

Aus dem Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Herr Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. I. Hansmann)

Molekularzytogenetische Charakterisierung eines Deletions-
bzw. Duplikationssyndroms im proximalen 15q-Arm

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Melanie Sophie Hohner
geboren am 20.01.1984 in Stuttgart

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. I. Hansmann
2. Prof. Dr. med. Dipl. Biol. C. M. Schempp
3. Prof. Dr. med. R. Grabitz

Eröffnung 11.05.2010

Verteidigung 21.09.2011

Referat

Zielsetzung: Bei zwei Probanden mit Entwicklungsstörungen und unklaren Dysmorphie-syndromen wurden zytogenetisch nachgewiesene Aberrationen – eine Deletion, welche die mit dem Prader-Willi Syndrom assoziierte Region mit einbezieht, sowie eine partielle Trisomie – im Bereich 15q mittels molekularzytogenetischer Charakterisierung dargestellt. Es erfolgte eine Analyse bekannter Gene in den jeweiligen Regionen sowie ein Genotyp-Phänotyp-Vergleich mittels Kasuistiken von Patienten mit ähnlichen Aberrationen in 15q aus der Literatur. Es wurde geprüft, ob bestimmte chromosomale Abschnitte einzelnen phänotypischen Merkmalen zugeordnet werden können, um so möglicherweise Kandidatengene für diese Merkmale zu identifizieren.

Methoden: Die Kartierung der Bruchpunkte der vorliegenden Deletion bzw. der partiellen Trisomie erfolgte durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von 16 bzw. 13 BAC-Klonen an Metaphasechromosomen der Probanden.

Ergebnisse: Der proximale Bruchpunkt der Deletion wurde mittels FISH in der Region der sich überlappenden BAC-Klone RP11-483L3 und RP11-73C9 festgelegt. Der distale Deletions-bruchpunkt konnte durch einen Bruchpunkt-überspannenden BAC-Klon (RP11-242M5) kartiert werden. Die Bruchpunktregionen ließen sich somit auf einen Bereich von ca. 125 bzw. 100 kb eingrenzen. Die Deletion konnte somit einem etwa 10 Mb großen Bereich in 15q11.2q13.3 zugeordnet werden.

Die Bruchpunkte der partiellen Trisomie konnten mittels FISH jeweils der Region zweier sich überlappender BAC-Klone (RP11-638N6 und RP11-60L22 für den proximalen; RP11-960H11 und RP11-124A24 für den distalen Bruchpunkt) lokalisiert werden. Die gesamte trisome Region beim Probanden 2 ist etwa 5,1 Mb groß und lässt sich in 15q14q15 eingrenzen.

Schlussfolgerung: Nach der Analyse der Gene in den untersuchten Regionen konnten die Phänotypen der Probanden nicht durch die Deletion bzw. Triplikation eines einzelnen Gens erklärt werden. Durch Phänotyp-Genotyp-Korrelation konnte gezeigt werden, dass in Kasuistiken mit Deletionen gehäuft Patienten mit mentaler Retardierung, Kleinwuchs und Herzfehlbildungen beschrieben wurden; bei partiellen Trisomien traten mentale Retardierung, verzögerte Sprachentwicklung und Skelettdeformitäten auf. Unter Berücksichtigung der Größe der betroffenen Chromosomenaberrationen und der Vielzahl der vorhandenen Symptome ist das Vorliegen eines *Contiguous gene syndrome* wahrscheinlich. Eine Aussage über denkbare Kandidatengene in dieser Region ist anhand der bisherigen Datenlage nicht möglich.

Hohner, Melanie: Molekularzytogenetische Charakterisierung eines Deletions- bzw. Duplikationssyndroms im proximalen 15q-Arm. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Strukturelle Chromosomenaberrationen	1
1.1.1	Deletion	2
1.1.2	Insertion	3
1.1.3	Mögliche Entstehung einer partiellen Trisomie	3
1.2	Contiguous gene syndrome	4
1.3	Zielstellung der Arbeit	6
2	Material	7
2.1	Chemikalien	7
2.2	Enzyme	8
2.3	Gebrauchswaren	8
2.4	Geräte	8
2.5	Lösungen	9
2.5.1	Puffer	9
2.5.2	Gebrauchslösungen	10
2.6	Art und Herkunft der BAC-Klone	12
2.7	Patientenmaterial	12
2.8	Verwendete Software	12
3	Methoden	13
3.1	Präparation der BAC-Klone	13
3.1.1	Herstellung von BAC-DNA aus Bakterienkulturen	13
3.1.2	Anlage einer Stammkonserve (Stock)	14
3.2	Chromosomenpräparation	14
3.2.1	Vorbereitung des Probanden-Materials	14
3.3	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	15
3.3.1	Vorbehandlung der Probanden-Objektträger	16
3.3.2	Vorbereitung der Sonden	16
3.3.3	Hybridisierung	18
3.3.4	Waschschritte	18
3.3.5	Detektion der Biotin-markierten Sonden	18

4	Ergebnisse	22
4.1	Kasuistik I: Die Probandin 1	22
4.1.1	Deletion bei der Probandin 1	23
4.1.2	Analyse des proximalen Bruchpunktes der Deletion	25
4.1.3	Identifizierung und Darstellung der proximalen Bruchpunktregion	27
4.1.4	Analyse des distalen Bruchpunktes der Deletion	29
4.1.5	Identifizierung und Darstellung der distalen Bruchpunktregion	33
4.1.6	Mikrosatellitenanalyse der deletierten Region	34
4.2	Kasuistik II: Der Proband 2	36
4.2.1	Partielle Trisomie beim Probanden 2	37
4.2.2	Analyse des proximalen Bruchpunktes der partiellen Trisomie	40
4.2.3	Identifizierung und Darstellung der proximalen Bruchpunktregion	42
4.2.4	Analyse des distalen Bruchpunktes der partiellen Trisomie	44
4.2.5	Identifizierung und Darstellung der distalen Bruchpunktregion	47
5	Diskussion	50
5.1	Genomische Instabilität der Region 15q	50
5.2	Der mit einer Deletion 15(q11.2q13.3) einhergehende Phänotyp bei der Probandin 1	52
5.3	Der mit einer partiellen Trisomie 15(q14q15) einhergehende Phänotyp beim Probanden 2	61
5.4	Reziproke Translokation 15 und 21	66
5.5	Ausblick	68
6	Zusammenfassung	69
7	Literaturverzeichnis	71
8	Thesen	78

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BAAD	biotinyliertes Anti-Avidin D
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat-p-Toluidinsalz
bp	Basenpaare
BP	<i>break point</i> , Bruchpunkt(region)
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	cirka
cm	Zentimeter
DAPI	4,6-diamidino-2`phenylindol
der	derivativ
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNTP	Desoxynukleosid-5`-triphosphat
dATP	2`-Desoxy-adenosin-5`-triphosphat
dCTP	2`-Desoxy-cytosin -5`-triphosphat
dGTP	2`-Desoxy-guanosin -5`-triphosphat
dNTPs	Mischung von 2`-Desoxy-5`-Triphosphat-Nukelotiden
dTTP	2`-Desoxy-thymidin-5`-triphosphat
dUTP	2`-Desoxy-uridin-5`-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et altera
FisH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
IUGR	<i>intrauterin growth retardation</i> (intrauterine Wachstumsverzögerung)
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
l	Liter
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
m	milli-
M	Molarität
Mb	Megabasen

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar (mmol/l)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
n	nano-
NaAC	Natrium-Acetat
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
(O)MIM	(Online) Mendelian Inheritance in Man, Datenbank
OT	Objektträger
p	pico
p-Arm	kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
q-Arm	langer Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RZPD	<i>Resource Center/ Primary Database</i>
sec	Sekunde
S.	Seite
Tab.	Tabelle
ter	terminales Ende eines Chromosoms
U/min	Umdrehungen pro Minute
U	Unit (Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
wpc	<i>whole chromosome painting</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Seit der Sequenzierung des menschlichen Genoms im Zuge des humanen Genomprojekts (HGP) sind die Ursachen vieler monogener Erkrankungen charakterisiert (Rowen *et al.*, 1997; Venter *et al.*, 1998). Ein Ansporn für dieses Projekt war die Erwartung, durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms eine überwiegende Zahl der Erbkrankheiten in ihren Ursachen aufklären zu können und damit die Grundlage für ihre Behandlung zu schaffen. Doch bei einigen, vor allem neuropsychiatrischen Erkrankungen sind die Mechanismen weiter unklar, da von einer polygenen Genese ausgegangen werden muss.

Für die Identifizierung und Lokalisierung krankheitsverursachender Gene gibt es verschiedene Ansätze, aber keine universell anwendbare Strategie. Zwei häufig verwendete Methoden zur Charakterisierung sind die funktionelle und die positionelle Klonierung (Collins, 1992; Ballabio, 1993; Sterky *et al.*, 2000).

Die funktionelle Klonierung war noch zu Beginn der 1980er Jahre die Methode der Wahl, um sich der genetischen Ursache einer Krankheit zu nähern. Das Prinzip der Identifizierung eines krankheitsverursachenden Gens basiert auf der biochemischen Funktion des Proteins, welches durch seinen defekten Zustand für die Krankheit verantwortlich ist. Davon ausgehend wird nach dem dafür codierenden Gen gesucht (Collins, 1992; López-Bigas und Ouzounis, 2004)

Geeigneter für Erkrankungen, deren biochemische Grundlage unbekannt ist, ist jedoch die positionelle Klonierung (Nelson, 1995). Über die genetische und physikalische Lokalisierung wird die genomische Region, in der das krankheitsassoziierte Gen liegt, identifiziert. Die Eingrenzung dieser chromosomalen Position kann dann auf verschiedene Arten durchgeführt werden (Parrish *et al.*, 1993). Zur Verwendung kommen unter anderem Kopplungsanalysen, bei denen die Segregation von polymorphen Markern mit einem pathologischen Phänotyp analysiert wird. Andere Möglichkeiten der positionellen Klonierung stellen zytogenetische Analysen von chromosomalen Anomalien dar, welche mit Verlust von Genmaterial, Brüchen innerhalb von Genen oder Strukturveränderungen in Kontrollelementen einhergehen (Cooper und Mattox, 1997; Lupski, 1998; Inoue *et al.*, 2001; Lupski, 2003).

Bei der Suche nach krankheitsverursachenden Genen soll die Genotyp-Phänotyp-Analyse nicht unerwähnt bleiben, welche Korrelationen zwischen dem klinischen Bild und den Genom-Veränderungen aufzeigen kann.

1.1 Strukturelle Chromosomenaberrationen

Chromosomenaberrationen sind im Lichtmikroskop erkennbare, strukturelle Veränderungen der Chromosomen, welche durch Brüche in den Chromosomen und/oder Austausch von

Chromosomenfragmenten, die entweder nur ein Chromosom (intrachromosomal) oder mehrere Chromosomen (interchromosomal) betreffen, entstehen. Unterschieden werden numerische und strukturelle Veränderungen. Während bei der numerischen Chromosomenanomalie die Gesamtzahl der Chromosomen abweicht, betreffen strukturelle Chromosomenanomalien nur Segmente von Chromosomen.

Für die Entstehung und den Ursprung chromosomaler Aberrationen gibt es verschiedene Erklärungsversuche, wobei die Theorien von Sax (1940) und Revell (1974) die bekanntesten sind. Beide Hypothesen beruhen auf Daten aus dem Bereich der Mutationsforschung. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei interchromosomalen Umbauprozessen um mehrphasige, zeitlich voneinander trennbare Schritte handelt (Savage, 1976).

Strukturelle Chromosomenmutationen entstehen durch

- Deletion (Verlust eines Chromosomenabschnitts)
- Duplikation (Verdoppelung eines Chromosomenabschnitts)
- Translokation (Austausch von chromosomalem Material zwischen zwei Chromosomen)
- Insertion (Einbau eines Fragments in ein Chromosom) oder
- Inversion (um 180° gedrehtes Chromosomenbruchstück innerhalb eines Chromosoms).

Zusätzlich werden bei den strukturellen Chromosomenanomalien balancierte von unbalancierten Aberrationen unterschieden. Als unbalanciert wird der Zugewinn oder Verlust von Chromosomenmaterial bezeichnet, was häufig mit einem klinisch auffälligen Phänotyp verbunden ist.

Dagegen führt eine balancierte Strukturaberration üblicherweise nicht zu einem klinisch auffälligen Phänotyp, da das Genmaterial zwar an „falscher“ Stelle, aber in der richtigen Dosis vorhanden ist. Allerdings sind etwa 6% aller Patienten mit balancierten Chromosomenveränderungen klinisch auffällig; hier sind die klinischen Symptome in vielen Fällen auf eine Durchtrennung oder Inaktivierung von Genen oder deren Regulationszentren zurückzuführen (Ropers, 1998).

Im Folgenden sollen jene Chromosomenmutationen näher charakterisiert werden, welche in den unter 4.1 und 4.2 vorgestellten Kasuistiken zu den strukturellen Chromosomenaberrationen beigetragen haben.

1.1.1 Deletion

Deletion bedeutet Verlust von genetischem Material. Dies kann das Ende eines Chromosoms (terminale Deletion) oder einen innerhalb liegenden Abschnitt (interstitielle Deletion) betreffen. Beim Verlust von genetischem Material (Nukleotide, Exons, Gene) wird der diploide Orga-

nismus in Bezug auf diesen Bereich partiell monosom (Bochkov *et al.*, 1974; Savage, 1976).

Deletionen können lichtmikroskopisch sichtbar sein, Mikrodeletionen dagegen betreffen Sequenzabschnitte in der Größenordnung von 1-10 Mb und sind lichtmikroskopisch nicht wahrnehmbar, da sie unter der Auflösungsgrenze liegen.

Beispiele sind das Angelman Syndrom, das Retinoblastom oder das Langer-Giedion Syndrom; bei letzterem sind zwei eng benachbarte Gene deletiert, hier liegt ein *contiguous gene syndrome* vor (siehe 1.2) (Angelman, 1965; Langer *et al.*, 1984; Potluri *et al.*, 1986).

1.1.2 Insertion

Bei der Insertion wird zusätzliches DNA-Material in ein Chromosom eingebaut. Dabei handelt es sich um Chromosomenfragmente, die in die Chromosomensequenz eingefügt werden. Im Spender-Chromosom, welches das Chromosomenfragment liefert, entsteht dabei eine Deletion. Insgesamt geht aber meist kein Genmaterial verloren, die Mutation wird als balanciert bezeichnet (Rakowicz-Szulczynska, 1983; Hanna *et al.*, 2005).

1.1.3 Mögliche Entstehung einer partiellen Trisomie

Durch die Rekombination der Chromosomen in der Meiose I entstehen bei Trägern einer balancierten Insertion Keimzellen mit verschiedenen Chromosomensätzen (Garver *et al.*, 1976). Wenn bei der Konzeption diese Keimzellen mit genotypisch unauffälligen Gameten verschmelzen, können verschiedene Zygoten entstehen, wie sie in Abb. aufgeführt sind. Erkennbar wird hier, dass diese Zygoten sowohl unauffällige (a) bzw. balancierte (b) Chromosomensätze tragen als auch partielle Mono- bzw. Trisomien (c, d) aufweisen können. Während aus den Zygoten (a) und (b) phänotypisch unauffällige Nachkommen entstehen, könnte sich einerseits die partielle Monosomie (d) durch Haploinsuffizienz wie auch die partielle Trisomie (c) durch Überexpression der auf dem Abschnitt vorhandenen Gene auf den Phänotyp auswirken.

In der Kasuistik des Probanden 2 (siehe 4.2) findet sich bei der Probandenmutter II,6 (vgl. Abb. 13) ein balancierter Chromosomensatz, beim Probanden 2 (III,3, vgl. Abb.13) dagegen ein Genotyp mit partieller Trisomie (vgl. c).

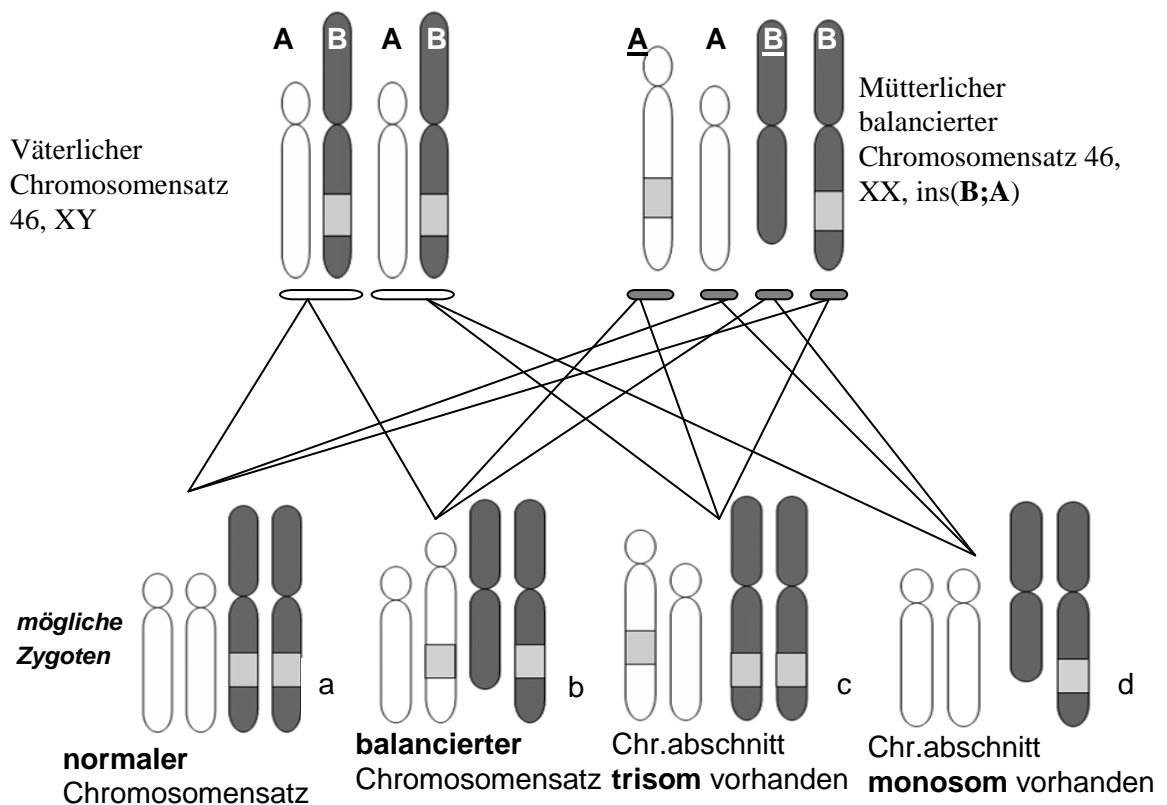


Abb. 1: Rekombinationsmöglichkeiten von elterlichen Keimzellen bei balanciertem Genotyp der Mutter. Der mütterliche Chromosomensatz weist eine Insertion des hellgrau gefärbten Chromosomenabschnitts (Chr.abschnitt) aus Chromosom B in Chromosom A auf. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur 2 schematisierte Chromosomen (A und B, bzw. die derivativen Chromosomen A und B) des väterlichen und mütterlichen Chromosomensatzes dargestellt..

Die im Folgenden verwendete, humangenetische Nomenklatur der Chromosomenaberrationen orientiert sich am *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) 2009.

1.2 Contiguous gene syndrome

Der Begriff *contiguous gene syndrome*, auch als Mikrodeletionssyndrom oder segmentales Aneusomie Syndrom bezeichnet, beschreibt einen Symptomenkomplex, dessen Ausprägung durch mehrere Gene verursacht wird, deren Loci voneinander unabhängig, jedoch physikalisch gekoppelt sind (Ballabio, 1991; Shaffer *et al.*, 2001). Bedingt wird das durch Chromosomenaberrationen, besonders Deletionen und Duplikationen oder nur punktuelle Mutationen im genetischen Code; so gesehen ist der Begriff Mikrodeletionssyndrom irreführend, da es sich bei den Aberrationen nicht ausschließlich um Deletionen handelt.

In jedem Fall liegt eine Veränderung der normalen Gendosis vor. Die Haploinsuffizienz bei Deletionen kann funktionelle Veränderungen von Genprodukten bewirken (*loss-of-function*). Bei der selteneren Duplikation kommt es zu einer Überexpression der Gene (*gain-of-function*).

Etwa 20 dieser Syndrome sind bekannt (Schinzel, 1988; Dallapiccola *et al.*, 1995). Erstmals verwendet wurde der Begriff *contiguous gene syndrome* im Jahr 1986 (Schmickel, 1986). Die zugrunde liegenden Veränderungen am Chromosom sind oftmals nicht besonders groß (< 5 Mb) und werden erst bei Hochauflösungsbandierung der Chromosomen nachweisbar. Noch besser eingrenzbar sind sie durch molekulargenetische Methoden wie beispielsweise die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) oder die Mikrosatellitenanalyse.

Beispiele für *contiguous gene syndromes* sind das Smith-Magenis Syndrom (Smith *et al.*, 1986; Lucas *et al.*, 2001) bei Deletion del(17)(p11.2), das Prader-Willi Syndrom bei Deletion der väterlichen Gene von Chromosom 15 (q11q13) (Magenis *et al.*, 1990; Nicholls und Knepper, 2001) oder das Williams-Beuren Syndrom bei Deletion del(7)(q11.23q11.23) (Donnai und Karmiloff-Smith, 2000).

Genetisch gut verstanden ist das WAGR Syndrom bei Deletion von del(11)(p13). Der Name steht als Akronym für die Merkmale: Wilms-Tumor, Aniridie, Urogenitaltraktdysplasie und Wachstumshemmung (*retardation of growth*) (OMIM #194072; Miller *et al.*, 1964).

Es wurden 2 Gene identifiziert, welche unabhängig voneinander zu den verschiedenen Symptomen beitragen: PAX6 ist verantwortlich für die Aniridie, das WT1-Gen für die übrigen Merkmale (Pelletier *et al.*, 1991; Chao *et al.*, 2003).

Das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 (OMIM #188400) dagegen steht für verschiedene Syndrome, die durch Mikrodeletion eines 1,5 bis 3,0 Mb großen Stücks am Chromosom 22 del(22)(q11.21q11.23) hervorgerufen werden. Darunter fallen zum Beispiel das DiGeorge Syndrom und das Shprintzen Syndrom (*velo-cardio-faziales Syndrom*), welche sich unterschiedlich präsentieren, jedoch fließende Übergänge ineinander zeigen. Gelegentlich wird auch noch der Überbegriff CATCH-22 Syndrom verwendet. Dieser Name ist ein Akronym für „*cardiac anomalies*“ (Herzfehler), „*abnormal facies*“ (Gesichtsdysmorphien), „*thymic hypoplasia*“ (Thymushypoplasie), „*cleft palate*“ (Gaumenspalte), „*hypocalcemia*“ (Hypocalcämie) (Burn, 1999; Sergi *et al.*, 1999; Cuneo, 2001)

Obwohl diese Symptome so verschiedenen genetischen Ursprungs anmuten, dürften sie vermutlich ausschließlich durch Haploinsuffizienz des TBX1-Gens hervorgerufen werden. Yagi *et al.* (2003) zeigten, dass auch Punktmutationen in diesem Gen diese 5 Hauptsymptome hervorrufen.

Bei der Suche nach Kandidatengen zur Korrelation mit den Phänotypen, die bei Patienten mit (Mikro-)Deletionen, anderen chromosomalen Aberrationen oder auch zytogenetisch unauffälligem Chromosomensatz gesehen werden, kann neben einer gründlichen *in silico* Analyse der vorhandenen Literatur und Kasuistiken auch eine Analyse zur Punktmutation einzelner Gene notwendig werden.

Gerade bei größeren heterozygoten Deletionen und *contiguous gene syndromes* ist es jedoch möglich, die Gene in der betroffenen Region in den entsprechenden Datenbanken direkt nach spezifischen Phänotypen zu rastern.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die molekularzytogenetische Charakterisierung zweier strukturell auffälliger, ca. 5 bzw. 10 Mb großer Aberrationen im Bereich 15q11-q15 bei zwei Probanden mit unklaren Dysmorphiesyndromen.

Zum einen handelt es sich dabei um eine Probandin mit einer *de novo* Deletion del(15)(q11.2q13) und Verdacht auf atypisches Prader-Willi Syndrom, welche durch muskuläre Hypotonie, unersättlichen Appetit, mentale Retardierung ohne Sprachentwicklung, faziale Dysmorphien sowie Herz- und Darmfehlbildungen auffiel.

Ein weiterer Proband mit einer maternal vererbten partiellen Trisomie der Banden 15q14q15 zeigte Augen- und Skelettanomalien mit Kleinwüchsigkeit, atypische Fettverteilung, mentale Retardierung und Verhaltensauffälligkeiten mit Hyperaktivität und Aggressionen, ohne dass diesem Symptomenkomplex ein definiertes Krankheitsbild zugeordnet konnte.

Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden die Bruchpunkte der Deletion del(15)(q11.2q13) und der partiellen Trisomie der Banden 15q14q15 genau eingegrenzt.

Weiterhin erfolgte eine *in silico* Analyse der betroffenen Chromosomenregionen, um durch Phänotyp-Genotyp-Korrelation bekannter Fällen mit ähnlichen Aberrationen einen gemeinsamen Phänotyp zu definieren.

2 Material

2.1 Chemikalien

Agar	Fluka Chemika AG, Buchs, Schweiz
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein, D
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg, D
Biotinylated anti-Avidin D	Roche, Mannheim, D
5-Bromo-3-chloro-3-indoly-phosphat (BCIP)	Roche, Mannheim, D
BSA	Serva, Heidelberg, D
Chloramphenicol	Fluka Chemika AG, Buchs, Schweiz
Cot-I-Human DNA	Roche, Mannheim, D
Dextransulfat	Roche, Mannheim, D
4-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Vysis, Downers Grove, IL, USA
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe, D
dNTPs	Roche, Mannheim MBI Fermentas, St. Leon-Roth
EDTA	USB, Cleveland, Ohio, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, D
Fluorescein Avidin D	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
Formaldehyd (37%ig)	Sigma, Deisenhofen, D
Formamid	Fluka Chemika AG, Buchs, Schweiz
Formamid loading dye	Amersham, Cleveland, Ohio, USA
Glycerin	GIBCO/BRL, Paisley, Schottland
Hefeextrakt	GIBCO/BRL, Paisley, Schottland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt, D
Lachssperm-DNA	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe, D
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe, D
Natriumacetat	Applied Biosystems
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, D

Natriumhydroxyd	Roth, Karlsruhe, D
Natriumphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Pepton	Roth, Karlsruhe, D
Phytohämagglutinin	Biochrom, Berlin, D
SDS	Roth, Karlsruhe, D
Tris-Cl	Roth, Karlsruhe, D
Tween 20	Roth, Karlsruhe, D

2.2 Enzyme

DNA-Polymerase I	Ivitrogen, Karlsruhe, D
RNase A	Roche, Mannheim, D
Pepsin	Sigma, Deisenhofen, D
Streptavidin-alkaline-Phosphatase	Roche, Mannheim, D

2.3 Gebrauchswaren

Filterpapier	Schleicher&Schüll, Dassel, D
Fixogum	Marabuwerke, Tamm, D
Glaswaren	Schott, Jena, D
Nagellack	Manhattan, Stuttgart, D
Objektträger/Deckgläser	Roth, Karlsruhe, D
Parafilm	American National Can TM , Chicago, IL, USA
Petrischalen	Greiner, Nürtingen, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Plastikwaren	Falcon, Heidelberg, D Greiner, Nürtingen, D Sarstedt, Nümbrecht, D Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße	
Skalpelle, steril	Swann-Morton, Sheffield, UK
Sterilfilter	Renner, Darmstadt, D

2.4 Geräte

Elektrophoresekammern	peqlab, Biotechnologie GmbH
Heizblock	Blockthermostat BT 100, Kleinfeld
Labortechnik	
Inkubatoren	innova 4000 Schüttelinkubator, New Brunswick
Kryostat	Biometra
Küvetten	UV-Küvette mikro, Plastibrand, Brand GmbH

Mikroliterpipetten	Gilson und Eppendorf
Mikroskop	Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop, Zeiss
Phospho-Imager	Sorm 860, Molecular Dynamics
pH-Meter	Typ CG 810, Schott
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf Ultraspec III, Pharmacia LKB
Reinstwasseranlage	MilliQ-Plus PF, Millipore
Transilluminator	Harolab GmbH
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker 1800, Stratagene
Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifugen	Tischzentrifuge, Biofuge pico, Heraeus
Instruments	Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech SIGMA 3K20

2.5 Lösungen

Alle Lösungen wurden entweder mit „Ampuwa“ oder mit „Milli-Q“ Wasser (Millipore) angesetzt. Lösungen, die keine hitzeempfindlichen Bestandteile enthielten, sowie Gebrauchswaren wurden bei 121°C und 10⁵ Pascal für 20 Minuten im Dampfdruck-Autoklaven autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Steril-Filtrationssystems (Millipore) sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm).

2.5.1 Puffer

Dot-Blot-Puffer I (pH eingestellt auf 7,5)	100 mM Maleinsäure, pH 7,5 150 mM NaCl
Dot-Blot-Puffer III (pH eingestellt auf 9,5)	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl
Nicktranslations-Puffer, 10×	0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) 0,1 M MgSO ₂ 1 mM Dithiothreitol 500 µg/ml BSA (aliquotiert bei -20°C lagern)
PBS (Phosphate-buffered saline), 10×	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ (pH eingestellt auf 7,4)

P1(Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-Cl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A (bei 4°C lagern)
P2 (Lysepuffer)	200 mM NaOH 1 % SDS
P3 (Neutralisationspuffer)	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
TBE-Puffer, 10×	500 mM Tris/HCl 500 mM Borsäure 20 mM EDTA (pH eingestellt auf 8,2 mit HCl)
Tris EDTA, 10× (TE)	100 mM Tris-Cl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)

2.5.2 Gebrauchslösungen

Agar-Nährboden	LB-Medium 1,5 % w/v Agarose steril in Petrischalen gießen
Avidin-FITC-Stammlösung	5 mg/ml in Ampuwa bei 4°C lichtgeschützt lagern
Avidin-FITC-Gebrauchslösung	0,5 ml 4×SSC 0,5 ml Blockinglösung 2 µl Avidin-FITC-Stammlösung
BAAD-Stammlösung	0,5 mg/ml in Ampuwa bei 4°C lichtgeschützt lagern
BAAD-Gebrauchslösung	0,5 ml 4×SSC 0,5 ml Blockinglösung 5 µl BAAD-Stammlösung
Avidin-FITC- und BAAD-Gebrauchslösungen frisch ansetzen und lichtgeschützt bei 4°C lagern.	
BCIP/NBT-Lösung	5 ml Dot-Blot-Puffer III 20 µl BCIP 20 µl NBT frisch ansetzen und lichtgeschützt lagern
10 %ige Blocking-Lösung	1 g 10% BSA (0,1 µg/µl) 20 ml 4x SSC frisch ansetzen, steril filtrieren

DAPI(4`-6`Diamidino-2-phenylindol)- Stammlösung	0,1 mg/ml in Ampuwa bei 4°C lichtgeschützt lagern
Denaturierungslösung	42 ml Formamid 6 ml 20×SSC 12 ml Aqua dest. (pH eingestellt auf 7,0)
DNase I - Stammlösung	1 mg pancreatic DNase A 1 ml Aqua dest.
DNase I – Gebrauchslösung	1 µl DNase I - Stammlösung auf 1 ml Aqua dest.
dNTP-Mix	1 mM 2`-Desoxy-adenosin-5`-triphosphat (1,0 mM) 1 mM 2`-Desoxy-guanosin -5`-triphosphat (1,0 mM) 1 mM 2`-Desoxy-cytosin -5`-triphosphat (1,0mM) 0,65 mM 2`-Desoxy-thymidin-5`-triphosphat (1,0mM)
Ethidiumbromid-Gebrauchslösung	10 µl Stammlösung (10 mg/ml in Ampuwa) 100ml Aqua dest.
Fixierungslösung	0,18 g Magnesiumchlorid 39 ml 1×PBS 1 ml Formaldehyd (37%ig)
Formamid-Waschlösung	100 ml Formamid 100 ml 4x SSC (pH eingestellt auf 7,0)
LB-Medium (lysogeny broth)	7,5 g/l NaCl 5 g/l Hefe-Extrakt 10,0 g/l Pepton oder Trypton (pH eingestellt auf 7,0 mit NaOH– autoklaviert)
Mastermix	20 % Dextransulfat in 2x SSC (bei -20°C lagern)
Propidiumjodid-Stammlösung	1 mg/ml in Aqua dest. bei 4°C lichtgeschützt lagern
Propidiumjodid-DAPI (Gebrauchslösung je OT)	23 µl Vectashield 3 µg DAPI (4`-6`Diamidino-2-phenylindol) 4 µl Propidiumiodid
RNase A-Stammlösung	10 mg/ml in Aqua dest., bei 4°C lagern
SSC, 20× (pH eingestellt auf 7,0)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat

2.6 Art und Herkunft der BAC-Klone

Die hier verwendete Genbank bietet die Gesamtheit der Klone an, die (als *Contig*) einen großen Teil des humanen Genoms abdecken. Die Fragmente genomischer DNA sind dabei in einem Vektor, in diesem Fall in einem sog. *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC), enthalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden BAC-Klone aus der Genbank „*RP-11 Human Male BAC*“ verwendet.

Library Human BAC (RPCI-11)

Vektor	pBACe3.6
Stamm	<i>Escherichia coli</i> (DH10B)
Resistenz	Chloramphenicol

Die BAC-Klone wurden vom Ressourcenzentrum für das deutsche Humangenomprojekt am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin bezogen (imaGenes, ehemals RZPD, <http://www.imagenes-bio.de>).

2.7 Patientenmaterial

Um die Chromosomen der Probanden als Untersuchungsmaterial zu gewinnen, wurde venöses Vollblut (5-10 ml) abgenommen und heparinisiert. Die daraus gezüchtete Lymphozytenkultur eignet sich zur Chromosomenpräparation.

Nicht verwendetes Blut kann bei -20°C aufbewahrt werden.

2.8 Verwendete Software

Mit Hilfe von *ISIS 3*, einer digitalen FISH-Bildgebungssoftware (Metasystems, Heidelberg), wurden die präparierten Metaphasechromosomen der Probanden am Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Das Programm *PED 5* (Plendl, 2007, <http://www.medgen.de>) wurde zur Erstellung der Stammbäume angewendet.

Zur Erstellung der Ideogramme wurde die Software *CyDAS Online Analysis Site* (Hiller *et al.*, 2004; <http://www.cydas.org/OnlineAnalysis/>) verwendet.

3 Methoden

Die Methoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt, Abweichungen sind entsprechend gekennzeichnet. Die Zusammensetzung verwendeter Lösungen ist unter 2.5 beschrieben.

3.1 Präparation der BAC-Klone

Im Folgenden wird die Isolierung von BAC-DNA beschrieben, die auf der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) beruht. Die Bakterien wurden jeweils auf Agar-Nährböden mit Chloramphenicol über Nacht bei 37°C angezüchtet.

3.1.1 Herstellung von BAC-DNA aus Bakterienkulturen

- 100 ml Chloramphenicol-haltiges (34 µg/ml) LB-Medium wird unter sterilen Bedingungen mit einer einzelnen Plattenkolonie beimpft.
- Diese Kultur wird bei 37°C für 12 bis 20 h unter Schütteln inkubiert.
- Anschließend folgt die Zentrifugation der Kultur (3000 U/min; 10 Minuten bei 4°C).
- Nach Abgießen des Überstands wird das Pellet in 8 ml gekühlter P1-Lösung resuspendiert.
- Mit 8 ml P2-Lösung erfolgt die Lyse der Bakterien, durch Zusatz von 8 ml P3-Lösung kommt es zur Neutralisation.
- Das Lysat wird über Filter und Anionenaustauschersäulen gegeben. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA eluiert, mit 3,5 ml Isopropanol ausgefällt und mit Ethanol gewaschen.
- Das entstandene DNA-Pellet wird in 10 µl TE aufgenommen und im Kühlschrank aufbewahrt.

Die DNA-Konzentration wurde durch Messung im Spektralphotometer ermittelt. Die Konzentration der Nukleinsäuren errechnet sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$c = E_{260} \times f \times k$$

c= Konzentration der Nukleinsäuren in µg/µl

E= Extinktion in nm

f = Verdünnungsfaktor

k = 47,5 µg/µl für doppelsträngige Nukleinsäuren

Ein Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm (E_{260}/E_{280}) kann zur Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäuren herangezogen werden: ein Quotient unter 1,6 spricht für eine Verunreinigung durch Proteine, ein Quotient über 2,0 für eine Verunreinigung durch RNA.

3.1.2 Anlage einer Stammkonserve (Stock)

Die Haltbarkeit der Bakterienstämme, die vom IMAGENES zur Verfügung gestellt werden, beträgt etwa 6 Monate. Daher empfiehlt sich die Anlage einer Stammkonserve zur langfristigen Aufbewahrung der Bakterienstämme. Durch Zugabe von 20%igem Glycerin zur Übernacht-Kultur wird die Zerstörung des Zytoplasmas durch Kristallisation verhindert (1:1 Gemisch in autoklaviertem Eppendorfgefäß zur Aufbewahrung bei -20°C).

3.2 Chromosomenpräparation (nach Hsu, 1952 und Hughes, 1952)

Die Probandenchromosomen werden auf Objektträgern fixiert, um sie für die Methode der FISH zugänglich zu machen. Aus dem venösen Vollblut (heparinisiert) wird eine Lymphozytenkultur gezüchtet. Der Mitose-Hemmstoff Colcemid arretiert die Chromosomen in den Blutzellen durch Störung des Spindelapparates in der Metaphase, diese eignet sich zur Beurteilung der FISH-Signale.

3.2.1 Vorbereitung des Probanden-Materials

Lymphozyten-Kulturansatz: 1 ml Vollblut
100 μl Phytohämagglutinin
10 ml MEM-Medium

- Dieser Ansatz wird steril in eine Flachboden-Kulturflasche pipettiert, gut gemischt und bei 37°C für 72 Stunden inkubiert. 1-2-mal täglich schwenken.
- Unterbrechen des Wachstums nach 72 h durch Zugabe von Colcemidlösung (200 μl).
- Nach 90 Minuten Einwirkzeit bei 37°C den Ansatz auf 10-ml-Röhrchen verteilen und bei 1000 rpm 10 Minuten zentrifugieren.
- Lösungen herstellen:
 - hypotone Lösung: 5,92 g/l Kaliumchlorid
4 g/l Natriumcitrat bei 4°C lagern
 - Fixativ: 3 Vol. Methanol
1 Vol. Essigsäure
- Nach dem Zentrifugieren den Überstand mit einer Pasteurpipette abnehmen, dabei 0,5 cm Lösung oberhalb des Zell-Sediments stehen lassen. In der verbleibenden Flüssigkeit wird das Sediment resuspendiert.
- 10 ml hypotone Lösung unter Schwenken tropfenweise zufügen. Ansatz für 20 Minuten bei 37°C inkubieren. Die hypotone Lösung führt zu einem osmotisch bedingten Anschwellen der Lymphozyten und Zerbersten der Zellwände. Die Zellkerne werden hierbei frei.

- Anschließend für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Nach dem Zentrifugieren den Überstand mit einer Pasteurpipette abnehmen, dabei 0,5 cm Lösung oberhalb des Pellets stehen lassen. Resuspendieren und tropfenweise eiskalte Fixativlösung (insgesamt 10 ml) unter behutsamem Schwenken zufügen.
- Anschließend für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Nach dem Zentrifugieren den Überstand mit einer Pasteurpipette abnehmen, dabei 0,5 cm Lösung oberhalb des Pellets stehen lassen. Resuspendieren und wiederum 10 ml eiskalte Fixativlösung unter Schwenken zufügen. Diesen Ansatz für 15 Minuten bei -20°C inkubieren.
- Wiederum für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Nach dem Zentrifugieren den Überstand mit einer Pasteurpipette abnehmen, dabei 0,5 cm Lösung oberhalb des Pellets stehen lassen und resuspendieren.
- Erneut 10 ml eiskalte Fixativlösung unter behutsamem Mischen zufügen und diesen Ansatz für 15 Minuten bei -20°C inkubieren.
- Anschließend für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren; nach dem Zentrifugieren den Überstand mit einer Pasteurpipette abnehmen, dabei 0,5 cm Lösung oberhalb des Pellets stehen lassen und 3 ml Fixativlösung hinzugeben. Das Pellet resuspendieren.
- Feuchte, saubere und eiskalte OT aus mindestens 50 cm Höhe mit 3-5 Tropfen der Zellsuspension betropfen. Langsam trocknen lassen.

Die Objektträger werden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die ideale Lagerungsdauer für die FISH wurde empirisch auf etwa 6 Monate ermittelt. Kürzer gelagerte OT wiesen mehr unspezifische Bindungen auf, über 2 Jahre aufbewahrte OT führten zu schlechteren Hybridisierungsergebnissen.

3.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) modifiziert nach Caspersson et al. (1970), Pinkel et al. (1986) und Lichter et al. (1988)

Ein Durchbruch in der Chromosomendiagnostik gelang in den 1980er-Jahren mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Diese molekulargenetische Methode identifiziert bestimmte Chromosomen, kleinste Chromosomenabschnitte bis hin zu einzelnen Genen spezifisch und fluoreszenzmikroskopisch mit hoher Auflösung.

Dadurch ist es möglich, das gesamte humane Genom auf submikroskopische Veränderungen, wie kleine Deletionen oder Duplikationen, zu untersuchen, um beispielsweise die Ursachen von bisher nicht klassifizierbaren Dysmorphiesyndromen aufzuklären.

Das Prinzip der FISH-Methode besteht darin, Sonden mit bekannten Sequenzen, die spezifisch für einen bestimmten Chromosomenabschnitt oder ein bestimmtes Gen sind, mit den Metaphasechromosomen einer zu prüfenden Probe zu hybridisieren, wo sie lediglich an

komplementären Basen binden können, quasi „*in situ*“ liegend nachgewiesen und gleichzeitig lokalisiert werden können.

Werden diese Sonden mit Biotin markiert, welches durch an Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes Streptavidin detektiert wird (die Signalstärke kann durch weitere Reaktionen intensiviert werden), können die entsprechenden Loci unter einem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden.

3.3.1 Vorbehandlung der Probanden-Objektträger

Die Vorbehandlung verringert die Reste des Nukleoplasmas im Präparat (Nenno *et al.*, 1994). Ziel dieser Vorarbeit ist eine verbesserte Signalstärke, da unspezifische Bindungen an RNA oder Zytoplasma die Aussagekraft eines Signals einschränken.

- OT in 60 ml 0,01N HCl mit 40 µl Pepsin bei 37°C im Wasserbad 15 min inkubieren.
- Je 5 min in 2xPBS, Fixierungslösung und wieder 2xPBS bei RT fixieren.
- Danach in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 80%, 90%, 99%, 99%) je 1 min dehydrieren. Trocknen lassen.
- OT in 40 ml Formamid-Denaturierungslösung bei 70°C im Wasserbad 2 min 45 sec inkubieren.
- Danach in einer eiskalten aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 80%, 90%, 99%, 99%) je 1 min dehydrieren. Danach trocknen lassen.

Das Formamid senkt den Schmelzpunkt der DNA, so dass diese nicht auf ihre Schmelzpunkttemperatur von üblicherweise 95°C erhitzt werden muss; die doppelsträngige DNA trennt sich dennoch; so wird eine bessere Hybridisierung gewährleistet.

3.3.2 Vorbereitung der Sonden

Neben dem Einbau von Biotin zur späteren Detektion unter dem Fluoreszenz-Mikroskop dient diese Vorarbeit dazu, die DNA in etwa 200-500 bp kurze Fragmente zu schneiden, welche bei der Hybridisierung an die Chromosomen binden können.

Biotin-Markierung der DNA-Sonden mittels Nicktranslation (*modifiziert nach Rigby et al., 1977*)

DNase I verursacht freie Einzelstrangbrüche an statistisch verteilten Stellen der DNA (Kelly *et al.*, 1970), welche durch die Polymerase I wieder „repariert“ werden. Dies geschieht durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase I, welche die Nukleotide vom 5'-Ende aus in Richtung 3'-Ende ausschneidet, ersetzt und am 5'-Ende korrekt verkettet. Bei diesem Schritt wird das Nukleotid Biotin-16-dUTP in die DNA-Sonde eingebaut. Der Bruch wird also nicht verschlossen, sondern verschoben (daher der Name *nick translation*).

Als Template DNA dient das in 3.1.1 gewonnene DNA-Pellet. Als Reaktionsansatz wird in ein

Eppendorf-Tube pipettiert:

Template DNA	ca. 500 ng
10 × Nick Translationspuffer	4,0 µl
dNTP-Mix (1mM)	6,0 µl
Biotin-16-dUTP (1mM)	1,2 µl
DNA-Polymerase I (5U/µl)	0,5 µl
DNase I-Gebrauchslösung	1,3 µl
	ad 40,0 µl mit Ampuwa

Diesen Ansatz gut gemischt im Kryostat (14°C) für 2 Stunden inkubieren. Für einen anschließenden Dot-Blot zur Kontrolle des Biotin-Einbaus 2µl des Nicktranslation-Ansatzes abnehmen, die Reaktion der restlichen 38 µl durch Aufbewahrung bei -20°C stoppen.

- Die nach der Inkubation entnommenen 2 µl Ansatz mit dH₂O in einer Verdünnungsreihe (unverdünt, 1:10, 1:100, 1:1000) ansetzen, je 1µl davon auf einen Nitrozellulosefilter auftragen („blotten“) und durch UV-Strahlung (Crosslinker) fixieren.
- Filter 5 min bei RT in Dot-Blot-Puffer I (9:1 mit Blockinglösung) auf dem Schüttler inkubieren.
- Filter für 15 min bei RT in Dot-Blot-Puffer II (Dot-Blot-Puffer I und Blockinglösung 9:1 gemischt mit 10000:1 Streptavidin-alkaline-Phosphatase) auf dem Schüttler inkubieren.
- Filter 2 x 5 min in Dot-Blot-Puffer I auf dem Schüttler waschen.
- Filter 3 min in Dot-Blot-Puffer III unter Schütteln inkubieren.
- Filter in BCIP/NBT-Lösung lichtgeschützt für 1 h inkubieren.
- Filter mit 2 x SSC spülen und dann trocknen lassen.

Wurde das Biotin erfolgreich in die DNA-Sonde eingebaut, kann das Streptavidin daran binden; die Streptavidin-alkaline-Phosphatase setzt durch Phosphorylierung die BCIP/NBT-Lösung in einen braunen Niederschlag um. Ist zumindest bei der 1:100-Verdünnung noch eine Farb-reaktion zu sehen, kann die Nicktranslation erfolgreich für eine FISH eingesetzt werden.

Preannealing der Sonde

Zur Suppression unspezifischer Hybridisierungen wird die Sonde mit so genannter Kompetitions-DNA gemischt, welche vor der Hybridisierung (FISH) deren repetitive Sequenzen absättigt. Später können ausschließlich nicht abgesättigte Zielsequenzen der Sonde an die komplementären Basen der Chromosomen binden; so werden die Hintergrundsignale minimiert. Für die Absättigung unspezifischer Sequenzen der Sonde wird Lachssperm-DNA verwendet; für die hochrepetitiven Sequenzen wird CoT-1-DNA in Fragmentlängen zwischen 250–500 bp zugegeben.

- Die restlichen 38 µl Hybridisierungs-Ansatz werden mit 8 µl Lachssperm-DNA und 12 µl CoT-1-DNA gemischt.
- Danach werden 0,1 Vol 3 M NaAC (pH 5,7) und 2,5 Vol 100% Ethanol hinzu pipettiert.

- Bei -20°C fällt die DNA aus.
- Pro Objektträger werden 250-300 ng der mit Biotin-markierten, ausgefällten und mit Kompetitions-DNA versehenen Sonde 30 min bei 20000 rpm und 4°C zentrifugiert.
- Nach Abpipettieren des Überstandes wird das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut 10 Minuten zentrifugiert, dann Überstand abnehmen und das Pellet trocknen lassen.
- 5 μl Formamid (100 %ig) zufügen, mischen und bei 37°C für 30 Minuten inkubieren.
- 5 μl Mastermix zufügen, mischen und bei 95°C für 5 Minuten denaturieren. Sofort auf Eis abkühlen und abzentrifugieren.
- Die denaturierte Sonde wird für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Jetzt sättigt die hinzugefügte Kompetitions-DNA die unspezifischen und hochrepetitiven Sequenzen der Sonde ab. Danach kurz abzentrifugieren.

3.3.3 Hybridisierung

- Die vorbehandelten OT werden in einer Kammer liegend angeordnet. Durch befeuchtete Einweg-Tücher werden die OT vor dem Austrocknen bewahrt.
- 10 μl des Hybridisierungsansatzes auf den OT pipettieren. Mit einem 24×24 mm oder 40×22 mm großen Deckgläschen blasenfrei abdecken. Den Rand mit Fixogum versiegeln.
- Die OT mindestens 8 Stunden bei 37° in der feuchten Kammer hybridisieren lassen.

3.3.4 Waschschritte

Zur Entfernung fehlgepaarter und überschüssiger Sondenanteile werden im Anschluss an die Hybridisierung Waschungen durchgeführt. Um eine gleichmäßige Verteilung der Waschlösungen zu erzielen, erfolgen die folgenden Schritte unter ständigem Schütteln.

- Die Deckgläschen und das Fixogum mit der Pinzette von den OT entfernen.
- OT 3×5 Minuten in einer Küvette mit Formamid-Waschlösung bei 50°C waschen. Dabei nach jeweils 5 min die Formamidlösung erneuern.
- OT 5×2 Minuten in $2\times\text{SSC}$ bei 50°C waschen. Nach jeweils 2 min die Lösung erneuern.
- OT 3×5 Minuten in $0,1\times\text{SSC}$ bei 66°C waschen. Nach jeweils 5 min die Lösung erneuern.
- OT 2×5 Minuten in $4\times\text{SSC}/0,1\%$ Tween bei 50°C spülen. Nach jeweils 5 min die Lösung erneuern. Danach kurz abtropfen lassen.

3.3.5 Detektion der Biotin-markierten Sonden

Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden, sollten alle folgenden Schritte unter Lichtausschluss geschehen, sowohl die Inkubations- als auch die Waschschritte. Im Licht notwendige Arbeiten sind so schnell wie möglich durchführen.

- Je OT 500 μl Blocking-Lösung auftragen, in der feuchten Kammer 10 Minuten bei RT inkubieren lassen; bei diesen Schritt werden unspezifische Bindungen abgesättigt.

- Blocking-Lösung kurz abtropfen lassen und je OT 100 µl Avidin-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Gebrauchslösung auftragen. Mit 24×24 mm oder 40×22 mm großen Deckgläschen blasenfrei abdecken und in der feuchten Kammer vor Licht geschützt 30 Minuten bei 37°C inkubieren lassen.
- Deckgläschen entfernen und OT 4×5 Minuten in 4×SSC/0,1% Tween bei 50°C waschen. Dabei nach jeweils 5 Minuten die Lösung erneuern.

Die folgenden Schritte dienen der Verstärkung der Fluoreszenzsignale:

- Je OT 500 µl Blocking-Lösung auftragen, in feuchter Kammer 10 Minuten bei RT inkubieren lassen.
- Blocking-Lösung kurz abtropfen lassen und je OT 100 µl biotinylierte Anti-Avidin D (BAAD)-Gebrauchslösung auftragen. Mit Deckgläschen blasenfrei abdecken und in der feuchten Kammer vor Licht geschützt 30 Minuten bei 37°C inkubieren lassen.
- Deckgläschen entfernen und OT 4×5 Minuten in 4×SSC/0,1% Tween bei 50°C waschen.
- Je OT 500 µl Blocking-Lösung auftragen, in der feuchten Kammer 10 Minuten bei RT inkubieren lassen.
- Blocking-Lösung kurz abtropfen lassen und je OT 100 µl Avidin-FITC-Gebrauchslösung auftragen. Mit Deckgläschen blasenfrei abdecken und in der feuchten Kammer lichtgeschützt 30 Minuten bei 37°C inkubieren lassen.
- Deckgläschen entfernen und OT 4×5 Minuten in 4×SSC/0,1% Tween bei 50°C waschen.
- OT vor Licht geschützt trocknen lassen.

Vor allem für kleinere Sonden kann ein weiterer Verstärkungsschritt notwendig werden.

Gegenfärbung der Chromosomen

Die Gegenfärbung dient der Visualisierung der Chromosomen. Es wird das Fluorochrom DAPI (4'-6'-Diamidino-2-phenylindol) verwendet. Dieses interkaliert in die DNA und erzeugt aufgrund seiner hohen Affinität zu AT-Sequenzen eine Chromosomenbänderung, die wechselseitig etwa der G-Bänderung nach Trypsinverdau und Giemsa-Färbung entspricht. Auch Propidiumjodid interkaliert in die DNA, hat jedoch im Gegensatz zu DAPI einen anderen Spektralbereich.

- Je OT 30 µl Propidiumjodid-4'-6'-Diamidino-2-phenylindol-Gebrauchslösung auftragen
- Mit einem 24×24 mm oder 40×22 mm großen Deckgläschen blasenfrei abdecken, überschüssige Flüssigkeiten unter Deckglas herauslaufen lassen.
- Deckglas rundherum mit Nagellack verschließen.

Die Fluoreszenzsignale auf den OT sind vor Licht geschützt bei 4 °C gelagert mehrere Wochen sichtbar.

Auswertung der Signale am Fluoreszenzmikroskop

Die OT werden mit einem Zeiss Axioplan2 Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zunächst werden die Metaphasen in 100-facher Vergrößerung aufgesucht und in 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl betrachtet, hierbei werden die Vollzähligkeit der Chromosomen und ihre Morphologie untersucht.

Die Fluorescein-, die 4'-6-Diamidino-2-phenylindol- und die Propidiumiodid-Signalfärbung sowie Kombinationen aus diesen können mittels verschiedenen Filtersystemen sichtbar gemacht werden. Vollständige Metaphasen werden mit der CCD-Kamera fotografiert und mit der Software ISIS 3 bearbeitet und digital gespeichert.

Abb. 2 zeigt, welche unterschiedlichen Signale detektiert und interpretiert werden können:

Das humane Insert, welches sich im BAC-Vektor befindet, wird durch die Nick-Translation fragmentiert und mit einer Biotin-Markierung versehen. Die untersuchten Chromosomen zeigen schematisch folgende Fälle:

- (a) Die dem BAC-Insert entsprechende Sequenz des Chromosoms ist vollständig vorhanden. Das bedeutet, dass über die gesamte Länge der Sequenz hinweg Biotin-markierte Fragmente auf dem Chromosom binden können, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können; das Signal ist in diesem Fall deutlich sichtbar.
- (b) Ist die komplementäre Sequenz im Chromosom dagegen teilweise deletiert, können sich nur an den noch vorhandenen Basen Fragmente anlagern. Die Ausdehnung der Biotin-markierten Sequenz ist geringer als bei (a), daher ist das detektierbare Signal zwar deutlich sichtbar, aber quantitativ kleiner.
- (c) Wenn die komplette dem BAC-Insert entsprechende Sequenz des Chromosoms deletiert ist, haben die Biotin-markierten Fragmente keine Möglichkeit zur Bindung am Chromosom. Daher kann kein Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Die Schlussfolgerung ist, dass bei Abwesenheit von Signalen die zum BAC-Insert komplementäre Sequenz am Chromosom deletiert ist, bei Vorhandensein von Signalen diese Sequenz komplett oder teilweise vorhanden ist (jeweils vorausgesetzt, dass die Bindung der Biotin-markierten Fragmente an die DNA und ihre Markierung mit Fluoreszenz optimal erfolgt ist).

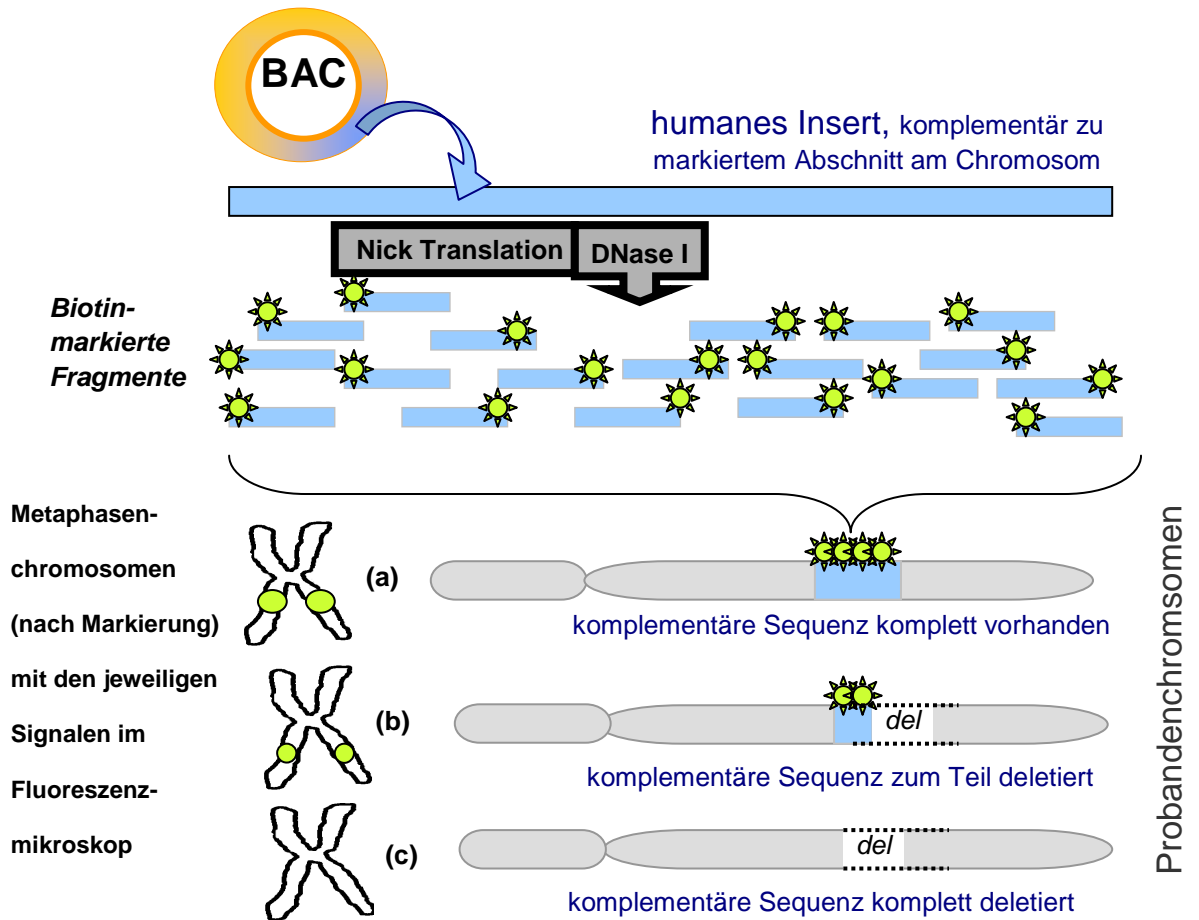


Abb. 2: Die in den BAC inserierte humane Sequenz bindet spezifisch an die Chromosomen.

(a) Signal vollständig ausgeprägt, da kein Sequenzverlust am Probandenchromosom.

(b) Teile des Probandenchromosoms sind deletiert, daher Signal vermindert (i.e.S. kleiner) detektierbar.

(c) Komplette Sequenz auf Probandenchromosom deletiert, kein Fragment kann binden, daher kein Signal detektierbar.

Abb. schematisch, Größenverhältnisse nicht berücksichtigt

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Charakterisierung der Bruchpunktregionen aberranter Bereiche am Chromosom 15 zu den unter 4.1 und 4.2 beschriebenen Probanden durchgeführt. Die zu Beginn der Arbeit vorliegenden Befunde der zytogenetischen Untersuchung mittels G-Banding (Shaffer, 1997), welche im Rahmen der Abklärung der Dysmorphiesyndrome angefertigt wurden, erlaubten eine erste Orientierung hinsichtlich der Loci. Da diese Methode nur gering auflöst (etwa 2-5 Mb), standen im Mittelpunkt der im Folgenden dargestellten Ergebnisse die molekulargenetischen Analysen zur Eingrenzung der jeweiligen Bruchpunkte mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH).

4.1 Kasuistik I: Die Probandin 1

Bei der Probandin 1, die zur Abklärung ihres unklaren Dysmorphiesyndroms in der genetischen Beratungsstelle des Instituts für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgestellt wurde, wurde eine Deletion von Chromosom 15 im Bereich der Banden q11-q13 festgestellt.

Die Vorstellung der Probandin erfolgte im Rahmen eines humangenetischen Konsils bereits in der Perinatalperiode wegen muskulärer Hypotonie.

Die Probandin ist das erste Kind klinisch unauffälliger, nicht verwandter Eltern. Während der Schwangerschaft bestand Nikotinabusus. Die Probandin wurde in der 38.+1. Schwangerschaftswoche aus Beckenendlage entbunden. Das Geburtsgewicht mit 2100 g (< 3. Perzentile), die Körpergröße bei 45 cm und der Kopfumfang bei 33 cm lagen unter der 25. Perzentile.

Bei einer ersten humangenetischen Betrachtung am zweiten Lebenstag fielen morphologisch ein kleiner Gesichtsschädel, schmales Lippenrot mit verstrichenem Philtrum, Retrognathie und tief ansetzende Ohren mit Ohrmuscheldysplasie, tiefer Stirnhaaransatz, mandelförmige Augen, kurze Zehen und Finger sowie eine Antepositio ani auf. Es wurde eine muskuläre Hypotonie festgestellt, Saug- und Schluckreflexe waren vermindert, infolgedessen fiel eine Trinkschwäche auf. Weiterhin bestand ein persistierender Ductus arteriosus Botalli (PDA). Wegen eines Mekoniumileus und eines *small left colon*-Syndroms wurde postnatal ein Ileostoma angelegt.

Entwicklungsdiagnostische Tests zeigten eine Retardierung der Motorik und des Sprach- und Sozialalters. Im Alter von etwa drei Jahren kam es bei der Probandin zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme, das Körpergewicht liegt seitdem über der 97. Perzentile.

In Alter von fünf Jahren war die Sprachentwicklung bis auf weiteres stark retardiert (5 Worte).

In der zytogenetischen Routineuntersuchung fiel bei der Probandin eine interstitielle Deletion der Banden q11.2-q13 an einem Chromosom 15 auf, die Untersuchung der Eltern erbrachte ein unauffälliges Ergebnis. Da die Region deletiert war, welche typischerweise beim Prader-Willi Syndrom (PWS) betroffen ist, wurde der Verdacht auf ein atypisches Prader-Willi Syndrom geäußert.

Abb. 3 zeigt den Stammbaum der Familie, die mit Pfeil gekennzeichneten Personen standen für eine zyto- und molekulargenetische Analyse zur Verfügung.

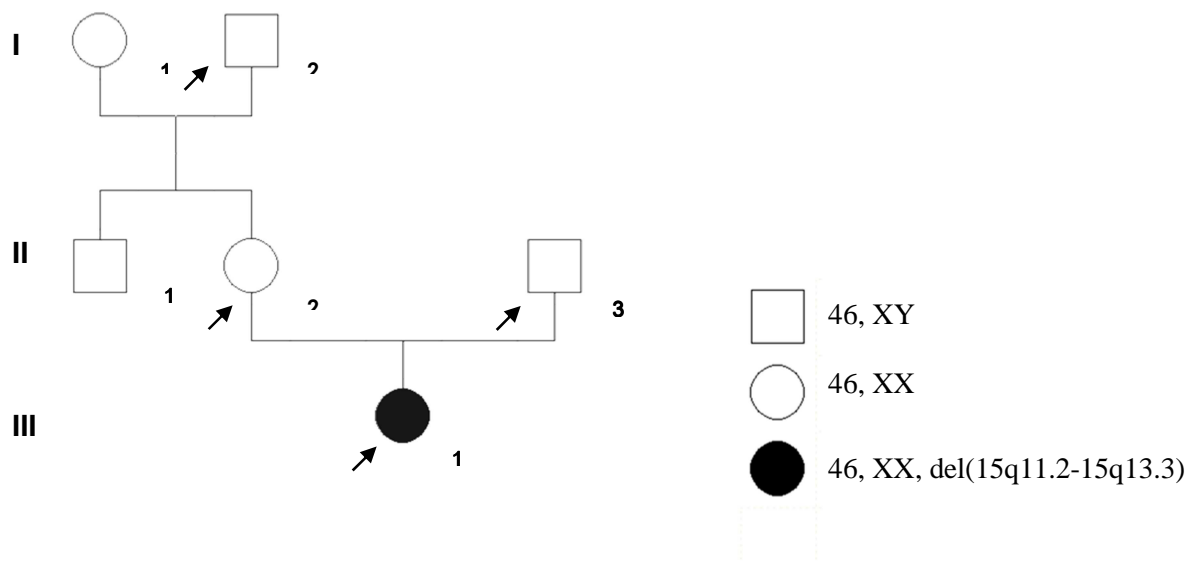


Abb. 3: Stammbaum der Probandin 1 (III, 1)

Das Stammbaumschema zeigt in drei Generationen jene Personen, deren Phänotyp bekannt ist. Von den mit Pfeilen markierten Personen stand Vollblut zur Analyse zur Verfügung.

4.1.1 Deletion bei der Probandin 1

Als Ergebnis der zytogenetischen Untersuchungen wurde bei der Probandin 1 eine *de novo* entstandene interstitielle Deletion der Banden q11.2-q13 an einem Chromosom 15 festgestellt. Auf Abb. 4 sind die gebänderten Chromosomen 15 und die entsprechenden Ideogramme dargestellt. Im Ideogramm ist hervorgehoben, welcher Abschnitt des unauffälligen Chromosoms 15 beim derivativen Chromosom 15 betroffen ist.

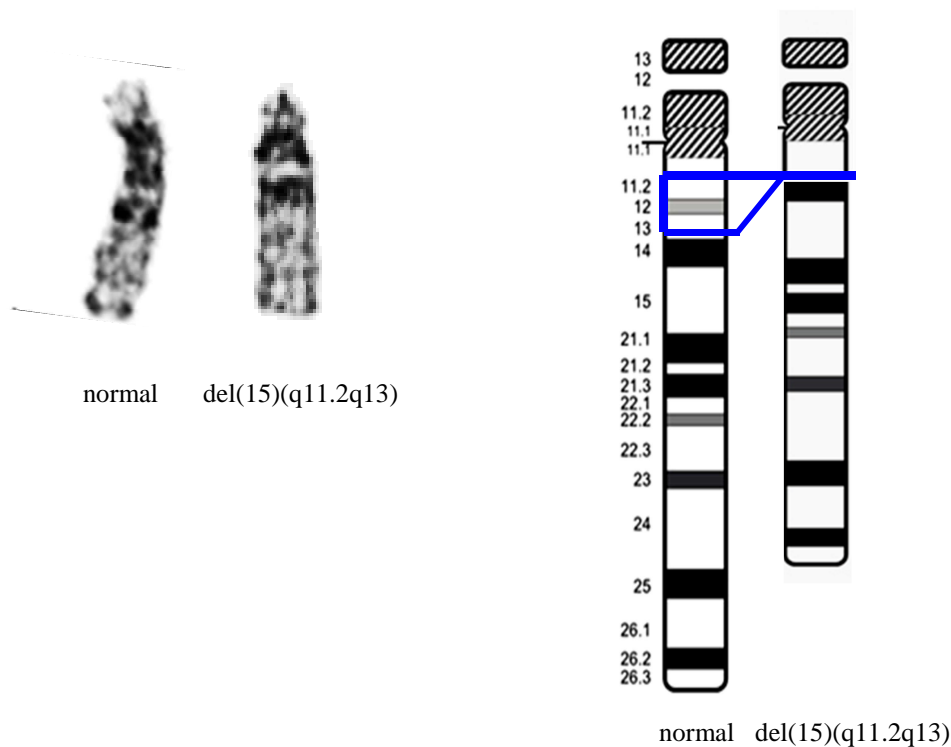


Abb. 4: G-Banding im 550-Bandenstadium und Ideogramm der Chromosomen 15 bei der Probandin 1. Das deletierte Chromosom befindet sich jeweils rechts. Zytogenetisch wird der Chromosomensatz der Probandin als 46,XX, del(15)(q11.2q13) de novo angegeben.

Da die zytogenetische Untersuchung bei Aberrationen lediglich bis auf die Ebene einzelner Banden mögliche Bruchpunkte identifizieren kann, geschah die weitere Eingrenzung der vorliegenden Bruchpunkte mittels FISH. Dafür wurden ausschließlich BAC-Klone verwendet, da sich diese aufgrund einer mittleren Insertgröße von 150 – 180 kb für eine Hybridisierung an Metaphasechromosomen sehr gut eignen.

Die Auswahl der BAC-Klone erfolgte durch eine *in silico* Analyse der deletierten Region. Dafür wurde die Online-Datenbank der *University of California, Santa Cruz* (UCSC, <http://genome.ucsc.edu>) verwendet, die den Service eines *Genome Browsers* anbietet, mit dessen Hilfe es möglich ist, Sequenzdaten des humanen Genoms sowie ständig aktualisierte Versionen zytogenetischer, genetischer und physikalischer Karten einzusehen. In diesem *Genome Browser* sind die BACs anhand ihrer Anfangs- und Endsequenzen lokalisiert und graphisch als *Contig* sich überlappender Klone dargestellt. Die Start- und Endsequenzen beziehen sich dabei auf das Telomer des p-Armes als Nullpunkt, die Entfernung hiervon wird in Basenpaaren (bp) angegeben.

Ausgehend von der zytogenetischen Analyse werden verschiedene BACs ausgewählt, welche den mutmaßlichen Bruchpunkt von distal und proximal eingrenzen.

4.1.2 Analyse des proximalen Bruchpunktes der Deletion

Zur genaueren Charakterisierung des in der Bande 15q11.2 festgelegten Bruchpunktes standen insgesamt 8 BAC-Klone zur Verfügung (siehe Tab. 1).

Tab. 1: BAC-Klone, die zur Charakterisierung des proximalen Bruchpunktes verwendet wurden

RZPD – Name	Name	Start	Ende	Lokalisation
RPCIB 753P06135Q8	RP11-135P6	18419710	18576834	15q11.2
RPCIB 753P14701Q8	RP11-701P14	20817423	21003113	15q11.2
RPCIB 753L05795Q	RP11-795L5	21117261	21206778	15q11.2
RPCIB 753L03483Q	RP11-483L3	21192515	21382845	15q11.2
RZPDB 737B072027D	RP11-73C9	21309498	21438847	15q11.2
RPCIB 753G171061Q	RP11-1061G17	21378851	21558886	15q11.2
RPCIB 753I19243Q	RP11-243I19	21865247	22180113	15q11.2
RPCIB 753C221071Q	RP11-1071C22	22601976	22822028	15q11.2

Die in Tabelle 1 aufgeführten BAC-Klone wurden entsprechend 3.1.1 vorbereitet und auf Metaphasenchromosomen der Probandin hybridisiert. Nach den Gegenfärbungen der Präparate wurden die Fluoreszenzsignale am Mikroskop mit Hilfe der ISIS 3 Computersoftware ausgewertet. Dazu wurden jeweils 50 Metaphasen sowohl auf die Vollständigkeit des Chromosomensatzes als auch auf die korrekte Lage der Signale hin untersucht. Zeigten sich bei der Analyse der Metaphasen auf beiden Chromosomen 15 spezifische Signale, so wurden die jeweiligen Regionen bzw. die dort hybridisierenden BAC-Klone als „nicht deletiert“ beurteilt. Wenn nur auf einem Chromosom Signale erschienen, wurde diese Region bzw. die entsprechenden BAC-Klone als „deletiert“ gewertet, sofern dies in allen analysierten Metaphasen der Fall war. Die Unterscheidung der beiden Chromosomen 15 von anderen akrozentrischen Chromosomen der Gruppe D gelang mithilfe des charakteristischen DAPI-Bandenmusters sowie bei den deletierten Chromosomen durch ihre veränderte Größe.

Im Folgenden sind Beispiele der Hybridisierungen auf den Chromosomen der Probandin 1 zur Analyse des proximalen Bruchpunktes ihrer Deletion dargestellt.

Abb. 5 zeigt Hybridisierungen mit den BAC-Klonen RP11-135P6, RP11-701P14, RP11-795L5 und RP11-483L3. Es sind spezifische Signale auf jeweils beiden Chromosomen 15 knapp unterhalb des Zentromers zu erkennen, sowohl auf dem unauffälligen als auch auf dem veränderten. Damit sind die Zielsequenzen dieser BAC-Klone als „nicht deletiert“ zu werten.

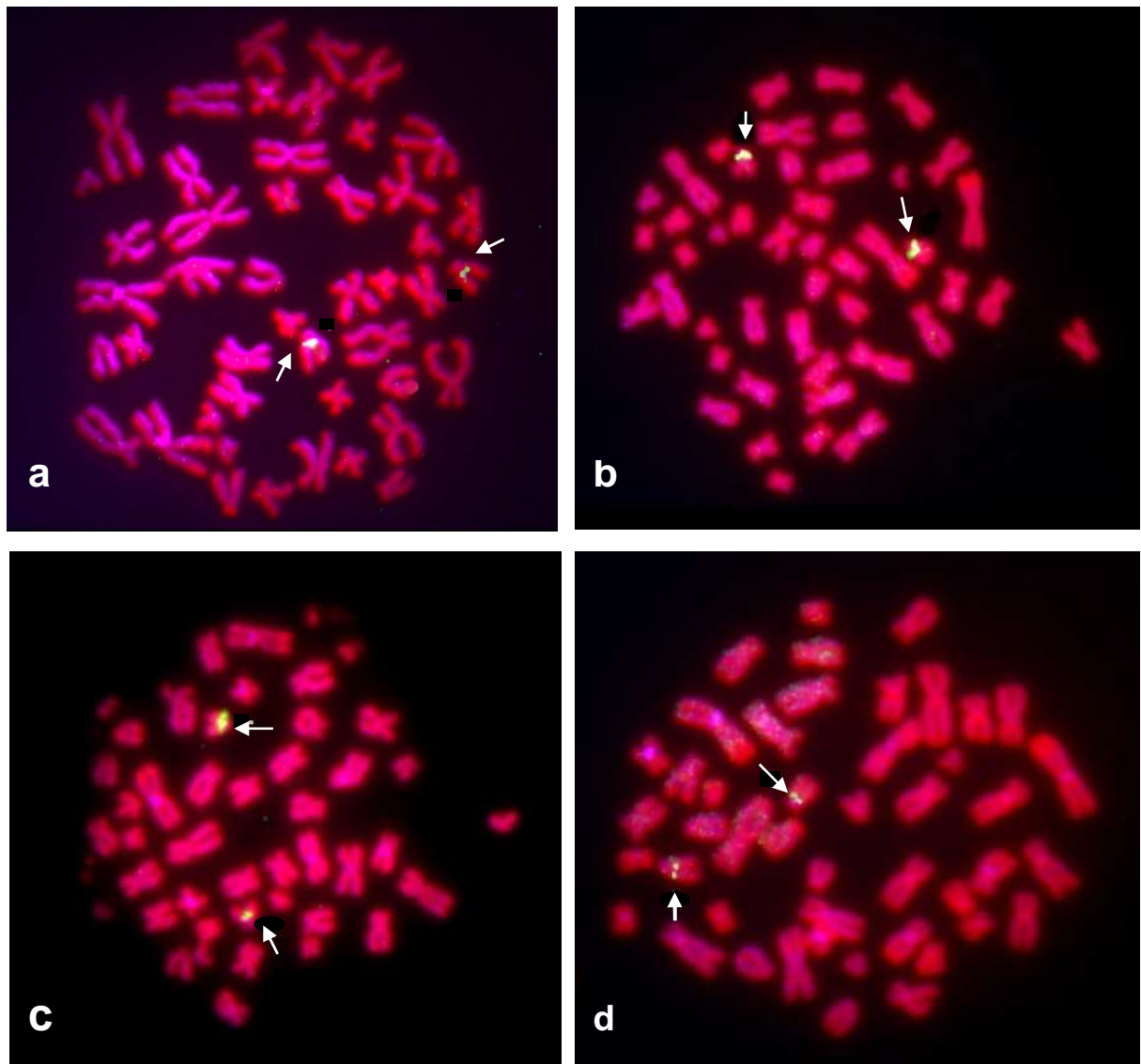


Abb. 5: FISH mit den BAC-Klonen (a) RP11-135P6, (b) RP11-701P14, (c) RP11-795L5 und (d) RP11-483L3 an Metaphasen der Probandin. Die Pfeile deuten auf die Chromosomen 15 mit detektierbaren Fluoreszenz-Signalen.

Im Gegensatz dazu sind in Abb. 6 bei Hybridisierungen mit den BAC-Klonen RP11-73C9, RP11-1061G17, RP11-243I19 und RP11-1071C22 Signale nur auf dem unauffälligen Chromosom 15 zu erkennen. Bei keinem dieser BAC-Klone wurden Signale auf dem deletierten Chromosom 15 detektiert. Somit gelten die den Zielsequenzen dieser BAC-Klone entsprechenden Chromosomenabschnitte als „deletiert“.

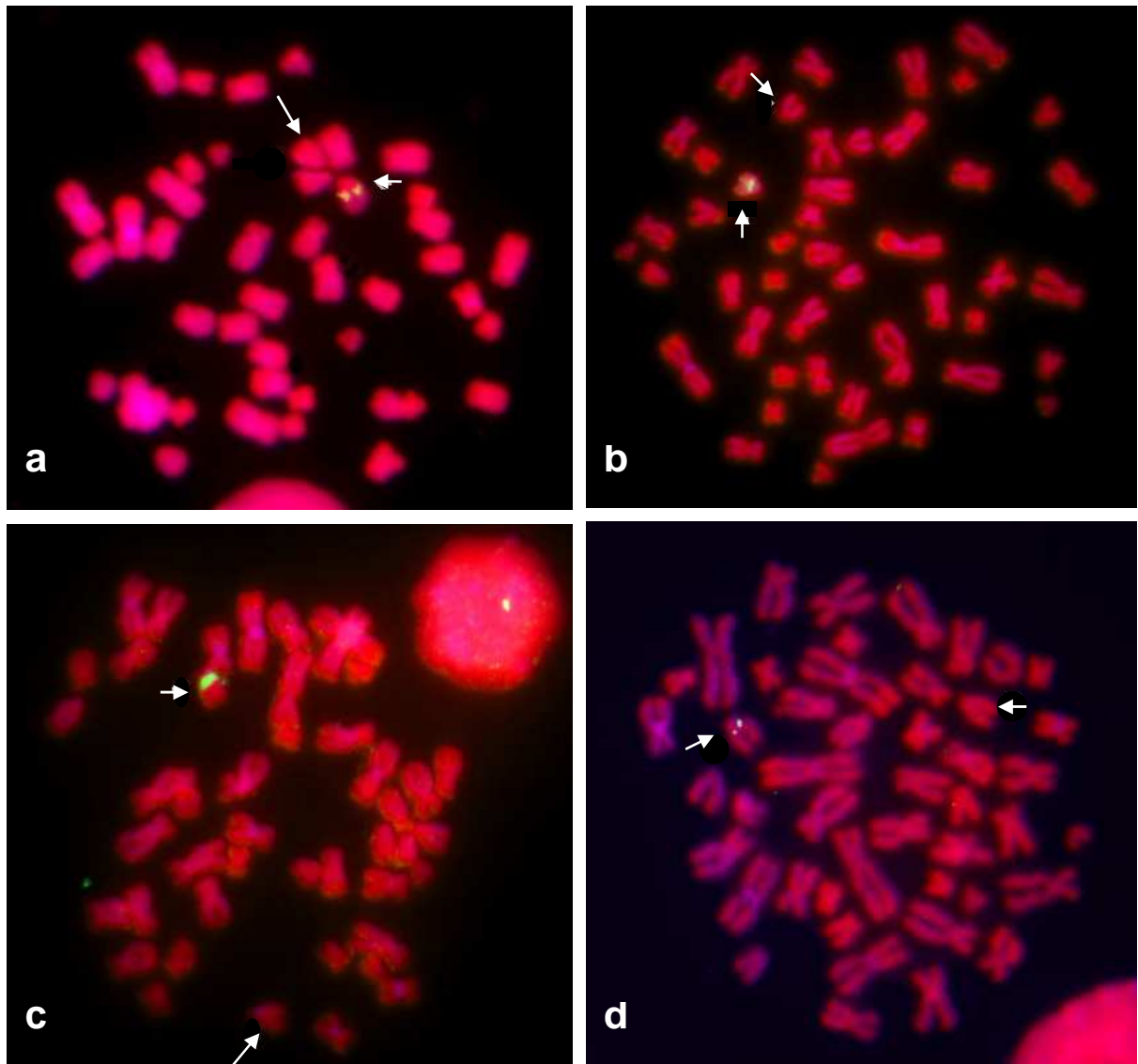


Abb. 6: FISH mit den BAC-Klonen (a) RP11-73C9, (b) RP11-1061G17, (c) RP11-243I19 und (d) RP11-1071C22 an Metaphasen der Probandin. Die Pfeile deuten auf die Chromosomen 15, wobei jeweils nur auf dem unauffälligen Chromosom 15 Fluoreszenz-Signale erscheinen.

4.1.3 Identifizierung und Darstellung der proximalen Bruchpunktregion

Die Ergebnisse der FISH-Analyse für die Charakterisierung des proximalen Bruchpunktes sind in Tab. 2 sowie in der Abb. 7 zusammengefasst.

Von den insgesamt für die Bruchpunktanalyse eingesetzten 8 BAC-Klonen stellten sich 4 als „nicht deletiert“ mit Signalen auf beiden Chromosomen 15 dar. Bei den restlichen 4 BAC-Klonen wurde hingegen nur auf einem Chromosom 15 ein spezifisches Signal detektiert. Diese BAC-Klone gelten daher als „deletiert“. Der proximale Bruchpunkt wird somit auf den Bereich eingegrenzt, in dem die beiden Klone RP11-483L3 und RP11-73C19 liegen.

Tab. 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der FISH-Analyse bei der Probandin 1 zur Charakterisierung der proximalen Bruchpunkt-Region

Name	Lokalisation	FISH-Ergebnis bei der Probandin 1
RP11-135P6	15q11.2	nicht deletiert
RP11-701P14	15q11.2	nicht deletiert
RP11-795L5	15q11.2	nicht deletiert
RP11-483L3	15q11.2	nicht deletiert
RP11-73C9	15q11.2	deletiert
RP11-1061G17	15q11.2	deletiert
RP11-243I19	15q11.2	deletiert
RP11-1071C22	15q11.2	deletiert

Diese beiden in Bande 15q11.2 liegenden Klone decken einen 246 kb großen Chromosomenabschnitt ab und überlappen in einem Teilbereich von 73 kb (vgl. Abb. 7).

Da bei einer FISH-Analyse davon auszugehen ist, dass lediglich Sonden einer Größe von ca. ≥ 10 kb ein nachweisbares Fluoreszenzsignal ergeben, wird der Bruchpunkt im zentromernahen, proximalen Teil der durch den BAC-Klon RP11-483L3 repräsentierten Chromosomenregion liegen, da die verbleibende Teilsequenz von maximal 125 kb ein sichtbares Fluoreszenzsignal auf beiden Chromosomen ergibt.

Nähme man einen weiter distal liegenden Bruchpunkt an, würde der BAC-Klon RP11-73C9 auf einem dann verbleibenden Teilabschnitt mit einer Länge von weniger ca. 10 kb hybridisieren, denn er bewirkt in der FISH kein sichtbares Fluoreszenzsignal.

In der zytogenetischen Untersuchung war der proximale Bruchpunkt des deletierten Bereichs der Probandin 1 ebenfalls in Bande 15q11.2 eingeordnet worden.

Abb. 7 zeigt die verwendeten BAC-Klone mit den überlappenden Bereichen und der Bruchpunktregion. Im oberen Teil sind sämtliche untersuchte BAC-Klone angegeben, der untere Teil zeigt nur die für die Analyse der proximalen Bruchpunkt-Region relevanten BAC-Klone.

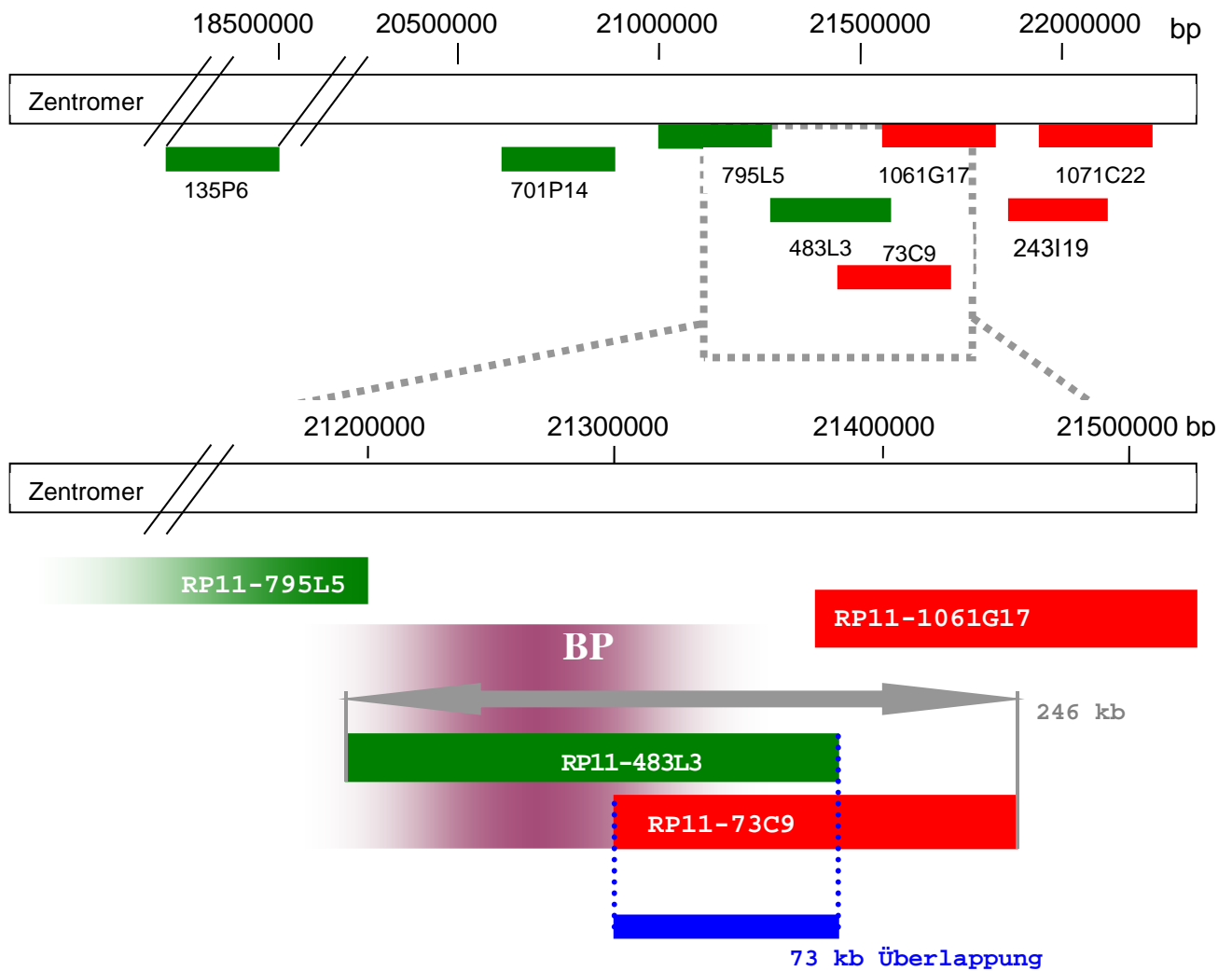


Abb. 7: Schematische Darstellung der zur Bruchpunktanalyse des proximalen Bruchpunktes ausgewählten BAC-Klone. Die proximale Bruchpunktregion mit den eingrenzenden BAC-Klonen RP11-483L3, -73C9 und -1061G17 ist dabei als Ausschnitt gezeigt. Deletierte BAC-Klone sind rot, nicht deletierte Klone sind grün dargestellt, der Teilbereich von 73 kb, in dem die angrenzenden BAC-Klone überlappen, ist blau gefärbt. Die Entfernung zum Telomer des p-Arms als Nullpunkt ist zur Orientierung in Basenpaaren (bp) angegeben. Der Bruchpunkt wird in der violetten Bruchpunktregion (BP) lokalisiert.

4.1.4 Analyse des distalen Bruchpunktes der Deletion

Durch die zytogenetischen Voruntersuchungen war der distale Bruchpunkt schon auf die Bande 15q13 festgelegt worden. Um den distalen Bruchpunkt näher zu charakterisieren, wurden 8 BACs ausgewählt (vgl. Tab. 3). Die Auswahl geschah analog zu den Kriterien in 4.1.

Tab. 3: BAC-Klone, die zur Charakterisierung des distalen Bruchpunktes verwendet wurden

RZPD – Name	Name	Start	Ende	Lokalisation
RPCIB 753H22958Q8	RP11-958H22	28744860	28947109	15q13.2
RZPDB 737B102117D	RP11-413D22	30407460	30575370	15q13.3
RPCIB 753M05242Q	RP11-242M5	30488306	30658880	15q13.3
RPCIB 753B06420Q	RP11-420B6	30654133	30830813	15q13.3
RPCIB 753E131008Q	RP11-1008E13	30774167	30966453	15q13.3
RZPDB 737A092027D	RP11-74D7	31856427	32019252	15q14
RPCIB 753N12806Q2	RP11-806N12	32466174	32687997	15q14
RZPDB 737A042016D	RP11-37C7	37765617	37934861	15q14/15q15.1

Die in Tabelle 3 aufgeführten BAC-Klone wurden entsprechend 3.1.1 vorbereitet und auf Metaphasenchromosomen der Probandin hybridisiert. Anschließend wurden sie - wie in 4.1.2 beschrieben - analysiert.

Im Folgenden sind Beispiele der Ergebnisse der Hybridisierungen auf den Chromosomen der Probandin 1 zur Analyse des distalen Bruchpunktes ihrer Deletion dargestellt.

Abb. 8 zeigt in Hybridisierungen mit den BAC-Klonen RP11-958H22 und RP11-413D22 Signale nur auf dem unauffälligen Chromosom, die Fluoreszenz-Signale liegen jeweils im proximalen Abschnitt des q-Arms von Chromosom 15. Bei keinem dieser BAC-Klone wurden dagegen Signale auf dem deletierten Chromosom 15 detektiert. Somit gelten diese BAC-Klone als „deletiert“.

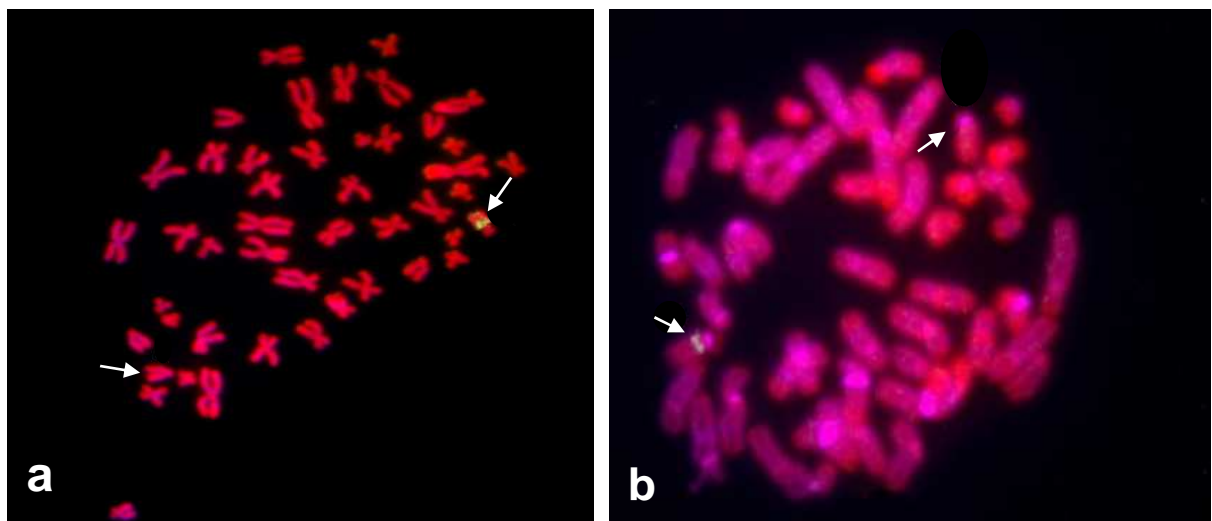


Abb. 8: FISH mit den BAC-Klonen (a) RP11-958H22 und (b) RP11-413D22 an Metaphasen der Probandin. Die Pfeile deuten auf die Chromosomen 15, wobei lediglich auf dem unauffälligen Chromosom 15 Fluoreszenz-Signale erscheinen.

Mittels des BAC-Klons RP11-242M5 wurden spezifische Signale auf jeweils beiden Chromosomen 15, sowohl auf dem unauffälligen als auch auf dem veränderten Chromosom, detektiert (vgl. Abb. 9). Damit ist dieser BAC-Klon als „nicht deletiert“ einzustufen. Allerdings ist auf sämtlichen ausgewerteten Metaphasen zu erkennen, dass das Signal auf dem deletierten Chromosom 15 mit einer geringeren Intensität erschien als auf dem anderen. Daraus ist – allerdings nicht quantitativ – abzuleiten, dass nur ein Teil der Sequenz des BAC-Klons RP11-242M5 am deletierten Chromosom bindet (vgl. Abb. 2b) – der BAC ist Bruchpunkt überspannend.

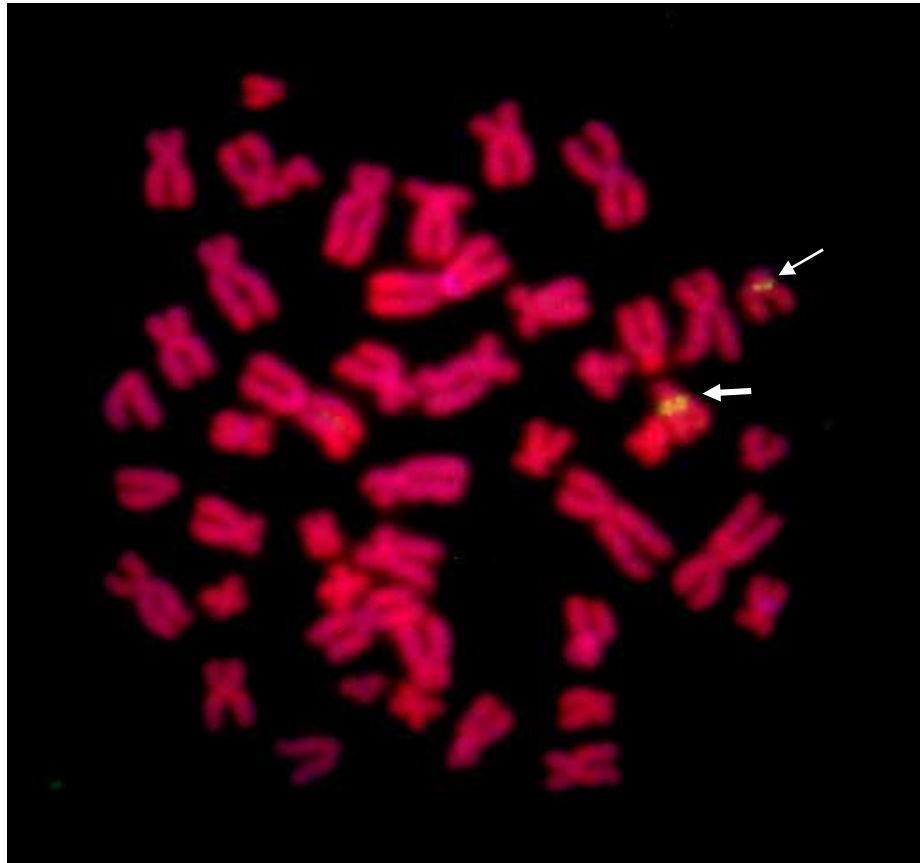


Abb. 9: FISH mit dem BAC-Klon RP11-242M5 auf einer Metaphase der Probandin. Die Pfeile deuten auf die beiden Chromosomen 15. Das oberhalb gelegene Signal auf Chromosom 15 erscheint im Vergleich zu dem unterhalb gelegenen von geringerer Intensität.

Abb. 10 dagegen zeigt, dass bei den Hybridisierungen mit den BAC-Klonen RP11-420B6, RP11-1008E13, RP11-74D7, RP11-806N12 und RP11-37C7 spezifische Signale auf jeweils beiden Chromosomen 15 zu erkennen sind, sowohl auf dem unauffälligen als auch auf dem deletierten. Damit sind diese BAC-Klone als „nicht deletiert“ zu werten.

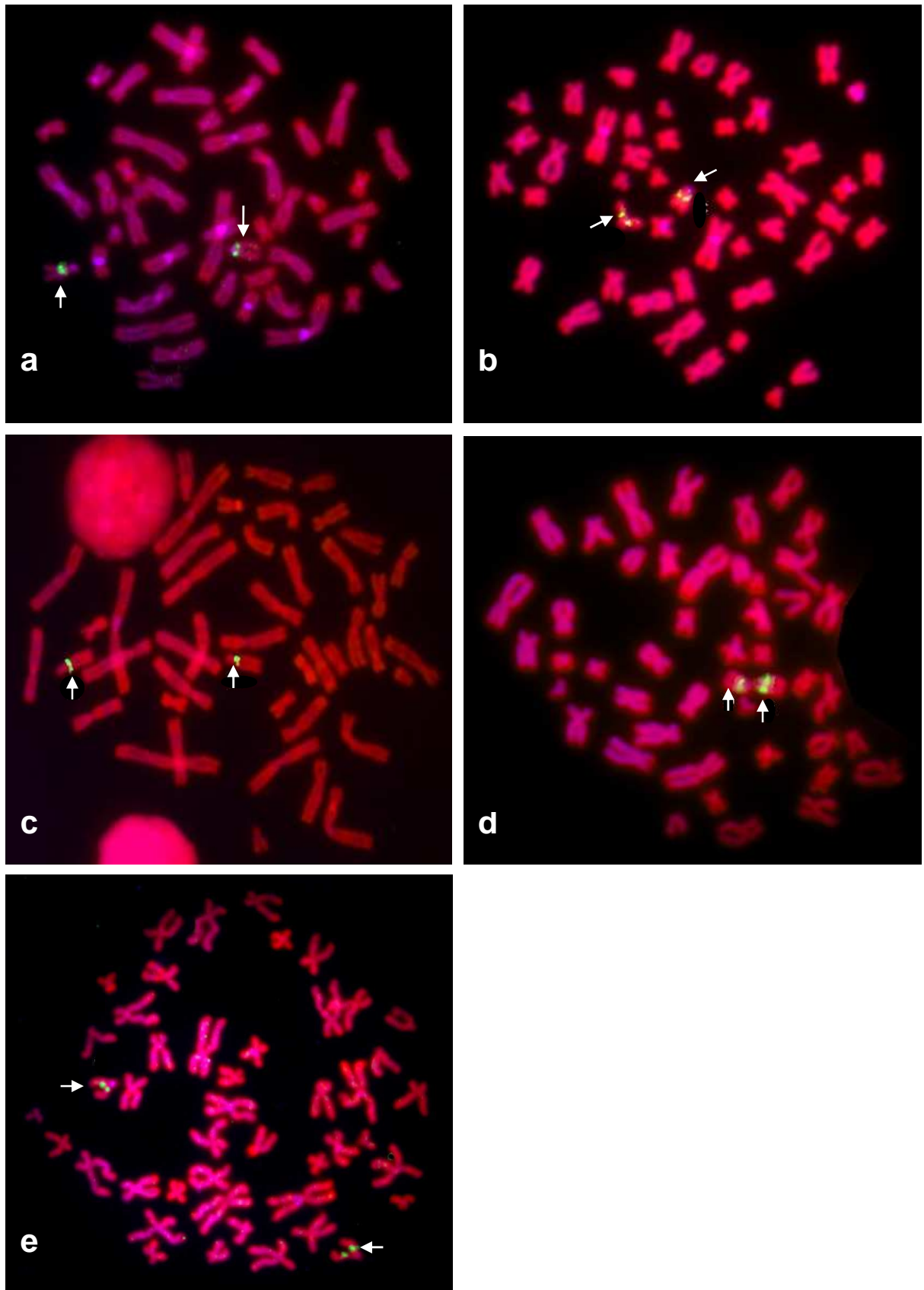


Abb. 10: FISH mit den BAC-Klonen (a) RP11-420B6, (b) RP11-1008E13, (c) RP11-74D7, (d) RP11-806N12 und (e) RP11-37C auf einer Metaphase der Probandin. Die Pfeile deuten auf die beiden Chromosomen 15 mit spezifischen Signalen auf jeweils beiden Chromosomen.

4.1.5 Identifizierung und Darstellung der distalen Bruchpunktregion

Die Ergebnisse der FISH-Analyse für die Charakterisierung des distalen Bruchpunktes sind in Tab. 2 sowie in der Abb. 11 zusammengefasst.

Von den insgesamt für die Bruchpunktanalyse ausgewählten 8 BAC-Klonen wurden zwei als „deletiert“ mit spezifischen Signalen nur auf einem Chromosom 15 und fünf BAC-Klone als „nicht deletiert“ mit Signalen auf beiden Chromosomen 15 gewertet. Ein BAC-Klon erwies sich als den Bruchpunkt überspannend. Der distale Bruchpunkt wird somit auf den Bereich eingegrenzt, in dem der Klon RP11-242M5 liegt. Er hat eine Gesamtlänge von etwa 170 kb (vgl. Abb.7). Tab. 4 fasst die Ergebnisse der FISH-Analyse mit den verwendeten BACs zusammen.

Tab. 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der FISH-Analyse bei der Probandin zur Charakterisierung der distalen Bruchpunkt-Region

Name	Lokalisation	FISH-Ergebnis bei der Probandin
RP11-958H22	15q13.2	deletiert
RP11-413D22	15q13.3	deletiert
RP11-242M5	15q13.3	Bruchpunkt überspannend
RP11-420B6	15q13.3	nicht deletiert
RP11-1008E13	15q13.3	nicht deletiert
RP11-74D7	15q14	nicht deletiert
RP11-806N12	15q14	nicht deletiert
RP11-37C7	15q14 - 15q15.1	nicht deletiert

Da bei einer FISH-Analyse unter den in dieser Arbeit gegebenen Bedingungen lediglich Sonden einer Größe von ca. ≥ 10 kb ein gut sichtbares Fluoreszenzsignal zeigen, ist davon auszugehen, dass der Bruchpunkt mindestens soweit im zentromerfernen, distalen Teil des BAC-Klons RP11-413D22 liegt, so dass eine ggf. verbleibende Teilsequenz mit einer Länge von weniger als ca. 10 kb kein sichtbares Fluoreszenzsignal mehr erzeugt. Vom Klon RP11-242M5 muss die verbleibende Teilsequenz von maximal 100 kb auf dem deletierten Chromosom auf einer Länge von ca. ≥ 10 kb hybridisieren, da sie ein gut sichtbares Fluoreszenzsignal ergibt. Das Fluoreszenzsignal auf dem deletierten Chromosom weist jedoch im Vergleich zum vollständig erhaltenen Signal auf dem unauffälligen Chromosom 15 eine geringere Intensität auf.

In der zytogenetischen Untersuchung war der proximale Bruchpunkt in Bande 15q13/q14 eingeordnet worden, lokalisiert wurde er durch die FISH-Methode nun in Bande 15q13.3.

Analog zur Abb. 7 zeigt Abb. 11 nur eine Auswahl der verwendeten BAC-Klone mit den überlappenden Bereichen und der Bruchpunktregion.

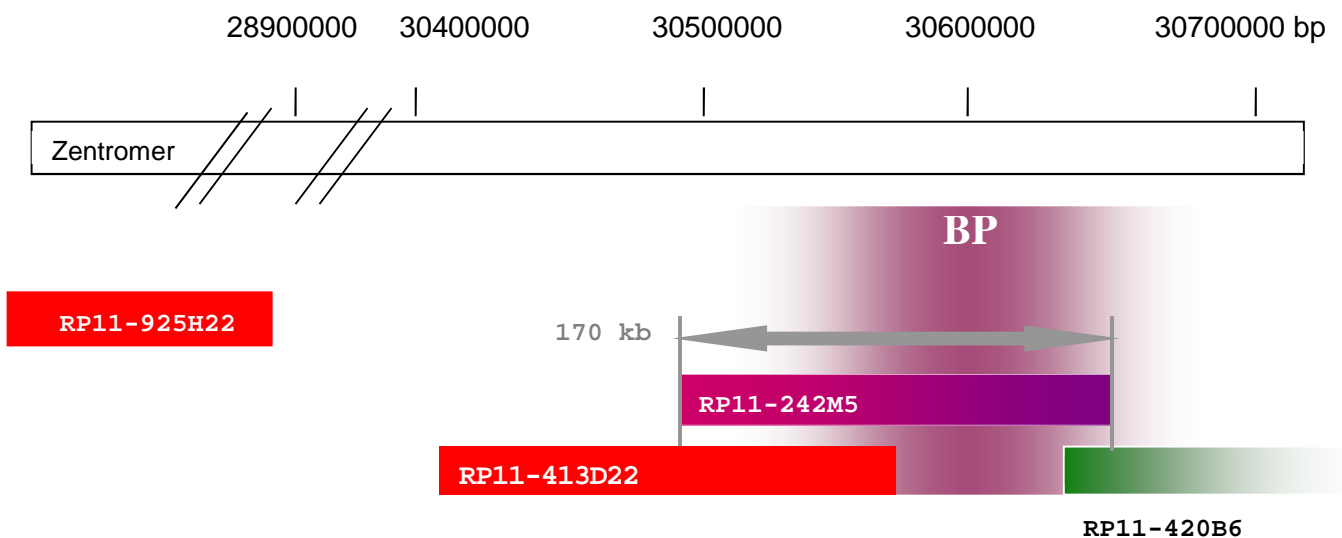


Abb. 11: Schematische Darstellung ausgewählter BAC-Klone im Bereich des distalen Bruchpunktes. Die BAC-Klone RP11-74D7, -806N12 und -37C7 sind der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt. „Deletierte“ BAC-Klone sind rot, „nicht deletierte“ Klone sind grün, der Bruchpunkt überspannende Klon violett markiert. Die Entfernung zum Telomer des p-Armes als Nullpunkt ist zur Orientierung in Basenpaaren (bp) angegeben. Der Bruchpunkt wird in der violetten Bruchpunktregion (BP) lokalisiert.

Die Gesamtgröße der durch die Bruchpunktregionen begrenzten Deletion beträgt etwa 9,3 Mb.

4.1.6 Mikrosatellitenanalyse der deletierten Region

Da der deletierte Chromosomenabschnitt bei der Probandin 1 die Prader-Willi-/Angelman-Region mit einschließt, wurde zur weiteren Abklärung eine Mikrosatellitenanalyse durchgeführt, welche aufdeckt, ob die Deletion das väterliche oder das mütterliche Allel betrifft.

Diese Unterscheidung ist von Interesse, da in dieser Region ein so genanntes Imprinting (Prägung) der Chromosomen stattfindet. Ist die paternale Region deletiert, kommt es zum Prader-Willi Syndrom; ist die maternale Region von der Deletion betroffen, ist dies mit der Angelman-Erkrankung assoziiert (Repetto, 2001; Horsthemke und Wagstaff, 2008).

Untersucht wurden die Probandin und beide Eltern auf bestimmte innerhalb und außerhalb des typischen Deletionsbereichs vorkommende Marker (Mikrosatelliten oder STRs (*short tandem repeats*)). Diese sind normalerweise im Organismus doppelt vorhanden, da sie durch beide Elternteile vererbt werden (Biallelie). Bei Verlust der Biallelie beispielsweise durch Deletion wird mittels Mikrosatellitenanalyse abgeleitet, ob das paternale oder maternale Allel vorhanden ist.

In Tabelle 5 ist eine Auswahl von typischerweise für die Diagnostik von Prader-Willi und Angelman Syndrom empfohlenen Markern (Berufsverband Medizinische Genetik e.V., Deutsche Gesellschaft für Humangenetik, 2001) aufgeführt. Angegeben ist jeweils deren Bezeichnung, der Locus auf Chromosom 15, die Verteilung der Allele bei der Probandin 1 und deren Eltern und das daraus resultierende Ergebnis der Mikrosatellitenanalyse: ein biallelisches Vorhandensein weist

auf eine Vererbung durch beide Elternteile hin. Existiert hingegen ein Marker nur monoallelisch beim Probanden, wurde dieser nur von einem Elternteil an das Kind weitergegeben. Kann nicht differenziert werden, ob ein Locus maternalen oder paternalen Ursprungs ist, wird das Ergebnis als „nicht informativ“ gewertet.

Die STS-Marker D15S156, D15S1048, D15S976, D15S1031, D15S1007 und D15S971 dienen dazu, den Bereich der Deletion einzugrenzen. D15Z1 zeigt spezifisch das Zentromer von Chromosom 15 an. Tabelle 5 zeigt das Ergebnis der Mikrosatellitenanalyse bei der Probandin 1.

Tab. 5: Genotypisierung mit spezifischen Mikrosatelliten für Chromosom 15 bei der Probandin 1

Mikrosatellitenmarker	Bande	Start- und Endsequenz	Probandin 1	Mutter	Vater	Ergebnis
D15Z1	15p11.2	Zentromer				biallelisch
D15S156	15q12-13.1	chr15: 25580600-25580939	B	B	AB	nicht informativ
D15S1048	15q13.1-13.2	chr15: 27656620-27656982	C	BC	AB	paternale Deletion
D15S976	15q13.3	chr15: 29339627-29339903	B	AB	A	paternale Deletion
D15S1031	15q13.3	chr15: 29875416-29875834	A	A	A	nicht informativ
D15S1007	15q14	chr15: 31524979-31525315	BC	AB	CD	pat. + mat. Allel
D15S971	15q14	chr15: 33171120-33171439	BC	C	AB	pat. + mat. Allel

Genotypen nach laborinterner Klassifizierung 2005; Recherche der Position 11/2009

Im konkreten Fall wurde eine Hemizygotie der Marker D15S1048 und D15S976 diagnostiziert, sie deckten eine Deletion des väterlichen Allels auf. Da bei der Probandin zumindest weiter distal gelegene Loci eine paternale Deletion belegen, wird davon ausgegangen, dass sämtliche Loci, bei denen durch Mikrosatellitenanalyse oder FISH ein monoallelischer Zustand diagnostiziert wurde, von einer Deletion des väterlichen Allels betroffen sind.

Abb. 12 zeigt, dass sowohl die für Prader-Willi Syndrom kritische Region in Bande 15q11.2 als auch weiter distal gelegene Banden in den deletierten Bereich mit eingeschlossen waren.

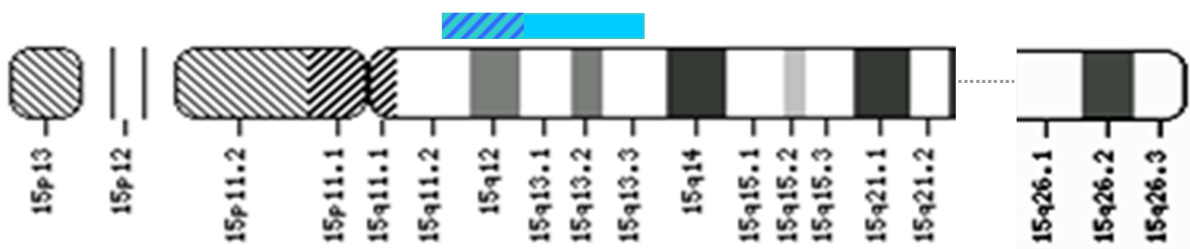


Abb. 12: Blau markiert ist der molekularzytogenetisch und durch Mikrosatelliten-Analyse eingegrenzte Bereich der Deletion am Chromosom 15 bei der Probandin 1. Die für das Prader-Willi Syndrom kritische Region ist schraffiert gekennzeichnet.

4.2 Kasuistik II: Der Proband 2

Beim Probanden 2, der zur Abklärung eines unklaren Dysmorphiesyndroms in der genetischen Beratungsstelle des Instituts für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgestellt wurde, wurde eine strukturelle Veränderung im Chromosom 18 festgestellt, welche durch eine Insertion der Banden q14-q15 des Chromosoms 15 hervorgerufen wurde.

Der Proband ist das erste Kind klinisch unauffälliger, nicht verwandter Eltern. Während der Schwangerschaft bestand Nikotinabusus sowie bereits intrauterin eine Wachstumsverzögerung (IUGR), bei der Spontan-Geburt wog der Proband 2670 g (< 15. Perzentile) bei 48 cm Körpergröße (25.-50. Perzentile). Die humangenetische Erstvorstellung erfolgte im Alter von knapp 8 Jahren, die Krankengeschichte bis dahin umfasste einen perimembranösen Ventrikelseptumdefekt sowie einen Maldescensus testis.

An facialem Dysmorphien fielen auf: Mikrozephalie, einseitiger Hypervisus und Hornhaut-Astigmatismus, ein hoher Nasenrücken, ein betont langes Kinn, struppige Haare, Zahnfehlstellungsanomalien und ein Büffelnacken; kurze Finger, am 4. und 5. Finger Klinodaktylie nach radial. Am Fuß fand sich eine Sandalenlücke. Das Achsenskelett war im Vergleich zu den Extremitäten dysproportional kurz, die Haltungsanomalie wurde durch eine Trichterbrust und leichte Kyphoskoliose noch verstärkt. Auffallend war auch eine weibliche Fettverteilung mit Gynäkomastie und eingezogenen Brustwarzen.

Im Alter von 8 Jahren lagen das Körpergewicht, die Körperhöhe und der Kopfumfang unter der 10. Perzentile; das Skeletalter war retardiert.

Es bestand eine mäßiggradige geistige Behinderung bei leichtem motorischem Defizit.

Seit dem 3. Lebensjahr wurden Verhaltensauffälligkeiten beobachtet: Das Kind sei autoaggressiv und hyperaktiv, schlage sich ins Gesicht, die Sprachentwicklung sei verzögert. Eine Essstörung (der Proband nehme zu wenig Nahrung zu sich) und abnorme Schlafgewohnheiten (spät einschlafen und früh wach werden) sowie Kopfschmerzen wurden ab dem 6. Lebensjahr erwähnt. Im Alter von 16,5 Jahren zeigte der Proband stereotypische Hand- und Armbewegungen und zwanghafte Bewegungsabläufe. Es wurde der Verdacht auf Gleichgewichtsstörungen geäußert.

Bei Aufenthalt in psychiatrischen Einrichtungen wurden weitere Befunde erhoben: Im MRT fand sich eine fokale dysmyelinisierende Erkrankung an Sehbahn und Hinterhörnern beidseits. Ein EEG zeigte eine zu langsame elektrische Aktivität in Ruhe.

Die Probandenmutter ist phänotypisch unauffällig, der Probandenvater war bereits vor der ersten Vorstellung in der genetischen Beratung verstorben; der 7 Jahre jüngere Bruder des Probanden weist ähnliche Haltungsanomalien und eine faciale Asymmetrie auf, ist aber genotypisch unauffällig.

Abb. 13 zeigt den Stammbaum der Familie, die mit Pfeil gekennzeichneten Personen standen für eine zyto- und molekulargenetische Analyse zur Verfügung:

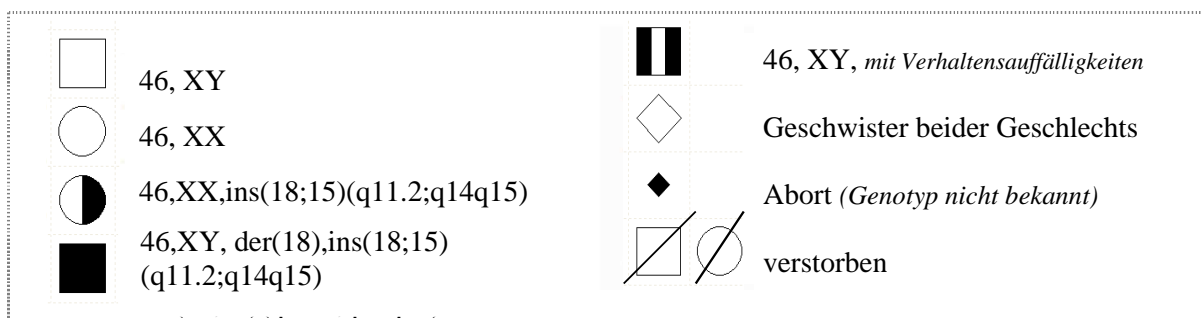
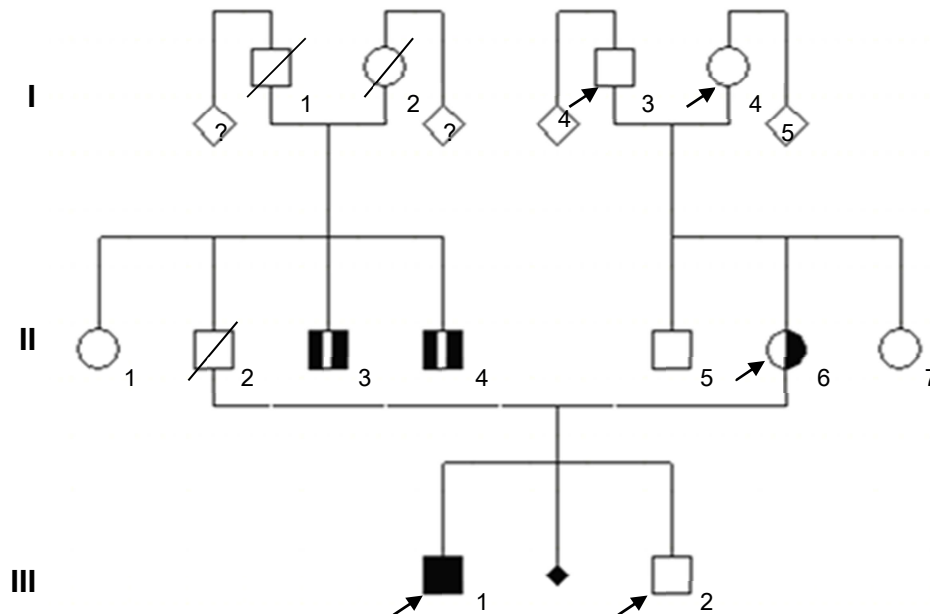


Abb. 13: Stammbaum des Probanden 2 (III,1)

Das Stammbaumschema zeigt in drei Generationen jene Personen, deren Phänotyp erörtert werden konnte. Von den mit Pfeilen markierten Personen stand Vollblut zur Analyse zur Verfügung.

4.2.1 Partielle Trisomie beim Probanden 2

Auch der Proband 2 wurde in der vorliegenden Arbeit zur Abklärung seines Dysmorphiesyndroms zyto- und molekulargenetischen Untersuchungen zugeführt, eine Analyse wurde zur Eingrenzung der jeweiligen Bruchpunkte mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt.

Bei den zytogenetischen Analysen fiel beim Probanden 2 ein derivatives Chromosom 18 auf. Um dessen Ursprung zu determinieren, wurde die Probandenmutter II,6 (vgl. Abb. 13) karyotypisiert: Ein Chromosom 15 zeigte sich unauffällig, eines mit Deletion der Banden 15q14q15. Ein Chromosom 18 war unauffällig, das andere mit einer Insertion der Banden 15q14q15 bei 18q11.2.

Eine anschließende Untersuchung der Mutter mittels *whole chromosome painting* (wpc, Fluoreszenzmarkierung eines ganzen Chromosoms) ergab im wpc des Chromosoms 15 (wpc15) Markierungen auf beiden Chromosomen 15 und auf dem proximalen 18q-Arm. Beim wpc18 erschien ein Chromosom 18 unauffällig, das andere stellte sich mit Insertion eines Chromosomenabschnitts in den q-Arm dar.

Die Chromosomenabschnittsinsertion der Banden 15q14q15 ins Chromosom 18 wurde als balanciert interpretiert, was sich im klinisch unauffälligen Phänotyp der Mutter bestätigte.

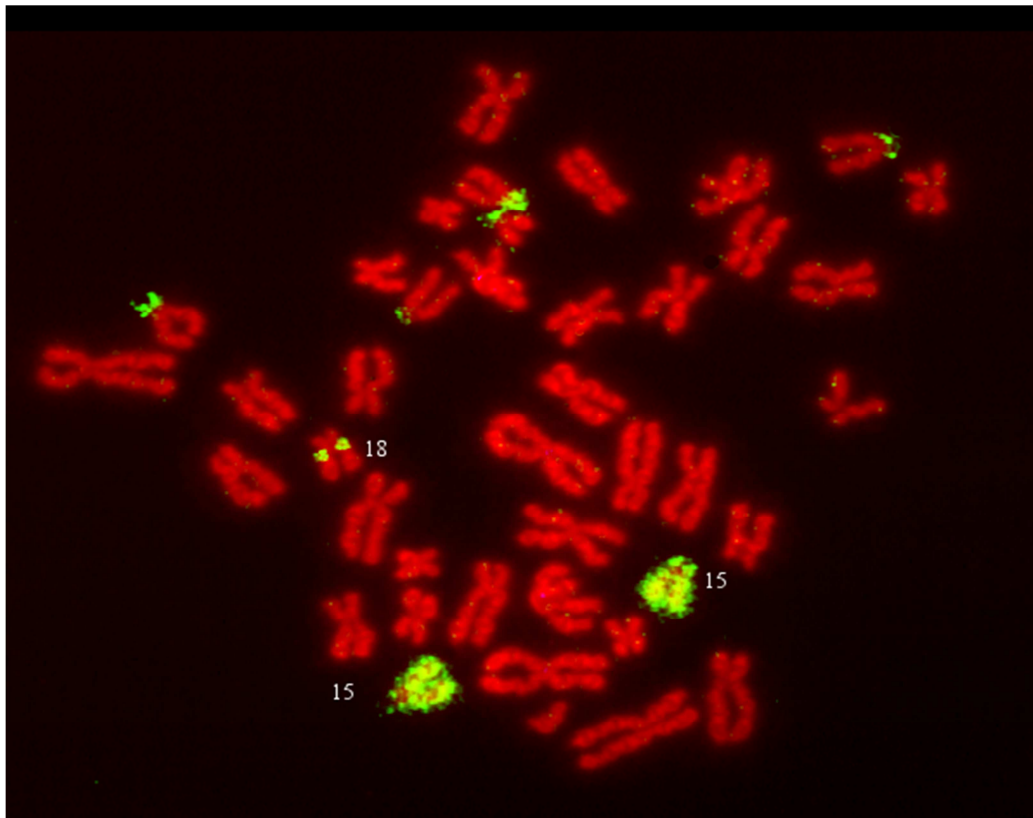
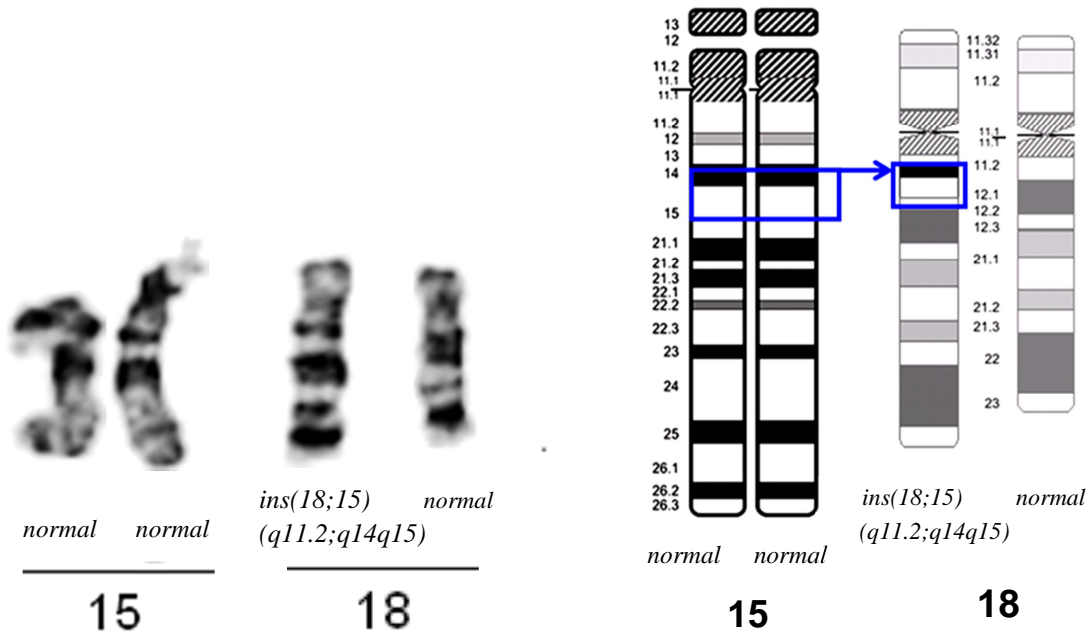


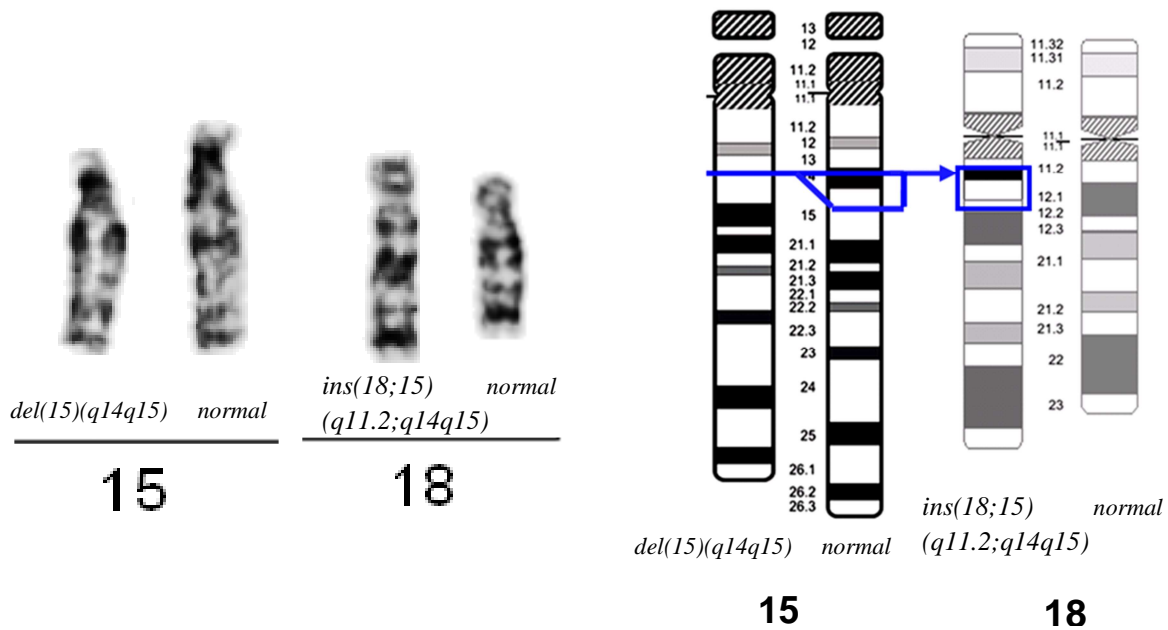
Abb. 14: *whole chromosome painting* des Chromosoms 15 bei der Probandenmutter II,6. Auf beiden Chromosomen 15 sowie im proximalen q-Arm eines Chromosoms 18 sind Markierungen zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass der inserierte Abschnitt im Chromosom 18 Chromosom-15-spezifisches Material aufweist. Daneben sind beim wpc 15 typischerweise entstehende, unspezifische Kreuzhybridisierungen mit den kurzen p-Armen aller akrozentrischen Chromosomen zu erkennen (Davidsson et al., 2008).

Nach Untersuchung der Eltern (I,3 und I,4, vgl. Abb. 13) der Probandenmutter, welche beide einen unauffälligen Chromosomensatz aufwiesen, wurde die Aberration der Mutter als „*de novo*“ definiert. Das derivative Chromosom des Probanden ist als mütterlichen Ursprungs anzusehen.

Daraufhin wurde der Befund beim Probanden 2 als eine partielle Trisomie der Banden 15q14q15 gedeutet, wobei sich die Banden je einmal orthotop in den Chromosomen 15 darstellen, einmal jedoch im Chromosom 18 in der Bande q11.2. Die Befunde der zytogenetischen Analyse von Proband 2 und Probandenmutter II,6 sind in Abb. 15 dargestellt.



G-Banding und Ideogramm im 550-Banden-Stadium der Chromosomen 15 und 18 beim Probanden 2. Das derivative Chromosom 18 befindet links.



G-Banding und Ideogramm im 550-Banden-Stadium der Chromosomen 15 und 18 bei der Probandenmutter II,6. Das derivative Chromosom befindet sich jeweils links.

Abb. 15: Zytogenetische Befunde beim Probanden 2 und seiner Mutter II,6.

In der Nomenklatur der Chromosomenanomalien (ISCN 2009) wird der Chromosomensatz der Probandenmutter mit 46,XX,*ins(18;15)(q11.2;q14q15)* *de novo* angeben, der des Probanden mit 46,XY, *der(18)*ins(18;15)(q11.2;q14q15)*mat.* Beim Probanden 2 liegt eine partielle Trisomie der Banden 15q14q15 vor, der mütterliche Abschnitt existiert zweifach (vgl. Abb. 15).

4.2.2 Analyse des proximalen Bruchpunktes der partiellen Trisomie

Da die zytogenetische Untersuchung mögliche Bruchpunkte von Aberrationen lediglich bis auf die Ebene einzelner Banden genau identifiziert, geschah die weitere Eingrenzung der vorliegenden Bruchpunkte mittels FISH, entsprechend der Überlegungen in 4.1. wurden die BAC-Klone ausgewählt. Es standen insgesamt 7 BAC-Klone zur molekulargenetischen Identifikation des in der Bande 15q14 festgelegten Bruchpunktes zur Verfügung (siehe Tab. 6).

Tab. 6: BAC-Klone, die zur Charakterisierung des proximalen Bruchpunktes verwendet wurden

RZPD – Name	Name	Start	Ende	Lokalisation
RZPDB 737A092027D	RP11-74D7	31927669	32090488	15q14
RPCIB 753D06680Q	RP11-680D6	34794162	34971246	15q14
RPCIB 753M16233Q	RP11-233M16	35697099	35850450	15q14
RPCIB 753N06638Q	RP11-638N6	35764267	35937213	15q14
RPCIB 753L2260Q	RP11-60L22	35885832	36056873	15q14
RZPDB 737C092099D	RP11-346D14	36123966	36328314	15q14
RZPDB 737A042016D	RP11-37C7	37694420	37863620	15q14 - 15q15.1

Die in Tabelle 6 aufgeführten BAC-Klone wurden entsprechend 3.1.1 vorbereitet und auf Metaphasenchromosomen des Probanden hybridisiert. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale geschah nach Gegenfärbung der Präparate am Mikroskop mit Hilfe der ISIS 3 Computersoftware. Dazu wurden jeweils 50 Metaphasen sowohl auf die Vollständigkeit des Chromosomensatzes als auch auf die korrekte Lage der Signale hin untersucht.

Zeigten sich beim Probanden selbst 2 Signale auf den beiden Chromosomen 15 und keines auf den Chromosomen 18, wurde die jeweilige Region bzw. der dieser Chromosomensequenz entsprechende BAC-Klon als „nicht trisom“ gewertet.

Zeigten sich sowohl auf den Chromosomen 15 als auch auf dem derivativen Chromosom 18 Signale, wurde diese Region bzw. der darauf hybridisierende BAC-Klon als „trisom“ vermerkt, sofern dies in allen analysierten Metaphasen der Fall war.

Zeigten sich bei der Probandenmutter II,6 Signale auf den beiden Chromosomen 15 und keines auf den Chromosomen 18, wurde die jeweilige Region als „nicht transloziert“ gewertet; zeigte sich ein Signal auf dem nicht deletierten Chromosom 15 und eines auf dem derivativen Chromosom 18, wurde diese Region als „transloziert“ beurteilt (exemplarische Darstellung der Hybridisierungen auf Metaphasen der Probandenmutter II,6 in Abb. 21).

Im Folgenden sind Beispiele der Ergebnisse der Hybridisierungen auf den Chromosomen des Probanden 2 zur Analyse des proximalen Bruchpunktes seiner partiellen Trisomie dargestellt.

In Abb. 16 sind Hybridisierungen mit den BAC-Klonen RP11-74D7, RP11-680D6, RP11-233M16

und RP11-638N6 abgebildet. Es sind spezifische Signale auf jeweils beiden Chromosomen 15 zu erkennen und keine Signale auf Chromosom 18. Diese BAC-Klone sind somit als „nicht trisom“ zu befunden.

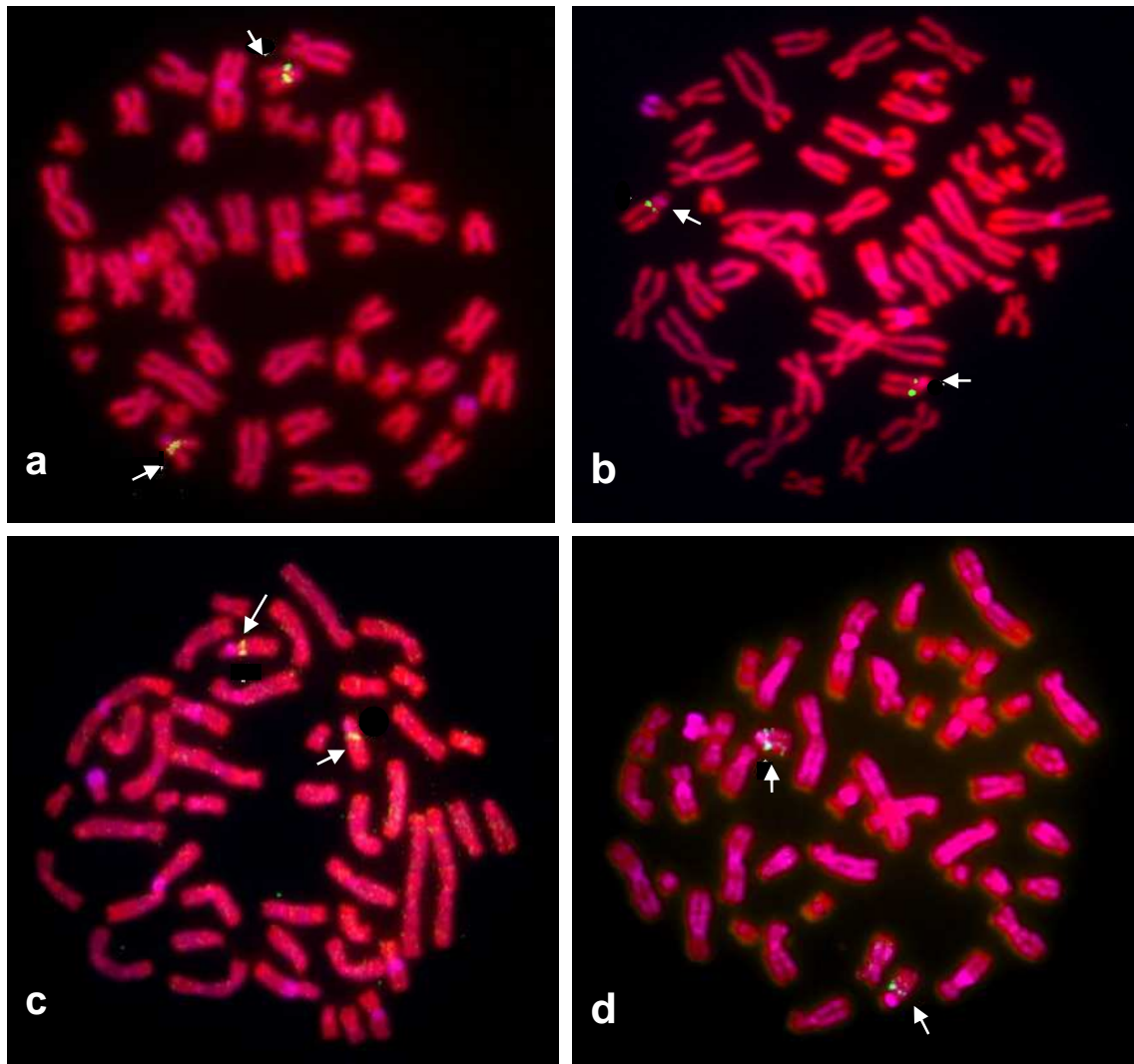


Abb. 16: FISH mit den BAC-Klonen (a) RP11-74D7, (b) RP11-680D6, (c) RP11-233M16 und (d) RP11-638N6 an Metaphasen des Probanden. Die Pfeile deuten auf die Chromosomen 15 mit deutlich erkennbaren Fluoreszenz-Signalen.

Abb. 17 zeigt Hybridisierungen mit den BAC-Klonen RP11-60L22, RP11-346D14 und RP11-37C7. Es wird deutlich, dass Signale sowohl auf den beiden Chromosomen 15 als auch auf dem derivativen Chromosom 18 zu beobachten sind. Auf dem unauffälligen Chromosom 18 wurden in keiner Metaphase Signale gesehen, Kreuzhybridisierungen sind somit unwahrscheinlich. Damit werden die von diesen BACs detektierten Sequenzen als „trisom“ gewertet.

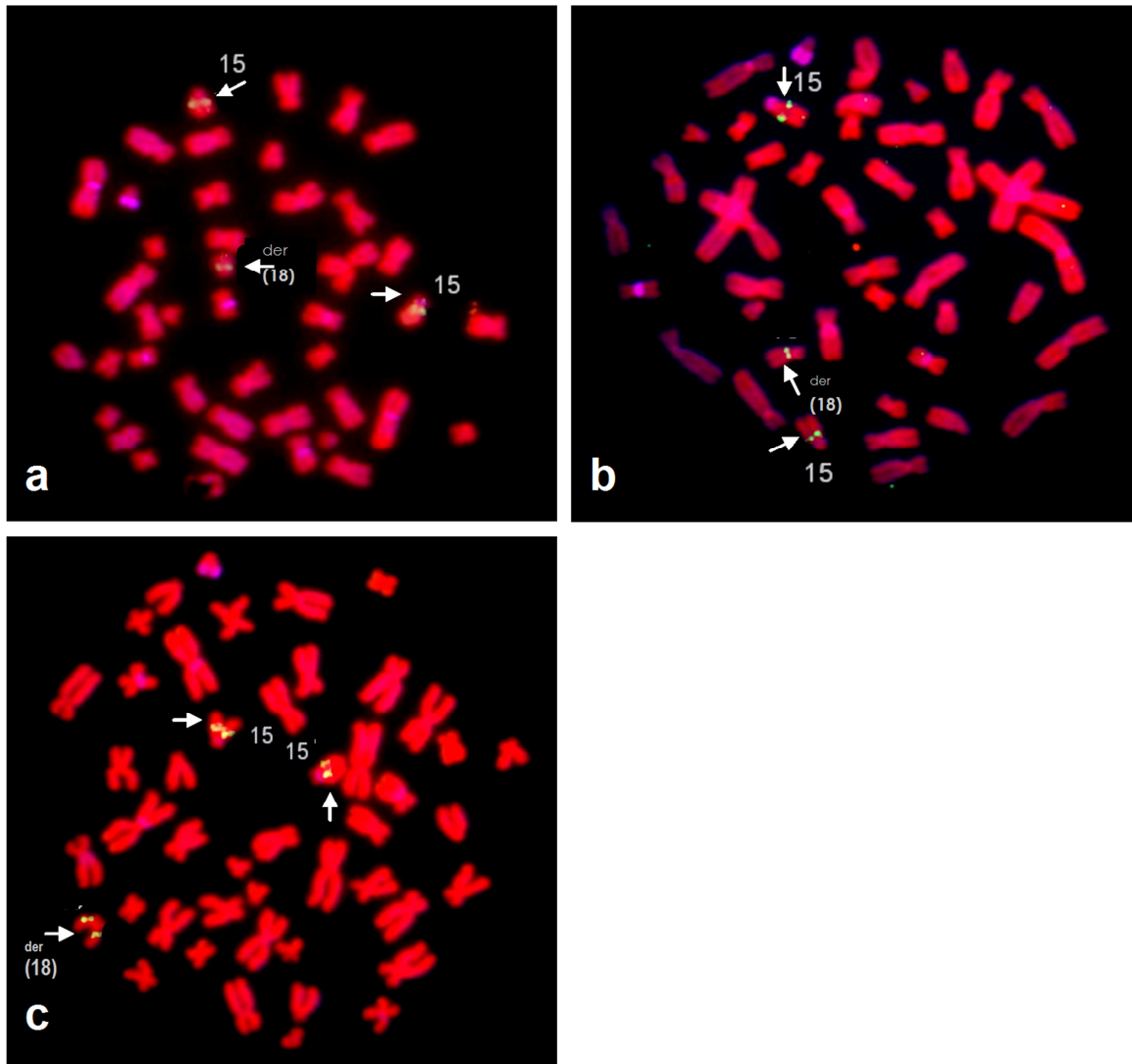


Abb. 17: FISH mit den BAC-Klonen (a) RP11-60L22, (b) RP11-346D14 und (c) RP11-37C7 auf Metaphasen des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chromosomen 15 und das derivative Chromosom 18. Zusätzlich sind die Chromosomen mit Zahlen, das derivative Chromosom 18 mit „der(18)“ gekennzeichnet.

4.2.3 Identifizierung und Darstellung der proximalen Bruchpunktregion

Von den in Tab. 7 aufgeführten 7 BACs ergaben sich bei 4 Klonen „nicht trisome“ Hybridisierungsergebnisse mit Signalen auf beiden Chromosomen 15 und ohne Signale auf Chromosom 18. Bei den FISH-Analysen mit den verbleibenden 3 BAC-Klonen wurden Signale sowohl auf den Chromosomen 15 als auch auf dem derivativen Chromosom 18 identifiziert, sie gelten als „trisom“. Analog wurden bei der Probandenmutter 4 BAC-Klone als „nicht transloziert“ und 3 als „transloziert“ ausgewertet.

Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der FISH-Analyse beim Probanden und seiner Mutter zur Charakterisierung der proximalen Bruchpunkt-Region

Name	Lokalisation	FISH-Ergebnis beim Probanden	FISH-Ergebnis bei Probandenmutter
RP11- 74D7	15q14	nicht trisom	nicht transloziert
RP11-680D6	15q14	nicht trisom	nicht transloziert
RP11-233M16	15q14	nicht trisom	nicht transloziert
RP11-638N6	15q14	nicht trisom	nicht transloziert
RP11-60L22	15q14	trisom	transloziert
RP11-346D14	15q14	trisom	transloziert
RP11-37C7	15q14 - 15q15.1	trisom	transloziert

Der proximale Bruchpunkt wird somit auf den Bereich eingegrenzt, in dem die beiden Klone RP11-638N6 und RP11-60L22 liegen.

Diese beiden in Bande 15q14 liegenden Klone decken einen ca. 292 kb großen Chromosomenabschnitt ab. Die Größe der Überlappung beträgt 51 kb (vgl. Abb. 18).

Da bei einer FISH-Analyse davon auszugehen ist, dass lediglich Sonden einer Größe von ca. ≥ 10 kb ein nachweisbares Fluoreszenzsignal zeigen, sollte der Bruchpunkt zwischen dem zentromerfernen, distalen Teil des BAC-Klons RP11-638N6 und dem zentromerfernen, distalen Teil des BAC-Klons RP11-60L22 liegen. Es sind dann von dem Klon RP11-638N6 noch sichtbare Fluoreszenzsignale auf den Chromosomen 15 nachweisbar, eine ggf. verbleibende Teilsequenz auf dem derivativen Chromosom 18 wäre jedoch weniger als ca. 10 kb groß, da sich dort kein Fluoreszenzsignal nachweisen lässt. Wäre der verbleibende Teilabschnitt bei weiter proximal liegendem Bruchpunkt größer als ca. 10 kb, würde der BAC-Klon RP11-638N6 in der FISH ein sichtbares Fluoreszenzsignal auf Chromosom 18 bewirken. Mittels des BAC-Klons RP11-60L22 lässt sich die Bruchpunktregion noch weiter eingrenzen, denn von diesem Klon muss eine Teilsequenz von mindestens ca. 10 kb auf Chromosom 18 hybridisieren, da sich in der FISH ein deutliches Fluoreszenzsignal auf dem derivativen Chromosom 18 nachweisen lässt.

In der zytogenetischen Untersuchung war der proximale Bruchpunkt der Bande 15q14 zugeordnet worden, lokalisiert wurde er durch die FISH-Methode im distalen Abschnitt der Bande 15q14.

Abb. 18 zeigt eine Auswahl der für die Analyse der proximalen Bruchpunkt-Region relevanten, verwendeten BAC-Klone mit den überlappenden Bereichen und der Bruchpunktregion.

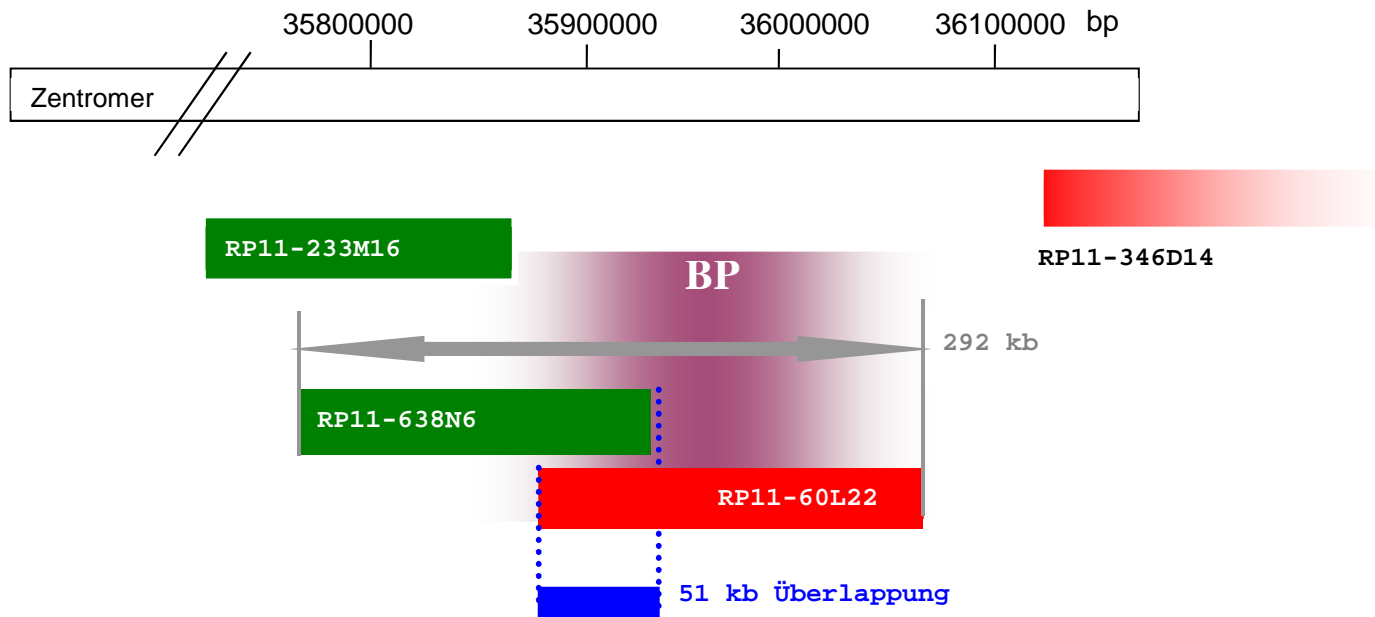


Abb. 18: Schematische Darstellung ausgewählter BAC-Klone im Bereich des proximalen Bruchpunktes. Die BAC-Klone RP11-74D7, -680D6 und -37C7 sind der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt. „Trisome“ bzw. „translozierte“ BAC-Klone sind rot, „nicht trisome“ bzw. „nicht translozierte“ Klone grün markiert. Die Entfernung zum Telomer des p-Armes als Nullpunkt ist zur Orientierung in Basenpaaren angegeben. Der Bruchpunkt wird in der violetten Bruchpunktregion (BP) lokalisiert.

4.2.4 Analyse des distalen Bruchpunktes der partiellen Trisomie

Durch die zytogenetischen Voruntersuchungen war der distale Bruchpunkt bereits der Bande 15q15 zugeordnet. Zur weiteren Eingrenzung der vorliegenden Bruchpunkte mittels FISH standen 6 BAC-Klone zur Verfügung, die entsprechend den Überlegungen in 4.1. ausgewählt wurden und in Tab. 8 weiter beschrieben werden.

Tab. 8: BAC-Klone, die zur Charakterisierung des distalen Bruchpunkt verwendet wurden

RZPD – Name	Name	Start	Ende	Lokalisation
RPCIB 753A22595Q	RP11-595A22	40240005	40446630	15q15.1
RPCIB 753K12185Q	RP11-185K12	40822040	41016360	15q15.2
RPCIB 753H11960Q	RP11-960H11	40921386	41110317	15q15.2
RPCIB 753A24124Q	RP11-124A24	41016379	41204740	15q15.2
RPCIB 753P06599Q	RP11-599P6	41117575	41320857	15q15.2
RZPDB 737A022191D	RP11-925D8	56220905	56430668	15q22.1

Die in Tabelle 8 aufgeführten BAC-Klone wurden entsprechend 3.1.1 bearbeitet und auf Metaphasenchromosomen des Probanden hybridisiert. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale geschah nach Gegenfärbung der Präparate am Mikroskop mit Hilfe der ISIS 3 Computersoftware. Dazu wurden jeweils 50 Metaphasen sowohl auf die Vollständigkeit des Chromosomensatzes als auch auf die korrekte Lage der Signale hin untersucht.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Hybridisierungen auf den Chromosomen des Probanden 2 zur Analyse des distalen Bruchpunktes seiner partiellen Trisomie dargestellt.

Abb. 19 zeigt Hybridisierungen mit den BAC-Klonen RP11-595A22, RP11-185K12 und RP11-960H11. Es werden Signale sowohl auf den beiden Chromosomen 15 als auch auf dem derivativen Chromosom 18 dargestellt. Auf dem unauffälligen Chromosom 18 wurde in keiner Metaphase Signale gesehen. Damit werden diese den BACs entsprechenden Sequenzen als „trisom“ gewertet.

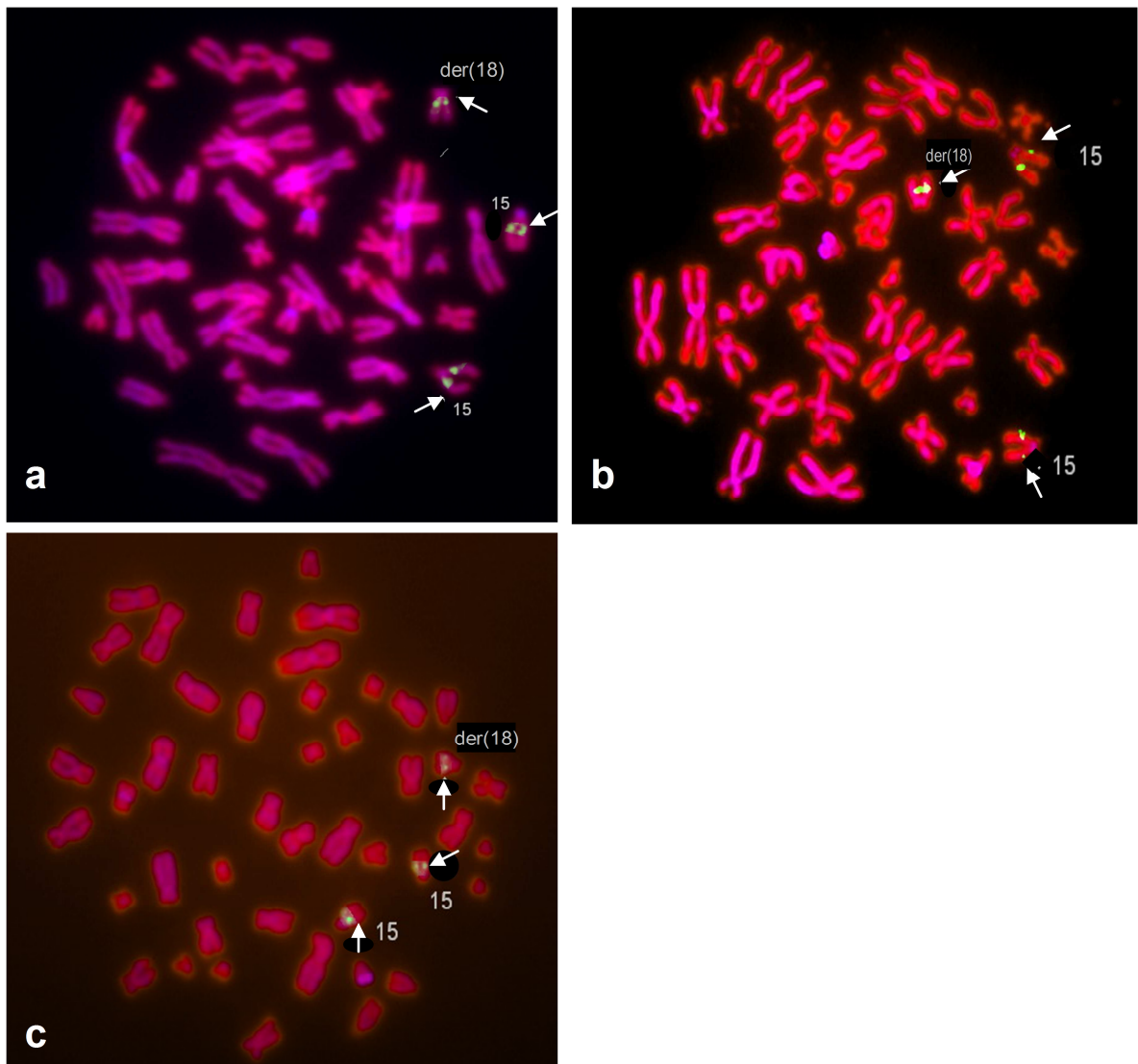


Abb. 19: FISH mit den BAC-Klonen (a) RP11-595A22, (b) RP11-185K12 und (c) RP11-960H11 auf Metaphasen des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chromosomen 15 und das derivative Chromosom 18. Zusätzlich sind die Chromosomen mit Zahlen, das derivative Chromosom 18 mit „der(18)“ gekennzeichnet.

In Abb. 20 sind Hybridisierungen mit den BAC-Klonen RP11-124A24, RP11-599P6 und RP11-925D8 dargestellt. Es sind spezifische Signale auf jeweils beiden Chromosomen 15 zu erkennen, aber keinerlei Signale auf Chromosom 18. Diese BAC-Klone sind somit als „nicht trisom“ zu befunden.

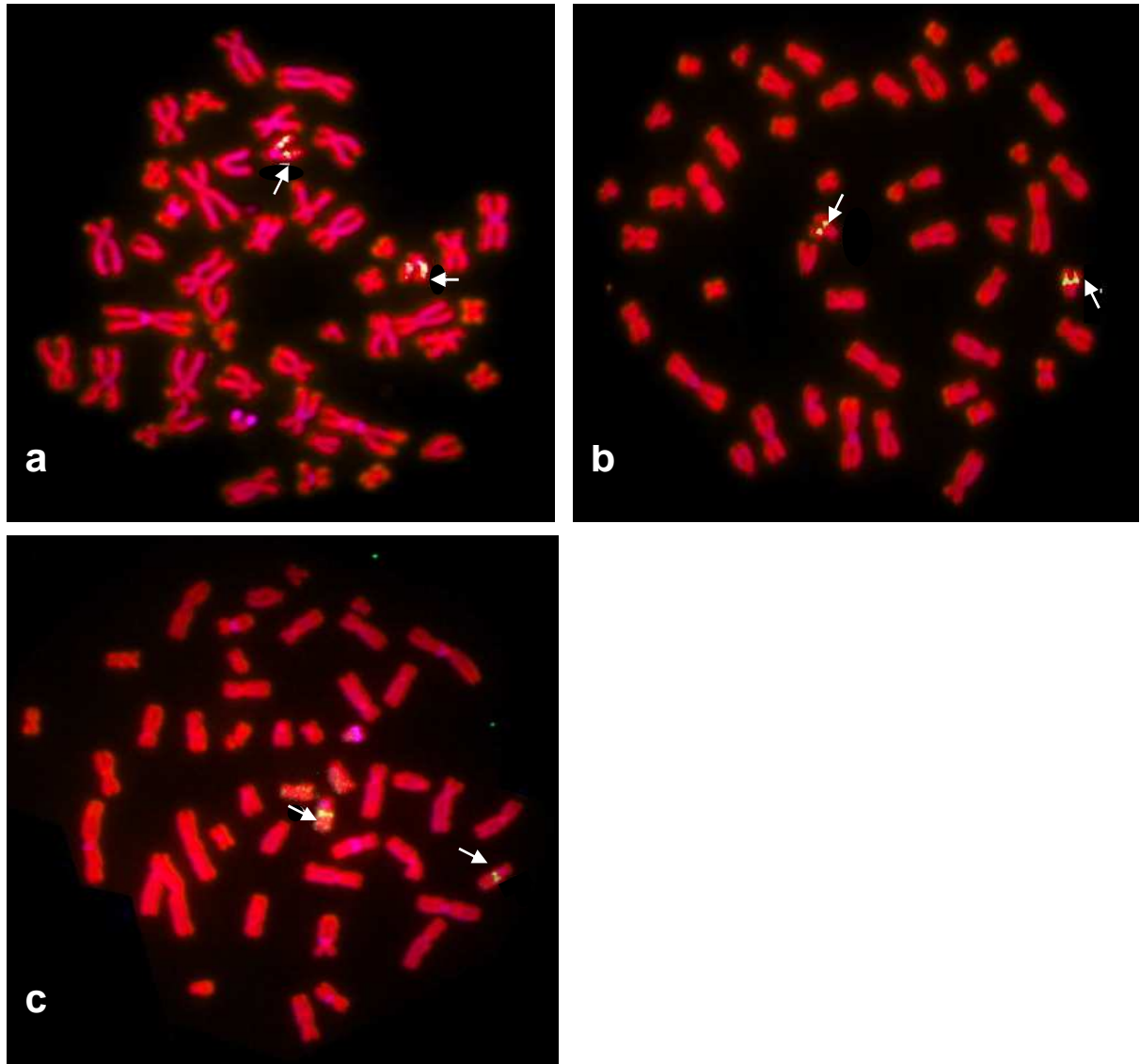


Abb. 20: FISH mit den BAC-Klonen (a) RP11-124A24, (b), RP11-599P6 und (c) RP11-925D8 auf Metaphasen des Probanden. Die Pfeile deuten auf die Fluoreszenz-Signale der beiden Chromosomen 15.

Exemplarische Darstellung von FISH-Ergebnissen bei der Mutter des Probanden 2

Da die Ergebnisse der FISH-Analysen bei der Probandenmutter II,6 übereinstimmend zu den Ergebnissen des Probanden 2 interpretiert wurden, werden sie hier nur exemplarisch dargestellt. In Abb. 21 (a) ist zu erkennen, dass lediglich auf den Chromosomen 15 Signale des BACs RP11-124A24 zu detektieren sind. In keiner Metaphase wurden dagegen Signale auf dem derivativen

Chromosom 18 entdeckt, so dass die genomische Sequenz, die dem Insert des Klons RP11-124A24 entspricht, zum größten Teil als „nicht transloziert“ zu werten ist.

Abb. 21 (b) zeigt Signale des BAC-Klons RP11-960H11 auf den unauffälligen Chromosomen 15 und auf dem derivativen Chromosom 18. Das deletierte Chromosom 15 dagegen zeigt in keiner Metaphase ein Fluoreszenz-Signal. Die Sequenz, der diesem BAC-Klon entspricht, wird somit als „transloziert“ gewertet.

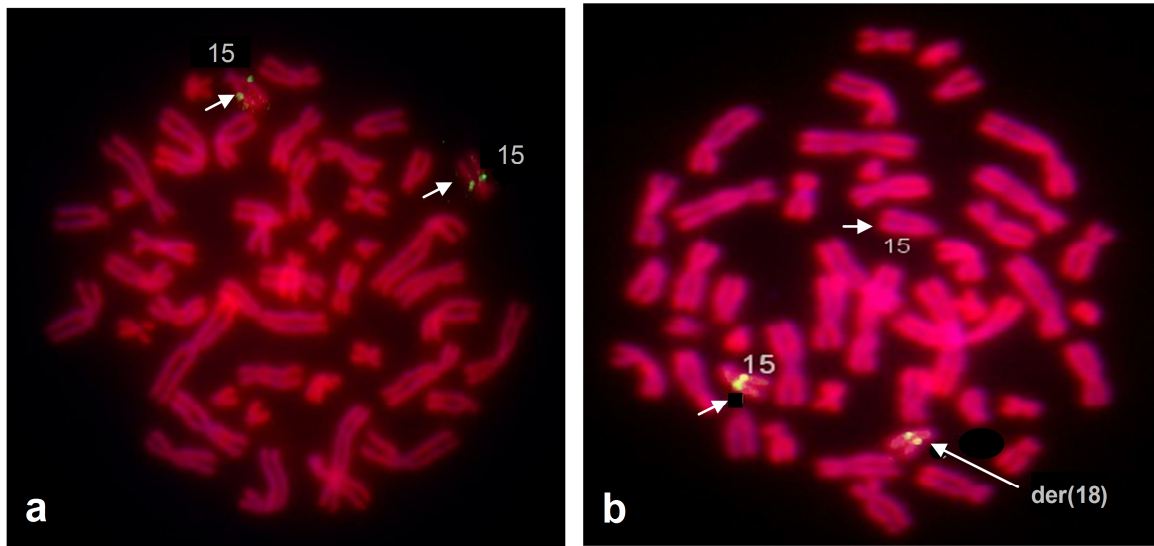


Abb. 21: *FISH mit den BAC-Klonen (a) RP11-124A24 bzw. (b) RP11-960H11 auf Metaphasen der Probandenmutter. Die Chromosomen sind mit Zahlen, das derivative Chromosom 18 mit „der(18)“ gekennzeichnet, Pfeile deuten auf die Hybridisierungssignale.*

4.2.5 Identifizierung und Darstellung der distalen Bruchpunktregion

Beim Probanden 2 stellten sich von den in Tab. 9 vorgestellten 6 BAC-Klonen 3 als „nicht trisom“ mit Signalen auf beiden Chromosomen 15 und ohne Signale auf Chromosom 18 dar; 3 Klone mit Signalen sowohl auf den Chromosomen 15 als auch auf dem derivativen Chromosom 18 gelten als „trisom“. Analog wurden bei der Probandenmutter II,6 3 BAC-Klone als „nicht transloziert“ und 3 als „transloziert“ ausgewertet.

Der distale Bruchpunkt wird somit auf den Bereich eingegrenzt, in dem die beiden Klone RP11-960H11 und RP11-124A24 liegen. Diese beiden in Bande 15q15.2 liegenden BAC-Klone decken einen 283 kb großen Chromosomenabschnitt ab. Die Größe der Überlappung beträgt 95 kb (vgl. Abb. 22).

Tab. 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der FISH-Analyse beim Probanden 2 und seiner Mutter zur Charakterisierung der distalen Bruchpunktregion.

BAC-Klon	Lokalisation	FISH-Ergebnis beim Probanden	FISH-Ergebnis bei der Probandenmutter
RP11-595A22	15q15.1	trisom	transloziert
RP11-185K12	15q15.2	trisom	transloziert
RP11-960H11	15q15.2	trisom	transloziert
RP11-124A24	15q15.2	nicht trisom	nicht transloziert
RP11-599P6	15q15.2	nicht trisom	nicht transloziert
RP11-925D8	15q22.1	nicht trisom	nicht transloziert

Da bei einer FISH-Analyse, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, davon auszugehen ist, dass lediglich Sonden einer Größe von ca. ≥ 10 kb ein nachweisbares Fluoreszenzsignal zeigen, sollte die Bruchpunktregion zwischen dem zentromernahen, proximalen Teil des BAC-Klons RP11-960H11 und dem zentromernahen, proximalen Teil des BAC-Klons RP11-124A24 liegen. Vom BAC-Klon RP11-960H11 muss ein Teilabschnitt von mindestens 10 kb bis maximal 95 kb sowohl auf dem derivativen Chromosom 18 als auch auf den Chromosomen 15 hybridisiert haben, da sich sichtbare Fluoreszenzsignale auf den Chromosomen 15 und auf dem derivativen Chromosom 18 nachweisen lassen.

Weiterhin eingrenzen lässt sich die Bruchpunktregion durch den BAC-Klon RP11-124A24, ihr distales Ende liegt maximal im zentromernahen, proximalen Teil des BAC-Klons: vom BAC-Klon RP11-124A24 müsste eine ggf. auf Chromosom 18 hybridisierende Teilsequenz jedoch weniger als 10 kb groß sein, da sich kein Fluoreszenzsignal auf dem derivativen Chromosom 18, sondern nur auf beiden Chromosomen 15 nachweisen lässt. Bei weiter distal liegendem Bruchpunkt wäre der vom BAC-Klon RP11-124A24 verbleibende Teilabschnitt ≥ 10 kb groß und würde in der FISH ein sichtbares Fluoreszenzsignal herbeiführen.

Abb. 22 zeigt ausgewählte BAC-Klone mit den überlappenden Regionen.

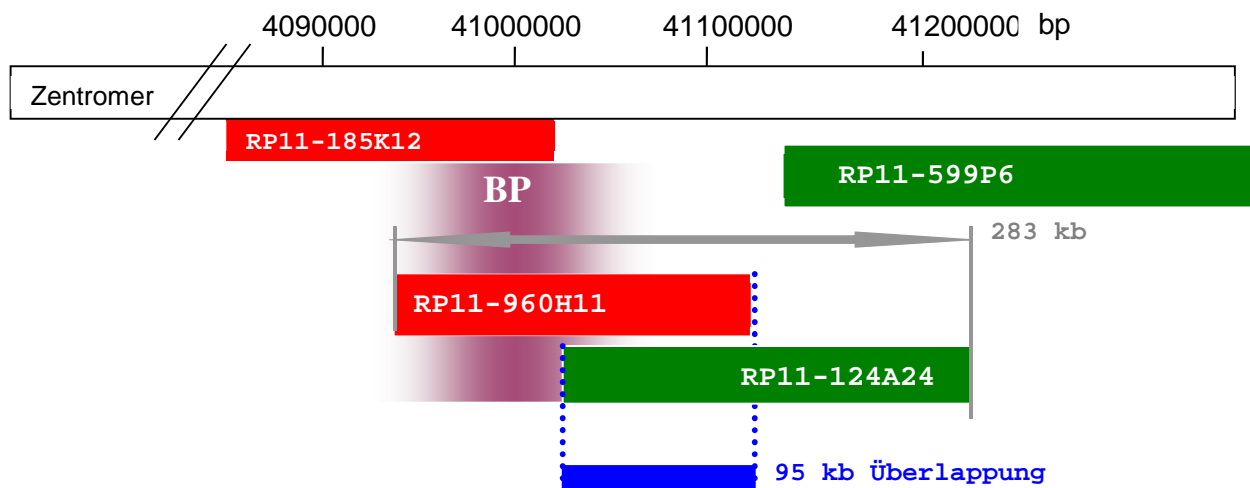


Abb. 22: Schematische Lokalisation von ausgewählten BAC-Klonen in der distalen Bruchpunktregion. Die BAC-Klone RP11-595A22 und RP11-925D8 sind der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt. „Trisome“ bzw. „translozierte“ BAC-Klone sind rot, „nicht trisome“ Klone sind grün markiert. Die Entfernung zum Telomer des p-Armes als Nullpunkt ist zur Orientierung in Basenpaaren angegeben. Der Bruchpunkt wird in der Bruchpunktregion (BP, violett) eingegrenzt.

In der zytogenetischen Untersuchung war der distale Bruchpunkt in Bande 15q15 eingeordnet worden, die FISH-Untersuchung präziserte die Eingrenzung auf 15q15.2.

Somit wurde eine Gesamtgröße der trisomen Region beim Probanden 2 bzw. des translozierten Abschnitts bei der Probandenmutter II,6 von etwa 5,1 Mb errechnet.

Abb. 23 zeigt, welcher Abschnitt des Chromosoms 15 beim Probanden 2 trisom vorhanden ist.

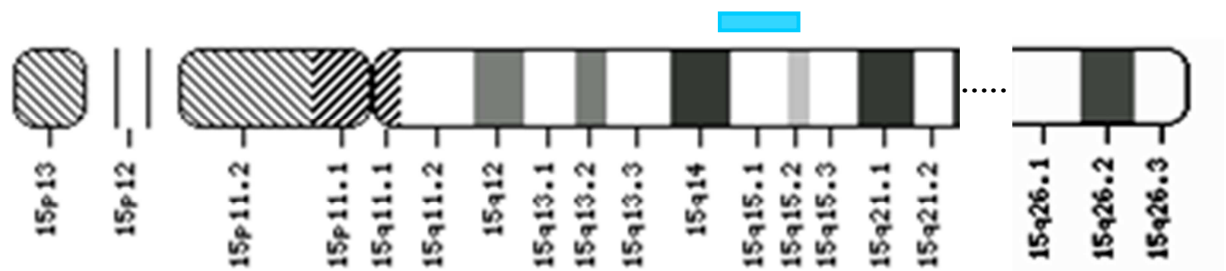


Abb. 23: Die blaue Markierung repräsentiert den durch zytogenetische und FISH-Analysen eingegrenzten Bereich der partiellen Trisomie von Chromosom 15 bei dem Probanden 2 bzw. den in Chromosom 15 deletierten und in Chromosom 18 inserierten Chromosomenabschnitt bei der Probandenmutter II,6.

5 Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Chromosomenaberrationen im Bereich des humanen Chromosoms 15q lassen sich zu den bereits in 1.2 erwähnten *contiguous gene syndromes* zählen. Der überwiegende Teil solcher Phänotypen beruht auf einer Deletion physikalisch benachbarter, jedoch funktionell unabhängiger Gene. Für einige dieser Syndrome, wie zum Beispiel für das WAGR-Syndrom (Akronym für die Merkmale: Wilms-Tumor, Aniridie, Uro-Genitaltrakt dysplasie und Wachstums hemmung (*retardation of growth*) (OMIM #194072), konnten durch Genotyp-Phänotyp-Studien bestimmte Symptome verschiedenen Kandidatengen zugeordnet werden (Pelletier *et al.*, 1991; Chao *et al.*, 2003).

Aus diesem Grund war es neben der möglichst exakten Eingrenzung der jeweils vorliegenden Bruchpunkte auch ein Ziel der Arbeit, eine solche Gegenüberstellung zwischen den vorliegenden Phänotypen und den gefundenen Chromosomenaberrationen bei den betrachteten Probanden unter Einbeziehung ähnlicher, in der Literatur beschriebener Fälle durchzuführen.

So wird es möglich, Gene in dieser Region als Kandidatengene mit einem festgesetzten Phänotyp zu korrelieren (*positional candidate approach*) (Collins, 1992; Ballabio, 1993).

Einen Überblick über die in der zu analysierenden Chromosomenregion vorhandenen Gene sowie deren physiologische Bedeutung bieten Datenbanksysteme (OMIM, UCSC Genome Browser). Da in den meisten Fällen über die Funktion der Genprodukte nur wenig bekannt ist, sollen im Rahmen dieser Arbeit nur diejenigen Gene betrachtet werden, bei denen ein möglicher Zusammenhang zwischen der mutmaßlichen Genfunktion und dem vorgefundenen Phänotyp hergestellt werden konnte.

Vor Beginn dieser Betrachtungen soll jedoch auf die durchgeführte, molekularzytogenetische Eingrenzung der Bruchpunkte sowie deren Einordnung in bereits bekannte, instabile Regionen auf Chromosom 15q eingegangen werden.

5.1 Genomische Instabilität der Region 15q

Neben hochrepetitiven Sequenzen wird die Stabilität von Chromosomen hauptsächlich durch Strukturelemente beeinflusst, den so genannten Duplicons bzw. *low-copy repeats* (LCRs), welche instabile Regionen flankieren. Dabei handelt es sich um Sequenzabschnitte von mindestens einem bis mehreren 100 kb Länge, welche eine über 90%ige Homologie zu anderen Chromosomenabschnitten im Genom aufweisen. Sie sind mit einer Häufigkeit von etwa 5% zu finden und spielen eine bedeutende Rolle bei nicht-allelischen homologen Rekombinationsvorgängen in der Meiose (Lupski, 1998; Stankiewicz und Lupski, 2002).

Vor allem perizentrische Bereiche weisen einen hohen Grad an genomischer Instabilität auf, neben der Region 17p11.2 und dem damit assoziierten Smith-Magenis Syndrom (SMS, OMIM 182290) (Smith *et al.*, 1986; Shaw *et al.*, 2002) gehört auch die Region 15q11.2 zu den

instabilsten Bereichen des humanen Genoms (Eichler *et al.*, 1998; Amos-Landgraf *et al.*, 1999). Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Region des langen Arms von Chromosom 15 (15q11-q15) ist in ihrer Organisation sehr komplex, sie unterliegt ständigen nicht-homologen Rekombinationsereignissen. Prädisponierend hierfür sind große Duplicon-Strukturen mit einer Länge von etwa 50-400 kb (Donlon *et al.*, 1986; Amos-Landgraf *et al.*, 1999; Christian *et al.*, 1999, Pujana *et al.*, 2002), welche sich auf 15q11 und 15q13 befinden.

Im Folgenden soll insbesondere eingegangen werden auf die Region 15q11-q14: In der Literatur werden zurzeit insgesamt 6 „hotspots“ beschrieben (Pujana *et al.*, 2002; Mignon-Ravix *et al.*, 2007), Regionen beträchtlicher Instabilität, die als Bruchpunkte (*breakpoints*, BP, siehe Abb. 24) bezeichnet werden. An diesen auch als Cluster benannten Regionen ereignen sich besonders häufig sporadische Translokations-, Duplikations- und Deletionsereignisse. Bei der Analyse der flankierenden Sequenzen wurden auf beiden Seiten dieser Bruchpunkte relativ große genomische Duplikationen (Duplicons) gefunden. Es wird vermutet, dass diese paraloge Sequenzen die falsche Anlagerung von Chromatiden und damit ungleiche Rekombinationsereignisse während der Meiose begünstigen.

Abb. 24 zeigt die bisher charakterisierten 6 „hotspots“ im langen Arm vom Chromosom 15 (Mignon-Ravix *et al.*, 2007). Dabei wurden – für den typischen Fall eines Prader-Willi Syndroms – BP1 und BP2 im Bereich 15q11 als typische, proximale Bruchpunkte von Rekombinationsereignissen und BP3 als typischer, distaler Bruchpunkt klassifiziert. Entsprechend eingeteilt werden die Deletionen beim PWS in Deletionen vom Typ 1 (BP1-BP3) oder vom Typ 2 (BP2-BP3) (Butler *et al.*, 2004).

Für das 15q13.3 Mikrodeletions-Syndrom werden von Sharp *et al.* (2008) Deletionen des Bereichs von BP3-BP4 und von BP3/4-BP5 diskutiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit experimentell gesicherten Bruchpunkte der Aberrationen an den Chromosomen 15 konnten für die Probandin 1 übereinstimmend mit den in der Literatur beschriebenen „hotspots“ korreliert werden:

Wie in Abb. 24 ersichtlich, liegt der distale Bruchpunkt der Deletion der Probandin 1 direkt in der Bruchpunktregion 5 (BP5), welche flankiert ist vom *low-copy repeat* 11 (LCR11; bei 30.47–30.7 Mb; 218 kb groß). Andere LCRs, welche häufig mit dem LCR11 in Rekombinationsereignissen miteinbezogen werden, sind z.B. die LCRs 1, 2, 3 und 4. Der proximale Bruchpunkt der Probandin 1 liegt nicht innerhalb eines dieser LCRs, allerdings nur ca. 210 kb weiter telomerisch als LCR2 (bei 20.85–21.06 Mb; 19–213 kb groß) in der Bruchpunktregion 2 (BP2) (Mignon-Ravix *et al.*, 2007; Sahoo *et al.*, 2007).

Als typische Bruchpunkte für eine Deletion beschreiben Sahoo *et al.* (2007) jedoch BP1-BP5 oder BP2-BP4.

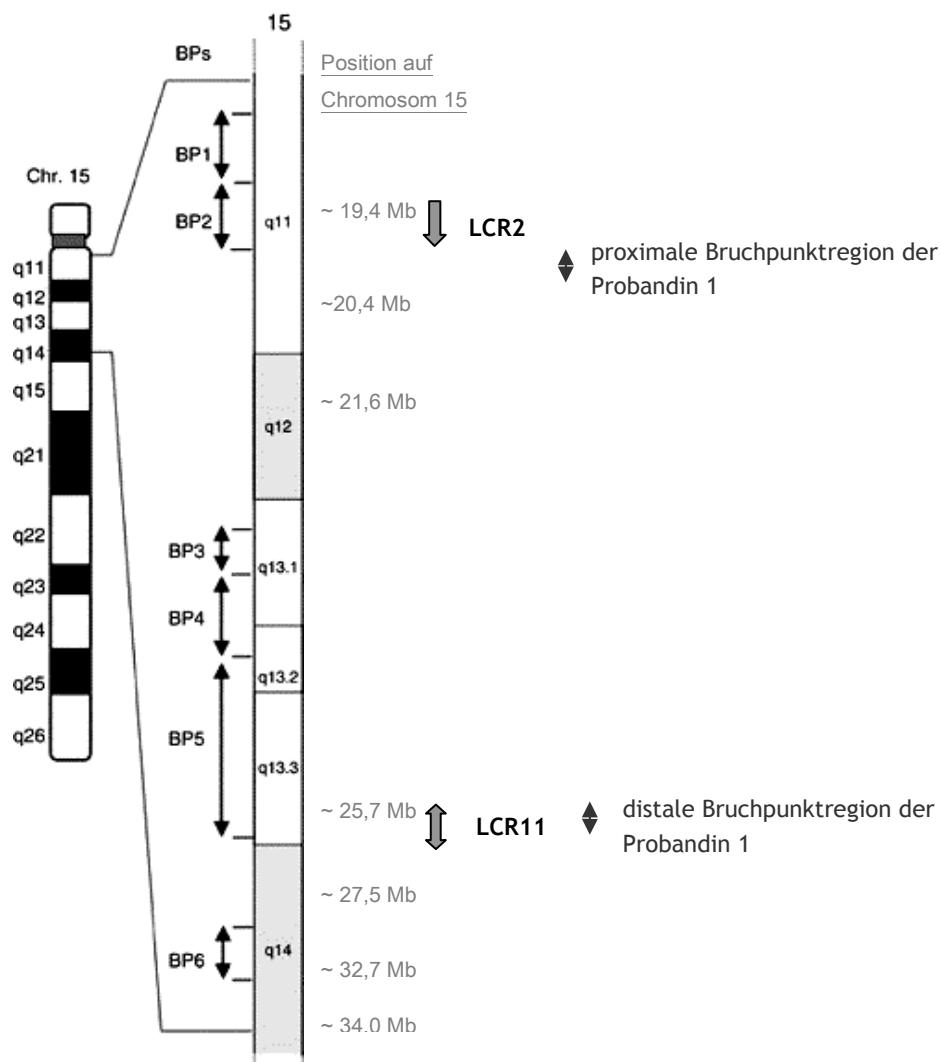


Abb. 24: Lokalisierung der bisher bekannten Bruchpunkte BP1-BP6 mit den LCRs auf Chromosom 15q [aus Mignon-Ravix et al. (2007), modifiziert nach Sahoo et al. (2007)]

Die Bruchpunkte des trisomen Chromosomensegments des Probanden 2 lassen sich keinem der von Mignon-Ravix *et al.* (2007) beschriebenen Bruchpunkte zuordnen, obwohl BP4-BP6 als spezifisch für unbalancierte Translokationen genannt werden.

Der in dieser Arbeit gefundene proximale Bruchpunkt des Probanden 2 liegt mindestens 2,5 Mb distal des BP6, eine Korrelation ist daher nur eingeschränkt möglich.

5.2 Der mit einer Deletion 15(q11.2q13.3) einhergehende Phänotyp bei der Probandin 1

Aufgrund der bei der Probandin 1 beschriebenen phänotypischen Auffälligkeiten und dem Ergebnis der zytogenetischen Analyse ließe sich vermuten, dass eine Reihe der vorliegenden Dysmorphiemerkmale durch die Deletion der klassischerweise auch beim Prader-Willi Syndrom (PWS) betroffenen Region verursacht sind. Daneben weist die Probandin einige atypische

Befunde auf, die im Folgenden vom typischen PWS-Phänotyp abgegrenzt werden sollen.

Um die atypischen Befunde beim PWS im Phänotyp der Probandin 1 deutlich zu machen, wird im Folgenden zunächst der typische Genotyp und Phänotyp des Prader-Willi Syndroms beschrieben:

Das Prader-Willi Syndrom (*PWS*), auch unter den Synonymen *Prader-Labhard-Willi-Franconi Syndrom*, *Urban Syndrom* und *Urban-Rogers-Meyer Syndrom* bekannt, betrifft etwa eines von 10.000 - 20.000 Lebendgeborenen, beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen. Erstmals 1887 wurde dieses Syndrom von Sir Langdon-Down beschrieben, 1956 durch drei Züricher Kinderärzte (Andrea Prader, Alexis Labhard und Heinrich Willi) betitelt (Prader *et al.*, 1956). Das PWS ist ein so genanntes „*contiguous gene syndrome*“; es ist durch einen Funktionsverlust von zumindest dem SNRPN-Gen (Small-nuclear-Ribonucleoprotein-Polypeptide-N-Gen) (Ozcelik *et al.*, 1992; Buiting *et al.*, 1995), dem Necdin-Gen und eventuell weiteren spezifisch geprägten Genen gekennzeichnet, welche sich auf Chromosom 15q11-13 befinden.

Vom Berufsverband Medizinische Genetik e.V. (Deutsche Gesellschaft für Humangenetik, 2001) wird als typischer Startpunkt für Deletionen das MKRN3-Gen (Chromosom 15 bei 21,36 Mb) festgesetzt, als üblicher Endpunkt das OCA2-Gen (Chromosom 15 bei 25,67-26,0 Mb).

Ursächlich ist entweder eine Deletion der paternalen Allele (~75% der Fälle), eine maternale uniparentale Disomie (UPD) (~25% der Fälle) oder Mutationen im Imprinting-Center (<5% der Fälle). Der ausschließliche Verlust väterlicher Allele wurde durch Markeranalyse gesichert (Magenis *et al.*, 1990; Zori *et al.*, 1990; Robinson *et al.*, 1991).

Diagnostiziert wird das PWS neben der Genotypisierung durch das Auftreten folgender Hauptkriterien:

- Muskelhypotonie im Säuglingsalter und daraus resultierende Trinkschwäche
- Hypogonadismus
- charakteristische faziale Merkmale mit schmalem Gesicht, Strabismus, mandelförmigen Augen, einem kleinen Mund mit schmaler Oberlippe
- niedriges Geburtsgewicht
- moderate mentale Retardierung (IQ um die 60)
- Verhaltensprobleme (Hyperphagie ab dem 3.Lebensjahr)
- daraus resultierende zentrale Adipositas

Untergeordnete Kriterien sind beispielsweise:

- kleine Hände und Füße (Akromikrie)
- Hypopigmentierung (blondes Haar, blaue Augen; nur in Fällen mit Deletion)
- Kleinwuchs (155 cm Endgröße für ♂, 147 cm für ♀)
- zäher Speichel und Artikulationsprobleme.

Bei unüblich großen Deletionen mit weiter distal liegendem Bruchpunkt wurden schwerere Ausprägungen des Phänotyps bei PWS-Probanden beschrieben (Pujana *et al.*, 2002; Mignon-Ravix *et al.*, 2007; Sahoo *et al.*, 2007). Eine Analyse der Gene distal des im Bereich 15q13.1 gelegenen OCA2-Gen gelingt nur eingeschränkt, weil eine mögliche phänotypische Ausprägung der Genprodukte durch den PWS-Phänotyp überlagert ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten molekulargenetischen Analysen der deletierten Region des proximalen 15q-Arm bei der Probandin 1 zeigten eine sehr große, auf fast 10 Mb ausgedehnte Deletion, der Karyotyp konnte mit 46, XX, del(15)(q11.2q13.3) betitelt werden. Die charakterisierte proximale Bruchpunktregion fällt mit dem MKRN3-Gen (21,36-21,37 Mb in 15q11.2) zusammen, welches vom Berufsverband Medizinische Genetik e.V. (2001) als charakteristischer Startpunkt der Deletion beim Prader-Willi Syndrom angegeben wird. Mit einem distalen Bruchpunkt, der durch den in dieser Arbeit dargestellten BAC-Klon RP11-242M5 überspannt wird, reicht die Deletion jedoch weit in die Bande 15q13.3 hinein und geht über die übliche distale Begrenzung einer PWS-Deletion hinaus. Das distale Ende der Deletion wird in den Leitlinien des Berufsverband Medizinische Genetik e.V. im Bereich des Gens OCA2 (Chromosom 15q13.1 bei 25,67-26,0 Mb) festgesetzt. Es wird ersichtlich, dass der deletierte Bereich bei der in dieser Arbeit untersuchten Probandin etwa doppelt so groß wie bei typischen Fällen ist.

Die Befunde der Probandin 1 lassen sich durch die Deletion des für das Prader-Willi Syndrom typischen Chromosomenabschnitts teilweise erklären. Bereits in 4.1 wurden eine neonatale muskuläre Hypotonie mit Trinkschwäche und leicht verringertem Geburtsgewicht, kleine Hände und Füße und ein sich entwickelnder unersättlicher Appetit im Alter von 3 Jahren mit entsprechender Gewichtszunahme beschrieben. Auch die mäßige mentale Retardierung und der Kleinwuchs sind als solche bei der Probandin schon zu erkennen.

Als typische PWS-Befunde bei der Probandin 1 finden sind außerdem die Hypopigmentierung und faciale Auffälligkeiten wie schmales Lippenrot und mandelförmige Augen.

Es fielen – neben den typischen PWS-Befunden – allerdings auch eine Reihe von atypischen Befunden bei der Probandin auf: deutlich verringertes Geburtsgewicht, ein persistierender Ductus arteriosus Botalli sowie ein small left colon-Syndrom mit Antepositio ani in der Postnatalperiode sowie im weiteren Verlauf bestehende Retardierung der Motorik, stark retardierte Sprachentwicklung und andere faciale Dysmorphien.

Um die Ursachen der atypischen Befunde zu verstehen, wurden zunächst die distal des OCA2-Gens vorkommenden Gene analysiert, welche nicht in der typischen PWS-Region liegen. Durch diesen Genotyp-Phänotyp-Abgleich soll über eine Funktion der Genprodukte eine Korrelation zu jenen beobachteten Symptomen hergestellt werden, welche sich nicht durch die Deletion der PWS-Region erklären lassen.

Prüfung bekannter Gene der Region 15q11.2q13.3

Mit Hilfe von Datenbanken (OMIM, *UCSC Genome Browser*) gelingt die Untersuchung von Chromosomenregionen auf vorhandene Gene und deren physiologische Bedeutung. Da in den meisten Fällen über die Funktion der Genprodukte nur wenig bekannt ist, sollen nur diejenigen Gene betrachtet werden, bei welchen ein Zusammenhang zwischen den beobachteten phänotypischen Auffälligkeiten und der mutmaßlichen Genfunktion hergestellt werden konnte. Tabelle 10 zeigt die in der deletierten Region liegenden Gene mit ihrer jeweiligen Funktion.

Tabelle 10: Betrachtete Gene in der deletierten Region der Probandin 1

<ul style="list-style-type: none"> • GABRG3 (GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID RECEPTOR, GAMMA-3-Gen, MIM-Nr. 600233), kodiert für die $\gamma 3$-Untereinheit des GABA(A)-Rezeptors. Bei Deletion schwere muskuläre Hypotonie.
<ul style="list-style-type: none"> • ABPA2 (AMYLOID BETA A4 PRECURSOR PROTEIN-BINDING, FAMILY A, MEMBER 2-Gen, MIM-Nr. 602712), bindet an die Domäne des Alzheimer-Locus. Mitverantwortlich für die Synapsenentstehung, wichtiger Beitrag zur Gehirnentwicklung (Ho <i>et al.</i>, 2003).
<ul style="list-style-type: none"> • NDNL2 (NECDIN-LIKE-Gen 2, MIM-Nr. 608243), verminderte Expression von NDNL2 könnte eine verminderte axonale Aktivität im Gehirn nach sich ziehen.
<ul style="list-style-type: none"> • CHRNA7 (CHOLINERGIC RECEPTOR, NEURONAL NICOTINIC, ALPHA POLYPEPTIDE 7-Gen, MIM-Nr. 118511) und CHRFAM7A (CHRNA7/FAM7A FUSION-Gen, MIM-Nr. 609756), mit Schizophrenie, bipolaren affektiven Störungen, Entwicklungsverzögerung und mentaler Retardierung assoziiert. Bei Haploinsuffizienz juvenile myoklone Epilepsie.
<ul style="list-style-type: none"> • KLF13 (KRUPPEL-LIKE FACTOR 13-Gen, MIM-Nr. 605328), Komponente in der Herzentwicklung. Funktioneller Knockout führt zu Ventrikel-Septum-Defekten und verzögerter Herzklappenreifung.

Wie in Tab. 10 ersichtlich, sind einige Gene - unter der Prämisse eines *contiguous gene syndrome* - als ursächlich für einzelne phänotypische Merkmale der Probandin 1 denkbar:

Das GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID RECEPTOR, GAMMA-3-Gen (GABRG3) kodiert für die $\gamma 3$ -Untereinheit des GABA(A)-Rezeptors. Wird die physiologische Rolle dieses Rezeptors betrachtet (Culiat *et al.*, 1994), ist bei einer Deletion des GABRG3-Gens die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es zu der schweren muskulären Hypotonie kommt, welche PWS-Patienten mit größerer Deletion aufweisen. Dieses Merkmal wurde auch bei der Probandin 1 angetroffen.

Das AMYLOID BETA A4 PRECURSOR PROTEIN-BINDING, FAMILY A, MEMBER 2-Gen und das NECDIN-LIKE-Gen 2 sollen beide einen bedeutsamen Teil zur Gehirnentwicklung beitragen (Blanco *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005).

Allerdings ist die Identifizierung der Ursachen für eine gestörte Gehirnentwicklung schwierig, da einzelne Verursacher-Gene für Entwicklungsstörungen in ihrer Funktion pleiotrop und nicht nur auf das Gehirn limitiert sind. Zudem spielen viele Elemente bei der Regulierung der

Ausbildung von Gehirnstrukturen eine wichtige Rolle; das Zusammenspiel von Zelldifferenzierung, Migration, Synapsenbildung und Myelinisierung muss aufeinander abgestimmt sein (Dykens *et al.*, 2004). Störungen in der Gehirnentwicklung können eine Ursache für die mentale Retardierung der Probandin 1 sein.

Das CHRNA7-Gen ist mit Schizophrenie und bipolaren affektiven Störungen (Stefansson *et al.*, 2008) als auch mit Epilepsien (Elmslie *et al.*, 1997) assoziiert. Shinawi *et al.* (2009) diskutieren bei Deletion des CHRNA7-Gens Entwicklungsverzögerung, mentale Retardierung sowie mit Autismus verknüpfte Krankheitsbilder.

Das KRUPPEL-LIKE FACTOR 13-Gen (KLF13) wird als wichtige Komponente in der Herzentwicklung angesehen, da es GATA4 (GATA-BINDING PROTEIN 4; OMIM *600576) modifiziert, einen Regulator der Herzentwicklung (Lavalleé *et al.*, 2006; Nemer und Horb, 2007). Ein funktioneller Knockout des KLF13-Gens in *Xenopus*-Embryonen führt nach anfänglich normaler Herzentwicklung zu Ventrikel-Septum-Defekten, verzögerter Herzkammerentwicklung und Klappenreifung (Nemer und Horb, 2007). KLF13 ist ein konserviertes Gen und findet sich bei Maus und Mensch (auf 15q13.2; Suske *et al.*, 2005). Bei der Probandin 1 fiel postnatal ein persistierender Ductus arteriosus auf, eine Haploinsuffizienz dieses Genes durch Deletion führte eventuell zu dieser Fehlbildung.

Genotyp-Phänotyp-Korrelation unter Berücksichtigung beschriebener Deletionen aus der Literatur

Da die Symptomatik, die die Probandin 1 präsentiert, sich nicht durch die Deletion eines einzelnen Gens erklären ließ, wurde die Literatur auf der Suche nach ähnlichen Deletionssyndromen analysiert, um zu ergründen, ob bei Kasuistiken mit ähnlich großen Deletionen eine entsprechende Symptomatik gefunden wird.

Erschwert wurde der Vergleich der Fälle aus der Literatur mit dem Phänotyp der Probandin 1 durch folgende Problematik:

Die Bruchpunkte wurden in einigen früheren Publikationen nur grob zytogenetisch charakterisiert, was sich aus dem damaligen Stand der Wissenschaft erklärt. In vielen Fällen waren differenzierte Techniken wie FISH, Methylierungs- oder Mikrosatellitenanalysen nicht vor Mitte der 1990er Jahre verfügbar (Windpassinger *et al.*, 2003). Auch der Fokus humangenetischer Beschreibungen hat sich in den vergangenen 40 Jahren gewandelt, zum einen in der Art des betrachteten Befundes (Dermatoglyphen, Blutbefunde), zum anderen in der Gewichtung von Phänotypisierung und Methodendarstellung. In einigen der publizierten Fällen sind auch mehrere Chromosomen in die Rekombinationen mit einbezogen; dies erschwert es, beschriebene Symptome präzise dem Chromosom 15 zuzuschreiben.

Insgesamt sind interstitielle Deletionen dieser Größe und/oder Region wie in dem in dieser Arbeit analysierten Fall äußerst selten, so dass es schwierig ist, statistisch fundierte Aussagen

über ein phänotypisches Bild zu machen, vor allem, da in einigen Fällen ein Prader-Willi Syndrom mit vorliegt, welches ebenfalls heterogen auftritt. Trotzdem soll versucht werden, einige wichtige Ähnlichkeiten und Gegensätze hervorzuheben.

In einem Vergleich von 15 „non-PWS“-Fällen mit 15q-Deletionen, welche allesamt den p-Arm von Chromosom 15 mit einschließen, verschiedene Lokalisationen des distalen Bruchpunkt auf 15q besitzen und in 11 Fällen auch noch Deletionsereignisse auf anderen Chromosomen aufweisen, leiten Schwartz *et al.* (1985) ein relativ heterogenes klinisches Bild ab, das jedoch gewisse charakteristische Gemeinsamkeiten aufweist: (geistige und motorische) Entwicklungsverzögerung, ungewöhnlich geformte Stirn und Ohren, Augenanomalien, Kryptorchismus, Skelettdeformitäten, schwere muskuläre Hypotonie und 4-Finger-Furche; es kommt praktisch nie zum Auftreten des beim PWS häufigen unersättlichen Appetits oder zur Fettleibigkeit.

Eine Besprechung weiterer Fälle, die chronologisch an jene von Schwartz *et al.* (1985) anknüpfen, bieten Erdogan *et al.* (2007): gehäuft treten in diesen Kasuistiken Gaumenspalten/geteilte Uvulae, Hypotonie, tief ansetzende Ohren und Herzfehlbildungen auf. Besonders auffällig ist, dass in allen Fällen mit persistierendem Ductus arteriosus (PDA) ein distaler Bruchpunkt in 15q14 vorliegt (Duckett und Roberts, 1981; Schwartz *et al.*, 1985; Tonk *et al.*, 1995; Matsumura *et al.*, 2003; Windpassinger *et al.*, 2003). Dieser Phänotyp-Genotyp-Befund korreliert teilweise gut mit dem der Probandin 1, da sich bei ihr ebenfalls tief ansetzende Ohren, muskuläre Hypotonie und ein persistierender Ductus arteriosus fanden. Wie bereits erläutert, wäre das KLF13-Gen bei Haploinsuffizienz ein möglicher Kandidat für den PDA, da es wie der distale Bruchpunkt der Probandin in 15q13.3 liegt. Die von Erdogan *et al.* (2007) vorgeschlagenen Gene GREM1, CX36, ACTC1 and MEIS2 liegen dagegen zu weit distal in Bande 15q14, um als verursachende Gene für die PWS-atypische Symptomatik der Probandin 1 in Betracht gezogen zu werden.

Bei Analysen der Literatur konnte eine Deletion mit identisch gelegenen Bruchpunkten wie die im Rahmen dieser Arbeit bei der Probandin 1 charakterisierten Bruchpunkten nicht gefunden werden. Von den Deletionen, welche die PWS-Region mit einschließen, wurden wegen der oben erwähnten Problematik der Heterogenität des 15q13-Bruchpunktes aus den untersuchten Fällen jene ausgewählt, bei welchen der distale BP in 15q14 und weiter telomerisch charakterisiert wurde.

Zur besseren Übersicht wurden in Tabelle 11 die phänotypischen Auffälligkeiten des eigenen und der bisher beschriebenen Patienten mit interstitiellen Deletionen im proximalen q-Arm aufgelistet. Ein weiteres Problem bei phänotypischen Gegenüberstellungen ist die teils sehr unterschiedliche Exaktheit der Beschreibung in den Fällen aus der Literatur, vor allem bei der Betrachtung von geistiger Entwicklungsverzögerung und Langsamkeit von Sprachentwicklung sowie die Subjektivität in der Beschreibung solcher Befunde.

Tabelle 11: Phänotypische Auffälligkeiten von 11 Patienten mit Deletionen in 15q

Kasuistik	muskuläre Hypotonie	IUGR bzw. erniedr. Geburtsmaße	Motorische Retardierung	retard. Sprachentwicklung	Ohrenmalformation	Retrognathie/schmale Oberlippe	small left colon-Syndrom/Anteopistion	Herzfehler (PDA/PFO)	Karyotyp
eigener Patient	+	+	+	+	+ ^e	+/+	+	+	46, XX, del(15)(q11.2q13.3)
Matsumura <i>et al.</i> (2003)	+	+	n.a.	n.a.	+		0	+	46, XY, 15,+der(22)t(15;22)(q14;q11).ish; distaler BP zw. D15S118 und D15S146
Calounova <i>et al.</i> (2008) (Pat. #2)	+	-	+	+	+	+/0	0	0	46, XX, del(15)(q11.2-q14) [C15ORF2 → AVEN]
Windpassinger <i>et al.</i> (2003)	+	-	n.a.	n.a.	+	+/0	0	+	45, XY, -15, der(3)t(3;15)(qter;q14) distaler BP bei D15S1232
Brunetti-Pierri <i>et al.</i> (2008) (Pat. #2)	+	+	+	+	0	0/+	0	+ ^f	46, XX, del(15)(q12q14) [arr cgh 15q13.1q14 (RP11-143)24→RP11-323]15x1.ish
Abeliovich <i>et al.</i> (1996) (Pat. #1)	+	+	(+)	(+)	0	-/+	0	-	46, XX, -15, +der(21)t(15;21)(q15;q22.1)
Tonk <i>et al.</i> (1995)	0	+	0	+	+	0/0	0	+ ^e	46, XY, del(15)(q12q14)
Galan <i>et al.</i> (1991)	+	+	n.a.	+	+ ^e	-/-	0	+ ^m	46, XY, del(15)(q11 or q12→q14)
Schwartz <i>et al.</i> (1985)	+	-	n.a.	n.a.	+	0/0	0	+ ^m	45, XY, -15, -22, +rec(15;22)(22qter→22q13.2::15q14→15qter)
Pauli <i>et al.</i> (1983)	+	0	n.a.	n.a.	0	0/0	0	+	(n.a.) XY, del(15)(pterq15) und del(11)(q15qter)
Kucerová <i>et al.</i> (1979)	+	-	+	+	0	0/+	0	0	45, XY, -3, -15, +t(3;15)(p25;q15)

+ = Befund vorhanden, - = Befund nicht vorhanden, 0 = Befund nicht erwähnt; n.a. = nicht anwendbar, da Proband/in in Beschreibung zu jung;

m = Herzgeräusch; e = tief ansetzende Ohren mit Ohrmuscheldysplasie; f = offenes For. ovale; g = VSD, PDA, ischämische Kardiomyopathie

Bei Patienten, bei denen die Region 15q11.2-13.3 mit in die jeweilige Deletion eingeschlossen war (siehe Tabelle 11), wurden vor allem die PWS-typische muskuläre Hypotonie (10/10), ein Herzfehler (9/10) und ein verringertes Geburtsgewicht (5/10) gefunden. Unter den

Herzfehlbildungen fanden sich vor allem persistierende Ductus Botalli oder offene Foramina ovalia (PFO).

Wie oben erläutert, könnte das KLF13-Gen ein möglicher Kandidat für dieses Symptom sein. Allerdings sind offene Foramina ziemlich häufig und nicht immer krankheitsrelevant und auch PDAs sind mit einer Häufigkeit von ca. 8% (Schumacher *et al.*, 2008) unter den Herzfehlbildungen vertreten.

Die Fazies der Patienten weisen gehäuft Malformationen der Ohren (5/10) auf, in einem Fall (Galan *et al.*, 1991) sogar eine entsprechende Ohrmuscheldysplasie bei tief sitzenden Ohren; eine schmale Oberlippe (3/10) oder eine Retrognathie (2/10) wie bei der Probandin 1 waren im Vergleich mit den Fällen aus der Literatur nicht besonders häufig.

Hinsichtlich der mentalen Retardierung sowie der Sprachverzögerung scheint eine große Divergenz zu bestehen. Bei Patienten mit sehr ähnlicher deletierter Region sind teils sehr unterschiedliche Grade der mentalen Retardierung beschrieben worden.

Butler *et al.* (2004) untersuchten mittels Verhaltens- und Intelligenztests sowie Versuchen zu motorischen Fähigkeiten PWS-Patienten mit unterschiedlich großen Deletionen; dabei wurden die Probanden nach Deletionen eingeteilt, die proximal (Typ I) oder distal (Typ II) des BP2 lagen (zur Lokalisation der BP vgl. Abb. 24). Butler *et al.* (2004) kamen zu dem Ergebnis, dass Patienten mit Typ II-Deletionen sowohl in Intelligenz- als auch in Verhaltenstests besser abschnitten, außerdem die motorischen Fähigkeiten höher ausgeprägt wären.

Während die hier vorgestellte Probandin ebenso wie 2 weitere Fälle aus der Literatur (Galan *et al.*, 1991; Brunetti-Pierrri *et al.*, 2008) nach dieser Einteilung dem Typ II entsprechen, müssten alle anderen sowie die von Schwartz *et al.* (1985) beschriebenen Fälle dem Typ I zugeordnet werden. Andererseits wird bei der von Abeliovich *et al.* (1996) vorgestellten Patientin mit einer großen Deletion von einer mäßigen mentalen Retardierung und einer langsamen Sprechweise berichtet; bei der hier untersuchten Probandin 1 mit einer kleineren Deletion zeigte sich sowohl im motorischen als auch im mentalen Bereich eine deutliche Retardierung und keinerlei Sprachentwicklung. Bei der von Calounova *et al.* (2008) beschriebenen Patientin, die gegenüber der Probandin 1 weiter distal liegende Bruchpunkte besitzt, wird eine mäßige bis schwere Retardierung beschrieben.

Demgegenüber muss jedoch auch beachtet werden, dass bei größeren Deletionen mit weiter distal liegendem Bruchpunkt anscheinend schwerere Ausprägungen des Phänotyps bei PWS-Patienten mit sich ziehen (Schwartz *et al.*, 1985; Pujana *et al.*, 2002; Butler *et al.*, 2004; Mignon-Ravix *et al.*, 2007; Sahoo *et al.*, 2007).

Abschließend sollte jedoch auch bedacht werden, dass der Schweregrad einer Retardierung vom Alter der Patienten und die Einteilung nicht zuletzt auch von Betrachter abhängt.

Eine weitere Herangehensweise bei der Analyse der Syndrome war nun, lediglich Kasuistiken von Regionen zu analysieren, die distal der PWS-typischen Deletionen, aber noch innerhalb der bei der Probandin vorliegenden Deletion lokalisiert sind, um zu ergründen, ob die bei der Probandin 1 vorkommenden atypischen PWS-Befunde sich möglicherweise auf mit diesem Bereich assoziierte Syndrome zurückführen lassen.

Hierbei fand sich das *MICRODELETION 15q13.3* Syndrom (OMIM 612001). Dieses wurde zuerst von Sharp *et al.* (2008) beschrieben und in zwei Ausprägungen der Mikrodeletion eingeteilt, zum einen eine kleine Deletion von 1,5 Mb Länge, die von BP4-BP5 reicht, zum anderen eine größere Deletion von etwa 3,95 Mb, welche sich vom BP3-BP5 spannt. Auch wurde ein Proband mit einer Deletion von BP3-BP4 beschrieben (vgl. Lokalisierung der Bruchpunkte BP1-BP6 auf Chromosom 15q, Abb.24). Miller *et al.* (2009) berichten ebenfalls von Patienten mit Deletionen, welche von BP4-BP5 reichen.

Die Hauptbefunde dieses Syndroms sind milde bis mäßige Retardierung, Epilepsie mit abnormen EEG-Resultaten und milde Gesichtsdysmorphien (Sharp *et al.*, 2008). Besonders die facialen Dysmorphien dieser Patienten – runde Gesichter mit voller, aufgeworfener Oberlippe, Strabismus, Hypertelorismus und tief liegenden Augen – unterscheiden sich deutlich von denen der Probandin 1.

Andere Befunde jedoch korrelieren gut: die signifikanten Sprachdefizite (Miller *et al.*, 2009) bzw. die milde bis mäßige Retardierung mit Sprech- und Lernschwierigkeiten sowie die muskuläre Hypotonie (Sharp *et al.*, 2008).

Die vorgestellten EEG-Befunde und die Erkrankungen aus dem Formenkreis der Epilepsie sind wegen nicht durchgeführter EEG-Untersuchung und bei der Probandin 1 (bisher) nicht aufgetretener Epilepsie nicht diskussionsfähig.

Deutlich wird, dass wie auch beim Prader-Willi Syndrom selbst, nicht nur ein einzelnes Gen zum Phänotyp der Probandin 1 beiträgt, sondern mehrere Gene im Sinne eines *contiguous gene syndrome* beteiligt sind.

Neben den für das PWS vermuteten Kandidatengenen MRKN3, ZNF125, SNRPN, Necdin, IPW, HBII-85 (Jong *et al.*, 1999a; Jong *et al.*, 1999b; Gerard *et al.*, 1999; Wirth *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Rodriguez-Jato *et al.*, 2005) bieten sich als mögliche verursachende Gene für die vorgestellte Probandin 1 GABRG3, ABPA2, NDNL2, KLF13 und CHRNA7 an (Culiat *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Lavalleyé *et al.*, 2006; Nemer *et al.*, 2007; Shinawi *et al.*, 2009).

Die sorgfältige und sich stets an den aktuellen Fällen orientierende Analyse von Phänotyp-Genotyp-Vergleichen, zusammen mit Mutationsanalysen oder Tiermodellen werden möglicherweise das Verständnis dahingehend erweitern.

5.3 Der mit einer partiellen Trisomie 15(q14q15) einhergehende Phänotyp beim Probanden 2

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten molekulargenetischen Analysen der trisomen Region des proximalen 15q-Arms beim Probanden 2 zeigten eine ungewöhnlich lokalisierte, etwa 5,4 Mb überspannende, partielle Trisomie im proximalen 15q-Arm, der Karyotyp konnte mit 46,XY, der(18)ins(18;15)(q11.2;q14q15)*mat* benannt werden.

Der proximale Startpunkt liegt dabei in der terminalen Hälfte der Bande 15q14, also deutlich distal des BP6 (vgl. Abb. 24), der von Mignon-Ravix *et al.* (2007) als spezifisch für unbalancierte Translokationen oder andere Rekombinationen aufgeführt wird.

Da bei der Probandenmutter eine balancierte Insertion der 15q14q15-Banden in Chromosom 18q11.2 erfolgte, müssen zwischen den Chromosomen 15 und 18 während der Meiose interchromosomale Umbauprozesse stattgefunden haben.

In der Literatur finden sich nur zwei Fälle von genetischen Rekombinationen zwischen den langen Armen der Chromosomen 15 und 18 (Rivera *et al.*, 1990; Semerci *et al.*, 2004); hierauf Bezug nehmend kann nicht von einem gehäuften Auftreten von Rekombinationsereignisse begünstigenden Strukturen zwischen den beiden Chromosomen 15 und 18 ausgegangen werden. Eine molekulargenetische Untersuchung der Region 18q11.2 auf genomische Instabilität fand indes im Rahmen dieser Arbeit nicht statt.

Die phänotypische Einordnung des Probanden gestaltete sich schwierig: ein Symptomenkomplex von IUGR, Augen- und Skelettanomalien mit Kleinwüchsigkeit, atypischer Fettverteilung, Ventrikelseptumdefekt, Verhaltensauffälligkeit mit Hyperaktivität und Aggressionen, verzögerter Sprachentwicklung und retardierter geistiger Entwicklung mit stereotaktischen Bewegungsabläufen bei auffälligen Befunden im EEG und MRT konnte keinem definierten Krankheitsbild zugeordnet werden.

Prüfung bekannter Gene der Region 15q14q15

Für eine Korrelation von Genotyp und Phänotyp des Probanden wurde die trisome Region zwischen den im Rahmen dieser Arbeit durch Molekularanalysen charakterisierten Bruchpunkten auf vorhandene Gene untersucht, um über eine Funktion der Genprodukte eine Korrelation zu den beobachteten Symptomen herzustellen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Da in den meisten Fällen über die Funktion der Genprodukte nur wenig bekannt ist, sollen nur diejenigen Gene hier aufgeführt werden, bei welchen ein geeigneter Zusammenhang hergestellt wurde.

Tabelle 12: Betrachtete Gene in der trisomen Region des Probanden 2

<ul style="list-style-type: none"> • SPRED1 (Sprouty-related EVH1 domain-containing protein 1, MIM-Nr. 609291), eine Überexpression des Spred1 hemmt NGF-induzierte Neuronen-Differenzierung in Rattenzellen (PC12) (Wakioka <i>et al.</i>, 2001). Eine trisome Anlage beim Probanden mag zu einer reduzierten Gehirnentwicklung geführt haben.
<ul style="list-style-type: none"> • THBS1 (thrombospondin 1 precursor, MIM-Nr. 188060) hemmt die Angiogenese.
<ul style="list-style-type: none"> • PAK6 (p21-ACTIVATED KINASE 6, MIM-Nr. 608110) hemmt die Aktivität von Androgen-Rezeptoren. Überexprimiert ist er möglicherweise für die eher weibliche Fettverteilung des Probanden 2 verantwortlich sein.
<ul style="list-style-type: none"> • DISP2 (DISPATCHED, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 2, MIM-Nr. 607503) ist Teil des Hedgehog (Hh)-Signalwegs.
<ul style="list-style-type: none"> • IVD (isovaleryl Coenzyme A dehydrogenase, MIM-Nr. 607036) ist ein mitochondriales Matrixenzym.
<ul style="list-style-type: none"> • LTK (LEUKOCYTE TYROSINE KINASE, MIM-Nr. 151520), das Genprodukt kontrolliert mittels Phosphorylierung diverse Signalwege für Zellwachstum und – differenzierung.
<ul style="list-style-type: none"> • VPS39/ VAM6 (vacuolar protein sorting 39, MIM-Nr. 612188) moduliert Faktoren im Smad-Signalweg.
<ul style="list-style-type: none"> • CAPN3 (CALPAIN 3, MIM-Nr. 114240), muskelspezifische Calpain, welches Titin spezifisch bindet.
<ul style="list-style-type: none"> • SNAP23 (SYNAPTOSOMAL-ASSOCIATED PROTEIN, 23-KD, MIM-Nr. 602534) ist ein Regulator bei dem Vesikel-Docking und der Fusion. Veränderungen im SNAP23-Gen könnten neurologische und andere Krankheiten verursachen, die mit Defekten im Vesikel-Membran-Fusionsprozess einhergehen (Lazo <i>et al.</i>, 2001).
<ul style="list-style-type: none"> • TTBK2 (TAU TUBULIN KINASE 2, MIM-Nr. 611695) kodiert für eine Caseinkinase, welche Tubulin und Tau phosphoryliert. Eine vermehrte Expression dieser Kinase führt zu einer Hyperphosphorylisation des Tau-Proteins, dieses kann nicht mehr an Mikrotubulin binden und lagert sich als paired helical filaments (PHFs) im Gehirn ab.

Wie in Tabelle 12 ersichtlich, sind einige Gene im Sinne eines *contiguous gene syndrome* als Verursacher einzelner Symptome des Phänotyps denkbar. Da in der Literatur allerdings meist nur Informationen über einen Phänotyp bei Haploinsuffizienz eines bestimmten Gens zu finden sind, muss im Sinne der Genotyp-Phänotyp-Korrelation die Überlegung erfolgen, wie Merkmale sich bei Überexpression des jeweiligen Gens ausprägen.

Ein Beispiel ist CALPAIN 3, welches im Knockout-Mausmodell eine Atrophie der Muskeln bewirkt, da das Protein Titin, welches von Calpain gebunden wird, nicht bei der Stabilisierung des Muskels mitwirkt. Titin sorgt für die Muskelruhespannung, zur Elastizität trägt allerdings nur derjenige Abschnitt des Titins bei, der nicht an Myosin oder Aktin gebunden ist (Linke, 2000). Zu schlussfolgern ist also, dass bei übermäßiger Expression des Titin-bindenden Calpains die Elastizität des Muskels abnimmt, er rigider wird.

Interessant ist die Situation auch bei der TAU TUBULIN KINASE 2 (TTBK2): Houlden *et al.* (2007) fanden bei Familien mit spinocerebellärer Ataxie 11 (SCA11; OMIM 604432) eine Haploinsuffizienz des TTBK2-Gens. Folgt man der Funktion der Caseinkinase, könnte davon ausgegangen werden, dass eine verminderte Phosphorylierung von Tau hierfür ursächlich ist. Da der Mikrotubuli-bindende Anteil des Tau-Proteins hierdurch vermindert wird, fällt auch die Funktion der Mikrotubuli, welche am schnellen axonalen Transport zwischen Zellsoma und Synapse beteiligt sind, aus. Es treten verzögerte Verschaltungen der Bewegungskoordination auf, was sich im klinischen Bild einer Ataxie widerspiegelt.

Kommt es dagegen durch eine vermehrte Expression der TTBK2 zu einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, bindet dieses nicht mehr an Mikrotubulin und lagert sich als paired helical filaments (PHFs) ab (Goedert *et al.*, 1989; Hanger *et al.*, 1998; Kitano-Takahashi *et al.*, 2007).

Vergleichbar ist dieser Mechanismus mit dem der Duplikation des APP-Locus auf Chromosom 21; durch eine Akkumulation von Amyloid- β -Peptiden wird eine autosomal dominante Form der early-onset Alzheimerkrankheit mit Amyloidangiopathie der Gehirnarterien verursacht (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006). Eine Art Demenz im Sinne einer Alzheimer-Erkrankung, wie sie auch bei Trisomie 21 auftritt (Granic *et al.*, 2010), könnte also eine Ursache für die schwere mentale Retardierung des vorgestellten Probanden sein.

Genotyp-Phänotyp-Korrelation unter Berücksichtigung beschriebener Trisomien aus der Literatur

Da dieser Erklärungsansatz jedoch unbefriedigend für den Gesamt-Phänotyp war, wurde die Literatur nach ähnlichen genotypischen Konstellationen durchsucht, um zu ergründen, ob bei Kasuistiken mit ähnlichen Triplikationen der Region 15q14q15 (wie beim Probanden 2) entsprechende phänotypische Ausprägungen gefunden werden.

Im Gegensatz zu Deletionen gibt es bei partiellen Trisomien diverse Möglichkeiten für die Entstehung eines duplizierten Chromosomensegments:

Möglich sind invertierte und nicht invertierte Duplikationen im Ursprungs-Chromosom oder in andere Chromosomen inserierte Chromosomensegmente in einem unbalancierten Chromosomensatz; es kommen isodicentrische Chromosomen 15 (idic15) vor (wobei bei Vorliegen zweier unauffälliger Chromosomen 15 dann ein 4-facher Chromosomenabschnitt vorliegt), außerdem unbalancierte Translokationen und zusätzliche Ringchromosomen (Butler *et al.*, 1988; Battaglia, 2005; Zou *et al.*, 2006; Battaglia, 2008).

Diese Chromosomenaberration ist demzufolge durch eine überzählige Kopie eines Chromosomenabschnitts bestimmt, außer wenn durch die Rekombinationsereignisse Gene im Bruchpunktbereich zerstört wurden; diese liegen dann haploinsuffizient vor.

Neben der in 5.2 beschriebenen Problematik der unpräzisen Angaben in Kasuistiken in der Literatur sind Trisomien der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Region 15q14q15 insgesamt äußerst selten, so dass es schwierig scheint, statistisch fundierte Aussagen über einen assoziierten Phänotyp zu treffen.

Die in der Literatur beschriebenen Fälle tragen meist eine Trisomie, die vom terminalen Ende des p-Arms oder vom Zentromer bis 15q15, oder darüber hinaus, reicht.

Die Symptomatik einer reinen Duplikation 15q14q15 wird dabei überlagert von den Symptomen des *Duplication-15q11-q13* Syndroms (OMIM 608636; Bunday *et al.*, 1994). Dieses präsentiert sich mit geistiger Behinderung, kindlichem Autismus, Ataxie and Epilepsie, das duplizierte Chromosomensegment ist meist mütterlichen Ursprungs.

Bekannt ist zudem generell, dass Duplikationen maternalen Ursprungs dieser Region assoziiert sind mit unterschiedlich stark ausgeprägter mentaler Retardierung und autistischem Verhalten (Browne *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 1997; Repetto *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit sollen einige wichtige Ähnlichkeiten und Gegensätze hervorgehoben werden, die sich beim Vergleich des vorgestellten Probanden mit den Fällen aus der Literatur ergeben; die Karyotypen und die Phänotypen von Kasuistiken über Patienten mit partieller Trisomie oder Duplikation des langen Arm von Chromosom 15 sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Die beim Probanden 2 bestehenden phänotypischen Auffälligkeiten wie die mentale Retardierung waren in allen Fällen (8/8), Kleinwüchsigkeit, IUGR und Skelettdeformitäten in der überwiegenden Mehrzahl (5/8) der Fälle vorhanden. Eine verzögerte Sprachentwicklung konnte bei 50% der Patienten angetroffen werden, Herzfehlbildungen und auffällige EEG-Befunde waren dagegen unterrepräsentiert (3/8).

Die pathologischen Augenanomalien und das auffällige Verhalten des Probanden 2 wurden lediglich in der Kasuistik von Abeliovich *et al.* (1996) beschrieben (siehe auch 5.4). Der Patient mit der genotypisch noch am ehesten übereinstimmenden Chromosomenaberration (dup(15)(q12/13q15), den DeFrance *et al.* (1984) darstellen, wurde als Kind mit typischen PWS-Befunden beschrieben. Bezogen auf die atypische Fettverteilung ergibt sich eine mögliche Konkordanz, ein weiterer Vergleich des Phänotyps zeigt jedoch keine Übereinstimmungen.

Von Veenema *et al.* (1984) wird eine Patientin mit einer Chromosomenaberration beschrieben, welche wie eine Duplikation der Banden 15q14 und 15q15 erscheint (nicht in der Tabelle 13). Diese wird als mental retardierte 14-Jährige mit Epilepsie beschrieben, jedoch ohne jegliche phänotypische Auffälligkeit.

Da die anderen betrachteten partiellen Trisomien sich auf einen größeren Bereich erstrecken, ist ungewiss, welchen Anteil dieser Bereich (15q14 und 15q15) an einem auffälligen Phänotyp hat. Aufgrund der Unsicherheit, was die Karyotypisierung angeht, soll der Fall von Veenema *et al.* (1984) nicht weiter diskutiert werden.

Tab. 13: Phänotypen von 8 Patienten mit partieller Trisomie 15

Kasusistik	IUGR	Kleinwuchs	mentale Retardierung	verzögerte Sprachentwicklung	Verhaltensauffälligkeit (aggressiv, hyperaktiv)	Herzfehler	Augenanomalie	atyp. Fettverteilung	Skelettdeformität	Befunde im EEG/MRI	Karyotyp
eigener Patient	+	+	+	+	+	+ ^g	+	+	+	+	46,XY,der(18)ins(18;15)(q11.2;q14q15)mat
Elcioglu <i>et al.</i> (1997)	-	-	+	+	-	+ ^m	-	-	+	0	46,XY,ins inv dup(15)(q24.3;q21.3 → q13.3)
Abeliovich <i>et al.</i> (1996)	+	+	+	+	+	0	+ ^s	-	+	0	46,XX,-21,+der(15)t(15;21)(q15;q22.1)
Geneix <i>et al.</i> (1979)	-	+	+	n.a.	n.a.	0	0	0	0	0	47,XY,+der(15)t(5;15)(p15;q22)mat
DeFrance <i>et al.</i> (1984)	+	+	+	0	0	-	-	+*	0	0	46,XY, dup(15)(q12 or 13 → q15)
Voss <i>et al.</i> (1982)	-	+	+	+	0	-	-	-	+	+	48,XY,+15q(pter→q15),+mar(15)
Coldwell <i>et al.</i> (1981)	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	0	0	+	n.a.	47,XX,+15
Watson <i>et Gordon</i> (1971)	+	-	+	n.a.	n.a.	0	0	n.a.	-	+	47,XX,+der(15)t(15;G)(q22;p11)

+ = Befund vorhanden, - = Befund nicht vorhanden, 0 = Befund nicht erwähnt, n.a. = nicht anwendbar, * = typische PWS-Befunde, g = VSD, m = Herzgeräusch, s = Strabismus

Murdock und Wurster-Hill (1986) ziehen einen Vergleich in 22 Fällen mit partiellen Trisomien des Chromosoms 15, welche allesamt verschiedene Lokalisationen der Bruchpunkte besitzen und in 9 Fällen auch Translokationsereignisse mit anderen Chromosomen aufweisen, und leiten ein relativ heterogenes klinisches Bild ab. Als Gemeinsamkeiten werden geistige Entwicklungsverzögerung, Wachstumsretardierung, Mikrozephalie und Krampfanfälle abgeleitet; dieser Phänotyp lässt sich auch am Probanden 2 erkennen.

Allerdings ist zu vermuten, dass der von Murdock und Wurster-Hill (1986) beschriebene Phänotyp in einigen Fällen vom Phänotyp des *Duplication-15q11-q13* Syndroms überlagert wird.

Zur Vollständigkeit wurden auch die krankheitsassoziierten Gene in der Region 18q11.2 untersucht, da ein Gen durch Insertion des Chromosomensegments aus 15q unterbrochen sein könnte. Allerdings hätte sich diese Haploinsuffizienz eines Gens dann auch schon bei der Probandenmutter II,6 manifestieren müssen. Die Krankheitsbilder, die bei Gendosis-Veränderung mit der Region 18q11.2 lokalisierten Gene assoziiert sind, konnten indes weder beim Probanden noch bei seiner Mutter beobachtet werden.

Es wird ersichtlich, dass zum vorgestellten Fall kein konkretes Korrelat in der Literatur zu finden ist. Auch bei der Analyse von bekannten Genen der in dieser Arbeit charakterisierten Region 15q14q15 konnte ein einzelnes Gen, das für den gesamten Phänotyp verantwortlich ist, nicht abgegrenzt werden.

Vielmehr sind als verursachende Gene für die neurologischen Auffälligkeiten und Gehirnentwicklungsstörungen des Probanden 2 die Gene SPRED1, SNAP23 und TTBK2 zu erwägen, die Gene DISP2, LTK und VPS39 könnten durch ihre Funktionen in Signalwegen einen modulierenden Einfluss in der Embryonalentwicklung beigetragen haben. Die sorgfältige orientierende Analyse von Phänotyp-Genotyp-Vergleichen in der Literatur, zusammen mit Mutationsanalysen und Tiermodellen werden möglicherweise das Verständnis dahingehend erweitern.

5.4 Reziproke Translokation 15 und 21

An den Schluss der Betrachtungen zu einer Phänotyp-Genotyp-Assoziation bei den hier vorgestellten Probanden soll der Vergleich mit einer in der Literatur beschriebenen außergewöhnlichen Kasuistik einer reziproken Mono- bzw. Trisomie der Chromosomen 15 und 21 gestellt werden.

Von ganz besonderem Interesse ist der Fall durch das gleichzeitige Auftreten einer partiellen Monosomie 15(pter→q15) und partiellen Trisomie 15(pter→q15) bei zwei Geschwistern, er hat demzufolge eine große Übereinstimmung mit der genomischen Konstellation bei den in dieser

Arbeit betrachteten Probanden 1 und 2.

Das Geschwisterpaar wird von Abeliovich *et al.* (1996) beschrieben: durch eine Translokation der Chromosomen 15 und 21 [t(15;21)(q15;q22.1)*pat*] haben beide jeweils eine partielle Trisomie als auch eine partielle Monosomie eines Chromosoms.

Dabei hat „Patientin 1“ den Karyotyp 46, XX, -15, +der(21)t(15;21)(q15;q22.1) mit partieller Monosomie 15(pter→q15) und partieller Trisomie 21(pter→q22.1). Sie präsentiert ein klassisches Prader-Willi Syndrom mit anhaltender muskulärer Hypotonie, Esssucht, rundem Gesicht, Fehlsichtigkeit, undeutlicher Sprache und mäßiger mentaler Retardierung sowie Kleinwüchsigkeit, was im Einklang zu einer paternalen Deletion der Bande 15q11.2 steht.

„Patient 2“, Bruder von „Patientin 1“, mit Karyotyp 46, XY, -21, +der(15)t(15;21)(q15;q22.1) mit partieller Trisomie 15(pter→q15) und partieller Monosomie 21(pter→q22.1) wird mit erhöhtem Muskeltonus mit brüskten Reflexen, aggressivem Verhalten, dreieckigem Gesicht, später Sprachentwicklung und milder mentaler Retardierung sowie verzögerter körperlicher Entwicklung mit Skelettdeformitäten beschrieben. Weitere Befunde, die Abeliovich *et al.* (1996) der Trisomie 15 zuschreiben, sind eine Mikrozephalie, eine große Nase und Syndaktylie der Zehen.

Bei der Analyse der PWS-Region fanden Abeliovich *et al.* (1996) bei „Patientin 1“ eine paternale Deletion, bei „Patient 2“ eine doppelte Ausprägung der väterlichen Marker.

Es ergibt sich ein annähernd gegensätzlicher Phänotyp bei reziprokem Genotyp; am Beispiel des Muskeltonus wäre zu postulieren, dass die Monosomie 15 bei „Patientin 1“ durch die paternale Haploinsuffizienz eine verminderte Funktion der Muskeltätigkeit bewirkt, während bei „Patient 2“ durch das zweifach paternale Vorliegen ein „Zu viel“ an Muskeltonus ausgeprägt ist.

Obwohl der Einfluss von Gendosis-Veränderungen des Chromosoms 21 an der oben genannten Kasuistik von Abeliovich *et al.* (1996) sicherlich berücksichtigt werden muss, ist deren „Patientin 1“ phänotypisch mit der in dieser Arbeit vorgestellten Probandin 1 vergleichbar: hier fallen vor allem die PWS-typischen Befunde wie muskuläre Hypotonie, Kleinwüchsigkeit und die mentale Retardierung auf. Auch die Sprachentwicklung ist sowohl bei der hier beschriebenen Probandin 1 als auch bei der von Abeliovich *et al.* (1996) beschriebenen „Patientin 1“ verzögert.

Ebenso zeigt „Patient 2“ viele Ähnlichkeiten mit dem hier untersuchten Probanden 2. Aufzuzeigen sind hier insbesondere die Aggressivität, die mentale Retardierung und die verzögerte körperliche Entwicklung mit Skelettdeformitäten. Gleichwohl muss gesagt sein, dass bei dem von Abeliovich *et al.* (1996) beschriebenen „Patienten 2“ der paternale Chromosomenabschnitt dupliziert vorliegt, beim hier dargestellten Patienten 2 dagegen ein kleinerer, maternaler Abschnitt.

Contiguous gene syndromes entstehen, wie bereits in 1.2 erwähnt, durch eine Veränderung der normalen Gendosis. Die Haploinsuffizienz von Genen bei Deletionen bewirkt meist durch Veränderungen von Genprodukten einen Funktionsverlust des entsprechenden Gens (*loss-of-function*). Bei der selteneren Duplikation von Genen kommt es zu einer Überexpression der Gene und damit zu einem Zuwachs an Genprodukt (*gain-of-function*) (Breuning und Bakker, 2000; Dang *et al.*, 2008; Rudd *et al.*, 2009).

Der Gendosis-Effekt wurde bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse anhand der vorgestellten Kasuistiken an mehreren möglichen Genen sowohl im Bezug auf eine *loss-of-function*-Mutation im Fall der Probandin 1 als auch auf eine *gain-of-function*-Mutation beim Probanden 2 aufgezeigt.

Bei der durchgeführten Analyse von Deletions- und Duplikationssyndromen des proximalen 15q-Arms am Beispiel der Kasuistiken konnte festgestellt werden, dass bedingt durch die Größe des betroffenen Chromosomenteils und der Vielzahl der vorhandenen Symptome das Vorliegen eines *contiguous gene syndrome* wahrscheinlich ist. Ein einzelnes Kandidatengen konnte mit dem derzeitigen Stand der Wissenschaft nicht verifiziert werden.

5.5 Ausblick

Die Klärung des Krankheitsmechanismus in den beiden hier vorgestellten Kasuistiken kann nicht darauf angelegt sein, den Patienten eine Therapieoption zu bieten. Wohl können aber durch Grundlagenforschung dieser Art Ansätze formuliert werden, wie genetische Defekte, die Krankheiten verursachen, möglicherweise durch Gentherapie kompensiert werden können.

Wichtig sind hier explizite klinische Beschreibungen von Dysmorphiesyndromen in der Literatur in Kombination mit modernen molekularzytogenetischen Analysemethoden, welche es erlauben, einzelne oder physikalisch gekoppelte Gene und auch genomisch instabile Regionen zu identifizieren. Eine geeignete Strategie zur detaillierten Detektion der Bruchpunkte bei den in dieser Arbeit beschriebenen Probanden wäre die Anwendung von Chromosomenregion-spezifischen Chip-Analysen (Dufva, 2009), zum Beispiel die Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung (*comparative genomic hybridization*, Array-CGH), eine Weiterentwicklung der vergleichenden Genomhybridisierung (konventionelle CGH) (Solinas-Toldo *et al.*, 1997).

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, bei zwei Patienten mit unklaren Dysmorphiesyndromen die zytogenetisch bereits dargestellten Chromosomenaberrationen im Bereich des Chromosoms 15 mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) weiter einzugrenzen und zu analysieren.

Hierzu sollten die Bruchpunkte einer *de novo* Deletion del(15)(q11.2q13.3) bei einer Probandin mit Verdacht auf atypisches Prader-Willi-Syndrom sowie einer maternal vererbten partiellen Trisomie der Banden 15q14q15 bei einem Probanden mit unklarem Dysmorphiesyndrom molekularzytogenetisch eingegrenzt werden.

Der proximale Bruchpunkt der Deletion von Probandin 1 konnte in der Region zweier sich überlappender BAC-Klone (RP11-483L3 und RP11-73C9) festgelegt werden. Bei der Analyse des distalen Bruchpunktes der Deletion von Probandin 1 konnte ein Bruchpunkt-überspannender BAC-Klon (RP11-242M5) aufgezeigt werden. Die Bruchpunktregionen ließen sich somit auf einen Bereich von ca. 125 bzw. 100 kb eingrenzen, die Größe der gesamten Deletion bei Probandin 1 beträgt etwa 10 Mb und ist somit mehr als doppelt so ausgedehnt wie die beim typischen Prader-Willi-Syndrom beschriebene Deletion.

Durch Mikrosatellitenanalyse der deletierten Region konnte bei den Markern D15S1048 und D15S976 eine paternale Deletion belegt werden, so dass insgesamt von einer paternalen Deletion ausgegangen werden kann.

Die Bruchpunkte der partiellen Trisomie beim Probanden 2 konnten jeweils der Region zweier sich überlappender BAC-Klone (RP11-638N6 und RP11-60L22 für den proximalen; RP11-960H11 und RP11-124A24 für den distalen Bruchpunkt) zugeordnet werden. Die Bruchpunktregionen ließen sich auf einen Bereich von 140 bzw. 95 kb eingrenzen, die gesamte trisome Region beim Probanden 2 ist etwa 5,1 Mb groß.

Durch *whole chromosome painting* bei der Mutter des Probanden 2 konnte der Ursprung eines derivativen Chromosoms mit Insertion eines Chromosomenabschnitts aus Chromosom 15 festgestellt werden, so dass davon auszugehen ist, dass die partielle Trisomie maternalen Ursprungs ist.

Die beschriebenen Aberrationen liegen in einer Region von großer chromosomaler Instabilität - die Bruchpunkte der Deletion konnten mit den in der Literatur beschriebenen „*hotspots*“ korreliert werden; die Bruchpunkte des trisomen Chromosomensegments konnten keinem der beschriebenen Bruchpunkten zugeordnet werden.

Es wurden im Bereich der charakterisierten Chromosomenabschnitte vorkommende Gene analysiert, um einen Zusammenhang zwischen den mutmaßlichen Genfunktionen und den bei den Patienten festgestellten phänotypischen Merkmalen herzustellen. Hierbei wurde jedoch kein einzelnes Gen gefunden, welches die beobachteten Symptome jeweils erklären könnte.

Da die Phänotyp-Genotyp-Korrelation für klinische Betrachtungen von großer Relevanz ist, wurde anschließend durch phänotypischen und genotypischen Vergleich mit Fällen aus der Literatur, welche ähnliche Deletionen bzw. Trisomien wie die Patienten aufweisen, versucht, einen charakteristischen Phänotyp für Deletionen der Banden 15q11.2-q13.3 bzw. für Trisomien der Banden 15q14-q15 zu definieren.

Deutlich wurde, dass Patienten mit den beschriebenen Aberrationen zwar eine Reihe phänotypischer Gemeinsamkeiten aufweisen, insgesamt jedoch eine sehr große Streuung bezüglich der Ausprägung besteht. Mentale Retardierung unterschiedlichen Ausmaßes, Kleinwuchs und Herzfehlbildungen wurden gehäuft bei den Deletionen beschrieben. Bei den partiellen Trisomien traten regelmäßig mentale Retardierung, verzögerte Sprachentwicklung und Skelettdeformitäten auf.

Präzise klinische Beschreibungen phänotypisch auffälliger Patienten in der Literatur können in Kombination mit den zur Verfügung stehenden molekularzytogenetischen Analyseverfahren (FISH, Mikrosatellitenanalyse, CHG-Array) dazu beitragen, dass die Genotyp-Phänotyp-Assoziation immer differenzierter wird. Eine detaillierte molekularzytogenetische Analyse chromosomaler Aberrationen kann helfen, mit Krankheiten assoziierte Gene aufzeigen und zu identifizieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Abeliovich D, Dagan J, Lerer I, Silberstein S, Katznelson MB, Frydman M (1996) $t(15;21)(q15;q22.1)$ pat resulting in partial trisomy and partial monosomy of chromosomes 15 and 21 in two offspring. *Am J Med Genet* 66:45–51.
2. Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD (1999) Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 65:370–386.
3. Angelman H (1965) 'Puppet children': a report of three cases. *Dev Med Child Neurol* 7:681–688.
4. Ballabio A (1991) Contiguous deletion syndromes. *Curr Opin Genet Dev* 1:25–29.
5. Ballabio A (1993) The rise and fall of positional cloning? *Nat Genet* 3:277–279.
6. Battaglia A (2005) The inv dup(15) or idic(15) syndrome: A clinically recognisable neurogenetic disorder. *Brain and Development* 27:365–369.
7. Battaglia A (2008) The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). *Orphanet J Rare Dis* 3:30–37.
8. Berufsverband Medizinische Genetik e.V., Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (2001) Leitlinien für die molekulare und cytogenetische Diagnostik bei Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom. *medgen* 13:71–73.
9. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513–1523.
10. Blanco G, Irving NG, Brown SD, Miller CC, McLoughlin DM (1998) Mapping of the human and murine X11-like genes (APBA2 and apba2), the murine Fe65 gene (Apbb1), and the human Fe65-like gene (APBB2): genes encoding phosphotyrosine-binding domain proteins that interact with the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *Mamm Genome* 9:473–475.
11. Bochkov NP, Demin YS, Luchnik NV (1974) Classification and methods of counting chromosomal aberrations in somatic cells. *Sov Genet* 8:658–665.
12. Breuning MH, Bakker E (2000) From gene to disease; basic concepts. *Ned Tijdschr Geneesk* 144:1725–1728.
13. Browne CE, Dennis NR, Maher E et al (1997) Inherited interstitial duplications of proximal 15q: genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61:1342–1352.
14. Brunetti-Pierri N, Sahoo T, Frioux S, Chinault C, Zascavage R, Cheung S-W, Peters S, (2008) 15q13q14 deletions: Phenotypic characterization and molecular delineation by comparative genomic hybridization. *Am J Med Genet Part A* 146:1933–1941.
15. Buiting K, Saitoh S, Groß S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B (1995) Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* 9:395–400.
16. Bunday S, Hardy C, Vickers S, Kilpatrick MW, Corbett JA (1994) Duplication of the 15q11-13 region in a patient with autism, epilepsy and ataxia. *Dev Med Child Neurol* 36:736-742.
17. Burn J (1999) Closing time for CATCH22. *J Med Genet* 36:737–738.
18. Butler MG, Bittel DC, Kibiryeva N, Talebizadeh Z, Thompson T (2004) Behavioral Differences Among Subjects With Prader-Willi Syndrome and Type I or Type II Deletion and Maternal Disomy. *Pediatrics* 113:565–573.
19. Butler MG, Fogo AB, Fuchs DA, Collins FS, Dev VG, Phillips JA 3rd (1988) Two patients with ring chromosome 15 syndrome. *Am J Med Genet* 29:149–154.

20. Calounova G, Hedvicakova P, Silhanova E, Kreckova G, Sedlacek Z (2008) Molecular and clinical characterization of two patients with Prader-Willi syndrome and atypical deletions of proximal chromosome 15q. *Am J Med Genet Part A* 146:1955–1962.
21. Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ (1970) Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 30:215–227.
22. Chao LY, Mishra R, Strong LC, Saunders GF (2003) Missense mutations in the DNA-binding region and termination codon in PAX6. *Hum Mutat* 21:138–145.
23. Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH (1999) Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* 8:1025–1037.
24. Coldwell S, Fitzgerald B, Semmens JM, Ede R, Bateman C (1981) A case of trisomy of chromosome 15. *J Med Genet* 18:146–148.
25. Collins FS (1992) Positional cloning: Let`s not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1:3-6.
26. Cook Jr EH, Lindgren V, Leventhal BL et al (1997) Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet* 60:928–934.
27. Cooper TA, Mattox W (1997) The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. *Am J Hum Genet* 61:259–266.
28. Culiati CT, Stubbs LJ, Montgomery CS, Russell LB, Rinchik EM (1994) Phenotypic consequences of deletion of the gamma 3, alpha 5, or beta 3 subunit of the type A gamma-aminobutyric acid receptor in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2815–2818.
29. Cuneo BF (2001) 22q11.2 deletion syndrome: DiGeorge, velocardiofacial, and conotruncal anomaly face syndromes. *Curr Opin Pediatr* 13:465-472.
30. Dallapiccola B, Mingarelli R, Novelli G (1995) The link between cytogenetics and mendelism. *Biomed Pharmacother* 49:83–93.
31. Dang VT, Kassahn KS, Marcos AE, Ragan MA (2008) Identification of human haploinsufficient genes and their genomic proximity to segmental duplications. *Eur J Hum Genet* 16:1350-1357.
32. Davidsson J, Collin A, Björkhem G, Soller M (2008) Array based characterization of a terminal deletion involving chromosome subband 15q26.2: an emerging syndrome associated with growth retardation, cardiac defects and developmental delay. *BMC Medical Genetics* 9:1–8.
33. de France HF, Beemer FA, Ippel PF (1984) Duplication in chromosome 15q in a boy with the Prader-Willi syndrome; further cytogenetic confusion. *Clin Genet* 26:379–382.
34. Donlon TA, Lalande M, Wyman A, Bruns G, Latt SA (1986) Isolation of molecular probes associated with the chromosome 15 instability in the Prader-Willi syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4408–4412.
35. Donnai D, Karmiloff-Smith A (2000) Williams syndrome: from genotype through to the cognitive phenotype. *Am J Med Genet* 97:164–171.
36. Duckett DP, Roberts SH (1981) Adjacent 2 meiotic disjunction: report of a case resulting from a familial 13q;15q balanced reciprocal translocation and review of the literature. *Hum Genet* 85:377–386.
37. Dufva M (2009) Introduction to microarray technology. *Methods Mol Biol* 529:1-22.
38. Dykens EM, Sutcliffe JS, Levitt P (2004) Autism and 15q11-q13 disorders: behavioral, genetic, and pathophysiological issues. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10:284–291.
39. Eichler EE (1998) Masquerading repeats: paralogous pitfalls of the human genome. *Genome Res* 8:758–762.
40. Elçioğlu N, Fear C, Berry AC (1997) Partial trisomy of 15q due to inserted inverted duplication. *Clin Genet* 52:442–445.
41. Elmslie FV, Rees M, Williamson MP, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, Sundqvist A, Friis ML, Chadwick D, Richens A (1997) Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Hum Mol Genet* 6:1329–1334.

42. Erdogan F, Ullmann R, Chen W, Schubert M, Adolph S, Hultschig C, Kalscheuer V, Ropers HH, Spaich C, Tzschach A (2007) Characterization of a 5.3 Mb deletion in 15q14 by comparative genomic hybridization using a whole genome "tiling path" BAC array in a girl with heart defect, cleft palate, and developmental delay. *Am J Med Genet Part A* 143A:172–178.
43. Galan F, Aguilar MS, Gonzalez J, Clemente F, Sanchez R, Tapia M, (1991) Interstitial 15q deletion without a classic Prader-Willi phenotype. *Am J Med Genet* 38:532–534.
44. Garver KL, Ciocco AM, Turack NA (1976) Partial monosomy or trisomy resulting from crossing over within a rearranged chromosome 1. *Clin Genet* 10:319–324.
45. Geneix A, Jaffray JY, Malet P, Foulon E, Jalbert P, Crost P (1979) A new case of partial trisomy 15q-. *Hum Genet* 51:335–338.
46. Gérard M, Hernandez L, Wevrick R, Stewart CL (1999) Disruption of the mouse *necdin* gene results in early post-natal lethality. *Nat Genet* 23:199–202.
47. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519–526.
48. Granic A, Padmanabhan J, Norden M, Potter H (2010) Alzheimer A β Peptide Induces Chromosome Mis-Segregation and Aneuploidy, Including Trisomy 21: Requirement for Tau and APP. *Mol Biol Cell* 21: 511–520.
49. Hanger DP, Betts JC, Loviny TL, Blackstock WP, Anderton BH (1998) New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nano-electrospray mass spectrometry. *J Neurochem* 71:2465–2476.
50. Hanna N, Parfait B, Vidaud D, Vidaud M (2005) Mécanismes et conséquences des mutations. *Med Sci (Paris)* 21:969–980.
51. Hiller B, Bradtke J, Balz H, Rieder H (2004) CyDAS Online Analysis Site. <http://www.cydass.org/OnlineAnalysis>.
52. Ho A, Morishita W, Hammer RE, Malenka RC, Sudhof TC (2003) A role for Mints in transmitter release: Mint 1 knockout mice exhibit impaired GABAergic synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1409–1414.
53. Horsthemke B, Wagstaff J (2008) Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet* 146A:2041–2052.
54. Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe C, Lashley T, Hernandez D, Worth P, Singleton AB, Hilton DA, Holton J, Revesz T, Davis MB, Giunti P, Wood NW (2007) Mutations in *TTBK2*, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nat Genet* 39:1434–1436.
55. Hsu TC (1952) Mammalian chromosomes in vitro. The Karyotype of Man. *J Hered* 43:167–172.
56. Hughes A (1952) Some effects of abnormal tonicity on dividing cells in chick tissue cultures. *Quart J Microscopical Sci* 93:207–220.
57. Inoue K, Dewar K, Katsanis N, Reiter LT, Lander ES, Devon KL, Wyman DW, Lupski (2001) The 1.4-Mb *CMT1A* Duplication/*HNPP* Deletion genomic region reveals unique genome architectural features and provides insights into the recent evolution of new genes. *Genome Res* 11:1018–1033.
58. Jong MT, Carey AH, Caldwell KA, Lau MH, Handel MA, Driscoll DJ, Stewart CL, Rinchik EM, Nicholls RD (1999a) Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region. *Hum Mol Genet* 8:795–803.
59. Jong MT, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, Nicholls RD (1999b) A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet* 8:783–793.
60. Kelly RB, Cozzarelli NR, Deutscher MP, Lehman IR, Kornberg A (1970) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break. *J Biol Chem* 245:39–45.

61. Kitano-Takahashi M, Morita H, Kondo S, Tomizawa K, Kato R, Tanio M, Shirota Y, Takahashi H, Sugio S, Kohno T (2007) Expression, purification and crystallization of a human tau-tubulin kinase 2 that phosphorylates tau protein. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63:602–604.
62. Kucerová M, Straková M, Polívková Z (1979) The Prader-Willi syndrome with a 15/3 translocation. *J Med Genet* 16:234–235.
63. 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. *Am J Med Genet* 19:81–112.
64. Lavallée G, Andelfinger G, Nadeau M, Lefebvre C, Nemer G, Horb ME, Nemer M (2006) The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *EMBO J* 25:5201–5213.
65. Lazo PA, Nadal M, Ferrer M, Area E, Hernández-Torres J, Nabokina SM, Mollinedo F, Estivill X (2001) Genomic organization, chromosomal localization, alternative splicing, and isoforms of the human synaptosome-associated protein-23 gene implicated in vesicle-membrane fusion processes. *Hum Genet* 108:211–215.
66. Lee S, Walker CL, Karten B, Kuny SL, Tennese AA, O'Neill MA, Wevrick R (2005) Essential role for the Prader-Willi syndrome protein neccdin in axonal outgrowth. *Hum Mol Genet* 14:627–637.
67. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80: 224-234.
68. Linke W (2000) Titin-faszinierendes Riesenmolekül. *Ruperto Carola* 1:20–22.
69. López-Bigas N, Ouzounis CA (2004) Genome-wide identification of genes likely to be involved in human genetic disease. *Nucleic Acids Res* 32:3108–3114.
70. Lucas RE, Vlangos CN, Das P, Patel PI, Elsea SH (2001) Genomic organisation of the ~1.5 Mb Smith-Magenis syndrome critical interval: transcription map, genomic contig, and candidate gene analysis. *Eur J Hum Genet* 9:892–902.
71. Lupski JR (1998) Genomic disorders: Structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends in Genet* 14:417–422.
72. Lupski JR (2003) Genomic disorders recombination-based disease resulting from genomic architecture. *Am J Hum Genet* 72:246–252.
73. Magenis RE, Toth-Fejel S, Allen LJ, Black M, Brown MG, Budden S, Cohen R, Friedman JM, Kalousek D, Zonana J, et al (1990) Comparison of the 15q deletions in Prader-Willi and Angelman syndromes: specific regions, extent of deletions, parental origin, and clinical consequences. *Am J Med Genet* 35:333–349.
74. Matsumura M, Kubota T, Hidaka E, Wakui K, Kadowaki S, Ueta I, Shimizu T, Ueno I, Yamauchi K, Herzing LB, Nurmi EL, Sutcliffe JS, Fukushima Y, Katsuyama T (2003) 'Severe' Prader-Willi syndrome with a large deletion of chromosome 15 due to an unbalanced t(15,22)(q14;q11.2) translocation. *Clin Genet* 63:79–81.
75. Mignon-Ravix C, Depetris D, Luciani JJ, Cuoco C, Krajewska-Walasek M, Missirian C, Collignon P, Delobel B, Croquette MF, Moncla A, Kroisel PM, Mattei MG (2007) Recurrent rearrangements in the proximal 15q11-q14 region: a new breakpoint cluster specific to unbalanced translocations. *Eur J Hum Genet* 15:432–440.
76. Miller DT, Shen Y, Weiss LA, Korn J, Anselm I, Bridgemohan C, Cox GF, Dickinson H, Gentile J, Harris DJ, Hegde V, Hundley R, Khwaja O, Kothare S, Luedke C, Nasir R, Poduri A, Prasad K, Raffalli P, Reinhard A, Smith SE, Sobeih MM, Soul JS, Stoler J, Takeoka M, Tan WH, Thakuria J, Wolff R, Yusupov R, Gusella JF, Daly MJ, Wu BL (2009) Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J Med Genet* 46:242-248.
77. Miller RW, Fraumeni JF Jr, Manning MD (1964) Association of Wilms's Tumor with aniridia, hemihypertrophy and other congenital malformations. *N Engl J Med* 30:922–927.

78. Murdock RL, Wurster-Hill DH (1986) Non-reciprocal translocation (5;15), isodicentric (15) and Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 25:61–69.
79. Nelson DL (1995) Positional cloning reaches maturity. *Curr Opin Genet Dev* 5:298–303.
80. Nemer M, Horb ME (2007) The KLF family of transcriptional regulators in cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Cell Cycle* 6:117–121.
81. Nenno M, Schumann K, Nagl W (1994) Detection of rRNA and phaseolin genes on polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by fluorescence in situ hybridization after pepsin pretreatment. *Genome* 37:1018–1021.
82. Nicholls RD, Knepper JL (2001) Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:153–175.
83. Özçelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U (1992) Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nat Genet* 2:265–269.
84. Parrish JE, Nelson DL (1993) Methods for finding genes. A major rate-limiting step in positional cloning. *Genet Anal Tech Appl* 10:29–41.
85. Pauli RM, Meisner LF, Szmanda RJ (1983) “Expanded” Prader-Willi syndrome in a boy with an unusual 15q chromosome deletion. *Am J Dis Child* 137:1087–1089.
86. Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, Housman DE (1991) WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 353:431–434.
87. Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H (1986) Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51:151–157.
88. Plendl HJ (2007) Pedigree Software 5.1.2: <http://www.medgen.de>.
89. Potluri VR, Helson L, Ellsworth RM, Reid T, Gilbert F (1986) Chromosomal abnormalities in human retinoblastoma. A review. *Cancer* 58:663–671.
90. Prader A, Labhart A, Willi H (1956) Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *swiss med wklly* 86:1260–1261.
91. Pujana MA, Nadal M, Guitart M, Armengol L, Gratacòs M, Estivill X (2002) Human chromosome 15q11-q14 regions of rearrangements contain clusters of LCR15 duplicons. *Eur J Hum Genet* 10:26–35.
92. Rakowicz-Szulczynska EM (1983) Movable DNA sequences. *Acta Anthropogenet* 7:265–281.
93. Repetto GM (2001) Genomic imprinting and human chromosome 15. *Biol Res* 34:141–145.
94. Repetto GM, White LM, Bader PJ, Johnson D, Knoll JH (1998) Interstitial duplications of chromosome region 15q11q13: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet* 79:82–89.
95. Revell SH The breakage-and-reunion theory and the exchange theory for chromosomal aberrations induced by ionizing radiations: A short history. in: Lett JT, Adler K, Zelle M: *Advances in Radiation Biology* Academic Press, New York, 1974.
96. Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113:237–251.
97. Rivera H, Zuffardi O, Gargantini L (1990) Nonreciprocal and jumping translocations of 15q1->qter in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 37:311–317.
98. Robinson WP, Bottani A, Xie YG, Balakrishnan J, Binkert F, Mächler M, Prader A, Schinzel A (1991) Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients. *Am J Hum Genet* 49:1219–1234.
99. Rodriguez-Jato S, Nicholls RD, Driscoll DJ, Yang TP (2005) Characterization of cis- and trans-acting elements in the imprinted human SNURF-SNRPN locus. *Nucleic Acids Res* 33:4740–4753.

100. Ropers HH (1998) Die Erforschung des menschlichen Genoms: Ein Zwischenbericht. *Deutsches Ärzteblatt* 95:35–41.
101. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillet S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D (2006) APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38:24–26.
102. Rowen L, Mahairas G, Hood L. (1997) Sequencing the human genome. *Science* 278:605–607.
103. Rudd MK, Keene J, Bunke B, Kaminsky EB, Adam MP, Mülle JG, Ledbetter DH, Martin CL (2009) Segmental duplications mediate novel, clinically relevant chromosome rearrangements. *Hum Mol Genet* 18:2957–2962.
104. Sahoo T, Bacino CA, German JR, Shaw CA, Bird LM, Kimonis V, Anselm I, Waisbren S, Beaudet AL, Peters SU (2007) Identification of novel deletions of 15q11q13 in Angelman syndrome by array-CGH: molecular characterization and genotype-phenotype correlations. *Eur J Hum Genet* 15:943–949.
105. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T *Molecular cloning. A laboratory manual* Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
106. Savage JR (1976) Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet* 13:103–122.
107. Sax K (1940) An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. *Genetics in Medicine* 25:41–68.
108. Schinzel A (1988) Microdeletion syndromes, balanced translocations, and gene mapping. *J Med Genet* 25:454–462.
109. Schmickel RD (1986) Contiguous gene syndromes: A component of recognizable syndromes. *J Pediatr* 109:231–241.
110. Schumacher G, Bühlmeier K, Hess J: *Klinische Kinderkardiologie. Diagnostik und Therapie der angeborenen Herzfehler*. 4. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008.
111. Schwartz S, Max SR, Panny SR, Cohen MM (1985) Deletions of proximal 15q and non-classical Prader-Willi syndrome phenotypes. *Am J Med Genet* 20:255–263.
112. Semerci CN, Bahce M, Atik F, Candemir Z, Kiraz IK, Zorlu P, Gül D (2004) Partial trisomy 18q11.2-->qter due to de novo unbalanced translocation of chromosomes 15 and 18 analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Ann Genet* 47:393–398.
113. Sergi C, Serpi M, Müller-Navia J, Schnabel PA, Hagl S, Otto HF, Ulmer HE (1999) CATCH 22 syndrome: report of 7 infants with follow-up data and review of the recent advancements in the genetic knowledge of the locus 22q11. *Pathologica* 91:166–172.
114. Shaffer LG, Ledbetter DH, Lupski JR (2001) Molecular cytogenetics of contiguous gene syndromes: Mechanisms and consequences of gene dosage imbalance. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8 Edition. V.L. The McGraw-Hill Companies, Inc.:S. 1291-1327.
115. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R, Broome A, Casuga I, Wang Y, Xiao C, Barbacioru C, Gimelli G, Bernardina BD, Torniero C, Giorda R, Regan R, Murday V, Mansour S, Fichera M, Castiglia L, Failla P, Ventura M, Jiang Z, Cooper GM, Knight SJ, Romano C, Zuffardi O, Chen C, Schwartz CE, Eichler EE (2008) A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet* 40:322–328.
116. Shaw CJ, Bi W, Lupski JR (2002) Genetic proof of unequal meiotic crossovers in reciprocal deletion and duplication of 17p11.2. *Am J Hum Genet* 71:1072–1081.
117. Shinawi M, Schaaf CP, Bhatt SS, Xia Z, Patel A, Cheung SW, Lanpher B, Nagl S, Herding HS, Nevinny-Stickel C, Immken LL, Patel GS, German JR, Beaudet AL, Stankiewicz P (2009) A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet* 41:1269–1271.
118. Smith AC, McGavran L, Robinson J, Waldstein G, Macfarlane J, Zonona J, Reiss J, Lahr M, Allen L, Magenis E. (1986) Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2) in nine patients. *Am J Med Genet* 24:393–414.

119. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 4:399-407.
120. Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. *Curr Opin Genet Dev* 12:312-319.
121. Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietiläinen OP, Ingason A, Steinberg S, Fossdal R, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Buizer-Voskamp JE, Hansen T, Jakobsen KD, Muglia P, Francks C, Matthews PM, Gylfason A, Halldorsson BV, Gudbjartsson D, Thorgeirsson TE, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Bjornsson A, Mattiasdottir S, Blondal T, Haraldsson M, Magnusdottir BB, Giegling I, Möller HJ, Hartmann A, Shianna KV, Ge D, Need AC, Crombie C, Fraser G, Walker N, Lonnqvist J, Suvisaari J, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Touloupoulou T, Bramon E, Di Forti M, Murray R, Ruggeri M, Vassos E, Tosato S, Walshe M, Li T, Vasilescu C, Mühleisen TW, Wang AG, Ullum H, Djurovic S, Melle I, Olesen J, Kiemeny LA, Franke B; GROUP, Sabatti C, Freimer NB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Andreassen OA, Ophoff RA, Georgi A, Rietschel M, Werge T, Petursson H, Goldstein DB, Nöthen MM, Peltonen L, Collier DA, St Clair D, Stefansson K (2008) Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 455:232–236.
122. Sterky F, Lundeberg J (2000) Sequence analysis of genes and genomes. *J Biotechnol* 76:1-31.
123. Suske G, Bruford E, Philipsen S (2005) Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* 85:551-556.
124. Tonk V, Wyandt HE, Osella P, Skare J, Wu BL, Haddad B, Milunsky A (1995) Cytogenetic and molecular cytogenetic studies of a case of interstitial deletion of proximal 15q. *Clin Genet* 48:151–155.
125. Veenema H, Beverstock GC, Zvelebil-Tarasevitch N, Doorn JL, van Parys JA, v d Kamp JJ (1984) Duplication in the proximal portion of the long arm of chromosome 15, in a girl without phenotypic features of the Prader-Willi syndrome. *Clin Genet* 26:65–68.
126. Venter JC, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M (1998) Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 208:1540–1542.
127. Voss R, Lerer I, Maftzir G, Sheinis M, Cohen MM (1982) Partial trisomy 15 in a male with severe psychomotor retardation (48, XY, + 15q -, + mar(15)). *Am J Med Genet* 12:131–139.
128. Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, Tsuneoka M, Komiya S, Baron R, Yoshimura A (2001) Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* 412:647–651.
129. Watson EJ, Gordon RR (1974) A case of partial trisomy 15. *J Med Genet* 11:400–402.
130. Windpassinger C, Petek E, Wagner K, Langmann A, Buiting K, Kroisel PM (2003) Molecular characterization of a unique de novo 15q deletion associated with Prader-Willi syndrome and central visual impairment. *Clin Genet* 63:297–302.
131. Wirth J, Back E, Hüttenhofer A, Nothwang HG, Lich C, Gross S, Menzel C, Schinzel A, Kioschis P, Tommerup N, Ropers HH, Horsthemke B, Buiting K (2001) A translocation breakpoint cluster disrupts the newly defined 3' end of the SNURF-SNRPN transcription unit on chromosome 15. *Hum Mol Genet* 10:201–210.
132. Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R (2003) Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet* 362:1366–1373.
133. Zori R, Williams C, Mattei JF, Moncla A (1990) Parental origin of del(15)(q11-q13) in Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Med Genet* 37:294–295.
134. Zou YS, McGrann PS, Uphoff TS, Van Dyke DL (2006) A case of mosaic supernumerary ring chromosome 15 with two copies of the segment 15p11.1-q14. *Am J Med Genet A* 140:1663–1668.

Thesen

1. Weder der Phänotyp der in dieser Arbeit beschriebenen Probandin 1 mit Deletion der Banden 15q11.2-q13 noch der Phänotyp des beschriebenen Probanden 2 mit Duplikation der maternalen Banden 15q14q15 sind bisher in der Literatur beschrieben worden.
2. Mithilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) lässt sich bei Probandin 1 die durch die zytogenetische Analyse definierte, ca. 10 Mb große Deletion del(15)(q11.2q13) spezifizieren, wobei die Bruchpunkte den Banden 15q11.2 und 15q13.3 zuzuordnen sind und auf einen Bereich von ca. 125 kb eingegrenzt werden können.
3. Die in der zytogenetischen Analyse dargestellte, ca. 5 Mb große Duplikation der maternalen Banden 15q14q15 beim Probanden 2 ist durch die molekularzytogenetische Untersuchung mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zu belegen, die Bruchpunkte sind in einem Bereich von maximal 140 kb zu lokalisieren.
4. Obwohl sich nach den durchgeführten molekularzytogenetischen Analysen keine spezifischen Kandidatengene für einzelne klinische Merkmale der Probanden benennen lassen, können durch den phänotypischen und genotypischen Vergleich mit zuvor in Kasuistiken beschriebenen ähnlichen Deletionen bzw. partiellen Trisomien phänotypische Auffälligkeiten einzelnen chromosomalen Regionen zugeordnet werden.
5. Die betrachtete Region im proximalen Arm von Chromosom 15 ist aufgrund ihrer genomischen Instabilität für Rekombinationsereignisse prädestiniert.

Lebenslauf

Melanie Sophie Hohner

geboren am 20. Januar 1984 in Stuttgart

1990–1994	Grundschule Deißlingen
1994–2003	Albertus-Magnus-Gymnasium, Rottweil
2003–2010	Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit 2010	Ärztin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Halle/Saale, den 30.04.2010

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle/Saale, 30.04.2010



(Melanie Hohner)*

* Mit der Unterschrift bestätige ich die Korrektheit der Selbstständigkeitserklärung.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mir auf unterschiedliche Weise bei meiner Doktorarbeit geholfen haben.

Ich danke insbesondere Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ingo Hansmann für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die wertvollen Anregungen zum Verlauf der Arbeit.

Ganz aufrichtig bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Dietmar Schlote für die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung während der experimentellen Arbeiten im Labor, die unzähligen Ratschläge und zügigen Antworten auf meine Fragen, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ein herzliches Dankeschön auch an die Mitarbeiterinnen des Institutes für Humangenetik der Martin-Luther-Universität Halle für jederzeit gewährte Unterstützung und technische Hilfe im Laboralltag sowie für die schöne Arbeitsatmosphäre.

Danke an meine Familie, meinen Mann und meine Freunde für die vertrauensvolle und kontinuierliche Unterstützung meiner Vorhaben.