: Schematische Darstellung der Inhibition der chondrogenen Differenzierung durch D-Serin an NMDA-Rezeptoren. Extrazelluläres D-Serin kann als Antagonist des Glycin-abhängigen NMDA-Rezeptors, welcher aus NR1- und NR3A-Untereinheiten zusammengesetzt ist und von hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird, inhibieren. Die Transkriptionsaktivität wird verringert, was die Differenzierung der Chondrozyten verzögert [Abbildung modifiziert nach Takarada et al. (2009)].

Das Gen *PRG-3* (*plasticity-related gene 3*), auch als *LPPR1* (*lipid phosphate phosphatase-related protein type 1*) bekannt, ist das zweite denkbare Kandidatengen für Intelligenzminderung. Es liegt rund 1,2 Mb proximal zum Bruchpunkt auf Chromosom 9 und kodiert für ein Mitglied der *plasticity-related gene* (PRG)-Familie (Savaskan et al. 2004). Die PRG-Gen-Familie spielt aufgrund ihrer Beteiligung an der neuronalen Plastizität eine Rolle während der ZNS-Entwicklung (Savaskan et al. 2004; Wang und Molnár 2005). *Prg-3* wird bei Ratten sehr stark im Gehirn exprimiert (Savaskan et al. 2004). *Prg-3*-mRNA konnte bei Nagetieren bereits in frühen embryonalen Stadien nachgewiesen werden, und die Expression von *Prg-3*-mRNA wird während der ZNS-Entwicklung stark reguliert (Savaskan et al. 2004; Wang und Molnár 2005). Des Weiteren wird für PRG-3 eine Funktion beim Neuritenwachstum und der Verlängerung von Neuriten postuliert (Savaskan et al. 2004). Aufgrund der Proteinfunktion und -expression ist *PRG-3* als Kandidatengen für Intelligenzminderung in Erwägung zu ziehen.

Nur ein Positionseffekt auf *PRG-3* oder *GRIN3A* könnte den Phänotyp des Patienten 2 erklären. Mithilfe der Datenbank UCSC konnten HCNEs identifiziert werden, die vermutlich regulatorisches Potential haben und infolge der Translokation von den zwei Kandidatengenen transloziert wurden (Abb. 53).

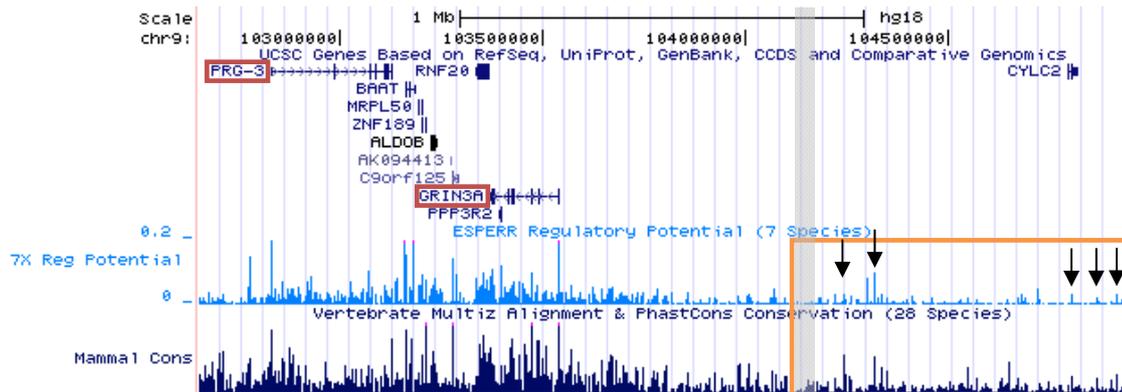


Abb. 52: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen distal des Bruchpunktes in 9q31.1. Gezeigt ist ein etwa 2 Mb großer Ausschnitt aus 9q31.1. Die Kandidatengene *PRG-3* und *GRIN3A*, die proximal des Bruchpunktes liegen, sind rot umrandet. Die orangefarben markierte Region beinhaltet die distal des Bruchpunktes gelegene Region. Die hellblauen „Peaks“ geben die *Regulatory Potential Scores* wieder, die aus Sequenzvergleichen von bekannten regulatorischen Einheiten von Mensch, Schimpanse, Makake, Maus, Ratte, Hund und Kuh abgeleitet werden. Die dunkelblauen „Peaks“ zeigen den Konservierungsgrad, der aus Sequenzvergleichen von 28 Spezies ermittelt wird. Die schwarzen Pfeile zeigen auf Positionen, die sowohl konserviert sind als auch regulatorisches Potential haben. Die graue Fläche gibt den Bruchpunkt des Patienten 2 an. Im orange markierten Bereich liegen die konservierten Elemente mit regulatorischem Potential, die auf die Expression der beiden Kandidatengene wirken können. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Zusammengenommen sind beide Gene, *PRG-3* und *GRIN3A*, gute Kandidatengene für Intelligenzminderung. Der Konservierungsgrad und das regulatorische Potential distal des Bruchpunktes ist zwar relativ gering, trotzdem ist ein Positionseffekt auf eines dieser Gene denkbar. Aufgrund der Hexadaktylie des Patienten 2 und der Einflussnahme von *NR3A* auf das Knorpel- und Knochengewebe erscheint *GRIN3A* als Kandidatengen wahrscheinlicher.

5.2.2 *PCDH8* ist ein weiteres Kandidatengen für den Phänotyp von Patient 2

Der Bruchpunkt in 13q14.3. konnte durch serielle FISH-Anaysen auf ungefähr 10 Kb eingegrenzt werden. Die Translokation zerstört kein Gen in der Bruchpunktregion. Etwa 60 Kb distal des Bruchpunktes befindet sich das Gen *PCDH8* (*protocadherin 8*). Das zur Protocadherin-Gengruppe gehörende *PCDH8* kodiert für das integrale Membranprotein Protocadherin 8. Es besteht aus einer extrazellulären Region, sechs Cadherin-Domänen, einer Transmembran-Region und 1070 Aminosäuren. Ihm werden Funktionen bei der Zelladhäsion und der Signalübertragung zugeschrieben (Chen und Gumbiner 2006). Murines *Pcdh8* ist zum einen sehr stark im ZNS exprimiert und zum anderen im interdigitalen Mesenchym der Extremitätenknospe (Makarenkova et al. 2005).

Für die orthologen *Pcdh8*-Proteine in der Ratte (*Arcadlin*) und in *Xenopus laevis* (*Papc*) wurde bereits eine neurobiologische Relevanz gezeigt (Yamagata et al. 1999;

Unterseher et al. 2004; Yasuda et al. 2007; Sugiura et al. 2009). Arcadlin kolokalisiert mit den Proteinen PSD-95 und der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 sowie dem Transmembranprotein N-Cadherin an dendritischen Dornen (Yasuda et al. 2007). Über synaptische Aktivität gesteuert reduziert Arcadlin postsynaptisch die adhäsive Aktivität von N-Cadherin, indem es dessen Internalisierung stimuliert. Hierdurch wird die Anzahl der dendritischen Dornen reguliert (Tai et al. 2007; Yasuda et al. 2007). Papc kontrolliert in vergleichbarer Weise die adhäsive Aktivität von C-Cadherin (Chen und Gumbiner 2006; Chen et al. 2009).

In der Datenbank *Decipher* sind neun Individuen mit Imbalancen im Bereich des *PCDH8*-Gens gelistet. Hiervon sind acht Personen Deletionsträger und eine Person trägt eine Duplikation. Drei der Deletionsträger mit Deletionen zwischen 11 und 35 Mb sind phänotypisch gesund. Die fünf phänotypisch auffälligen Patienten mit Deletionen zeigen verschiedene Dysmorphiezeichen und Organfehlbildungen, drei von ihnen zusätzlich eine Intelligenzminderung. Der einzige Duplikationsträger ist gesund. In der *Database of Genomic Variants* sind Einträge von acht gesunden Personen zu finden, bei denen CNVs in Form einer Duplikation nachgewiesen wurden. Demzufolge scheint eine Kopienzahlveränderung durch eine Duplikation keine pathogene Auswirkung zu haben. Da nicht alle Deletionsträger phänotypisch auffällig sind, kann keine abschließende Beurteilung der Pathogenität einer Kopienzahlveränderung durch eine Deletion erfolgen. Für *PCDH8* als Kandidatengen spricht, dass in der Datenbank *UCSC* hochkonservierte nicht-kodierende Elemente innerhalb des Bruchpunktbereiches proximal von *PCDH8* gefunden wurden. Diese deuten auf regulatorische Einheiten hin und können möglicherweise auf die Expression von *PCDH8* wirken (Abb. 53).

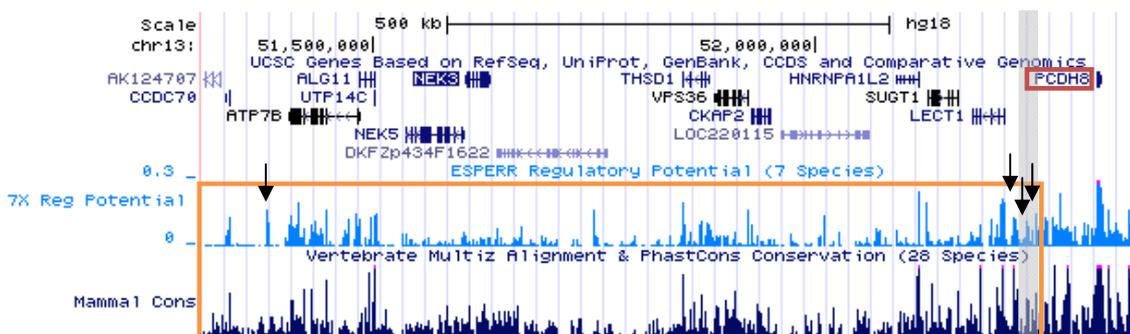


Abb. 53: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen proximal des Gens *PCDH8* in 13q14.3. Gezeigt ist ein etwa 1 Mb großer Ausschnitt aus 13q14.3. Das Kandidatengen *PCDH8* ist rot umrandet. Die orange markierte Region beinhaltet die proximal des Bruchpunktes gelegene Region. Die hellblauen „Peaks“ geben die *Regulatory-Potential-Scores* wieder, die aus Sequenzvergleichen von bekannten regulatorischen Einheiten von Mensch, Schimpanse, Makake, Maus, Ratte, Hund und Kuh abgeleitet werden. Die dunkelblauen „Peaks“ zeigen den Konservierungsgrad, der aus Sequenzvergleichen von 28 Spezies ermittelt wird. Die schwarzen Pfeile zeigen auf Positionen, die sowohl konserviert sind als auch regulatorisches Potential haben. Die graue Fläche gibt den Bruchpunkt von Patient 2 an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Der Bereich des Bruchpunktes ist relativ stark konserviert und weist auch regulatorisches Potential auf. Deswegen und aufgrund der vorliegenden Literaturdaten könnte eine fehlregulierte Expression von *PCDH8* für den Phänotyp des Patienten 2 verantwortlich sein.

Um *PCDH8* als Kandidatengen zu untermauern, wurde eine Sequenzierung von *PCDH8* in einem Patientenkollektiv mit Intelligenzminderung (insgesamt 370 Patienten, davon 280 Patienten mit milder bis moderater Intelligenzminderung und 90 Patienten mit moderater bis schwerer Intelligenzminderung) und unauffälligem Karyogramm durchgeführt. Es konnte allerdings keine krankheitsrelevante Veränderung detektiert werden (unveröffentlichte Daten). Somit bleibt die Frage, ob Mutationen in *PCDH8* zu einer Intelligenzminderung führen.

5.3 Eingrenzung der Bruchpunkte der 2;15-Translokation bei Patientin 3 auf 15 bzw. 25 Kb

5.3.1 *DBI* und *SCTR* – zwei Kandidatengene für klinische Merkmale von Patientin 3

Patientin 3 wurde auffällig durch Kleinwuchs, Intelligenzminderung und autistisches Verhalten. Durch serielle FISH-Analysen wurde die Bruchpunktregion in 2q14.2 auf etwa 15 Kb eingegrenzt. Datenbankrecherchen ergaben, dass der Bruchpunkt unmittelbar distal zum Gen *DBI* (*diazepam binding inhibitor*) lokalisiert ist.

In der Datenbank *Decipher* sind sieben die Bruchpunktregion betreffende Imbalancen zu finden. Fünf der Imbalancen sind Duplikationen. Zwei der Duplikationsträger sind phänotypisch gesund, obwohl sich die Größe der Duplikationen mit ungefähr 0,5 Mb und 40 Mb enorm unterscheidet. Die drei anderen Duplikationsträger zeigen alle entweder einen Kleinwuchs oder eine Intelligenzminderung oder vereinen beide klinische Merkmale in sich. Die beiden Patienten mit einer Deletion im Bruchpunktbereich zeigen eine Intelligenzminderung. Einer von ihnen ist kleinwüchsig. In der *Database of Genomic Variants* sind keine Einträge zu finden. Die Befunde sprechen dafür, dass in der Bruchpunktregion ein Kandidatengen für den Phänotyp von Patientin 3 lokalisiert sein kann.

Ein Kandidatengen für den Phänotyp der Patientin, *DBI*, kodiert für ein Protein, welches an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt ist: antagonistische Wirkung auf GABA_A-Rezeptoren, Einfluss auf das Zellwachstum, Induktion der Synthese von mittelkettigen Acyl-CoA-Estern, Regulation verschiedener Hormone (Knudsen et al. 1993; Herzig et al. 1996) sowie Aktivierung des Zelltodes (Shulga und Pastorino 2006).

Es wird vermutet, dass *Dbi* in unterschiedlichen Geweben verschiedene Funktionen übernimmt, da eine entwicklungsabhängige und gewebespezifische Expression bei Ratten beobachtet wurde (Mocchetti und Santi 1991). *Dbi* konnte bei Ratten in unterschiedlich hoher Konzentration in verschiedenen Arealen des ZNS ungleichmäßig in Neuronen nachgewiesen werden (Costa und Guidotti 1991).

Transgene Überexpression von *Dbi*-mRNA und damit einhergehender Überexpression des Proteins *Dbi* führte bei Mäusen zu einer übermäßigen glialen Expression in der infragranularen Region des Gyrus dentatus. Die Tiere zeigten eine verringerte synaptische Plastizität, ohne dass jedoch die inhibitorische oder exzitatorische synaptische Übertragung betroffen war. In Verhaltenstests war das Hippocampus-abhängige Lernen und Gedächtnis bei den transgenen Tieren beeinträchtigt (Siiskonen et al. 2007). Das Stilllegen einer Genkopie von *Dbi* führte zu phänotypisch gesunden Mäusen, wohingegen durch Kreuzung keine homozygoten Knockout-Mäuse erzeugt werden konnten. Daher wird davon ausgegangen, dass *Dbi* essentiell für die Entwicklung ist (Landrock et al. 2010). Zudem konnte an Mäusen gezeigt werden, dass *Dbi* die neuronale Migration durch Inhibition der Neurogenese-hemmenden GABA-Aktivität fördert (Alfonso et al. 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass synthetisch hergestelltes DBI eine epileptogene Wirkung bei Tieren hat (Vezzani et al. 1991). Interessanterweise wurden erhöhte Plasmaspiegel von DBI bei Patienten mit Epilepsie nachgewiesen (Ferrarese et al. 1998), so dass für dieses Protein eine Rolle bei Epilepsierkrankungen vermutet wurde (Vezzani et al. 1991; Ferrarese et al. 1998). Aufgrund einer Duplikation der Gene *C2orf76*, *DBI* und *STEAP3* in 2q14.2 wird *DBI* als Kandidatengen für autistische Verhaltensstörungen postuliert (Griswold et al. 2012). Diese Forschungsergebnisse diskutieren *DBI* als ein plausibles Kandidatengen für Epilepsie, Autismus und/oder Intelligenzminderung.

Ein weiteres attraktives Kandidatengen in der Bruchpunktregion ist *SCTR* (secretin receptor). Der Ligand des SCTR ist Sekretin, das vom Gen *SCT* (secretin) kodiert wird. Als gastrointestinales Hormon (Bloom 1974) spielt es eine wichtige Rolle im Verdauungstrakt (Petersen et al. 1978; Solomon et al. 1978; Kleibeuker et al. 1988; Jin et al. 1994; McGill et al. 1994). Sekretin kommt jedoch auch im ZNS vor (Mutt et al. 1979; O'Donohue et al. 1981; Itoh et al. 1991; Iguchi et al. 2004) und ist neuroaktiv (Fremeau et al. 1986; Ohta et al. 1992; Yung et al. 2001).

Der Sekretin-Rezeptor, SCTR, gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Ishihara et al. 1991). *SCTR*-mRNA wird beim Menschen mit abnehmender Konzentration in folgenden Geweben exprimiert: Bauchspeicheldrüse, Niere, Dünndarm,

Leber, Gehirn, Herz und Ovar (Patel et al. 1995). Im Gehirn ist die Expression der Transkripte und der Proteine bei Ratten im Cerebellum am höchsten (Fremeau et al. 1983; Yung et al. 2001; Köves et al. 2002).

Sekretininfusionen führten zu einer Verbesserung der Symptome bei autistischen Patienten (Horvath et al. 1998; Sandler et al. 1999; Pallanti et al. 2005), so dass vermutet wurde, dass Mutationen des *SCT*-Gens oder des *SCTR*-Gens Autismus verursachen könnten (Ho et al. 1999). Allerdings konnte in Kontrollstudien die Verbesserung der Klinik durch Sekretinverabreichung nicht verifiziert werden (Sandler et al. 1999; Chez et al. 2000; Dunn-Geier et al. 2000; Levy et al. 2003; Ratliff-Schaub et al. 2005). *Sctr*-defiziente Mäuse zeigen kein verändertes soziales und kognitives Verhalten, allerdings weisen sie weniger dendritische Dornen in den Pyramidenzellen der CA1-Region im Hippocampus auf. Diese histologischen Untersuchungsergebnisse legen nahe, dass das Sekretin-Rezeptor-System eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem spielt (Nishijima et al. 2006). Zusammengenommen geben diese Untersuchungsergebnisse Anlass, auch *SCTR* als Kandidatengen für Autismus und/oder Intelligenzminderung zu definieren.

Mithilfe von Datenbanken wurde nach möglicherweise translozierten regulatorischen Elementen gesucht, woraus eine veränderte Genexpression und damit eine Erklärung für den Phänotyp von Patientin 3 resultieren könnte (Abb. 54).

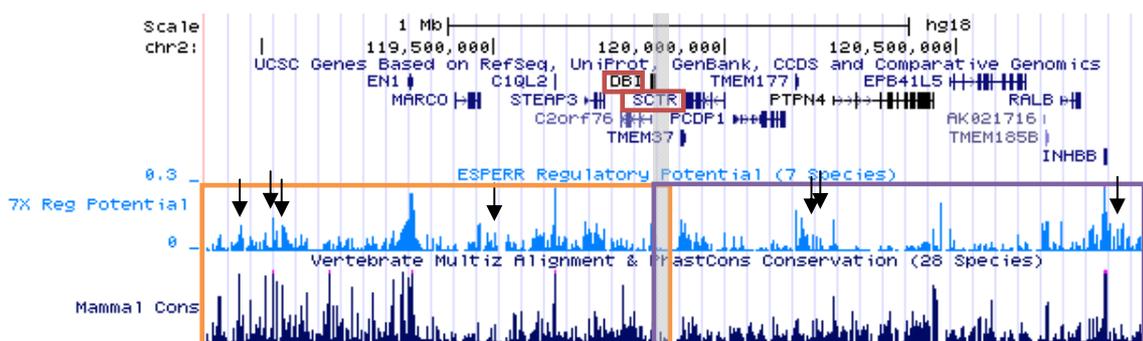


Abb. 54: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen um den Bruchpunkt in 2q14.2. Gezeigt ist ein etwa 2 Mb großer Ausschnitt aus 2q14.2. Die Kandidatengene *DBI* und *SCTR* sind rot umrandet. Die orangefarben markierte Region beinhaltet die proximal des Bruchpunktes gelegene Region, welche vom Kandidatengen *SCTR* transloziert wurde. Die violettfarbene eingerahmte Region beinhaltet die distal des Bruchpunktes gelegene Region, welche vom Kandidatengen *DBI* getrennt wurde. Die hellblauen „Peaks“ geben die *Regulatory-Potential-Scores* wieder, die aus Sequenzvergleichen von bekannten regulatorischen Einheiten von Mensch, Schimpanse, Makake, Maus, Ratte, Hund und Kuh abgeleitet werden. Die dunkelblauen „Peaks“ zeigen den Konservierungsgrad, der aus Sequenzvergleichen von 28 Spezies ermittelt wird. Die schwarzen Pfeile zeigen auf Positionen, die sowohl konserviert sind als auch regulatorisches Potential haben. Die graue Fläche gibt den Bruchpunkt von Patientin 3 an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Insgesamt ist es möglich, dass sich ein Positionseffekt entweder auf *DBI* oder auf *SCTR* ausgewirkt hat.

5.3.2 Ein Positionseffekt auf *IGF1R* könnte ursächlich für den Kleinwuchs und die Intelligenzminderung von Patientin 3 sein

Der Bruchpunkt in 15q26.3 konnte durch serielle FISH-Analysen auf ungefähr 25 Kb eingegrenzt werden. Datenbankrecherchen ergaben, dass das Gen *PGPEP1L* (*pyroglutamyl-peptidase 1 like*) entweder direkt unterbrochen ist oder der Bruchpunkt sich unmittelbar distal des Gens befindet. Über die genaue physiologische Bedeutung des Proteins ist wenig bekannt. Aufgrund des Vergleichs mit homologen Proteinen scheint es an der Proteolyse beteiligt zu sein und Peptidase-Aktivität zu besitzen (Gene Ontology).

Proximal des Bruchpunktes – etwa 40 Kb entfernt – ist das Gen *IGF1R* (*insulin-like growth factor 1 receptor*) lokalisiert. Der IGF1R gehört zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren. Der Rezeptor befindet sich an der Zelloberfläche und besteht als Heterotetramer aus zwei α - und zwei β -Einheiten. Die extrazellulär lokalisierten α -Untereinheiten sind an der Ligandenbindung beteiligt, während die β -Untereinheiten vor allem intrazellulär lokalisiert sind und intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzen (Abb. 55) (LeRoith et al. 1995; LeRoith 2000).

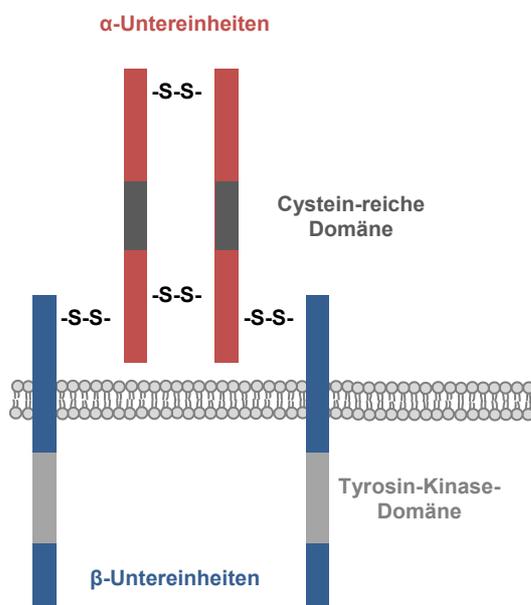


Abb. 55: Schematische Darstellung des IGF1-Rezeptors. Der IGF1-Rezeptor ist ein heterotetramerer Komplex. Er besteht zum einen aus zwei extrazellulär gelegenen α -Untereinheiten mit jeweils einer Cystein-reichen Domäne. Die α -Untereinheiten sind für die Ligandenbindung verantwortlich. Zum anderen besteht der Rezeptor aus zwei β -Untereinheiten, die den Rezeptor in der Zellmembran verankern und im zytoplasmatischen Teil die Tyrosin-Kinase-Aktivität aufweisen. Die Untereinheiten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. [Abbildung modifiziert nach LeRoith et al. (1995)].

Der Rezeptor bindet IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) und IGF2 (*insulin-like growth factor 2*) sowie Insulin und wird dadurch aktiviert. Dies führt zur Autophosphorylierung

und Aktivierung von mehreren nachgeschalteten Signalwegen, u.a. des Phosphatidylinositol 3-Kinase- und des Ras/Raf/MAP-Kinase-Signalweges, welche essentiell für Zellüberleben und -proliferation sind. Der IGF1R spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstum und Entwicklung (LeRoith et al. 1995; LeRoith 2000).

Fallbeschreibungen in der Literatur geben wichtige Hinweise dafür, dass das *IGF1R*-Gen mit dem Phänotyp der Patientin 3 assoziiert sein könnte. Bei zahlreichen Individuen mit Deletionen des *IGF1R*-Gens wurde ein ähnlicher Phänotyp beschrieben; die meisten der betroffenen Personen wiesen eine Wachstumsverzögerung, einen Mikrozephalus, faciale Dysmorphien und Intelligenzminderung auf (Nagai et al. 2002). Ein Verlust des *IGF1R*-Gens wurde bei Patienten mit einer terminalen (Roback et al. 1991; Siebler et al. 1995; Bettelheim et al. 1998; Tönnies et al. 2001; Okubo et al. 2003; Hammer et al. 2004; Bhakta et al. 2005; Pinson et al. 2005; Poot et al. 2007; Rujirabanjerd et al. 2007; Walenkamp et al. 2008; Ester et al. 2009; Choi et al. 2011; Dateki et al. 2011; Nakamura et al. 2011; Rudaks et al. 2011; Jezela-Stanek et al. 2012) oder interstitiellen Deletion (Schlembach et al. 2001; Veenma et al. 2010), einem Ringchromosom (Fujita und Matsumoto 1978; Butler et al. 1988; de Jong et al. 1989; Tamura et al. 1993; Peoples et al. 1995; de Lacerda et al. 1999; Glass et al. 2006) oder einer unbalancierten Translokation (Rosenberg et al. 1992; Nagai et al. 2002) beschrieben.

Der Verdacht, dass *IGF1R* das Krankheitsgen für die klinischen Merkmale bei Patientin 3 ist, erhärtet sich aufgrund der bereits vorhandenen Daten über intragenische Mutationen im *IGF1R*-Gen bei kleinwüchsigen Patienten, größtenteils mit einer Intelligenzminderung (Abuzzahab et al. 2003; Kawashima et al. 2005; Walenkamp et al. 2006; Inagaki et al. 2007; Fang et al. 2009; Kruis et al. 2010; Wallborn et al. 2010; Choi et al. 2011; Fang et al. 2012). Insgesamt zeigen Patienten mit einer *IGF1R*-Mutation ein variables Krankheitsbild (Veenma et al. 2010). Intelligenzminderung tritt sehr häufig auf, und alle Patienten sind kleinwüchsig (Choi et al. 2011).

Mithilfe der Datenbank UCSC konnten hochkonservierte nicht kodierende Elemente distal von *IGF1R* gefunden werden (Abb. 56). Durch die 2;15-Translokation könnten demnach regulatorische Elemente transloziert sein, so dass eine veränderte Expression als Ursache für den Phänotyp von Patientin 3 in Betracht kommt.

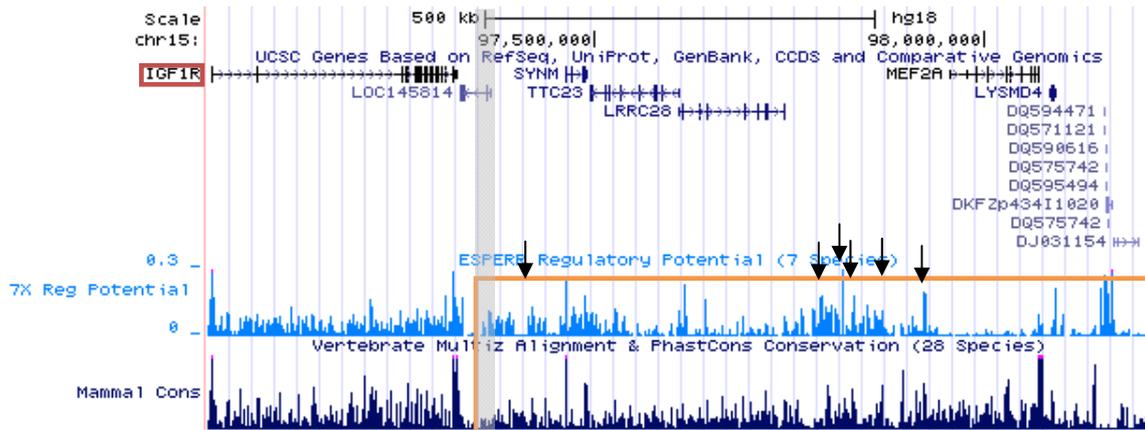


Abb. 56: Darstellung der Konservierung und des regulatorischen Potentials von DNA-Sequenzelementen zwischen den Genen *IGF1R* und *DJ031154* in 15q26.3. Gezeigt ist ein etwa 1,5 Mb großer Ausschnitt aus 15q26.3. Das Gen *IGF1R* ist rot umrandet. Die orange markierte Region beinhaltet die distal des Bruchpunktes gelegene Region. Die hellblauen „Peaks“ geben die *Regulatory Potential Scores* wieder, die aus Sequenzvergleichen von bekannten regulatorischen Einheiten von Mensch, Schimpanse, Makake, Maus, Ratte, Hund und Kuh abgeleitet werden. Die dunkelblauen „Peaks“ zeigen den Konservierungsgrad, der aus Sequenzvergleichen von 28 Spezies ermittelt wird. Die schwarzen Pfeile zeigen auf Positionen, die sowohl konserviert sind als auch regulatorisches Potential haben. Die graue Fläche gibt den Bruchpunkt bei der Patientin 3 an. Die physikalische Karte wurde nach NCBI36/hg18 erstellt.

Zusammengefasst erscheint es aufgrund der zahlreichen Befunde aus der Literatur wahrscheinlich, dass sich bei Patientin 3 ein durch die Translokation verursachter Positionseffekt auf das *IGF1R*-Gen ausgewirkt hat und eine veränderte Expression von *IGF1R* ursächlich für den Kleinwuchs und die Intelligenzminderung bei Patientin 3 war. Es ist jedoch auch möglich, dass die Bruchereignisse auf den Chromosomen 2 und 15 gemeinsam zur klinischen Ausprägung bei der Patientin 3 führten.

5.4 Bestätigung der 6,1 Mb großen Deletion in 4q31.1q31.22 und Eingrenzung des Bruchpunktes in 14q32.13 der 4;14-Translokation bei Patient 4 auf 80 Kb

5.4.1 Das klinische Bild von Patient 4 ist vermutlich unabhängig vom Bruchereignis in 14q32.13

Patient 4 zeigt als klinische Merkmale eine Intelligenzminderung, einen Septumdefekt, einen Kryptorchismus, eine Hypospadie sowie milde faziale Dysmorphiezeichen mit einer mandibulären Retrognathie.

Bei diesem Patienten konnte die Bruchpunktregion in 14q32.13 auf ungefähr 80 Kb eingegrenzt werden. In dem Bruchpunktbereich lokalisiert das Gen *TCL6* [*T-cell leukemia/lymphoma 6 (non-protein coding)*], das durch das Rearrangement direkt unterbrochen sein könnte.

In der Datenbank *Decipher* sind Daten von vier Individuen mit einer Duplikation und einem Individuum mit einer Deletion in der genannten Bruchpunktregion verzeichnet. Da drei der vier Duplikationsträger phänotypisch gesund sind und der phänotypisch auffällige Patient eine weitere Imbalance aufweist, ist davon auszugehen, dass eine Duplikation des Bruchpunktbereiches eher keine pathologischen Folgen hat. Bei dem phänotypisch auffälligen Patienten mit einer Deletion des Bruchpunktbereiches waren zwei weitere Imbalancen diagnostiziert worden, so dass sich die Pathogenität einer Deletion im Bruchpunktbereich nicht endgültig beurteilen lässt. In der *Database of Genomic Variants* sind derzeit keine Einträge zu dieser Region zu finden.

Sowohl das Gen *TCL6*, welches unmittelbar in der Bruchpunktregion lokalisiert ist, als auch die zwei nahegelegenen Gene *TCL1B* (*T-cell leukemia/lymphoma 1B*) und *TCL1A* (*T-cell leukemia/lymphoma 1A*) werden als Kandidatengene für die Leukämogenese und Entstehung von Lymphomerkrankungen postuliert, da bei T-Zell- und B-Zell-Malignomen häufig strukturelle Rearrangements (Translokationen, Inversionen oder Deletionen) in der Region dieser drei Gene detektiert wurden (Croce et al. 1985; Pekarsky et al. 1999; Sugimoto et al. 1999; Saitou et al. 2000; Urbankova et al. 2012).

Demzufolge ist der Phänotyp des Patienten 4 wahrscheinlich eher nicht mit dem Bruchpunkt in 14q32.13 assoziiert. Es ist aber durchaus möglich, dass er im Laufe seines Lebens ein T- oder B-Zell-Malignom entwickeln wird. Ein Positionseffekt auf ein anderes Gen, welches 1 Mb distal oder proximal zum Bruchbereich liegt, kann theoretisch auch krankheitsverursachend/-modifizierend wirken.

5.4.2 Der Phänotyp des Patienten 4 ist wahrscheinlich auf die Deletion in 4q31.1q31.22 zurückzuführen

Die durch Array-CGH aufgedeckte, rund 6,1 Mb große Deletion in 4q31.1q31.22 konnte bereits in Vorarbeiten mittels FISH-Untersuchungen bestätigt werden. In dem deletierten Bereich liegen etwa 35 Gene.

In der Literatur sind über 100 Patienten mit interstitieller bzw. terminaler 4q-Deletion beschrieben und unter dem Begriff 4q-Deletionssyndrom zusammengefasst; die Inzidenz wird mit 1/100.000 angegeben (Strehle et al. 2001; Strehle und Bantock 2003; Rossi et al. 2009). Für dieses Syndrom sind folgende phänotypische Eigenschaften charakteristisch: Gaumenspalte, typisches Gesicht mit Hypertelorismus, flachem Profil, kurzer Nase, Mikro- und Retrognathie und abnormalen Ohren, verschiedene Anomalien der Hand, Herzfehler, postnatale Wachstumsverzögerung und Entwicklungsverzögerung mit Intelligenzminderung (Townes et al. 1979; Mitchell et al. 1981; de Michelena und Campos 1989). Der Phänotyp kann jedoch aufgrund der unterschiedlichen Größe und

Lokalisation des verlorenen genetischen Materials sehr variabel sein (Fabretto et al. 2012). Einige Patienten mit interstitieller Deletion (Serville und Broustet 1977; Mitchell et al. 1981; del Valle Torrado et al. 1982; Sarda et al. 1992; Chew et al. 1995; Copelli et al. 1995; Robertson et al. 1998; Strehle und Middlemiss 2007; Thuresson et al. 2007; Malvestiti et al. 2010) oder terminaler Deletion (Kempen 1975; Back et al. 1977; Frias et al. 1978; Townes et al. 1979; Yang et al. 1979; Davis et al. 1981; Shroff et al. 1981; Yu et al. 1981; Chudley et al. 1982; Lipson et al. 1982; Young et al. 1982; Berger et al. 1983; de Michelena und Campos 1989; Kuldeep et al. 2012) weisen eine MRO mit der Deletion von Patient 4 auf (Abb. 57). Der Deletionsbereich des Patienten 4 ist bei den etwa 100 publizierten Fällen mit 4q-Deletionssyndrom oft nicht involviert. Die Vergleichbarkeit der terminalen Deletionen mit der in dieser Arbeit beschriebenen Deletion ist aufgrund des Verlustes weiter distal gelegener Banden und dort lokalisierter Gene eingeschränkt.

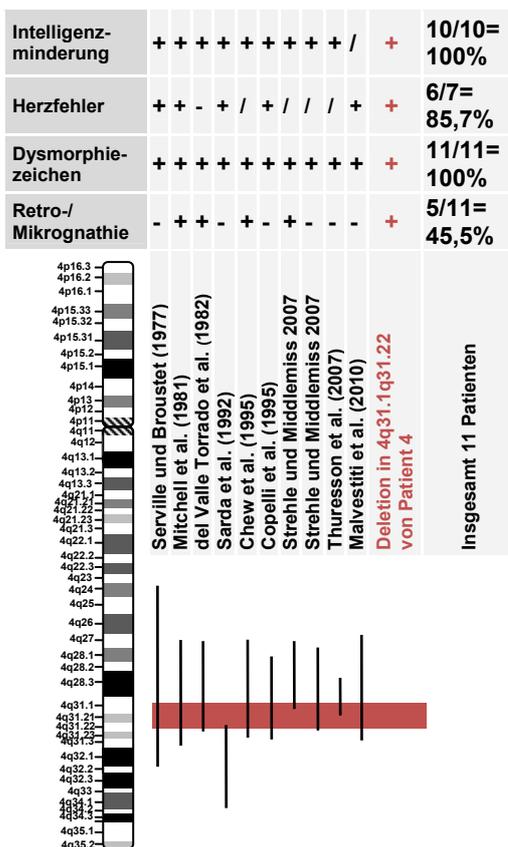


Abb. 57: Schematische Darstellung von Chromosom 4, der Lokalisation der Deletion in 4q31.1q31.22 bei Patient 4 sowie bereits bekannte interstitielle Deletionen in dieser chromosomalen Region, jeweils unter Angabe der phänotypischen Eigenschaften. Dargestellt ist das Ideogramm von Chromosom 4. Durch den roten Balken ist die Deletion des Patienten in 4q31.1q31.22 gekennzeichnet. Durch die schwarzen senkrechten Striche ist die Lokalisation von publizierten, interstitiellen Deletionen angegeben. Darüber ist eine tabellarische Übersicht der phänotypischen Eigenschaften der betroffenen Individuen zu finden. In Prozentzahlen ist angegeben, wie viele eine Intelligenzminderung, einen Herzfehler, Dysmorphiezeichen und eine Retro- bzw. Mikrognathie zeigen. Die Rechnungen beziehen sich auf die jeweilige Patientenanzahl mit entsprechender Angabe. „/“, nicht angegeben; „+“, klinisches Merkmal war beim Patienten nachweisbar; „-“, klinisches Merkmal wurde nicht festgestellt.

Ein mögliches Kandidatengen für die Intelligenzminderung von Patient 4 ist *INPP4B* (*inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II*). Über *INPP4B* ist bislang relativ wenig bekannt, während über das homologe *INPP4A* (*inositol polyphosphate-4-phosphatase, type I*) einige Literaturdaten vorhanden sind. *INPP4A* und *INPP4B* sind Enzyme, die die

Hydrolyse der Phosphatgruppe an der Position 4 von Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat, Inositol-1,3,4-Trisphosphat und Inositol-3,4-Bisphosphat katalysieren (Norris et al. 1997). INPP4B und INPP4A regulieren daher den Phosphatidylinositol (PI)-3-Kinase (PI3K/AKT)-Signalweg (Fedele et al. 2010; Aich et al. 2012). Über den PI3K/AKT-Signalweg werden in allen Zelltypen Zellproliferation, Überleben, Proteinsynthese, Stoffwechsel, Differenzierung und Motilität reguliert (Zhang und Claret 2012). Humane *INPP4B*-mRNA wird in abnehmender Konzentration im Skelettmuskel, Herz und Gehirn exprimiert, wohingegen die höchste Konzentration von *Inpp4a*-mRNA bei Ratten im Gehirn nachgewiesen wurde. Es werden gewebespezifische Funktionen für die beiden Proteine angenommen (Norris et al. 1995; Norris et al. 1997). Mithilfe von Knockout-Mäusen konnte die neuronale Relevanz von *Inpp4a* und dem involvierten PI3K/AKT-Signalweg nachgewiesen werden (Nystuen et al. 2001; Kisseleva et al. 2002; Easton et al. 2005; Sachs et al. 2009; Sasaki et al. 2010). Für eine Assoziation des Verlustes des *INPP4B*-Gens mit Intelligenzminderung spricht auch eine das *INPP4B*-Gen direkt unterbrechende, balanciert erscheinende *de novo* Translokation [46,XX,t(4;7)(q31.21;q11.23)] bei einer Patientin mit Entwicklungsverzögerung, welche in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche aufgedeckt werden konnte (unveröffentlichte Daten).

Zusammengefasst ist die etwa 6,1 Mb große 4q31.1q31.22-Deletion und die damit einhergehende Haploinsuffizienz einiger Gene sehr wahrscheinlich kausal für das klinische Bild des Patienten 4. Somit liegt hier vermutlich ein *contiguous gene*-Syndrom vor. Der Verlust des *INPP4B*-Gens könnte mit der Intelligenzminderung einhergehen, wie Daten über das Homolog *INPP4A* vermuten lassen.

5.5 Eingrenzung beider Bruchpunkte der 16;17-Translokation bei Patient 5-1 auf 40 Kb und Bestätigung der 85 Kb großen Deletion in 17q12 auf dem Wildtyp-Chromosom

5.5.1 Der Phänotyp des Patienten 5-1 ist wahrscheinlich unabhängig von der 17q12-Deletion und dem 17q11.2-Translokationsbruchpunkt

Folgende klinische Merkmale stehen bei Patient 5-1 im Vordergrund: Zum einen zeigt er eine schwere Intelligenzminderung und Verhaltensauffälligkeiten, zum anderen traten in der Kindheit zunächst Fieberkrämpfe, später tonisch klonisch generalisierte Krampfanfälle auf. Des Weiteren zeigt er verschiedene Dysmorphiezeichen. Der Vater (Patient 5-2), die Tante väterlicherseits (Patientin 5-3) und deren Sohn (Patient 5-4) sind

ebenfalls Träger der reziproken 16;17-Translokation und haben neurologische Auffälligkeiten (siehe 4.6.2).

Die mittels Array-CGH diagnostizierte und mittels FISH bestätigte 85 Kb große Deletion in 17q12 hat höchstwahrscheinlich keine klinische Relevanz, da sie der Patient von seiner gesunden Mutter erbte (siehe 4.6.4). Der etwa 6 Mb weiter proximal lokalisierte Bruchpunkt in 17q11.2 konnte auf ungefähr 40 Kb eingegrenzt werden. In dem Bruchpunktbereich sind fünf Gene lokalisiert, von denen eines unterbrochen sein könnte: *TMEM97* (*transmembrane protein 97*), *IFT20* (*intraflagellar transport 20 homolog*), *TNFAIP1* [*tumor necrosis factor, alpha-induced protein1 (endothelial)*], *POLDIP2* [*polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2*], *TMEM199* (*transmembrane protein 199*).

Weder in der Datenbank *Decipher* noch in der *Database of Genomic Variants* sind phänotypisch auffällige oder gesunde Individuen mit Imbalancen und CNVs im Bereich dieses Bruchpunktes gelistet.

Die bislang bekannten Funktionen der von den o.g. Genen kodierten Proteine sprechen wenig dafür, dass eines davon ein mögliches Kandidatengen für die klinischen Merkmale von Patient 5-1 ist. Das *TMEM97*-Gen kodiert für ein integrales Membranprotein unbekannter Funktion. *TMEM97* spielt eine Rolle bei der Regulierung des zellulären Cholesterinspiegels; eine Überexpression wird mit der Pathogenese von Ovarialkarzinomen in Verbindung gebracht (Wilcox et al. 2007; Bartz et al. 2009). Für *IFT20* wird angenommen, dass es am Transport von Zilienmembranproteinen zum Golgi-Apparat beteiligt ist (Follit et al. 2006). *TNFAIP* wird entwicklungsabhängig exprimiert, und die Expression kann durch *tumor necrosis factor* (TNF) α in Endothelzellen von Umbilicalvenen induziert werden (Wolf et al. 1992). Eine erhöhte Transkriptionsaktivität von *TNFAIP* wurde in Gehirnen von Patienten mit einer Alzheimer-Erkrankung festgestellt (Link et al. 2003). *POLDIP2* interagiert mit der DNA-Polymerase-p50-Untereinheit und hemmt die DNA-Polymerase-Delta-Aktivität um etwa 50% (Xie et al. 2005; Klaile et al. 2007). Es bindet außerdem PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Liu et al. 2003). Über die Funktion von *TMEM199* ist bislang nichts bekannt.

Zusammenfassend scheint keines der fünf in der Bruchpunktregion 17q11.2 liegenden Gene ein interessantes Kandidatengen für den Phänotyp von Patient 5-1 zu sein.

5.5.2 Die Disruption von *GRIN2A* in 16p13.2 ist höchstwahrscheinlich kausal für den Phänotyp von Patient 5-1

Datenbankrecherchen zufolge kommt es innerhalb der auf 40 Kb eingegrenzten Bruchpunktregion in 16p13.2 zu einer direkten Unterbrechung des Gens *GRIN2A* (*glutamate*

receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A), welches für die NR2A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors kodiert. Weitere Einzelheiten zum Aufbau und zur Funktion dieser Rezeptoren sind Kapitel 5.2.1 zu entnehmen. Die funktionellen Eigenschaften von NMDA-Rezeptoren werden durch die entwicklungsabhängige Zusammensetzung aus verschiedenen Untereinheiten bestimmt: Pränatal besteht der heterotetramere Komplex vor allem aus NR1- und NR2B-Untereinheiten; letztere werden vom *GRIN2B*-Gen kodiert. Postnatal setzen sich die Heterotetramere aus NR1- und NR2A- bzw. NR2B-Untereinheiten zusammen (Cull-Candy et al. 2001). Die Veränderung des NR2A:NR2B-Verhältnisses der NMDA-Rezeptoren beeinflusst die synaptische Plastizität (Yashiro und Philpot 2008).

Submikroskopische Deletionen in 16p13, welche das *GRIN2A*-Gen beinhalten, wurden bereits mit Intelligenzminderung und Epilepsie assoziiert (Reutlinger et al. 2010). Zwei *de novo* Translokationen mit Bruchpunkten im *GRIN2B*-Gen in 12p13.1 geben einen weiteren wichtigen Hinweis für eine Rolle von NMDA-Rezeptoren bei neurologischen Erkrankungen: Beide Patienten zeigten eine Intelligenzminderung und EEG-Veränderungen sowie Verhaltensauffälligkeiten (Endele et al. 2010). Risikohaplotypen von *GRIN1*, welches für die NR1-Untereinheit von NMDA-Rezeptoren kodiert, werden mit dem West-Syndrom in Verbindung gebracht, was als Hinweis auf eine Beteiligung von NMDA-Rezeptoren bei der Epileptogenese gewertet wurde (Ding et al. 2010).

Grin2a-Knockout-Mäuse zeigen eine erhöhte spontane lokomotorische Aktivität sowie Defizite in der kontextuellen Angstkonditionierung und im räumlichen Lernen. Zudem ist die Hippokampus-abhängige Langzeit-Potenzierung, welche die zelluläre Grundlage für Lernen und Gedächtnis darstellt, reduziert (Sakimura et al. 1995; Kiyama et al. 1998). *Grin2b*-defiziente Mäuse versterben aufgrund schwerer Entwicklungsstörungen des Gehirns bereits perinatal (Kutsuwada et al. 1996).

Insgesamt sind *GRIN2A* und *GRIN2B* exzellente Kandidatengene für neurologische Erkrankungen. Der Verdacht, dass *GRIN2A* ein Krankheitsgen für Intelligenzminderung und Epilepsie ist, wurde durch den Nachweis von zwei verschiedenen heterozygoten Punktmutationen im *GRIN2A*-Gen bei Patienten mit neurologisch auffälligem Phänotyp bestätigt. Darüber hinaus konnten auch vier *de novo* Mutationen in *GRIN2B* bei Patienten mit Intelligenzminderung detektiert werden (Endele et al. 2010). Während Mutationen des insbesondere pränatal exprimierten *GRIN2B* zu kognitiven Defiziten führen, tritt bei Mutationen im vor allem postnatal exprimierten *GRIN2A*-Gen als häufigstes klinisches Merkmal eine Epilepsieerkrankung auf (Endele et al. 2010). Der Phänotyp des Patienten 5-1 ist somit mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Unterbre-

chung des *GRIN2A*-Gens und der damit einhergehenden Haploinsuffizienz zurückzuführen.

5.6 Eingrenzung des Bruchpunktes der X;13-Translokation bei Patientin 6 in 13q22.1 auf 160 Kb und Detektion einer Mikroduplikation von 860 Kb in der Bruchregion Xq25

5.6.1 Vermutlich besteht kein Zusammenhang zwischen den klinischen Merkmalen von Patientin 6 und dem 13q22.1-Bruchpunkt

Patientin 6 weist eine Entwicklungsverzögerung mit Intelligenzminderung auf. Zudem sind faziale Dysmorphiezeichen wie Synophrys und Dolichocephalus sowie eine überzählige Brustwarze vorhanden. Mithilfe serieller FISH-Analysen wurde der Bruchpunkt auf Chromosom 13 in q22.1 auf etwa 160 Kb eingegrenzt. Datenbankrecherchen ergaben, dass kein Gen unterbrochen ist, da sich dieser Bruchpunkt in einer genarmen Region befindet.

Die Datenbank *Decipher* verzeichnet acht Individuen mit Imbalancen, welche die Region bis zu 1 Mb distal bzw. proximal des Bruchpunktes betreffen. Hiervon sind sieben Deletionsträger, von denen wiederum drei Personen mit Deletionsgrößen zwischen 15 und 21 Mb gesund sind. Drei Personen mit einer heterozygoten Deletion zwischen 8 und 38 Mb zeigen eine Intelligenzminderung bzw. Sprachentwicklungsverzögerung sowie diverse Dysmorphiezeichen. Eine Person mit einer homozygoten Deletion von knapp 15 Mb hat ebenfalls eine Intelligenzminderung und zeigt faziale Dysmorphiezeichen. Es ist ein gesunder Duplikationsträger mit einer Duplikation von 95,5 Mb gelistet. Laut der Datenbank *Database of Genomic Variants* sind in der 2 Mb großen Region um den Bruchpunkt der Patientin 6 zahlreiche CNVs und einige Deletionen, die die Gene *KLF12*, *TBC1D4*, *COMMD6*, *UCHL3* und *LMO7* betreffen, bei gesunden Personen detektiert worden. Zum *CTAGE11P*-Gen sind in der Datenbank keine genomischen Veränderungen verzeichnet. Demnach scheint eine Kopienzahlveränderung und Unterbrechung eines der o.g. Gene zumindest nicht immer eine pathologische Auswirkung zu haben.

Die *KLF*-Gen-Familie spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Tumorprogression (Black et al. 2001). Das *KLF12* (*Kruppel-like factor 12*)-Gen wird mit der Progression von Magenkarzinomen assoziiert (Nakamura et al. 2009). Eine Assoziation mit rheumatoider Arthritis wird diskutiert (Julià et al. 2008; Eyre et al. 2010; García-Bermúdez et al. 2011; Mihailova et al. 2011). Das vom Gen *Klf12* kodierte Protein konnte bei Mäusen lediglich im Nieren-, Lungen- und Lebergewebe nach-

gewiesen werden (Imhof et al. 1999). Über die Funktion des Gens *CTAGE11P* (*CTAGE family, member 11, pseudogene*) ist bislang nichts bekannt. Das Gen *TBC1D4* (*TBC1 domain family, member 4*) ist an der Regulation des Traffickings des Glukosetransporters GLUT4 beteiligt (Larance et al. 2005; Miinea et al. 2005) und hat Einfluss auf die Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen, die bei Mäusen nach Knockdown von *Tbc1d4* eine erhöhte Apoptoserate sowie eine verringerte Glukose-induzierte Proliferation zeigten (Bouzakri et al. 2008). *COMMD6* (*COMM domain containing 6*) ist ein Repressor des NF κ B-Signalweges (de Bie et al. 2006), welcher für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes verantwortlich ist (Baldwin 1996; Ghosh et al. 1998; Barkett und Gilmore 1999). *UCHL3* [*ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3*] ist an der Regulation des Ubiquitin-Signalweges beteiligt. Bei einer homozygoten Deletion des *Uchl3*-Gens konnten in Mäusen Defizite beim räumlichen Lernen und beim Arbeitsgedächtnis (Wood et al. 2005), ansonsten aber keine entwicklungsabhängigen oder histologischen Auffälligkeiten festgestellt werden (Kurihara et al. 2000). Eine homozygote Deletion, welche entweder nur das *Uchl3*-Gen oder das Gen *Uchl3* und das benachbarte Gen *Lmo7* (*LIM domain 7*) betrifft, verursachte bei Mäusen eine verringerte Lebensfähigkeit und Defizite beim postnatalen Wachstum sowie eine Degeneration der Muskulatur und Retina (Semenova et al. 2003). *LMO7* scheint an der Migration von Brustkrebszellen (Hu et al. 2011) und der transkriptionellen Regulation verschiedener muskelrelevanter Gene (Holaska et al. 2006; Dedeic et al. 2011) beteiligt zu sein. Es ist relativ unwahrscheinlich, dass *UCHL3* das gesuchte Krankheitsgen darstellt, da bei Patientin 6 ein Positionseffekt auf ein Allel von *UCHL3* postuliert werden müsste, während die Defizite im räumlichen Lernen und des Arbeitsgedächtnisses nur bei homozygoten Knockout-Tieren beobachtet wurden.

Zusammenfassend scheint keines der sechs Gene ein plausibles Kandidatengen für die phänotypischen Charakteristika von Patientin 6 zu sein.

5.6.2 In der Bruchpunktregion mit der Mikroduplikation in Xq25 sind mehrere Kandidatengene für die klinischen Merkmale der Patientin 6 lokalisiert

Mittels serieller FISH-Analysen wurde mithilfe von BAC-Klonen im Xq25-Bruchpunkt eine 860 Kb große Mikroduplikation detektiert. Deren Größe stimmt mit der durch die Array-CGH-Untersuchung gefundene Duplikation überein.

Duplikationen des langen Arms des X-Chromosoms sind mit Kleinwuchs, Intelligenzmin-derung, Mikrozephalie, Panhypopituitarismus und Dysmorphiezeichen assoziiert (Ricks et al. 2010). In der Literatur sind etwa 60 Fälle von Xq-Duplikationen beschrieben (Cheng et al. 2005), allerdings haben nur einige Duplikationen eine MRO mit der Xq25-

Duplikation von Patientin 6 (Abb. 58) (Varella-Garcia et al. 1981; van Dyke et al. 1983; Morichon-Delvallez et al. 1988; Aughton et al. 1993; Crandall et al. 1993; Kleczkowska et al. 1993; Garcia-Heras et al. 1997; Zhang et al. 1997; Monaghan et al. 1998; Tihy et al. 1999; Armstrong et al. 2003; Tachdjian et al. 2004; Cheng et al. 2005; Ricks et al. 2010).

Intelligenzminderung	+ / / + + - + + + + + / + +	+	11/12=91,7%
faziale Dysmorphiezeichen	+ + + + / - + + / + + + + +	+	12/13=92,3%
Auffälligkeiten der Kopfform	/ / + + + - + + - + + + - +	+	10/13=76,9%
Auffälligkeiten der Mamillen	+ + / - / - - / / / - / / /	+	3/7=42,9%

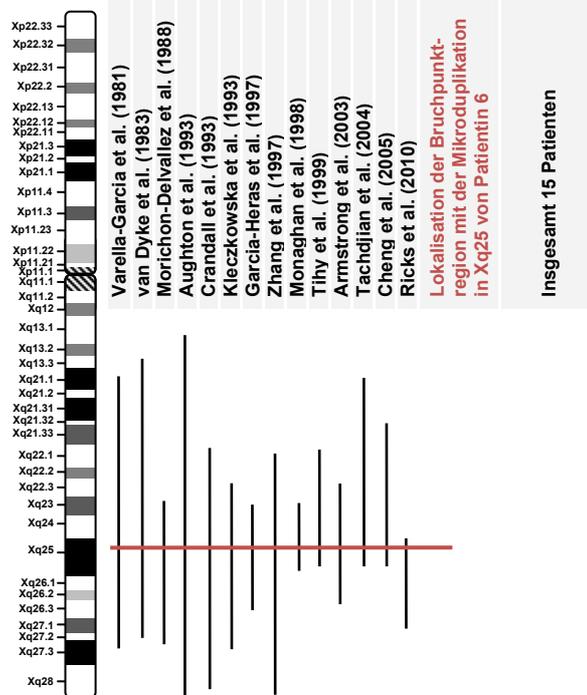


Abb. 58: Schematische Darstellung des X-Chromosoms, der Lokalisation der Bruchpunktregion und der Mikroduplikation in Xq25 bei Patientin 6 sowie bereits bekannte Duplikationen in dieser chromosomalen Region unter der Angabe der damit assoziierten phänotypischen Eigenschaften. Das Ideogramm des X-Chromosoms ist dargestellt. Durch den roten Strich ist die Bruchpunktregion mit der Mikroduplikation von Patientin 6 in Xq25 gekennzeichnet. Durch die schwarzen senkrechten Striche ist die Lokalisation von beschriebenen Duplikationen angegeben. Darüber ist eine tabellarische Übersicht der phänotypischen Eigenschaften der betroffenen Individuen zu finden. In Prozentzahlen ist angegeben, wie viele Intelligenzminderung, faziale Dysmorphiezeichen und Auffälligkeiten der Kopfform bzw. der Mamillen aufweisen. Die Rechnungen beziehen sich auf die jeweilige Patientenanzahl mit entsprechender Angabe. „/“, nicht angegeben; „+“, klinisches Merkmal war beim Patienten nachweisbar; „-“, klinisches Merkmal wurde nicht festgestellt.

Die klinischen Merkmale von Patientin 6 treten bei Patienten mit Duplikationen, die Xq25 umfassen, gehäuft auf. Demnach ist es wahrscheinlich, dass die Duplikation für den Phänotyp von Patientin 6 ursächlich ist.

Datenbankrecherchen ergaben, dass die unbalancierte reziproke Translokation von Patientin 6 zu einer Kopienanzahlveränderung verschiedener Gene geführt hat. Bei drei Genen – *XIAP* (*X-linked inhibitor of apoptosis*), *STAG2* (*stromal antigen 2*) und *SH2D1A* (*SH2 domain containing 1A*) – liegt eine vollständige Duplikation vor. Das Gen *ODZ1* (*odz, odd Oz/ten-m homolog 1*) ist partiell dupliziert. Das Gen *THOC2* (*THO complex 2*) ist entweder vollständig oder partiell verdoppelt. Bei einer partiellen Genduplikation

kommt es nicht nur zur Verdopplung eines gewissen Genanteils, sondern auch zur direkten Unterbrechung des betroffenen Gens. In der Nähe des duplizierten Bereiches bzw. der Bruchpunktregion befindet sich ein weiteres Gen, *GRIA3* (*glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3*), auf das sich ein Positionseffekt ausgewirkt haben könnte.

Drei der Gene haben nach Literaturrecherchen keinen offensichtlichen Einfluss auf den Phänotyp der Patientin 6: THOC2 ist Teil des THO-Komplexes, der wiederum Bestandteil des TREX (*transcription/export*)-Komplexes ist. Der THO-Komplex spielt bei der Rekrutierung von mRNA-Export-Proteinen für entstehende Transkripte eine wichtige Rolle und der humane TREX-Komplex bei der Kopplung der Transkription mit dem mRNA-Export (Strasser et al. 2002; Masuda et al. 2005). XIAP inhibiert Kaspasen, die den Zelltod herbeiführen, und soll daher den Zelltod inhibieren können (Deveraux et al. 1997). Das Gen *SH2D1A* spielt eine Rolle bei der humoralen Immunantwort, indem es an der Stimulation von B- und T-Zellen beteiligt ist (Ma und Deenick 2011). Mutationen und Deletionen sowohl des *XIAP*- als auch des *SH2D1A*-Gens verursachen ein X-chromosomales lymphoproliferatives Syndrom, welches durch Lymphohystiozytose, Hypogammaglobulinämie und EBV-assoziierte Lymphome gekennzeichnet ist (Rigaud et al. 2006; Booth et al. 2011; Eckrich et al. 2011; Pachlopnik Schmid et al. 2011).

Bei drei der in bzw. in der Nähe der Mikroduplikation und des Bruchpunktes gelegenen Gene ist ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression und den beschriebenen klinischen Merkmalen von Patientin 6 zu vermuten:

ODZ1 kodiert für ein Transmembranprotein (Minet und Chiquet-Ehrismann 2000), das beim Menschen vor allem im fetalen Gehirn exprimiert wird (Minet et al. 1999). Bei weiteren Vertebraten konnte insbesondere eine neuronale Expression detektiert werden (Tucker et al. 2007). Für *Caenorhabditis elegans* konnte gezeigt werden, dass das orthologe Protein an der Morphogenese und neuronalen Migration beteiligt ist (Drabikowski et al. 2005). Aufgrund des neuronalen Expressionsmusters von *ODZ1* und der Lokalisation in Xq25, einem bereits bekannten, mit Intelligenzminderung gekoppelten chromosomalen Locus, wurde *ODZ1* als Kandidatengen für Intelligenzminderung postuliert (Minet und Chiquet-Ehrismann 2000; Tucker und Chiquet-Ehrismann 2006). Eine computerunterstützte, v.a. auf der Gen-Annotation beruhende Priorisierung von Kandidatengen für X-chromosomale Intelligenzminderung ordnete das Gen *ODZ1* als kein gutes Kandidatengen ein (Lombard et al. 2011). Mutationen konnten bislang nicht detektiert werden (Gilfillan et al. 2008; Kenzelmann Brož 2008).

GRIA3 kodiert für eine Untereinheit des AMPA-Glutamat-Rezeptors. Glutamat-Rezeptoren sind allgemein an der Neurotransmission beteiligt und wichtig für die synaptische

Plastizität, das Lernen und das Gedächtnis (Ozawa et al. 1998). Männliche Mäuse mit einer Deletion des *Gria3*-Gens zeigten signifikante Veränderungen in der hippocampalen Langzeit-Potenzierung (Meng et al. 2003). Eine *de novo* Translokation [46,XX,t(X;12)(q24;q15)] mit einem Bruchpunkt im *GRIA3*-Gen gibt einen wichtigen Hinweis für eine Assoziation von *GRIA3* mit neurologischen Erkrankungen. Die Translokationsträgerin zeigte eine Intelligenzminderung und eine bipolare Störung (Gecz et al. 1999). Des Weiteren wurden verschiedene, das *GRIA3*-Gen umfassende Duplikationen bei fünf neurologisch auffälligen Patienten detektiert. Der eine Patient war autistisch, die anderen vier hatten eine Intelligenzminderung (Chiyonobu et al. 2007; Wu et al. 2007; Bonnet et al. 2009; Guilmatre et al. 2009). Vier der Duplikationen waren mütterlicherseits vererbt, wobei eine Mutter mit niedrigem Intelligenzquotienten und zufälligem X-Inaktivierungsmuster die Duplikation an ihre zwei Söhne vererbte (Bonnet et al. 2009). Die anderen Mütter waren phänotypisch unauffällig (Chiyonobu et al. 2007; Guilmatre et al. 2009), wobei bei einer ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster festgestellt wurde (Chiyonobu et al. 2007). Bei strukturellen Chromosomenanomalien wie einer Duplikation oder Deletion ist in der Regel das X-Chromosom mit der Veränderung inaktiviert (Brown und Robinson 2000; Tachdjian et al. 2004). Schließlich erhärtet sich der Verdacht, dass *GRIA3* das Krankheitsgen für Patientin 6 ist, zum einen aufgrund der Beschreibung von vier verschiedenen Missense-Mutationen im *GRIA3*-Gen bei Patienten mit Intelligenzminderung (Wu et al. 2007), zum anderen aufgrund der Assoziation einer 874 Kb zentromerwärts des *GRIA3*-Gens gelegenen 970 Kb großen Duplikation nicht kodierender Elemente bei einem Patienten mit einer fehlenden Expression von *GRIA3* und Intelligenzminderung (Bonnet et al. 2012).

STAG2 bildet mit SMC1, SMC3 und SCC1 den Kohesinkomplex, welcher die Kohäsion von Schwesterchromatiden vom Zeitpunkt ihrer Synthese bis zur Anaphase gewährleistet (Sumara et al. 2000) und daher die Trennung von Schwesterchromatiden während der Zellteilung reguliert (Solomon et al. 2011). Heterozygote Funktionsverlustmutationen des *STAG2*-Gens führen zu Chromatidadhäsionsdefekten und können in Aneuploidien in humanen Krebszellen resultieren (Solomon et al. 2011). Es gibt außerdem Anhaltspunkte dafür, dass *STAG2* eine Rolle bei der präferenziellen X-Inaktivierung spielt. So existiert eine Familie, in der drei Frauen mit einer heterozygoten Mutation im Faktor VIII-Gen und einer verschobenen X-Inaktivierung an Hämophilie A erkrankt sind (Renault et al. 2007). Mittels einer Kopplungsanalyse wurden mehrere Kandidatenregionen identifiziert (Renault et al. 2011), wobei die Region mit dem Gen *STAG2* bereits mit verschobener X-Inaktivierung assoziiert wurde (Naumova et al.

1998; Cau et al. 2006). Obwohl keine pathogene Mutation in *STAG2* detektiert werden konnte, wird es aufgrund seiner Assoziation mit CTCF [*CCCTC-binding factor (zinc finger protein)*] – einem Insulator und Transkriptionsfaktor, der an der Selektion des X-Chromosoms für die X-Inaktivierung beteiligt ist (Chao et al. 2002) – als Kandidatengen für eine verschobene X-Inaktivierung postuliert (Renault et al. 2011).

Das X-Inaktivierungsverhältnis der Patientin 6 konnte durch eine methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion am *AR*-Locus in Xq12 nicht ermittelt werden, da sie homozygot an diesem Locus ist (Dr. Isabella Rau, Institut für Humangenetik, UKE, persönliche Mitteilung). Unabhängig davon, wie das X-Inaktivierungsverhältnis in diesem Fall vorliegt, ergeben sich bei einer X-autosomalen Translokation mit einer X-chromosomalen Duplikation einige Besonderheiten (Abb. 59).

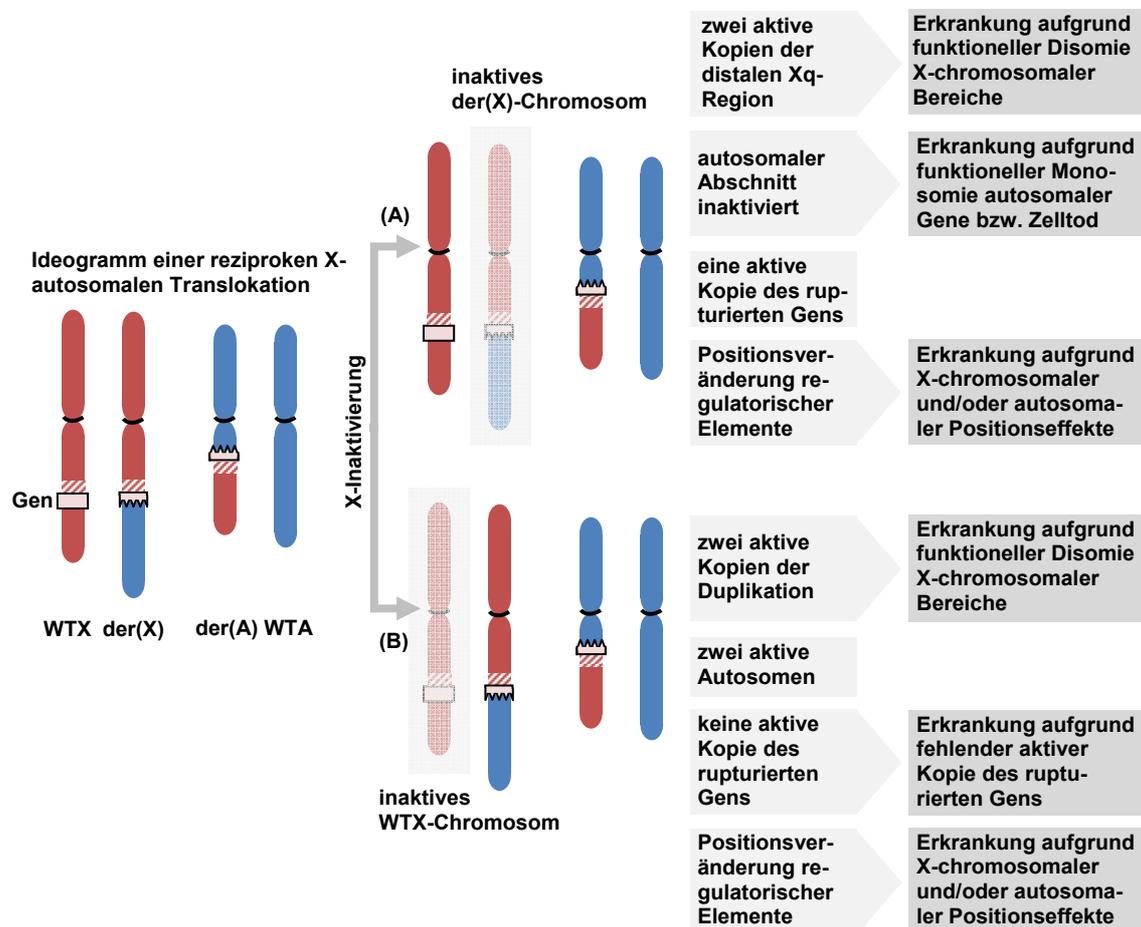


Abb. 59: Schema zur X-Inaktivierung bei Trägerinnen einer reziproken X-autosomalen Translokation mit einer Duplikation eines X-chromosomalen Bereiches. Ideogramme der Wildtyp- (WT) und derivativen (der) Chromosomen des Gonosoms (rot) und eines Autosoms (blau). Ein X-chromosomales Gen ist durch ein rosa Rechteck gezeigt, welches durch diese Translokation direkt unterbrochen wird. Der schraffierte Bereich zeigt den duplizierten Bereich des X-Chromosoms. Die X-Inaktivierung erfolgt normalerweise zufällig. Sie führt entweder zur Inaktivierung des derivativen X-Chromosoms (A) oder zur Inaktivierung des Wildtyp-X-Chromosoms (B). Die sich daraus ergebenden Besonderheiten und Folgen bei einer X-autosomalen Translokation mit einer Duplikation eines X-chromosomalen Bereiches sind in den grauen Kästen aufgeführt [Abbildung modifiziert nach Strachan und Read (2011)].

Die X-Inaktivierung erfolgt in der Regel zunächst nach dem Zufallsprinzip. Durch Selektionsdruck kann dann eine verschobene X-Inaktivierung entstehen (Belmont 1996; Migeon 1998):

Bei Patientinnen mit einer balancierten X-autosomalen Translokation liegt nach dem Selektionsprozess häufig das Wildtyp-X-Chromosom inaktiv vor (Belmont 1996; Migeon 1998). Denn wenn in Zellen das derivative X-Chromosom inklusive des translozierten autosomalen Segments durch einen Ausbreitungseffekt inaktiviert wird, besteht zum einen eine partielle autosomale Monosomie, die sehr häufig zum Zelltod führt, und zum anderen eine funktionelle Disomie X-chromosomaler Segmente (Mattei et al. 1982; Schmidt und Du Sart 1992; Belmont 1996; Strachan und Read 2011). Durch das X-Inaktivierungsmuster sowie durch die Lokalisation der Bruchpunkte wird der Phänotyp einer Trägerin einer balancierten X-autosomalen Translokation maßgeblich beeinflusst (Schmidt und Du Sart 1992; Sanlaville et al. 2009).

Demgegenüber haben bei Patientinnen mit einer unbalancierten X-autosomalen Translokation oft Zellen mit dem Wildtyp-Chromosom einen Selektionsvorteil. Das derivative X-Chromosom inklusive des translozierten autosomalen Segments liegt inaktiv vor (Mattei et al. 1982; Belmont 1996). Allerdings ist es bei unbalancierten X-autosomalen Translokationen möglich, dass das Ausmaß der Inaktivierung des derivativen X-Chromosoms das klinische Bild mitbestimmt, weil die Inaktivierung der autosomalen Bereiche unterschiedlich ausgeprägt sein kann (Mattei et al. 1982; Lyon 1998; White et al. 1998; Hall et al. 2002; Sharp et al. 2002; Gupta et al. 2006; Giorda et al. 2008; Hyon et al. 2011).

Es werden aber auch andere Inaktivierungsmuster bei balancierten und unbalancierten X-autosomalen Translokationen detektiert (Cottrell et al. 2009; Auber et al. 2010). Denn das Inaktivierungsmuster scheint das Ergebnis eines Wettbewerbs zwischen verschiedenen Selektionsmechanismen zu sein: einerseits gegen Zellen mit X-chromosomaler Disomie und autosomaler Monosomie, andererseits gegen Zellen mit einem Gendefekt, der zum Zelltod führt (Schmidt und Du Sart 1992).

Bei zwei Patientinnen mit jeweils einer X-autosomalen Translokation, einer Duplikation in der Bruchregion des X-Chromosoms und einer weiteren Imbalance im Bruchpunktbereich des beteiligten Autosoms wurde ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster festgestellt (Misceo et al. 2011; Fonseca et al. 2012). Bei einer Patientin ist der Phänotyp vermutlich auf die X-chromosomale Duplikation des *PLP1*-Gens zurückzuführen, während die autosomale Duplikation einer genleeren Region vermutlich keinen phänotypischen Einfluss nimmt (Fonseca et al. 2012). Bei dieser Translokationsträgerin ist das

Wildtyp-X-Chromosom inaktiv, während bei heterozygoten Trägerinnen einer *PLP1*-Duplikation aufgrund des Selektionsprozesses gegenüber Zellen mit einer Duplikation in der Regel das Wildtyp-X-Chromosom aktiv vorliegt (Woodward et al. 2000). Bei der anderen Translokationsträgerin liegt ebenfalls ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster vor. Ihr Phänotyp wird vermutlich durch die Deletion des *SHANK3*-Gens, welches in der autosomalen Bruchregion lokalisiert, hervorgerufen. Der X-chromosomale Bruchpunkt-bereich mit einer Duplikation scheint in diesem Fall keine pathogene Auswirkung zu haben (Misceo et al. 2011).

Es ist wahrscheinlich, dass auch bei Patientin 6 ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster vorliegt. Der duplizierte Bereich in Xq25 ist allerdings unabhängig vom X-Inaktivierungsmuster in jeder Zelle zwei Mal – zum einen auf dem derivativen Chromosom 13 und zum anderen auf einem X-Chromosom – in aktiver Form zu finden. Daher wird der Phänotyp der Patientin 6 vermutlich am ehesten durch die X-chromosomale Duplikation verursacht. Bei Inaktivierung des Wildtyp-X-Chromosoms kann auch die direkte Unterbrechung des *ODZ1*-Gens und/oder ein Positionseffekt auf das *GRIA3*-Gen eine Rolle bei der Entwicklung eines Krankheitsphänotyps gespielt haben.

Um den potentiellen Einfluss des X-Inaktivierungsverhältnisses zu beurteilen, sollte dieses mithilfe der R-Bänderung untersucht werden.

Eine abschließende Beurteilung ist aufgrund des nicht bestimmten X-Inaktivierungsmusters nur insoweit möglich, dass in dem Bruchpunkt drei interessante Kandidatengene liegen: *STAG2*, *ODZ1* und *GRIA3*. *STAG2* könnte das X-Inaktivierungsmuster beeinflusst haben. *ODZ1* und *GRIA3* sind gute Kandidatengene für Intelligenzminderung. Die bisherige Datenlage zu *GRIA3* macht es zu einem besonders interessanten Kandidatengen für die Intelligenzminderung der Patientin 6.

6 Zusammenfassung

Für das Verständnis von erblichen Krankheiten ist die Identifizierung der zugrunde liegenden genetischen Veränderung von großer Bedeutung. Familiär oder *de novo* auftretende chromosomale Rearrangements wie reziproke Chromosomentranslokationen, die mit einem Mendel'schen Krankheitsphänotyp einhergehen, tragen entscheidend zur Identifizierung neuer Krankheitsgene bei. Im Rahmen dieser Arbeit wurden lichtmikroskopisch sichtbare chromosomale Rearrangements bei sechs Patienten mit Intelligenzminderung und weiteren klinischen Merkmalen mittels serieller Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) physikalisch feinkartiert. Die Bruchregionen konnten auf 10 bis 160 Kb eingegrenzt werden. Außerdem wurden zwei Deletionen und eine Mikroduplikation detektiert bzw. bestätigt. Anschließend wurden Informationen zu den dort lokalisierten Genen gesammelt, um zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen den Eigenschaften der kodierten Proteine und dem Phänotyp des jeweiligen Patienten besteht. Ein weiterer Hinweis für ein putatives Krankheitsgen waren in der Literatur beschriebene Imbalancen, die das Kandidatengen betreffen und mit einem dem Indexpatienten ähnlichen Phänotyp assoziiert sind.

Bei Patientin 1 wurde *CSMD3* in 8q23.3 als potentielles Krankheitsgen für neurologische Erkrankungen identifiziert. Bei Patient 2 war es möglich, drei Kandidatengene für Intelligenzminderung – *GRIN3A* und *PRG-3* im 9q31.1-Bruchpunkt und *PCDH8* im 13q14.3-Bruchpunkt – zu definieren. Bei Patient 3 konnten in 2q14.2 zwei Gene – *DBI* und *SCTR* – als Kandidatengene für Autismus in Kombination mit Intelligenzminderung identifiziert werden. Darüber hinaus wurde in 15q26.3 *IGF1R* als weiteres Kandidatengen für Kleinwuchs in Kombination mit Intelligenzminderung ermittelt. Bei Patient 4 wurde der Phänotyp vermutlich durch eine 6,1 Mb große Deletion in 4q31.1q31.22 hervorgerufen. Das im deletierten Bereich lokalisierte Gen *INPP4B* und eine eventuell damit einhergehende Haploinsuffizienz könnte die Intelligenzminderung bei Patient 4 verursacht haben. Die direkte Unterbrechung des *GRIN2A*-Gens durch die 16;17-Translokation bei Patient 5-1 ist sehr wahrscheinlich kausal für die bei ihm diagnostizierte schwere Intelligenzminderung und die epileptischen Anfälle. Bei Patientin 6 ist die mittels FISH aufgedeckte 860 Kb große Duplikation in Xq25 vermutlich krankheitsverursachend, da sowohl das partiell duplizierte *ODZ1*-Gen als Kandidatengen für Intelligenzminderung postuliert werden kann als auch das in der

Nähe der Duplikation liegende Gen *GRIA3*, ein bereits bekanntes Krankheitsgen für Entwicklungsverzögerung.

Zusammengefasst konnten im Rahmen dieser Arbeit mehrere aussichtsreiche Kandidatengene für erblich bedingte Intelligenzminderung ermittelt werden. Insbesondere führte die hier identifizierte Unterbrechung des *GRIN2A*-Gens zur Erstbeschreibung dieses und des homologen *GRIN2B*-Gens, die für die regulatorischen Untereinheiten NR2A und NR2B der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren kodieren, als Krankheitsgene für neurologische Phänotypen.

7 Literaturverzeichnis

Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D et al. (2003) IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *The New England journal of medicine* 349(23): 2211-2222.

Aich J, Mabalirajan U, Ahmad T, Agrawal A, Ghosh B. (2012) Loss-of-function of inositol polyphosphate-4-phosphatase reversibly increases the severity of allergic airway inflammation. *Nature communications* 3: 877.

Al-Hallaq RA, Jarabek BR, Fu Z, Vicini S, Wolfe BB, Yasuda RP. (2002) Association of NR3A with the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 and NR2 subunits. *Molecular pharmacology* 62(5): 1119-1127.

Alfonso J, Le Magueresse C, Zuccotti A, Khodosevich K, Monyer H. (2012) Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell Stem Cell* 10(1): 76-87.

Andersson O, Stenqvist A, Attersand A, von Euler G. (2001) Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics* 78(3): 178-184.

Armatas V. (2009) Mental retardation: definitions, etiology, epidemiology and diagnosis. *Journal of Sport and Health Research* 1: 112-122.

Armstrong L, McGowan-Jordan J, Brierley K, Allanson JE. (2003) De novo dup(X)(q22.3q26) in a girl with evidence that functional disomy of X material is the cause of her abnormal phenotype. *American journal of medical genetics Part A* 116A(1): 71-76.

Astbury C, Christ LA, Aughton DJ, Cassidy SB, Kumar A, Eichler EE, Schwartz S. (2004) Detection of deletions in de novo "balanced" chromosome rearrangements: Further evidence for their role in phenotypic abnormalities. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 6(2): 81-89.

Auber B, Burfeind P, Thiels C, Alsat EA, Shoukier M, Liehr T, Nelle H, Bartels I, Salinas-Riester G, Laccone F. (2010) An unbalanced translocation resulting in a duplication of Xq28 causes a Rett syndrome-like phenotype in a female patient. *Clin Genet* 77(6): 593-597.

Aughton DJ, AISaadi AA, Johnson JA, Transue DJ, Trock GL. (1993) Dir dup(X) (q13-->qter) in a girl with growth retardation, microcephaly, developmental delay, seizures, and minor anomalies. *American journal of medical genetics* 46(2): 159-164.

Back E, Hertel C, Vogel W, Bettecken F, Thiesen M. (1977) Deletion of the long arm of chromosome 4 [46,XX,del(4)(q31)] in a patient with congenital anomalies. *Annales de genétique* 20(4): 294-296.

Baldwin AS. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology* 14(1): 649-681.

Ballabio A. (1993) The rise and fall of positional cloning? *Nature genetics* 3(4): 277-279.

Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, Coppinger J, Kashork CD, Shaffer LG, Bejjani BA. (2006) Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *American Journal of Medical Genetics Part A* 140A(24): 2757-2767.

Banfi S, Ballabio A. (2001) Disease-related genes: identification. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

Baptista J, Mercer C, Prigmore E, Gribble SM, Carter NP, Maloney V, Thomas NS, Jacobs PA, Crolla JA. (2008) Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *American journal of human genetics* 82(4): 927-936.

Barkett M, Gilmore TD. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18(49): 6910-6924.

- Bartz F, Kern L, Erz D, Zhu M, Gilbert D, Meinhof T, Wirkner U, Erfle H, Muckenthaler M, Pepperkok R et al.** (2009) Identification of cholesterol-regulating genes by targeted RNAi screening. *Cell Metabolism* 10(1): 63-75.
- Batista DAS, Pai GS, Stetten G.** (1994) Molecular analysis of a complex chromosomal rearrangement and a review of familial cases. *American journal of medical genetics* 53(3): 255-263.
- Belmont JW.** (1996) Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *American journal of human genetics* 58(6): 1101-1108.
- Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan D-J, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT et al.** (2009) Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nature genetics* 41(3): 359-364.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW et al.** (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51(4): 676-685.
- Berger A, Dar H, Reiter A, Tal Y.** (1983) Chromosome 4q deletion syndrome: a case report. *Israel journal of medical sciences* 19(9): 850-852.
- Bettelheim D, Hengstschräger M, Drahonsky R, Eppel W, Bernaschek G.** (1998) Two cases of prenatally diagnosed diaphragmatic hernia accompanied by the same undescribed chromosomal deletion (15q24 de novo). *Clinical Genetics* 53(4): 319-320.
- Bhakta KY, Marlin SJ, Shen JJ, Fernandes CJ.** (2005) Terminal deletion of chromosome 15q26.1: case report and brief literature review. *J Perinatol* 25(6): 429-432.
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J.** (2001) Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *Journal of Cellular Physiology* 188(2): 143-160.
- Bloom SR.** (1974) Hormones of the gastrointestinal tract. *British Medical Bulletin* 30(1): 62-67.
- Bonnet C, Leheup B, Beri M, Philippe C, Gregoire MJ, Jonveaux P.** (2009) Aberrant GRIA3 transcripts with multi-exon duplications in a family with X-linked mental retardation. *American journal of medical genetics Part A* 149A(6): 1280-1289.
- Bonnet C, Masurel-Paulet A, Khan AA, Beri-Dexheimer M, Callier P, Mugneret F, Philippe C, Thauvin-Robinet C, Faivre L, Jonveaux P.** (2012) Exploring the potential role of disease-causing mutation in a gene desert: duplication of noncoding elements 5' of GRIA3 is associated with GRIA3 silencing and X-linked intellectual disability. *Human mutation* 33(2): 355-358.
- Booth C, Gilmour KC, Veys P, Gennery AR, Slatter MA, Chapel H, Heath PT, Steward CG, Smith O, O'Meara A et al.** (2011) X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management and outcome of the disease. *Blood* 117(1): 53-62.
- Borg I, Squire M, Menzel C, Stout K, Morgan D, Willatt L, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Ropers HH, Tommerup N et al.** (2002) A cryptic deletion of 2q35 including part of the PAX3 gene detected by breakpoint mapping in a child with autism and a de novo 2;8 translocation. *Journal of medical genetics* 39(6): 391-399.
- Bork P, Beckmann G.** (1993) The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 231(2): 539-545.
- Bouzakri K, Ribaux P, Tomas A, Parnaud G, Rickenbach K, Halban PA.** (2008) Rab GTPase-activating protein AS160 is a major downstream effector of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 57(5): 1195-1204.
- Brandt CA, Lüdecke H-J, Hindkjær J, Strømkjær H, Pinkel D, Herlin T, Bolund L, Friedrich U.** (1997) A de novo complex t(7;13;8) translocation with a deletion in the TRPS gene region. *Human genetics* 100(3): 334-338.
- Brown CJ, Robinson WP.** (2000) The causes and consequences of random and non-random X chromosome inactivation in humans. *Clin Genet* 58(5): 353-363.

- Bulger M, Groudine M.** (2011) Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* 144(3): 327-339.
- Buselmaier W, Tariverdian G.** (2007) Humangenetik. In *Springer-Lehrbuch*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Butler MG, Fogo AB, Fuchs DA, Collins FS, Dev VG, Phillips JA, 3rd.** (1988) Two patients with ring chromosome 15 syndrome. *American journal of medical genetics* 29(1): 149-154.
- Capron C, Duyme M.** (1989) Assessment of effects of socio-economic status on IQ in a full cross-fostering study. *Nature* 340(6234): 552-554.
- Carter NP.** (2007) Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nature genetics*.
- Cau M, Addis M, Congiu R, Meloni C, Cao A, Santaniello S, Loi M, Emma F, Zuffardi O, Ciccone R et al.** (2006) A locus for familial skewed X chromosome inactivation maps to chromosome Xq25 in a family with a female manifesting Lowe syndrome. *J Hum Genet* 51(11): 1030-1036.
- Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, Davidow LS, Lee JT.** (2002) CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science* 295(5553): 345-347.
- Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Cherif B, Bienvenu T.** (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 14(6): 701-713.
- Chen C-P, Lin S-P, Wang T-H, Chen Y-J, Chen M, Wang W.** (2006) Perinatal findings and molecular cytogenetic analyses of de novo interstitial deletion of 9q (9q22.3→q31.3) associated with Gorlin syndrome. *Prenatal diagnosis* 26(8): 725-729.
- Chen X, Gumbiner BM.** (2006) Paraxial protocadherin mediates cell sorting and tissue morphogenesis by regulating C-cadherin adhesion activity. *The Journal of cell biology* 174(2): 301-313.
- Chen X, Koh E, Yoder M, Gumbiner BM.** (2009) A protocadherin-cadherin-FLRT3 complex controls cell adhesion and morphogenesis. *PLoS One* 4(12): e8411.
- Cheng SF, Rauen KA, Pinkel D, Albertson DG, Cotter PD.** (2005) Xq chromosome duplication in males: clinical, cytogenetic and array CGH characterization of a new case and review. *American journal of medical genetics Part A* 135(3): 308-313.
- Chew CK, Foster P, Hurst JA, Salmon JF.** (1995) Duane's retraction syndrome associated with chromosome 4q27-31 segment deletion. *American journal of ophthalmology* 119(6): 807-809.
- Chez MG, Buchanan CP, Bagan BT, Hammer MS, McCarthy KS, Ovrutskaya I, Nowinski CV, Cohen ZS.** (2000) Secretin and autism: a two-part clinical investigation. *Journal of autism and developmental disorders* 30(2): 87-94.
- Chiyonobu T, Hayashi S, Kobayashi K, Morimoto M, Miyanomae Y, Nishimura A, Nishimoto A, Ito C, Imoto I, Sugimoto T et al.** (2007) Partial tandem duplication of GRIA3 in a male with mental retardation. *American journal of medical genetics Part A* 143A(13): 1448-1455.
- Choi JH, Kang M, Kim GH, Hong M, Jin HY, Lee BH, Park JY, Lee SM, Seo EJ, Yoo HW.** (2011) Clinical and functional characteristics of a novel heterozygous mutation of the IGF1R gene and IGF1R haploinsufficiency due to terminal 15q26.2->qter deletion in patients with intrauterine growth retardation and postnatal catch-up growth failure. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96(1): E130-134.
- Chudley AE, Pabello PD, Bingham W, Goluboff N.** (1982) Del(4)(q31) syndrome. *American journal of medical genetics* 13(3): 341-343.
- Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA.** (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15(10): 6498-6508.
- Coe BP, Ylstra B, Carvalho B, Meijer GA, Macaulay C, Lam WL.** (2007) Resolving the resolution of array CGH. *Genomics* 89(5): 647-653.

- Copelli S, Rey GD, Heinrich J, Coco R.** (1995) Interstitial deletion of the long arm of chromosome 4, del(4)(q28→q31.3). *American journal of medical genetics* 55(1): 77-79.
- Corpas M, Bragin E, Clayton S, Bevan P, Firth HV.** (2012) Interpretation of genomic copy number variants using DECIPHER. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L Haines [et al]* Chapter 8: Unit 8 14.
- Costa E, Guidotti A.** (1991) Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions. *Life sciences* 49(5): 325-344.
- Cottrell CE, Sommer A, Wenger GD, Bullard S, Busch T, Krahn KN, Lidral AC, Gastier-Foster JM.** (2009) Atypical X-chromosome inactivation in an X;1 translocation patient demonstrating Xq28 functional disomy. *American journal of medical genetics Part A* 149A(3): 408-414.
- Coulomb L'Herminé A, Aboura A, Simon-Bouy B, Robin F, Audibert F, Strouk N, Capron F, Frydman R, Tachdjian G.** (2002) Female pseudohermaphroditism in a fetus with a deletion 9(q22.2q31.1). *Prenatal diagnosis* 22(8): 652-655.
- Cox JJ, Holden ST, Dee S, Burbridge JI, Raymond FL.** (2003) Identification of a 650 kb duplication at the X chromosome breakpoint in a patient with 46,X,t(X;8)(q28;q12) and non-syndromic mental retardation. *Journal of medical genetics* 40(3): 169-174.
- Crandall BF, Lamb AN, Estabrooks LL.** (1993) A girl with an inverted duplicated Xq and an abnormal phenotype. *American journal of human genetics* 53(3): 539A.
- Croce CM, Isobe M, Palumbo A, Puck J, Ming J, Tweardy D, Erikson J, Davis M, Rovera G.** (1985) Gene for alpha-chain of human T-cell receptor: location on chromosome 14 region involved in T-cell neoplasms. *Science* 227(4690): 1044-1047.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M.** (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 11(3): 327-335.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN.** (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004(255): re16.
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM, Jr., Jones MC, Kaback MM et al.** (1997) Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *American journal of medical genetics* 72(4): 468-477.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W et al.** (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393(6683): 377-381.
- Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Moriuchi H, Ogata T.** (2011) Identification of chromosome 15q26 terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis. *Endocrine journal* 58(3): 155-159.
- Davis JM, Clarren SK, Salk DJ.** (1981) Brief clinical report: the del(4) (q31) syndrome- a recognizable disorder with atypical Robin malformation sequence. *American journal of medical genetics* 9(2): 113-117.
- de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, Duran KJ, Berger R, Duckett CS, Wijmenga C, Klomp LW.** (2006) Characterization of COMMD protein-protein interactions in NF-kappaB signalling. *The Biochemical journal* 398(1): 63-71.
- de Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P et al.** (2007) Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *Journal of medical genetics* 44(12): 750-762.
- de Jong G, Rossouw RA, Retief AE.** (1989) Ring chromosome 15 in a patient with features of Frys's syndrome. *Journal of medical genetics* 26(7): 469-470.
- de Lacerda L, Carvalho JA, Stannard B, Werner H, Boguszewski MC, Sandrini R, Malozowski SN, Leroith D, Underwood LE.** (1999) In vitro and in vivo responses to short-term recombinant human insulin-like growth factor-1 (IGF-I) in a severely growth-retarded girl with ring chromosome 15 and deletion of a single allele for the type 1 IGF receptor gene. *Clinical endocrinology* 51(5): 541-550.

- de Michelena MI, Campos PJ.** (1989) Terminal deletion 4q in a severely retarded boy. *American journal of medical genetics* 33(2): 228-230.
- de Ravel T, Devriendt K, Fryns J-P, Vermeesch J.** (2007) What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *European Journal of Pediatrics* 166(7): 637-643.
- de Ravel TJL, Ameye L, Ballon K, Borghgraef M, Vermeesch JR, Devriendt K.** (2009) Early detection of chromosome 9q22.32q31.1 microdeletion and the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *European journal of medical genetics* 52(2-3): 145-147.
- Dedeic Z, Cetera M, Cohen TV, Holaska JM.** (2011) Emerin inhibits Lmo7 binding to the Pax3 and MyoD promoters and expression of myoblast proliferation genes. *Journal of Cell Science* 124(10): 1691-1702.
- del Valle Torrado M, Labarta JD, Migliorini AM.** (1982) Interstitial deletion of the long arm of chromosome 4 in a patient with mental retardation and abnormal phenotype. *Journal of medical genetics* 19(6): 477.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC.** (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388(6639): 300-304.
- Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Webb E, Sellick G, Wild R, Sullivan K, Vijaykrishnan J, Wang Y, Pittman AM et al.** (2008) A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics* 40(10): 1204-1210.
- Dilling H, World Health Organization.** (2011) *Internationale Klassifikation psychischer Störungen : ICD-10 Kapitel V (F) ; klinisch-diagnostische Leitlinien.* Huber, Bern.
- Ding Y-X, Zhang Y, He B, Yue W-H, Zhang DAI, Zou L-P.** (2010) A possible association of responsiveness to adrenocorticotrophic hormone with specific GRIN1 haplotypes in infantile spasms. *Developmental Medicine & Child Neurology* 52(11): 1028-1032.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF.** (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51(1): 7-61.
- Drabikowski K, Trzebiatowska A, Chiquet-Ehrismann R.** (2005) ten-1, an essential gene for germ cell development, epidermal morphogenesis, gonad migration, and neuronal pathfinding in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 282(1): 27-38.
- Dracopoli NC, Haines JL.** (1994) *Current protocols in human genetics.* Wiley, New York, NY [u.a.].
- Dua T, de Boer HM, Prilipko LL.** (2005) Atlas: Epilepsy care in the world. *Epilepsia* 46: 28-28.
- Dunn-Geier J, Ho HH, Md EA, Md DD, PhD LE, Orrbine E, Whiting S.** (2000) Effect of secretin on children with autism: a randomized controlled trial. *Developmental Medicine & Child Neurology* 42(12): 796-802.
- Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T et al.** (2005) Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Molecular and cellular biology* 25(5): 1869-1878.
- Eckrich MJ, Yang E, Domm J, Ho R, Calder C, Manes B, Bleesing J, Frangoul H.** (2011) A unique clinical presentation of X-linked lymphoproliferative syndrome with a novel mutation in SH2D1A and review of the literature. *Journal of pediatric hematology/oncology* 33(1): e39-42.
- Endele S, Rosenberger G, Geider K, Popp B, Tamer C, Stefanova I, Milh M, Kortum F, Fritsch A, Pientka FK et al.** (2010) Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nature genetics* 42(11): 1021-1026.
- Engel J, Pedley TA.** (2008) *Epilepsy: a comprehensive textbook.* Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Eriksson M, Nilsson A, Froelich-Fabre S, Åkesson E, Dunker J, Seiger Å, Folkesson R, Benedikz E, Sundström E.** (2001) Cloning and expression of the human N-methyl-d-aspartate receptor subunit NR3A. *Neuroscience Letters* 321(3): 177-181.
- Ester WA, van Duyvenvoorde HA, de Wit CC, Broekman AJ, Ruivenkamp CA, Govaerts LC, Wit JM, Hokken-Koelega AC, Losekoot M.** (2009) Two short children born small for gestational age with insulin-

like growth factor 1 receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94(12): 4717-4727.

Eyre S, Flynn E, Martin P, Hinks A, Wilson AG, Morgan AW, Emery P, Steer S, Hocking LJ, Reid DM et al. (2010) No evidence for association of the KLF12 gene with rheumatoid arthritis in a large UK cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69(7): 1407-1408.

Fabretto A, Rocca MS, Perrone MD, Skabar A, Pecile V, Gasparini P. (2012) De novo 6.9 Mb interstitial deletion on chromosome 4q31.1-q32.1 in a girl with severe speech delay and dysmorphic features. *American journal of medical genetics Part A* 158A(4): 882-887.

Fang P, Cho YH, Derr MA, Rosenfeld RG, Hwa V, Cowell CT. (2012) Severe short stature caused by novel compound heterozygous mutations of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97(2): E243-247.

Fang P, Schwartz ID, Johnson BD, Derr MA, Roberts CT, Jr., Hwa V, Rosenfeld RG. (2009) Familial short stature caused by haploinsufficiency of the insulin-like growth factor i receptor due to nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94(5): 1740-1747.

Farrell SA, Siegel-Bartelt J, Teshima I. (1991) Patients with deletions of 9q22q34 do not define a syndrome: three case reports and a literature review. *Clinical Genetics* 40(3): 207-214.

Fedele CG, Ooms LM, Ho M, Vieusseux J, O'Toole SA, Millar EK, Lopez-Knowles E, Sriratana A, Gurung R, Baglietto L et al. (2010) Inositol polyphosphate 4-phosphatase II regulates PI3K/Akt signaling and is lost in human basal-like breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(51): 22231-22236.

Ferrarese C, Cogliati T, Tortorella R, Zucca C, Bogliun G, Beghi E, Passoni D, Zoia C, Begni B, Airoidi L et al. (1998) Diazepam binding inhibitor (DBI) in the plasma of pediatric and adult epileptic patients. *Epilepsy Research* 29(2): 129-134.

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7(2): 85-97.

Fishburn J, Turner G, Daniel A, Brookwell R. (1983) The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohort of moderately retarded males with affected brothers. *American journal of medical genetics* 14(4): 713-724.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46(4): 470-472.

Floris C, Rasmussen S, Boccone L, Gasperini D, Cao A, Crisponi L. (2008) Two patients with balanced translocations and autistic disorder: CSMD3 as a candidate gene for autism found in their common 8q23 breakpoint area. *Eur J Hum Genet* 16(6): 696-704.

Follit JA, Tuft RA, Fogarty KE, Pazour GJ. (2006) The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Molecular biology of the cell* 17(9): 3781-3792.

Fölsch UR, Kochsiek K, R.F. S. (2000) *Pathophysiologie* Springer, Berlin [u.a.].

Fonseca AC, Bonaldi A, Costa SS, Freitas MR, Kok F, Vianna-Morgante AM. (2012) PLP1 duplication at the breakpoint regions of an apparently balanced t(X;22) translocation causes Pelizaeus-Merzbacher disease in a girl. *Clin Genet*.

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME et al. (2006) Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome research* 16(8): 949-961.

Freneau RT, Jr., Jensen RT, Charlton CG, Miller RL, O'Donohue TL, Moody TW. (1983) Secretin: specific binding to rat brain membranes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 3(8): 1620-1625.

Freneau RT, Jr., Korman LY, Moody TW. (1986) Secretin stimulates cyclic AMP formation in the rat brain. *J Neurochem* 46(6): 1947-1955.

- Frias JL, Nelson RM, Ray SL.** (1978) Deletion of the long arm of chromosome 4: a clinically identifiable syndrome? *Birth defects original article series* 14(6C): 355-358.
- Fujita H, Matsumoto H.** (1978) Ring chromosome 15; 46,XX,r(15) (p11q26) in a girl. *Journal of Human Genetics* 23(3): 233-237.
- García-Bermúdez M, López-Mejías R, Rodríguez-Rodríguez L, Fernández-Gutierrez B, García A, Raya E, Ortiz AM, Coenen MJH, van Riel PLCM, Radstake TRDJ et al.** (2011) No evidence of association of the KLF12 gene with rheumatoid arthritis in Spanish and Dutch cohorts and a meta-analysis of published data. *Human Immunology* 72(9): 779-782.
- Garcia-Heras J, Martin JA, Day DW, Scacheri P, Witchel SF.** (1997) "De novo" duplication Xq23-->Xq26 of paternal origin in a girl with a mildly affected phenotype. *American journal of medical genetics* 70(4): 404-408.
- Gecz J, Barnett S, Liu J, Hollway G, Donnelly A, Eyre H, Eshkevari HS, Baltazar R, Grunn A, Nagaraja R et al.** (1999) Characterization of the human glutamate receptor subunit 3 gene (GRIA3), a candidate for bipolar disorder and nonspecific X-linked mental retardation. *Genomics* 62(3): 356-368.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB.** (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260.
- Giedion A.** (1966) Das Tricho-rhino-phalangeale Syndrom. *Helvetica Paediatrica Acta* 21(5): 475-482.
- Gilfillan GD, Selmer KK, Roxrud I, Smith R, Kyllerman M, Eiklid K, Kroken M, Mattingsdal M, Egeland T, Stenmark H et al.** (2008) SLC9A6 mutations cause X-linked mental retardation, microcephaly, epilepsy, and ataxia, a phenotype mimicking Angelman syndrome. *American journal of human genetics* 82(4): 1003-1010.
- Giorda R, Bonaglia MC, Milani G, Baroncini A, Spada F, Beri S, Menozzi G, Rusconi M, Zuffardi O.** (2008) Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in a girl with microcephaly, mild dysmorphic features and t(X;5)(q22.1;q31.1). *Eur J Hum Genet* 16(8): 897-905.
- Glass I, Rauen K, Chen E, Parkes J, Alberston D, Pinkel D, Cotter P.** (2006) Ring chromosome 15: characterization by array CGH. *Human genetics* 118(5): 611-617.
- Greenstein RM, Reardon MP, Chan TS.** (1977) An X/autosome translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy: evidence for DMD gene localization. *Pediatr Res* 11(4): 457-457.
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S et al.** (2005) The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *Journal of medical genetics* 42(1): 8-16.
- Griffiths AJF.** (1999) Modern genetic analysis. Freeman, New York.
- Griswold AJ, Ma D, Cukier HN, Nations LD, Schmidt MA, Chung RH, Jaworski JM, Salyakina D, Konidari I, Whitehead PL et al.** (2012) Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. *Human molecular genetics*.
- Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallic S, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, Layet V, Rosier A, Briault S, Bonnet-Brilhault F et al.** (2009) Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Archives of general psychiatry* 66(9): 947-956.
- Gupta N, Goel H, Phadke SR.** (2006) Unbalanced X; autosome translocation. *Indian journal of pediatrics* 73(9): 840-842.
- Hall LL, Clemson CM, Byron M, Wydner K, Lawrence JB.** (2002) Unbalanced X;autosome translocations provide evidence for sequence specificity in the association of XIST RNA with chromatin. *Human molecular genetics* 11(25): 3157-3165.
- Hamers A, Jongbloet P, Peeters G, Fryns JP, Geraedts J.** (1990) Severe mental retardation in a patient with tricho-rhino-phalangeal syndrome type I and 8q deletion. *European Journal of Pediatrics* 149(9): 618-620.

- Hammer E, Kutsche K, Haag F, Ullrich K, Sudbrak R, Willig RP, Braulke T, Kubler B.** (2004) Monoallelic expression of the IGF-I receptor does not affect IGF responses in human fibroblasts. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 151(4): 521-529.
- Haniffa MA, Leech SN, Lynch SA, Simpson NB.** (2004) NBCCS secondary to an interstitial chromosome 9q deletion. *Clinical and Experimental Dermatology* 29(5): 542-544.
- Henson MA, Roberts AC, Salimi K, Vadlamudi S, Hamer RM, Gilmore JH, Jarskog LF, Philpot BD.** (2008) Developmental regulation of the NMDA receptor subunits, NR3A and NR1, in human prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18(11): 2560-2573.
- Herbst DS, Miller JR.** (1980) Nonspecific X-linked mental retardation II: the frequency in British Columbia. *American journal of medical genetics* 7(4): 461-469.
- Herzig KH, Schon I, Tatemoto K, Ohe Y, Li Y, Folsch UR, Owyang C.** (1996) Diazepam binding inhibitor is a potent cholecystokinin-releasing peptide in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(15): 7927-7932.
- Ho PK, Fong RS, Kai HS, Lau EH, Ngan ES, Cotton CU, Chow BK.** (1999) The human secretin receptor gene: genomic organization and promoter characterization. *FEBS Lett* 455(3): 209-214.
- Holaska JM, Rais-Bahrami S, Wilson KL.** (2006) Lmo7 is an emerin-binding protein that regulates the transcription of emerin and many other muscle-relevant genes. *Human molecular genetics* 15(23): 3459-3472.
- Horvath K, Stefanatos G, Sokolski KN, Wachtel R, Nabors L, Tildon JT.** (1998) Improved social and language skills after secretin administration in patients with autistic spectrum disorders. *Journal of the Association for Academic Minority Physicians : the official publication of the Association for Academic Minority Physicians* 9(1): 9-15.
- Hou J, Parrish J, Ludecke HJ, Sapru M, Wang Y, Chen W, Hill A, Siegel-Bartelt J, Northrup H, Elder FF et al.** (1995) A 4-megabase YAC contig that spans the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8q24.1: use in refining the location of the trichorhinophalangeal syndrome and multiple exostoses genes (TRPS1 and EXT1). *Genomics* 29(1): 87-97.
- Howard ML, Davidson EH.** (2004) cis-Regulatory control circuits in development. *Developmental Biology* 271(1): 109-118.
- Hu Q, Guo C, Li Y, Aronow BJ, Zhang J.** (2011) LMO7 mediates cell-specific activation of the Rho-myocardin-related transcription factor-serum response factor pathway and plays an important role in breast cancer cell migration. *Molecular and cellular biology* 31(16): 3223-3240.
- Hyon C, Marlin S, Chantot-Bastarud S, Mabboux P, Beaujard MP, Al Ageeli E, Vazquez MP, Picard A, Siffroi JP, Portnoi MF.** (2011) A new 17p13.3 microduplication including the PAFAH1B1 and YWHAE genes resulting from an unbalanced X;17 translocation. *European journal of medical genetics* 54(3): 287-291.
- Iafraite 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. *Nature genetics* 36(9): 949-951.
- Iguchi K, Yamamoto H, Ogata M, Mochizuki T, Hoshino M.** (2004) Expression of secretin nervous system in porcine and rat central. *J Health Sci* 50(6): 640-646.
- Imhof A, Schuierer M, Werner O, Moser M, Roth C, Bauer R, Buettner R.** (1999) Transcriptional regulation of the AP-2alpha promoter by BTEB-1 and AP-2rep, a novel wt-1/egr-related zinc finger repressor. *Molecular and cellular biology* 19(1): 194-204.
- Inagaki K, Tiulpakov A, Rubtsov P, Sverdlova P, Peterkova V, Yakar S, Terekhov S, LeRoith D.** (2007) A familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92(4): 1542-1548.
- Ishihama K, Turman JE, Jr.** (2006) NR3 protein expression in trigeminal neurons during postnatal development. *Brain research* 1095(1): 12-16.
- Ishihara T, Nakamura S, Kaziro Y, Takahashi T, Takahashi K, Nagata S.** (1991) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *The EMBO journal* 10(7): 1635-1641.

- Itoh N, Furuya T, Ozaki K, Ohta M, Kawasaki T.** (1991) The secretin precursor gene. Structure of the coding region and expression in the brain. *The Journal of biological chemistry* 266(19): 12595-12598.
- 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. *Journal of medical genetics* 29(2): 103-108.
- Jezela-Stanek A, Kucharczyk M, Pelc M, Chrzanowska KH, Krajewska-Walasek M.** (2012) Minimal clinical findings in a patient with 15qter microdeletion syndrome: delineation of the associated phenotype. *American journal of medical genetics Part A* 158A(4): 922-926.
- Jeziorska DM, Jordan KW, Vance KW.** (2009) A systems biology approach to understanding cis-regulatory module function. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20(7): 856-862.
- Jin HO, Lee KY, Chang TM, Chey WY, Dubois A.** (1994) Secretin: a physiological regulator of gastric emptying and acid output in dogs. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 267(4): G702-G708.
- Julià A, Ballina J, Cañete JD, Balsa A, Tornero-Molina J, Naranjo A, Alperi-López M, Erra A, Pascual-Salcedo D, Barceló P et al.** (2008) Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in the Spanish population: KLF12 as a risk locus for rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis & Rheumatism* 58(8): 2275-2286.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D.** (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258(5083): 818-821.
- Kawashima Y, Kanzaki S, Yang F, Kinoshita T, Hanaki K, Nagaishi J, Ohtsuka Y, Hisatome I, Ninomoya H, Nanba E et al.** (2005) Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90(8): 4679-4687.
- Kempen C.** (1975) A patient with congenital anomalies and a deletion of the long arm of the long arm of chromosome 4 [46,XY,del(4)(q31)]. *Journal of medical genetics* 12(2): 204-207.
- Kenzelmann Brož D.** (2008) Teneurins in development and disease. Dissertation. Universität Basel.
- Kiely M.** (1987) The prevalence of mental retardation. *Epidemiologic reviews* 9: 194-218.
- Kim B-T, Kitagawa H, Tamura J-i, Saito T, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Sugahara K.** (2001) Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(13): 7176-7181.
- Kisseleva MV, Cao L, Majerus PW.** (2002) Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits Akt/protein kinase B phosphorylation and leads to apoptotic cell death. *The Journal of biological chemistry* 277(8): 6266-6272.
- Kiyama Y, Manabe T, Sakimura K, Kawakami F, Mori H, Mishina M.** (1998) Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor epsilon1 subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(17): 6704-6712.
- Klaile E, Muller MM, Kannicht C, Otto W, Singer BB, Reutter W, Obrink B, Lucka L.** (2007) The cell adhesion receptor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 regulates nucleocytoplasmic trafficking of DNA polymerase delta-interacting protein 38. *The Journal of biological chemistry* 282(36): 26629-26640.
- Kleczkowska A, Fryns JP, van den Berghe H.** (1993) Duplication in the long arm of the X-chromosome associated with spastic paraparesis and premature menopause. *Genetic counseling* 4(3): 213-216.
- Kleibeuker JH, Beekhuis H, Piers DA, Schaffalitzky de Muckadell OB.** (1988) Retardation of gastric emptying of solid food by secretin. *Gastroenterology* 94(1): 122-126.
- Kleinjan DA, van Heyningen V.** (2005) Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *American journal of human genetics* 76(1): 8-32.

- Kleinjan DJ, van Heyningen V.** (1998) Position effect in human genetic disease. *Human molecular genetics* 7(10): 1611-1618.
- Kleyman SM, Parekh AJ, Rodriguez AR, Conte RA, Verma RS.** (1997) Paracentric inversion involving the long arm of chromosome 9 resulting in deletion of abl gene. *American journal of medical genetics* 68(4): 409-411.
- Knudsen J, Mandrup S, Rasmussen JT, Andreasen PH, Poulsen F, Kristiansen K.** (1993) The function of acyl-CoA-binding protein (ACBP)/diazepam binding inhibitor (DBI). *Molecular and cellular biochemistry* 123(1-2): 129-138.
- Köves K, Kausz M, Reser D, Horváth K.** (2002) What may be the anatomical basis that secretin can improve the mental functions in autism? *Regulatory Peptides* 109(1-3): 167-172.
- Kroes HY, Tuerlings JH, Hordijk R, Folkers NR, ten Kate LP.** (1994) Another patient with an interstitial deletion of chromosome 9: case report and a review of six cases with del(9)(q22q32). *Journal of medical genetics* 31(2): 156-158.
- Kruis T, Klammt J, Galli-Tsinopoulou A, Wallborn T, Schlicke M, Muller E, Kratzsch J, Korner A, Odeh R, Kiess W et al.** (2010) Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95(3): 1137-1142.
- Kuldeep CM, Khare AK, Garg A, Mittal A, Gupta L.** (2012) Terminal 4q deletion syndrome. *Indian journal of dermatology* 57(3): 222-224.
- Kulharya AS, Flannery DB, Norris K, Lovell C, Levy B, Velagaleti GVN.** (2008) Fine mapping of breakpoints in two unrelated patients with rare overlapping interstitial deletions of 9q with mild dysmorphic features. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A(17): 2234-2241.
- Kullmann DM.** (2002) Genetics of epilepsy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 73 Suppl 2: II32-35.
- Kumar A, Becker LA, Depinet TW, Haren JM, Kurtz CL, Robin NH, Cassidy SB, Wolff DJ, Schwartz S.** (1998) Molecular characterization and delineation of subtle deletions in de novo "balanced" chromosomal rearrangements. *Human genetics* 103(2): 173-178.
- Kurihara LJ, Semenova E, Levorse JM, Tilghman SM.** (2000) Expression and functional analysis of Uch-L3 during mouse development. *Molecular and cellular biology* 20(7): 2498-2504.
- Kutsuwada T, Sakimura K, Manabe T, Takayama C, Katakura N, Kushiya E, Natsume R, Watanabe M, Inoue Y, Yagi T et al.** (1996) Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron* 16(2): 333-344.
- Lan Q, Au W-Y, Chanock S, Tse J, Wong K-f, Shen M, Siu LP, Yuenger J, Yeager M, Hosgood Iii HD et al.** (2010) Genetic susceptibility for chronic lymphocytic leukemia among Chinese in Hong Kong. *European Journal of Haematology* 85(6): 492-495.
- Landrock D, Atshaves BP, McIntosh AL, Landrock KK, Schroeder F, Kier AB.** (2010) Acyl-CoA binding protein gene ablation induces pre-implantation embryonic lethality in mice. *Lipids* 45(7): 567-580.
- Langer LO, Krassikoff N, Laxova R, Scheer-Williams M, Lutter LD, Gorlin RJ, Jennings CG, Day DW.** (1984) The tricho-rhino-phalangeal syndrome with exostoses (or Langer-Giedion syndrome): Four additional patients without mental retardation and review of the literature. *American journal of medical genetics* 19(1): 81-112.
- Lapierre JM, Tachdjian G.** (2005) Detection of chromosomal abnormalities by comparative genomic hybridization. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 17(2): 171-177.
- Larance M, Ramm G, Stockli J, van Dam EM, Winata S, Wasinger V, Simpson F, Graham M, Junutula JR, Guilhaus M et al.** (2005) Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *The Journal of biological chemistry* 280(45): 37803-37813.
- Lau WL, Scholnick SB.** (2003) Identification of two new members of the CSMD gene family☆. *Genomics* 82(3): 412-415.

- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR.** (2007) Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nature genetics*.
- Lee JA, Lupski JR.** (2006) Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* 52(1): 103-121.
- LeRoith D.** (2000) Editorial: Insulin-like growth factor I receptor signalling - Overlapping or redundant pathways? *Endocrinology* 141(4): 1287-1288.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr.** (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16(2): 143-163.
- Levy SE, Souders MC, Wray J, Jawad AF, Gallagher PR, Coplan J, Belchic JK, Gerdes M, Mitchell R, Mulberg AE.** (2003) Children with autistic spectrum disorders. I: comparison of placebo and single dose of human synthetic secretin. *Archives of disease in childhood* 88(8): 731-736.
- Liehr T.** (2009) Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) - Application Guide. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Lindenbaum RH, Clarke G, Patel C, Moncrieff M, Hughes JT.** (1979) Muscular dystrophy in an X; 1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm. *Journal of medical genetics* 16(5): 389-392.
- Link CD, Taft A, Kapulkin V, Duke K, Kim S, Fei Q, Wood DE, Sahagan BG.** (2003) Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging* 24(3): 397-413.
- Lipson A, Collis J, Green C.** (1982) Partial deletion of the long arm of chromosome 4: a clinical syndrome. *Journal of medical genetics* 19(2): 155-157.
- Liu L, Rodriguez-Belmonte EM, Mazloum N, Xie B, Lee MY.** (2003) Identification of a novel protein, PDIP38, that interacts with the p50 subunit of DNA polymerase delta and proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of biological chemistry* 278(12): 10041-10047.
- Lombard Z, Park C, Makova KD, Ramsay M.** (2011) A computational approach to candidate gene prioritization for X-linked mental retardation using annotation-based binary filtering and motif-based linear discriminatory analysis. *Biology direct* 6: 30.
- Lübker B.** (2009) Molekularzytogenetische Eingrenzung der DNA-Bruchpunkte bei sechs Patienten mit chromosomalen Rearrangements. Bachelorarbeit. Universität Hamburg.
- Lüdecke H-J, J.Wagner M, Nardmann J, Pillo BL, E.Parrish J, J.Willems P, A.Haan E, Frydman M, J.H.Hamers G, E.Weils D et al.** (1995) Molecular dissection of a contiguous gene syndrome: localization of the genes involved in the Langer—Giedion syndrome. *Human molecular genetics* 4(1): 31-36.
- Lüdecke HJ, Johnson C, Wagner MJ, Wells DE, Turleau C, Tommerup N, Latos-Bielenska A, Sandig KR, Meinecke P, Zabel B et al.** (1991) Molecular definition of the shortest region of deletion overlap in the Langer-Giedion syndrome. *American journal of human genetics* 49(6): 1197-1206.
- Lüdecke HJ, Schaper J, Meinecke P, Momeni P, Gross S, von Holtum D, Hirche H, Abramowicz MJ, Albrecht B, Apacik C et al.** (2001) Genotypic and phenotypic spectrum in tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. *American journal of human genetics* 68(1): 81-91.
- Lüdecke HJ, Schmidt O, Nardmann J, von Holtum D, Meinecke P, Muenke M, Horsthemke B.** (1999) Genes and chromosomal breakpoints in the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8. *Human genetics* 105(6): 619-628.
- Lyon MF.** (1998) X-chromosome inactivation spreads itself: effects in autosomes. *American journal of human genetics* 63(1): 17-19.
- Ma CS, Deenick EK.** (2011) The role of SAP and SLAM family molecules in the humoral immune response. *Ann N Y Acad Sci* 1217: 32-44.
- Makarenkova H, Sugiura H, Yamagata K, Owens G.** (2005) Alternatively spliced variants of protocadherin 8 exhibit distinct patterns of expression during mouse development. *Biochimica et biophysica acta* 1681(2-3): 150-156.

- Malenka RC, Nicoll, A. R.** (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285(5435): 1870-1874.
- Malvestiti F, de Toffol S, Chinetti S, Grimi B, Favero G, Borsatti A, Maggi F, Simoni G, Romana Grati F.** (2010) Prenatal diagnosis of del(4)(q27q31.23), due to a maternal balanced complex chromosome rearrangement, characterized by array-CGH. *Prenatal diagnosis* 30(3): 280-283.
- Martin-Subero JI, Harder L, Gesk S, Schlegelberger B, Grote W, Martinez-Climent JA, Dyer MJ, Novo FJ, Calasanz MJ, Siebert R.** (2002) Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci. *International journal of cancer Journal international du cancer* 98(3): 470-474.
- Masuda S, Das R, Cheng H, Hurt E, Dorman N, Reed R.** (2005) Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes & development* 19(13): 1512-1517.
- Mattei MG, Mattei JF, Ayme S, Giraud F.** (1982) X-autosome translocations: cytogenetic characteristics and their consequences. *Human genetics* 61(4): 295-309.
- McGill JM, Basavappa S, Gettys TW, Fitz JG.** (1994) Secretin activates Cl⁻ channels in bile duct epithelial cells through a cAMP-dependent mechanism. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 266(4): G731-G736.
- Meng Y, Zhang Y, Jia Z.** (2003) Synaptic transmission and plasticity in the absence of AMPA glutamate receptor GluR2 and GluR3. *Neuron* 39(1): 163-176.
- Midro AT, Panasiuk B, Tümer Z, Stankiewicz P, Silahtaroglu A, Lupski JR, Zemanova Z, Stasiewicz-Jarocka B, Hubert E, Tarasów E et al.** (2004) Interstitial deletion 9q22.32-q33.2 associated with additional familial translocation t(9;17)(q34.11;p11.2) in a patient with Gorlin–Goltz syndrome and features of Nail-Patella syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 124A(2): 179-191.
- Migeon BR.** (1998) Non-random X chromosome inactivation in mammalian cells. *Cytogenetics and cell genetics* 80(1-4): 142-148.
- Mihailova A, Mikazane H, Klovinš J, Nikitina-Zake L.** (2011) Association of protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 (PTPN22) rs2476601 and Kruppel-like factor 12 (KLF12) rs1324913 single nucleotide polymorphisms with rheumatoid arthritis in a Latvian population. *Scandinavian journal of rheumatology* 40(6): 491-492.
- Miinea CP, Sano H, Kane S, Sano E, Fukuda M, Peranen J, Lane WS, Lienhard GE.** (2005) AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *The Biochemical journal* 391(Pt 1): 87-93.
- Mikami M, Yasuda T, Terao A, Nakamura M, Ueno S, Tanabe H, Tanaka T, Onuma T, Goto Y, Kaneko S et al.** (1999) Localization of a gene for benign adult familial myoclonic epilepsy to chromosome 8q23.3-q24.1. *American journal of human genetics* 65(3): 745-751.
- Minet AD, Chiquet-Ehrismann R.** (2000) Phylogenetic analysis of teneurin genes and comparison to the rearrangement hot spot elements of *E. coli*. *Gene* 257(1): 87-97.
- Minet AD, Rubin BP, Tucker RP, Baumgartner S, Chiquet-Ehrismann R.** (1999) Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene *ten-m*, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. *J Cell Sci* 112 (Pt 12): 2019-2032.
- Misceo D, Rodningen OK, Baroy T, Sorte H, Mellembakken JR, Stromme P, Fannemel M, Frengen E.** (2011) A translocation between Xq21.33 and 22q13.33 causes an intragenic SHANK3 deletion in a woman with Phelan-McDermid syndrome and hypergonadotropic hypogonadism. *American journal of medical genetics Part A* 155A(2): 403-408.
- Mitchell JA, Packman S, Loughman WD, Fineman RM, Zackai E, Patil SR, Emanuel B, Bartley JA, Hanson JW, Opitz JM.** (1981) Deletions of different segments of the long arm of chromosome 4. *American journal of medical genetics* 8(1): 73-89.
- Mocchetti I, Santi MR.** (1991) Diazepam binding inhibitor peptide: cloning and gene expression. *Neuropharmacology* 30(12B): 1365-1371.

- Momeni P, Glockner G, Schmidt O, von Holtum D, Albrecht B, Gillissen-Kaesbach G, Hennekam R, Meinecke P, Zabel B, Rosenthal A et al.** (2000) Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Nature genetics* 24(1): 71-74.
- Monaghan KG, van Dyke DL, Feldman GL.** (1998) Prader-Willi-like syndrome in a patient with an Xq23q25 duplication. *American journal of medical genetics* 80(3): 227-231.
- Moore CM, Best RG.** (2001) Chromosomal genetic disease: structural aberrations. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Morichon-Delvallez N, Couturier J, Bourdrel V.** (1988) Inherited Xq duplication due to a zygotic translocation t(X;X)(q23;q27). *Annales de genétique* 31(2): 117-119.
- Moser HW.** (1995) A role for gene therapy in mental retardation. *Ment Retard Dev D R* 1(1): 4-6.
- Moser HW.** (2004) Genetic causes of mental retardation. *Ann Ny Acad Sci* 1038: 44-48.
- Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E.** (2006) *Taschenlehrbuch Humangenetik*. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Murphy CC, Yeargin-Aillsopp M, Decoufle P, Drews CD.** (1995) The administrative prevalence of mental retardation in 10-year-old children in metropolitan Atlanta, 1985 through 1987. *Am J Public Health* 85(3): 319-323.
- Mutt V, Carlquist M, Tatemoto K.** (1979) Secretin-like bioactivity in extracts of porcine brain. *Life sciences* 25(20): 1703-1707.
- Nagai T, Shimokawa O, Harada N, Sakazume S, Ohashi H, Matsumoto N, Obata K, Yoshino A, Murakami N, Murai T et al.** (2002) Postnatal overgrowth by 15q-trisomy and intrauterine growth retardation by 15q-monosomy due to familial translocation t(13;15): Dosage effect of IGF1R? *American journal of medical genetics* 113(2): 173-177.
- Nakamura E, Makita Y, Okamoto T, Nagaya K, Hayashi T, Sugimoto M, Manabe H, Taketazu G, Kajino H, Fujieda K.** (2011) 5.78 Mb terminal deletion of chromosome 15q in a girl, evaluation of NR2F2 as candidate gene for congenital heart defects. *European journal of medical genetics* 54(3): 354-356.
- Nakamura Y, Migita T, Hosoda F, Okada N, Gotoh M, Arai Y, Fukushima M, Ohki M, Miyata S, Takeuchi K et al.** (2009) Krüppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. *International Journal of Cancer* 125(8): 1859-1867.
- Nardmann J, Tranebjærg L, Horsthemke B, Lüdecke HJ.** (1997) The tricho-rhino-phalangeal syndromes: frequency and parental origin of 8q deletions. *Human genetics* 99(5): 638-643.
- Naumova AK, Olien L, Bird LM, Smith M, Verner AE, Leppert M, Morgan K, Sapienza C.** (1998) Genetic mapping of X-linked loci involved in skewing of X chromosome inactivation in the human. *Eur J Hum Genet* 6(6): 552-562.
- Nishijima I, Yamagata T, Spencer CM, Weeber EJ, Alekseyenko O, Sweatt JD, Momoi MY, Ito M, Armstrong DL, Nelson DL et al.** (2006) Secretin receptor-deficient mice exhibit impaired synaptic plasticity and social behavior. *Human molecular genetics* 15(21): 3241-3250.
- Norris FA, Atkins RC, Majerus PW.** (1997) The cDNA cloning and characterization of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II. Evidence for conserved alternative splicing in the 4-phosphatase family. *The Journal of biological chemistry* 272(38): 23859-23864.
- Norris FA, Auethavekiat V, Majerus PW.** (1995) The isolation and characterization of cDNA encoding human and rat brain inositol polyphosphate 4-phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 270(27): 16128-16133.
- Nystuen A, Legare ME, Shultz LD, Frankel WN.** (2001) A null mutation in inositol polyphosphate 4-phosphatase type I causes selective neuronal loss in weeble mutant mice. *Neuron* 32(2): 203-212.
- O'Donohue TL, Charlton CG, Miller RL, Boden G, Jacobowitz DM.** (1981) Identification, characterization, and distribution of secretin immunoreactivity in rat and pig brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(8): 5221-5224.

- Oeschger FM, Wang WZ, Lee S, Garcia-Moreno F, Goffinet AM, Arbones ML, Rakic S, Molnar Z.** (2012) Gene expression analysis of the embryonic subplate. *Cereb Cortex* 22(6): 1343-1359.
- Ohta M, Funakoshi S, Kawasaki T, Itoh N.** (1992) Tissue-specific expression of the rat secretin precursor gene. *Biochemical and biophysical research communications* 183(2): 390-395.
- Okubo Y, Siddle K, Firth H, O'Rahilly S, Wilson LC, Willatt L, Fukushima T, Takahashi S, Petry CJ, Saukkonen T et al.** (2003) Cell proliferation activities on skin fibroblasts from a short child with absence of one copy of the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) gene and a tall child with three copies of the IGF1R gene. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88(12): 5981-5988.
- Olivieri C, Maraschio P, Caselli D, Martini C, Beluffi G, Maserati E, Danesino C.** (2003) Interstitial deletion of chromosome 9, int del(9)(9q22.31-q31.2), including the genes causing multiple basal cell nevus syndrome and Robinow/brachydactyly 1 syndrome. *European Journal of Pediatrics* 162(2): 100-103.
- Osoegawa K, Mammoser AG, Wu C, Frengen E, Zeng C, Catanese JJ, de Jong PJ.** (2001) A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome research* 11(3): 483-496.
- Ottman R.** (1997) Genetic epidemiology of epilepsy. *Epidemiologic reviews* 19(1): 120-128.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K.** (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54(5): 581-618.
- Pachlopnik Schmid J, Canioni D, Moshous D, Touzot F, Mahlaoui N, Hauck F, Kanegane H, Lopez-Granados E, Mejstrikova E, Pellier I et al.** (2011) Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood* 117(5): 1522-1529.
- Page DC, Fisher EMC, McGillivray B, Brown LG.** (1990) Additional deletion in sex-determining region of human Y chromosome resolves paradox of X,t(Y;22) female. *Nature* 346(6281): 279-281.
- Pallanti S, Lassi S, La Malfa G, Campigli M, Di Rubbo R, Paolini G, Cesarali V.** (2005) Short report: Autistic gastrointestinal and eating symptoms treated with secretin: a subtype of autism. *Clinical practice and epidemiology in mental health : CP & EMH* 1: 24.
- Paoloni-Giacobino A, Floris E, Dahoun SP.** (2000) Fetus with a 9q22q34 interstitial deletion and hygroma. *Prenatal diagnosis* 20(10): 855-856.
- Patel DR, Kong Y, Sreedharan SP.** (1995) Molecular cloning and expression of a human secretin receptor. *Molecular pharmacology* 47(3): 467-473.
- Pekarsky Y, Hallas C, Isobe M, Russo G, Croce CM.** (1999) Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(6): 2949-2951.
- Peoples R, Milatovich A, Francke U.** (1995) Hemizygoty at the insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) locus and growth failure in the ring chromosome 15 syndrome. *Cytogenetics and cell genetics* 70(3-4): 228-234.
- Perez-Otano I, Ehlers MD.** (2004) Learning from NMDA receptor trafficking: Clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. *Neurosignals* 13(4): 175-189.
- Perez-Otano I, Lujan R, Tavalin SJ, Plomann M, Modregger J, Liu XB, Jones EG, Heinemann SF, Lo DC, Ehlers MD.** (2006) Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nature neuroscience* 9(5): 611-621.
- Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF.** (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(4): 1228-1237.
- Petersen H, Solomon T, Grossman MI.** (1978) Effect of chronic pentagastrin, cholecystokinin, and secretin on pancreas of rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 234(3): E286-293.

- Pfäfflin M, May T.** (2000) Wieviele Patienten mit Epilepsien gibt es in Deutschland und wer behandelt sie? *Neurologie & Rehabilitation* 6(2): 77.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW.** (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(9): 2934-2938.
- Pinson L, Perrin A, Plouzennec C, Parent P, Metz C, Collet M, Le Bris MJ, Douet-Guilbert N, Morel F, de Braekeleer M.** (2005) Detection of an unexpected subtelomeric 15q26.2 → qter deletion in a little girl: Clinical and cytogenetic studies. *American Journal of Medical Genetics Part A* 138A(2): 160-165.
- Poot M, Eleveld MJ, van 't Slot R, van Genderen MM, Verrijn Stuart AA, Hochstenbach R, Beemer FA.** (2007) Proportional growth failure and oculocutaneous albinism in a girl with a 6.87 Mb deletion of region 15q26.2→qter. *European journal of medical genetics* 50(6): 432-440.
- Pschyrembel W, Witzel S.** (2011) *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2012*. de Gruyter, Berlin [u.a.].
- Ratliff-Schaub K, Carey T, Reeves GD, Rogers MA.** (2005) Randomized controlled trial of transdermal secretin on behavior of children with autism. *Autism : the international journal of research and practice* 9(3): 256-265.
- Raymond FL.** (2010) Monogenic causes of mental retardation. *Monographs in Human Genetics* 18: 89-100.
- Renault NK, Dyack S, Dobson MJ, Costa T, Lam WL, Greer WL.** (2007) Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females. *Eur J Hum Genet* 15(6): 628-637.
- Renault NK, Renault MP, Copeland E, Howell RE, Greer WL.** (2011) Familial skewed X-chromosome inactivation linked to a component of the cohesin complex, SA2. *J Hum Genet* 56(5): 390-397.
- Reutlinger C, Helbig I, Gawelczyk B, Subero JIM, Tönnies H, Muhle H, Finsterwalder K, Vermeer S, Pfundt R, Sperner J et al.** (2010) Deletions in 16p13 including GRIN2A in patients with intellectual disability, various dysmorphic features, and seizure disorders of the rolandic region. *Epilepsia* 51(9): 1870-1873.
- Ricks CB, Masand R, Fang P, Roney EK, Cheung SW, Scott DA.** (2010) Delineation of a 1.65 Mb critical region for hemihyperplasia and digital anomalies on Xq25. *American journal of medical genetics Part A* 152A(2): 453-458.
- Riedl S, Giedion A, Schweitzer K, Müllner-Eidenböck A, Grill F, Frisch H, Lüdecke HJ.** (2004) Pronounced short stature in a girl with tricho-rhino-phalangeal syndrome II (TRPS II, Langer-Giedion syndrome) and growth hormone deficiency. *American Journal of Medical Genetics Part A* 131A(2): 200-203.
- Rigaud S, Fondaneche M-C, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P, Galicier L, Le Deist F, Rieux-Laucat F, Revy P et al.** (2006) XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 444(7115): 110-114.
- Roback EW, Barakat AJ, Dev VG, Mbikay M, Chretien M, Butler MG.** (1991) An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1----qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene. *American journal of medical genetics* 38(1): 74-79.
- Robb LJ, Vekemans M, Richter A, Meaghervilleure K, Neilsen K, Derkaloustian VM.** (1991) Interstitial deletion of the long arm of chromosome 9. *American journal of human genetics* 49(4): 274-274.
- Roberts AC, Diez-Garcia J, Rodriguiz RM, Lopez IP, Lujan R, Martinez-Turrillas R, Pico E, Henson MA, Bernardo DR, Jarrett TM et al.** (2009) Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation. *Neuron* 63(3): 342-356.
- Robertson SP, O'Day K, Bankier A.** (1998) The 4q-syndrome: delineation of the minimal critical region to within band 4q31. *Clinical Genetics* 53(1): 70-73.
- Robinson PN, Krawitz P, Mundlos S.** (2011) Strategies for exome and genome sequence data analysis in disease-gene discovery projects. *Clinical Genetics* 80(2): 127-132.
- Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreels F.** (1997) The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Developmental medicine and child neurology* 39(2): 125-132.

- Ropers HH.** (2007) New perspectives for the elucidation of genetic disorders. *American journal of human genetics* 81(2): 199-207.
- Ropers HH, Hoeltzenbein M, Kalscheuer V, Yntema H, Hamel B, Fryns JP, Chelly J, Partington M, Gez J, Moraine C.** (2003) Nonsyndromic X-linked mental retardation: where are the missing mutations? *Trends in genetics : TIG* 19(6): 316-320.
- Rosenberg C, Blakemore KJ, Kearns WG, Giraldez RA, Escallon CS, Pearson PL, Stetten G.** (1992) Analysis of reciprocal translocations by chromosome painting: applications and limitations of the technique. *American journal of human genetics* 50(4): 700-705.
- Rossi MR, DiMaio MS, Xiang B, Lu K, Kaymakalan H, Seashore M, Mahoney MJ, Li P.** (2009) Clinical and genomic characterization of distal duplications and deletions of chromosome 4q: study of two cases and review of the literature. *American journal of medical genetics Part A* 149A(12): 2788-2794.
- Rudaks LI, Nicholl JK, Bratkovic D, Barnett CP.** (2011) Short stature due to 15q26 microdeletion involving IGF1R: Report of an additional case and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics Part A* 155(12): 3139-3143.
- Rujirabanjerd S, Suwannarat W, Sripo T, Dissaneevate P, Permsirivanich W, Limprasert P.** (2007) De novo subtelomeric deletion of 15q associated with satellite translocation in a child with developmental delay and severe growth retardation. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143A(3): 271-276.
- Sachs AJ, David SA, Haider NB, Nystuen AM.** (2009) Patterned neuroprotection in the Inpp4a(wbl) mutant mouse cerebellum correlates with the expression of Eaat4. *PLoS One* 4(12): e8270.
- Saitou M, Sugimoto J, Hatakeyama T, Russo G, Isobe M.** (2000) Identification of the TCL6 genes within the breakpoint cluster region on chromosome 14q32 in T-cell leukemia. *Oncogene* 19(23): 2796-2802.
- Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H et al.** (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor [epsilon]1 subunit. *Nature* 373(6510): 151-155.
- Sandler AD, Sutton KA, DeWeese J, Girardi MA, Sheppard V, Bodfish JW.** (1999) Lack of benefit of a single dose of synthetic human secretin in the treatment of autism and pervasive developmental disorder. *New England Journal of Medicine* 341(24): 1801-1806.
- Sanlaville D, Lapierre JM, Turleau C, Coquin A, Borck G, Colleaux L, Vekemans M, Romana SP.** (2005) Molecular karyotyping in human constitutional cytogenetics. *European journal of medical genetics* 48(3): 214-231.
- Sanlaville D, Schluth-Bolard C, Turleau C.** (2009) Distal Xq duplication and functional Xq disomy. *Orphanet journal of rare diseases* 4: 4.
- Sarda P, Lefort G, Fryns JP, Humeau C, Rieu D.** (1992) Interstitial deletion of the distal long arm of chromosome 4. *Journal of medical genetics* 29(4): 259-261.
- Sasaki J, Kofuji S, Itoh R, Momiyama T, Takayama K, Murakami H, Chida S, Tsuya Y, Takasuga S, Eguchi S et al.** (2010) The PtdIns(3,4)P2 phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature* 465(7297): 497-501.
- Sasaki T, Tonoki H, Soejima H, Niikawa N.** (1997) A 4 Mb cryptic deletion associated with inv(8)(q13.1q24.11) in a patient with trichorhinophalangeal syndrome type I. *Journal of medical genetics* 34(4): 335-339.
- Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D et al.** (2002) Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *Journal of neurophysiology* 87(4): 2052-2063.
- Saß H, American Psychiatric Association.** (2003) *Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen : Textrevision ; DSM-IV-TR ; übersetzt nach der Textrevision der 4. Auflage des Diagnostic and statistical manual of mental disorders der American Psychiatric Association.* Hogrefe, Göttingen [u.a.].
- Savaskan NE, Bräuer AU, Nitsch R.** (2004) Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the plasticity-related gene family. *European Journal of Neuroscience* 19(1): 212-220.

- Scherer SW, Lee C, Birney E, Altshuler DM, Eichler EE, Carter NP, Hurles ME, Feuk L.** (2007) Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nature genetics*.
- Schlembach D, Zenker M, Trautmann U, Ulmer R, Beinder E.** (2001) Deletion 15q24-26 in prenatally detected diaphragmatic hernia: increasing evidence of a candidate region for diaphragmatic development. *Prenatal diagnosis* 21(4): 289-292.
- Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset J-M, Sukno S, Labalme A, Duban-Bedu B, Plessis G, Jaillard S et al.** (2009) Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: Array CGH study of 47 unrelated cases. *European journal of medical genetics* 52(5): 291-296.
- Schmidt M, Du Sart D.** (1992) Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. *American journal of medical genetics* 42(2): 161-169.
- Schrider DR, Hahn MW.** (2010) Gene copy-number polymorphism in nature. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 277(1698): 3213-3221.
- Seabright M.** (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2(7731): 971-972.
- Semenova E, Wang X, Jablonski MM, Levorse J, Tilghman SM.** (2003) An engineered 800 kilobase deletion of Uchl3 and Lmo7 on mouse chromosome 14 causes defects in viability, postnatal growth and degeneration of muscle and retina. *Human molecular genetics* 12(11): 1301-1312.
- Serville F, Broustet A.** (1977) Pericentric inversion and partial monosomy 4q associated with congenital anomalies. *Human genetics* 39(2): 239-242.
- Shaffer DR, Kipp K.** (2007) *Developmental psychology: childhood and adolescence*. Thomson Wadsworth, Belmont, Calif.
- Shaffer LG.** (2005) American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 7(9): 650-654.
- Shaffer LG, Bejjani BA.** (2006) Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenetic and genome research* 115(3-4): 303-309.
- Shaffer LG, Lupski JR.** (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 34: 297-329.
- Sharp AJ, Spotswood HT, Robinson DO, Turner BM, Jacobs PA.** (2002) Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X;autosome translocations. *Human molecular genetics* 11(25): 3145-3156.
- Shimizu A, Asakawa S, Sasaki T, Yamazaki S, Yamagata H, Kudoh J, Minoshima S, Kondo I, Shimizu N.** (2003) A novel giant gene CSMD3 encoding a protein with CUB and sushi multiple domains: a candidate gene for benign adult familial myoclonic epilepsy on human chromosome 8q23.3-q24.1. *Biochemical and biophysical research communications* 309(1): 143-154.
- Shimkets R, Gailani MR, Siu VM, Yang-Feng T, Pressman CL, Levanat S, Goldstein A, Dean M, Bale AE.** (1996) Molecular analysis of chromosome 9q deletions in two Gorlin syndrome patients. *American journal of human genetics* 59(2): 417-422.
- Shroff M, Israel J, Rosenthal F.** (1981) Congenital anomalies associated with partial deletion of the long arms of chromosome-4 (46,XY,del(4)(q31). *American journal of human genetics* 33(6): A122-A122.
- Shulga N, Pastorino JG.** (2006) Acyl coenzyme A-binding protein augments bid-induced mitochondrial damage and cell death by activating mu-calpain. *The Journal of biological chemistry* 281(41): 30824-30833.
- Siebler T, Lopaczynski W, Terry CL, Casella SJ, Munson P, de Leon DD, Phang L, Blakemore KJ, McEvoy RC, Kelley RI.** (1995) Insulin-like growth factor I receptor expression and function in fibroblasts from two patients with deletion of the distal long arm of chromosome 15. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 80(12): 3447-3457.

- Siiskonen H, Oikari S, Korhonen V-P, Pitkänen A, Voikar V, Kettunen M, Hakumäki J, Wahlfors T, Pussinen R, Penttonen M et al.** (2007) Diazepam binding inhibitor overexpression in mice causes hydrocephalus, decreases plasticity in excitatory synapses and impairs hippocampus-dependent learning. *Molecular and Cellular Neuroscience* 34(2): 199-208.
- Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, Papadopoulou E, Kanavakis E, Kosmaidou-Aravidou Z, Patsalis P.** (2008) Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. *Molecular Cytogenetics* 1(1): 15.
- Slager SL, Goldin LR, Strom SS, Lanasa MC, Spector LG, Rassenti L, Leis JF, Camp NJ, Kay NE, Vachon CM et al.** (2010) Genetic susceptibility variants for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19(4): 1098-1102.
- Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, Vachon CM, Goldin LR, Strom SS, Lanasa MC, Spector LG, Rassenti LZ, Leis JF et al.** (2011) Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood* 117(6): 1911-1916.
- Smeets DF.** (2004) Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clinical biochemistry* 37(6): 439-446.
- Smith HO, Birnstiel ML.** (1976) A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic acids research* 3(9): 2387-2398.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P.** (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, chromosomes & cancer* 20(4): 399-407.
- Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahloun AG, Harris BT, Toretsky JA, Rosenberg SA, Shukla N, Ladanyi M et al.** (2011) Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science* 333(6045): 1039-1043.
- Solomon TE, Petersen H, Elashoff J, Grossman MI.** (1978) Interaction of caerulein and secretin on pancreatic size and composition in rat. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 235(6): E714-719.
- Strachan T, Read AP.** (2011) *Human molecular genetics*. Garland Science, New York, NY [u.a.].
- Strasser K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodriguez-Navarro S, Rondon AG, Aguilera A, Struhl K, Reed R et al.** (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417(6886): 304-308.
- Strehle EM, Ahmed OA, Hameed M, Russell A.** (2001) The 4q-Syndrome. *Genetic counseling* 12(4): 327-339.
- Strehle EM, Bantock HM.** (2003) The phenotype of patients with 4q-syndrome. *Genetic counseling* 14(2): 195-205.
- Strehle EM, Middlemiss PM.** (2007) Children with 4q-syndrome: the parents' perspective. *Genetic counseling* 18(2): 189-199.
- Strijbos PJ, Leach MJ, Garthwaite J.** (1996) Vicious cycle involving Na⁺ channels, glutamate release, and NMDA receptors mediates delayed neurodegeneration through nitric oxide formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16(16): 5004-5013.
- Stromme P, Hagberg G.** (2000) Aetiology in severe and mild mental retardation: a population-based study of Norwegian children. *Developmental medicine and child neurology* 42(2): 76-86.
- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA.** (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15(10): 6509-6520.
- Sugimoto J, Hatakeyama T, Narducci MG, Russo G, Isobe M.** (1999) Identification of the TCL1/MTCP1-like 1 (TML1) gene from the region next to the TCL1 locus. *Cancer research* 59(10): 2313-2317.

- Sugiura H, Tanaka H, Yasuda S, Takemiya T, Yamagata K.** (2009) Transducing neuronal activity into dendritic spine morphology: new roles for p38 MAP kinase and N-cadherin. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 15(1): 90-104.
- Sumara I, Vorlaufer E, Gieffers C, Peters BH, Peters JM.** (2000) Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *The Journal of cell biology* 151(4): 749-762.
- Sun L, Margolis FL, Shipley MT, Lidow MS.** (1998) Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS Letters* 441(3): 392-396.
- Szymanski L, King BH.** (1999) Summary of the Practice Parameters for the Assessment and Treatment of Children, Adolescents, and Adults with Mental Retardation and Comorbid Mental Disorders. American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 38(12): 1606-1610.
- Tachdjian G, Aboura A, Benkhalifa M, Creveaux I, Foix-Helias L, Gadisseux JF, Boespflug-Tanguy O, Mohammed M, Labrune P.** (2004) De novo interstitial direct duplication of Xq21.1q25 associated with skewed X-inactivation pattern. *American journal of medical genetics Part A* 131(3): 273-280.
- Tai CY, Mysore SP, Chiu C, Schuman EM.** (2007) Activity-regulated N-cadherin endocytosis. *Neuron* 54(5): 771-785.
- Takarada T, Takahata Y, Iemata M, Hinoi E, Uno K, Hirai T, Yamamoto T, Yoneda Y.** (2009) Interference with cellular differentiation by D-serine through antagonism at N-methyl-D-aspartate receptors composed of NR1 and NR3A subunits in chondrocytes. *Journal of Cellular Physiology* 220(3): 756-764.
- Tamura T, Tohma T, Ohta T, Soejima H, Harada N, Abe K, Niikawa N.** (1993) Ring chromosome 15 involving deletion of the insulin-like growth factor 1 receptor gene in a patient with features of Silver-Russell syndrome. *Clinical dysmorphology* 2(2): 106-113.
- Thuresson AC, Bondeson ML, Edeby C, Ellis P, Langford C, Dumanski JP, Anneren G.** (2007) Whole-genome array-CGH for detection of submicroscopic chromosomal imbalances in children with mental retardation. *Cytogenetic and genome research* 118(1): 1-7.
- Tihy F, Lemyre E, Lemieux N, Dallaire L.** (1999) De novo dup(X)(q22.1q25) in a girl with an abnormal phenotype. *American journal of medical genetics* 87(4): 302-305.
- Tommerup N.** (1993) Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. *Journal of medical genetics* 30(9): 713-727.
- Tong G, Takahashi H, Tu S, Shin Y, Talantova M, Zago W, Xia P, Nie Z, Goetz T, Zhang D et al.** (2008) Modulation of NMDA receptor properties and synaptic transmission by the NR3A subunit in mouse hippocampal and cerebrocortical neurons. *Journal of neurophysiology* 99(1): 122-132.
- Tönnies H, Schulze I, Hennies H-C, Neumann LM, Keitzer R, Neitzel H.** (2001) De novo terminal deletion of chromosome 15q26.1 characterised by comparative genomic hybridisation and FISH with locus specific probes. *Journal of medical genetics* 38(9): 617-621.
- Townes PL, White M, Di Marzo SV.** (1979) 4q- Syndrome. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 133(4): 383-385.
- Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R.** (2006) Teneurins: a conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. *Dev Biol* 290(2): 237-245.
- Tucker RP, Kenzelmann D, Trzebiatowska A, Chiquet-Ehrismann R.** (2007) Teneurins: transmembrane proteins with fundamental roles in development. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(2): 292-297.
- Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Muller-Navia J, Cremer T, Murken J et al.** (1999) Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *American journal of human genetics* 65(2): 448-462.
- Ulbrich MH, Isacoff EY.** (2008) Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(37): 14163-14168.

- Unterseher F, Hefele JA, Giehl K, de Robertis EM, Wedlich D, Schambony A.** (2004) Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *The EMBO journal* 23(16): 3259-3269.
- Urbankova H, Baens M, Michaux L, Tousseyn T, Rack K, Katrincsakova B, Ferreira JF, van Loo P, de Kelver W, Dierickx D et al.** (2012) Recurrent breakpoints in the 14q32.13/TCL1A region in mature B-cell neoplasms with villous lymphocytes. *Leukemia & lymphoma*.
- Vadlamudi L, Andermann E, Lombroso CT, Schachter SC, Milne RL, Hopper JL, Andermann F, Berkovic SF.** (2004) Epilepsy in twins - Insights from unique historical data of William Lennox. *Neurology* 62(7): 1127-1133.
- van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, van Steirteghem A, Liebaers I.** (1996) Cytogenetics of infertile men. *Human Reproduction* 11(suppl 4): 1-26.
- van Bokhoven H.** (2011) Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet* 45: 81-104.
- van Bon BWM, Koolen DA, Pfundt R, van der Burgt I, de Leeuw N, de Vries BBA.** (2008) Transposition of the great vessels in a patient with a 2.9 Mb interstitial deletion of 9q31.1 encompassing the inversin gene: Clinical report and review. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A(9): 1225-1229.
- van Dyke DL, Miller MJ, Weiss L.** (1983) The origin of inverted tandem duplications, and phenotypic effects of tandem duplication of the X chromosome long arm. *American journal of medical genetics* 15(3): 441-450.
- Vandeweyer G, Kooy RF.** (2009) Balanced translocations in mental retardation. *Human genetics* 126(1): 133-147.
- Varella-Garcia M, Tajara EH, Gagliardi AR.** (1981) Structural aberration of the X chromosome in a patient with gonadal dysgenesis: an approach to karyotype-phenotype correlation. *Journal of medical genetics* 18(3): 228-231.
- Veenma DCM, Eussen HJ, Govaerts LCP, de Kort SWK, Odink RJ, Wouters CH, Hokken-Koelega ACS, de Klein A.** (2010) Phenotype-genotype correlation in a familial IGF1R microdeletion case. *Journal of medical genetics* 47(7): 492-498.
- Vezzani A, Serafini R, Stasi MA, Samanin R, Ferrarese C.** (1991) Epileptogenic activity of two peptides derived from diazepam binding inhibitor after intrahippocampal injection in rats. *Epilepsia* 32(5): 597-603.
- Volpi EV, Bridger JM.** (2008) FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques* 45(4): 385-386, 388, 390 passim.
- von Spiczak S, Caliebe A, Muhle H, Helbig I, Stephani U.** (2011) Genetische Ursachen epileptischer Enzephalopathien. *Zeitschrift für Epileptologie* 24(2): 108-113.
- Walenkamp MJ, de Muinck Keizer-Schrama SM, de Mos M, Kalf ME, van Duyvenvoorde HA, Boot AM, Kant SG, White SJ, Losekoot M, Den Dunnen JT et al.** (2008) Successful long-term growth hormone therapy in a girl with haploinsufficiency of the insulin-like growth factor-I receptor due to a terminal 15q26.2-->qter deletion detected by multiplex ligation probe amplification. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93(6): 2421-2425.
- Walenkamp MJ, van der Kamp HJ, Pereira AM, Kant SG, van Duyvenvoorde HA, Kruithof MF, Breuning MH, Romijn JA, Karperien M, Wit JM.** (2006) A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91(8): 3062-3070.
- Wallborn T, Wuller S, Klammt J, Kruis T, Kratzsch J, Schmidt G, Schlicke M, Muller E, van de Leur HS, Kiess W et al.** (2010) A heterozygous mutation of the insulin-like growth factor-I receptor causes retention of the nascent protein in the endoplasmic reticulum and results in intrauterine and postnatal growth retardation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95(5): 2316-2324.
- Wang W-Z, Molnár Z.** (2005) Dynamic pattern of mRNA expression of plasticity-related gene-3 (PRG-3) in the mouse cerebral cortex during development. *Brain Research Bulletin* 66(4-6): 454-460.

- Warburton D.** (1991) De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *American journal of human genetics* 49(5): 995-1013.
- White WM, Willard HF, van Dyke DL, Wolff DJ.** (1998) The spreading of X inactivation into autosomal material of an x;autosome translocation: evidence for a difference between autosomal and X-chromosomal DNA. *American journal of human genetics* 63(1): 20-28.
- Wilcox CB, Feddes GO, Willett-Brozick JE, Hsu LC, de Loia JA, Baysal BE.** (2007) Coordinate up-regulation of TMEM97 and cholesterol biosynthesis genes in normal ovarian surface epithelial cells treated with progesterone: implications for pathogenesis of ovarian cancer. *BMC cancer* 7: 223.
- Winnepenninckx B, Rooms L, Kooy RF.** (2003) Mental retardation: A review of the genetic causes. *Brit J Dev Disabil* 49(96): 29-44.
- Wirth J, Nothwang HG, van der Maarel S, Menzel C, Borck G, Lopez-Pajares I, Brondum-Nielsen K, Tommerup N, Bugge M, Ropers HH et al.** (1999) Systematic characterisation of disease associated balanced chromosome rearrangements by FISH: cytogenetically and genetically anchored YACs identify microdeletions and candidate regions for mental retardation genes. *Journal of medical genetics* 36(4): 271-278.
- Wolf FW, Marks RM, Sarma V, Byers MG, Katz RW, Shows TB, Dixit VM.** (1992) Characterization of a novel tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial primary response gene. *Journal of Biological Chemistry* 267(2): 1317-1326.
- Wong H-K, Liu X-B, Matos MF, Chan SF, Pérez-Otaño I, Boysen M, Cui J, Nakanishi N, Trimmer JS, Jones EG et al.** (2002) Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *The Journal of Comparative Neurology* 450(4): 303-317.
- Wood MA, Kaplan MP, Brensinger CM, Guo W, Abel T.** (2005) Ubiquitin C-terminal hydrolase L3 (Uchl3) is involved in working memory. *Hippocampus* 15(5): 610-621.
- Woodward K, Kirtland K, Dlouhy S, Raskind W, Bird T, Malcolm S, Abeliovich D.** (2000) X inactivation phenotype in carriers of Pelizaeus-Merzbacher disease: skewed in carriers of a duplication and random in carriers of point mutations. *Eur J Hum Genet* 8(6): 449-454.
- World Health Organization.** (1985) *Mental retardation: meeting the challenge*, Geneva.
- World Health Organization, ebrary Inc.** (2001) *The world health report 2001 - mental health: new understanding, new hope*. World Health Organization, Geneva.
- Worsham MJ, Miller DA, Devries JM, Mitchell AR, Babu VR, Surli V, Weiss L, van Dyke DL.** (1989) A dicentric recombinant 9 derived from a paracentric inversion: phenotype, cytogenetics, and molecular analysis of centromeres. *American journal of human genetics* 44(1): 115-123.
- Wu Y, Arai AC, Rumbaugh G, Srivastava AK, Turner G, Hayashi T, Suzuki E, Jiang Y, Zhang L, Rodriguez J et al.** (2007) Mutations in ionotropic AMPA receptor 3 alter channel properties and are associated with moderate cognitive impairment in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(46): 18163-18168.
- Xie B, Li H, Wang Q, Xie S, Rahmeh A, Dai W, Lee MY.** (2005) Further characterization of human DNA polymerase delta interacting protein 38. *The Journal of biological chemistry* 280(23): 22375-22384.
- Yamagata K, Andreasson KI, Sugiura H, Maru E, Dominique M, Irie Y, Miki N, Hayashi Y, Yoshioka M, Kaneko K et al.** (1999) Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *The Journal of biological chemistry* 274(27): 19473-11979.
- Yamamoto K, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi M, Ito S, Tanaka Y, Masuno M, Chiyo H, Kurosawa K.** (2009) Further delineation of 9q22 deletion syndrome associated with basal cell nevus (Gorlin) syndrome: Report of two cases and review of the literature. *Congenital Anomalies* 49(1): 8-14.
- Yamamoto Y, Oguro N, Miyao M, Yanagisawa M, Ohsawa T.** (1989) Prometaphase chromosomes in the tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *American journal of medical genetics* 32(4): 524-527.
- Yang V, Nielsen MK, Heilman J, Hanson JW, Patil SR.** (1979) Deletions and a duplication in the long arm region of chromosome 4 in three patients. *American journal of human genetics* 31(6): A117-A117.

Yashiro K, Philpot BD. (2008) Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55(7): 1081-1094.

Yasuda S, Tanaka H, Sugiura H, Okamura K, Sakaguchi T, Tran U, Takemiya T, Mizoguchi A, Yagita Y, Sakurai T et al. (2007) Activity-induced protocadherin arcadlin regulates dendritic spine number by triggering N-cadherin endocytosis via TAO2beta and p38 MAP kinases. *Neuron* 56(3): 456-471.

Ying KL, Curry CJ, Rajani KB, Kassel SH, Sparkes RS. (1982) De novo interstitial deletion in the long arm of chromosome 9: a new chromosome syndrome. *Journal of medical genetics* 19(1): 68-70.

Young RS, Palmer CG, Bender HA, Weaver DD, Hodes ME, Opitz JM. (1982) Brief cytogenetic case report: A 4.5-year-old girl with deletion 4q syndrome — de novo, 46,XX, del(4) (pter→q31:). *American journal of medical genetics* 12(1): 103-107.

Yu CW, Chen H, Baucum RW, Hand AM. (1981) Terminal deletion of the long arm of chromosome 4. Report of a case of 46, XY, del(4)(q31) and review of 4q- syndrome. *Annales de genétique* 24(3): 158-161.

Yung WH, Leung PS, Ng SS, Zhang J, Chan SC, Chow BK. (2001) Secretin facilitates GABA transmission in the cerebellum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(18): 7063-7068.

Zhang A, Weaver DD, Palmer CG. (1997) Molecular cytogenetic identification of four X chromosome duplications. *American journal of medical genetics* 68(1): 29-38.

Zhang J, Feuk L, Duggan GE, Khaja R, Scherer SW. (2006) Development of bioinformatics resources for display and analysis of copy number and other structural variants in the human genome. *Cytogenetic and genome research* 115(3-4): 205-214.

Zhang Q, Claret FX. (2012) Phosphatases: the new brakes for cancer development? *Enzyme research* 2012: 659649.

Zimprich F. (2006) Genetik der Epilepsien. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 7(4): 35-42.

8 Danksagung

Allen, die in unterschiedlicher Weise an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren, danke ich herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche für die engagierte Betreuung. Ihre jederzeit gewährte Unterstützung und ihre kritischen Anmerkungen waren äußerst wertvoll für das Gelingen dieser Arbeit.

Hervorheben möchte ich auch Herrn Dr. Georg Rosenberger für die kontinuierliche und geduldige fachliche Begleitung. Seine Ratschläge und Anregungen haben diese Arbeit sehr bereichert – herzlichen Dank!

Ich spreche Herrn Prof. Dr. Andreas Gal meinen Dank für die Ermöglichung der Promotion am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf aus.

Auch meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Humangenetik möchte ich danken. Vor allem danke ich Frau Magdalena Mermela für die kompetente Einweisung in die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, Frau Dr. Fanny Kortüm für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen sowie Frau Anette Stryczek und Frau Karin Ziegler für die Herstellung der Chromosomenpräparate und die Einarbeitung in dieses Verfahren. Frau Dr. Sigrid Fuchs hatte stets ein offenes Ohr für mich und stand mir mit Rat und Tat zur Seite.

Dank gebührt schließlich meiner ganzen Familie für die Unterstützung nicht nur während der Erstellung dieser Arbeit. Fabian Bargon war immer für mich da und hat mich während meiner wissenschaftlichen Durststrecken ermuntert. Ihm danke ich von ganzem Herzen!

9 Eidesstattliche Erklärung

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

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

Unterschrift: