elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

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

Molekulare Charakterisierung von Chromosomenveränderungen mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Antje Hanni Hilde Hölsken
geboren am 12.12.1971 in Halle/Saale.

Gutachter: Prof. Dr. Hansmann
Prof. Dr. Grabitz
Prof. Dr. Claussen (Jena)

verteidigt am 14.04.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008422
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008422]

Für meine Eltern

Kurzreferat

Mit dem Ziel, die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) als eine ergänzende Methode zur zytogenetischen Diagnostik in der Charakterisierung und Präzisierung chromosomaler Aberrationen zu prüfen, wurden Untersuchungen an insgesamt 22 Probanden durchgeführt. Es wurden 3 Probandengruppen zusammengestellt. In der ersten Probandengruppe mit zytogenetisch sichtbaren Translokationen diente die FISH der Charakterisierung des Translokationsbruchpunktes. In der zweiten Gruppe, Probanden mit zytogenetisch aufgedeckten Deletionen, wurde die FISH eingesetzt, um den Deletionsbruchpunkt genauer zu lokalisieren. In der dritten Gruppe, bestehend aus 17 Probanden mit klinischem Verdacht auf das Vorliegen eines Rubinstein-Taybi, Alagille oder DiGeorge Syndroms und unauffälligem Karyotyp nach GTG-Bänderung, wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung angewandt, um als ergänzende Methode in der Routinediagnostik Mikrodeletionen aufzudecken und zu analysieren. In den Gruppen eins und zwei wurden durch den Einsatz der FISH das Ausmaß und die Lokalisierung der Translokations- bzw. Deletionsbruchpunkte eingegrenzt. Es ergaben sich daraus neue Erkenntnisse, wie die Anwesenheit interstitieller Telomersequenzen oder die Auswirkung des Verlustes der HDR1-Region bei DiGeorge Syndrom 2, die neue Überlegungen in Bezug zur Phänotyp-Genotyp-Beziehung bei chromosomalen Aberrationen ermöglichen.

Bei keinem Probanden der Gruppe 3 wurde eine Mikrodeletion aufgedeckt. Dennoch haben zahlreiche Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen bewiesen, dass die FISH zum Aufdecken von Mikrodeletionen ein geeignetes Instrument darstellt. Der Einsatz kommerzieller Proben vereinfacht die Durchführung der FISH und reduziert deren Zeitaufwand erheblich. Das erlaubt den Einsatz dieser Methode für diagnostische Fragestellungen im klinischen Alltag.

Bibliographische Beschreibung

Hölsken, Antje: Molekulare Charakterisierung von Chromosomenveränderungen mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH).
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2004

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	**Einleitung**	1
1.1	Methoden zur Identifizierung krankheitsverursachender Gene	1
1.2	Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)	2
1.3	Syndrome	5
1.3.1	Das Rubinstein-Taybi Syndrom (RTS)	5
1.3.2	Das Chromosom-18q Deletionssyndrom (Synonym: DeGrouchy Syndrom II)	6
1.3.3	Das Alagille Syndrom (AGS)	7
1.3.4	Das DiGeorge Syndrom (DGS)	8
1.4	Ziel der Arbeit	10
2	**Material**	11
2.1	Chemikalien, Gebrauchswaren, Geräte und Lösungen	11
2.2	Probanden und Untersuchungsmaterial	11
2.3	DNA-Sonden	12
2.3.1	Sonden zur Charakterisierung der Bruchpunkte von Probanden mit zytogenetisch sichtbaren Translokationen	13
2.3.2	Sonden zur Charakterisierung des Deletionsbruchpunktes von Probanden mit zytogenetisch sichtbaren Deletionen	14
2.3.3	Proben zur Untersuchung von Probanden mit Verdacht auf eine Mikrodeletion	15
3	**Methoden**	17
3.1	Isolierung von Cosmid-DNA	17
3.2	Präparation von YAC-DNA aus Hefezellen	17
3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	17
3.4	Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung	17
3.4.1	Vorbehandlung der Objektträger	18
3.4.2	Denaturieren der Chromosomen	18
3.4.3	Markierung der DNA-Sonde mittels Nick-Translation	19
3.4.4	Kontrolle des Einbaus von Biotin-16-dUTP durch einen Dot-Blot	19

3.4.5	Suppression unspezifischer Hybridisierungen	20
3.4.6	Hybridisierungsansatz	21
3.4.7	Preannealing	21
3.4.8	Hybridisierung	22
3.4.9	Waschen	22
3.4.10	Fluoreszenzmarkierung	23
3.4.11	Gegenfärbung der Chromosomen mit Propidiumjodid und DAPI	24
3.4.12	Auswertung der Präparate am Fluoreszenzmikroskop	24
3.4.13	Zweifarbige FISH	24
3.4.14	FISH mit kommerziellen Proben	25
3.5	Darstellung von Mikrosatelliten	25
4	**Ergebnisse**	26
4.1	Untersuchung von Probanden mit zytogenetisch sichtbarer Translokation	26
4.1.1	Charakterisierung des Translokationsbruchpunktes bei Probandin 1 mit familiärer Translokation t(3;20)(p25;p13) und klinischen Merkmalen des Alagille Syndroms (AGS)	26
4.1.2	Charakterisierung des Translokationsbruchpunktes bei Proband 2 mit der Translokation 45,XY,t(5;22) und den klinischen Merkmalen einer Mikrodeletion 22q11.2	30
4.1.3	Charakterisierung des Translokationsbruchpunktes bei Probandin 3 mit der Translokation 46,XX,t(9;20) und einem klinischen Merkmal des Alagille Syndroms (AGS)	35
4.2	Untersuchungen von Probanden mit zytogenetisch sichtbaren Deletionen	37
4.2.1	Charakterisierung des Deletionsbruchpunktes bei der Probandin 4 mit der Deletion 46,XX,del(10p)	37
4.2.2	Charakterisierung des Deletionsbruchpunktes bei der Probandin 5 mit der Deletion 46,XX,del(18q)	42
4.3	Untersuchungen von Probanden mit dem klinischen Verdacht auf ein Mikrodeletionssyndrom und zytogenetisch unauffälligem Karyotyp	47

5	**Diskussion**	48
5.1	Probanden mit zytogenetisch sichtbaren Translokationen	48
5.2	Probanden mit zytogenetisch sichtbaren Deletionen	53
5.3	Probanden mit Verdacht auf Mikrodeletionen	58
6	**Zusammenfassung**	63
7	**Literaturverzeichnis**	65
8	**Thesen**	80

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BAAD	biotinyliertes Anti-Avidin D
BAC	*bacterial artificial chromosome*
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat-p-Toluidinsalz
BCI	Bromchlorindoyl
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	cirka
cm	Zentimeter
DAPI	4,6-diamidino-2`phenylindol
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleosid-5`-triphosphat
dATP	2`-Desoxy-adenosin-5`-triphosphat
dCTP	2`-Desoxy-cytosin -5`-triphosphat
dGTP	2`-Desoxy-guanosin -5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2`-Desoxy-thymidin-5`-triphosphat
dUTP	2`-Desoxy-uridin-5`-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera
FISH	Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GH	Wachstumshormon
GTG	*G-bands by trypsin using Giemsa*
h	Stunde
ISCN	*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*
ISH	*in situ* Hybridisierung
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LMP	*low-melting-point*
Lsg.	Lösung
m	milli-
M	Molarität
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
M-FISH	Multiplex- Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar (mmol/l)

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
n	nano-
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
o.g.	obengenannt
p	pico-
p.a.	für die Analyse
PAC	*P1-derived artificial chromosome*
p-Arm	kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	*phosphate buffered saline*
PDR	*proximal deleted region*
PCR	*polymerase chain reaction*
q-Arm	langer Arm eines Chromosoms
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RZPD	*Resource Center/ Primary Database*
s	Sekunde
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	*single nucleotid polymorphism*
SRO	*smallest region of deletion overlap*
SSCP	*single strand conformational polymorphism*
SSW	Schwangerschaftswoche
STS	*sequence tagged site*
TDR	*typical deleted region*
TEMED	Tetramethylethylendiamin
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
U	Unit (Enzymaktivität)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
VNTR	*variable number of tandem repeats*
Vol.	Volumen
YAC	*yeast artificial chromosome*
YNB	*Yeast Nitrogen Base*
z.A.	zur Analyse
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Methoden zur Identifizierung krankheitsverursachender Gene

Die Anzahl der Gene, die das menschliche Genom umfasst, wird mit 35 000 (Venter et al., 2001) bzw. zwischen 30 000 und 40 000 (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001) angegeben. Die Identifikation und Zuordnung von Genen, die im veränderten Zustand eine genetische Erkrankung hervorrufen, wird durch zwei verschiedene Herangehensweisen erreicht, der funktionellen und positionellen Klonierung (Collins, 1992, 1995; Ballabio, 1993). Bei der klassischen Vorgehensweise, der funktionellen Klonierung, auch als *functional gene cloning* bezeichnet, ist der Ausgangspunkt das Wissen über den zugrundeliegenden biochemischen Defekt. Durch Isolierung des Proteins, das im defekten Zustand für das Erbleiden verantwortlich ist, und Darstellen dessen Aminosäuresequenz wird das krankheitsverursachende Gen durch Ermittlung des genetischen Codes identifiziert (Collins, 1992). Das Marfan Syndrom (Dietz et al., 1991), die Phenylketonurie (Robson et al., 1982; Woo et al., 1983) oder die Sichelzellanämie (Morton et al., 1984; Magenis et al., 1985) sind Beispiele für Erkrankungen, deren krankheitsverursachendes Gen durch die funktionelle Klonierung identifiziert wurde. Doch nicht immer führen Mutationen innerhalb der codierenden Sequenz eines Gens zu einem veränderten Proteinprodukt. Auch Mutationen der regulatorischen Region eines Gens oder der Spleißstellen können Auslöser einer Erbkrankheit sein (Strachan und Read, 1996).

Die zweite Vorgehensweise, die Positionsklonierung, ermöglicht die Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung eines Gens aufgrund seiner ungefähren chromosomalen Position (Collins, 1992). Zu Beginn wird das Untersuchungsmaterial möglichst vieler Generationen der Familien, in denen die Erkrankung aufgetreten ist, zusammengetragen. Anhand der Analyse des Stammbaumes ist es möglich, über den Vererbungsmodus der Erkrankung eine Aussage zu treffen: autosomal dominant, autosomal rezessiv, X-chromosomal dominant, X-chromosomal rezessiv oder mitochondrial. Erleichtert wird die Zuordnung der ungefähren chromosomalen Position, wenn ein zytogenetisch sichtbarer Bruchpunkt oder ein Heteromorphismus mit dem erblichen Phänotyp korrelieren (Collins, 1992). Mit polymorphen DNA-Markern wie Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLPs) (Donis-Keller et al., 1987), VNTR (*variable number of tandem repeats)*-Polymorphismen (hochpolymorphe Minisatelliten-DNA) (Jeffreys, 1987),

Mikrosatelliten-Polymorphismen (Strachan und Read, 1996), SNPs (*single nucleotid polymorphism)* (Risch et al., 1996), deren chromosomale Lokalisation bekannt ist, wird das genetische Material dieser Familien so lange untersucht, bis mindestens ein Marker identifiziert wird, der gekoppelt mit der Erkrankung segregiert (Kopplungsanalyse). Auf diese Weise kann das Gen einem bestimmten Chromosomenabschnitt zugeordnet werden. Um den verantwortlichen Bereich weiter einzugrenzen, sind feinere Kartierungsmethoden notwendig. Durch Erstellen einer Folge überlappender Cosmid-, Phagen-, PAC- (künstliches P1-Chromosom), BAC- (künstliches Bakterienchromosom) oder YAC- (künstliches Hefechromosom) Klone (sogenannte Contigs) wird versucht, sich von der bekannten Position des segregierenden Markers dem gesuchten Gen zu nähern (*chromosome jumping, chromosome walking*). Die so eingegrenzten Segmente werden auf das Vorhandensein von Exons untersucht oder auf Sequenzen (z.B. CpG-Inseln), die darauf hindeuten, dass der gefundene DNA-Abschnitt in der Nähe eines Gens lokalisiert ist. Sequenzanalysen ermöglichen den Vergleich der Sequenz des eingegrenzten DNA-Bereiches mit der Sequenz bekannter Gene. Das erste Gen, das mittels der Positionsklonierung zugeordnet werden konnte, ist das Gen für die chronische Granulomatose (Royer-Pokora et al., 1986). Weitere Beispiele für Erkrankungen, deren Gene erfolgreich durch die Positionsklonierung beschrieben wurden, sind die progressive Muskeldystrophie, Typ Duchenne (Monaco et al., 1986), die Cystische Fibrose (Rommens et al., 1989; Riordan et al., 1989) und die Neurofibromatose Typ 1 (Fountain et al., 1989; Cawthon et al., 1990).

1.2 Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Technik der *in situ* Hybridisierung (ISH) wurde erstmals 1969 von Pardue und Gall (1969) sowie unabhängig davon von John et al. (1969) beschrieben. Die ISH ermöglicht es, Nukleinsäuresequenzen direkt im biologischen Präparat, also in Geweben, Zellen und auf Chromosomen (Ziel-DNA), darzustellen. Das Prinzip der ISH besteht darin, dass durch vorherige Hitzedenaturierung sowohl Ziel-DNA als auch Sonden-DNA als Einzelstrang vorliegen. Die Ziel-DNA besteht z.B., wie in dieser Arbeit beschrieben, aus einem zu untersuchenden Abschnitt eines bestimmten humanen Metaphase-Chromosoms. Die Sonden-DNA erfüllt folgende Eigenschaften: Sie ist homolog zu dem zu untersuchenden Abschnitt der Ziel-DNA und ist entweder radioaktiv mittels ß-strahlender

Isotope mit geringer Reichweite oder durch nicht radioaktive Systeme (FISH), wie z.B. Biotin (Langer et al., 1981; Brigati et al., 1983) oder Digoxigenin (Heiles et al., 1988), markiert. In einem Renaturierungsschritt werden die Einzelstränge von Ziel-DNA und Sonden-DNA zu einem Doppelstrang vereinigt. Da in dieser Arbeit die Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) angewandt wurde, soll im weiteren auf dieses Prinzip genauer eingegangen werden.

Eine entscheidende Voraussetzung für die Anwendung nicht radioaktiv markierter Sonden stellt die Technik der *Chromosomen in situ Suppression Hybridisierung* (CISS) dar. Dabei werden repetitive (unspezifische) Sequenzen, die über das gesamte Genom verteilt sind und bei einer Hybridisierung zu einer unspezifischen einheitlichen Fluoreszenz aller Chromosomen führen würden, durch eine Vorhybridisierung abgesättigt (Lichter et al., 1988). Als Kompetitions-DNA werden Lachssperm-DNA zum Absättigen unspezifischer Sequenzen und Cot I-DNA zum Absättigen hochrepetitiver Sequenzen eingesetzt. Das entstandene Hybrid aus Ziel- und Sonden-DNA muß durch Detektionsschritte für den Untersucher sichtbar gemacht werden, sofern keine direktmarkierten DNA-Sonden verwendet wurden. Erreicht wird dies durch Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Bio-16dUTP, Dig-11dUTP) an die Markermoleküle. Das sogenannte FITC-Avidin-System (Baumann et al., 1981; Pinkel et al., 1986) enthält Avidin, das eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin aufweist, an das der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat gekoppelt ist. Durch ein zweistufiges Nachweisverfahren können die Signale verstärkt werden. Nachdem dem Präparat biotinylierte Anti-Avidin-Antikörper zugegeben wurden, werden diese erneut mit signalgebenden Avidin-Konjugaten inkubiert. Hierdurch werden die Signale enorm verstärkt, da Avidin circa sechs Fluorescein-Moleküle (Pinkel et al., 1986) binden kann.

Das Anwendungsgebiet der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung umfasst sowohl die Chromosomendiagnostik in dem prä- und postnatalen Bereich als auch die Tumorzytogenetik oder die physikalische Kartierung.

Das Auflösungsvermögen der für die Chromosomenuntersuchung in der Routine gebräuchlichen GTG-Technik (*G-bands by trypsin using Giemsa)* liegt zwischen 5-10 Mb (Shaffer, 1997; Uhrig et al., 1999), das der später eingeführten hochauflösenden *High-Resolution*-Technik zwischen 2-5 Mb (Uhrig et al., 1999). Mit der Einführung der FISH gelang es, auch bis dahin verborgene sogenannte kryptische Aberrationen aufzudecken und genauer zu charakterisieren (Shaffer, 1997). Durch Anwendung dieser Methode

konnten bei Probanden mit *contiguous gene deletion syndromes* Mikrodeletionen (Deletionen unter 2 Mb, Shaffer, 1997) in den kritischen Chromosomenbereichen nachgewiesen werden, die mittels GTG-Bänderung einen unauffälligen Karyotyp zeigten. Beispiele sind das DiGeorge Syndrom (DGS) (Schmickel et al., 1986; Scambler et al., 1992), das Prader-Willi Syndrom (PWS) (Schmickel et al., 1986; Bettio et al., 1995), das Angelman Syndrom (AS) (Bettio et al., 1995), das Miller-Dieker Syndrom (MDS) (Schmickel et al., 1986) und das Rubinstein-Taybi Syndrom (RTS) (Shaffer, 1997). Bei einigen dieser Syndrome deckte die FISH, neben den bereits durch Routine- oder *High-Resolution*-Untersuchungen identifizierten, zusätzlich aberrante Chromosomenabschnitte auf. Die Suche nach Deletionen bei Probanden mit Angelman Syndrom und Prader-Willi Syndrom durch Bettio et al. (1995) ergab bei 4 von 14 AS-Merkmalsträgern eine Deletion durch *High-Resolution*-Technik; bei 4 weiteren Probanden wurden durch FISH-Untersuchungen chromosomale Aberrationen im kritischen Bereich identifiziert. Anderen Krankheitsbildern, wie z.B. dem HNPP- Syndrom (*Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies*), ließen sich durch Karyotypisierung keine Aberrationen zuordnen, während mittels FISH bei über 90 % der Probanden eine Deletion im Bereich 17p12 gefunden wurde (Shaffer, 1997).

Genauere Analysen durch FISH gelangen auch bei durch Mikroduplikationen verursachten Erkrankungen, wie z. B. dem Beckwith-Wiedemann Syndrom (Shaffer, 1997) und der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (Valentijn et al., 1992; van Ommen et al., 1995) oder bei kryptischen Translokationen, welche in 10 % der Fälle zur Ausprägung des Wolf-Hirschhorn Syndroms führen (Lurie et al., 1980).

Die Identifizierung und Charakterisierung sogenannter komplexer chromosomaler Rearrangements (CCR), die als Folge von mehr als zwei Chromosomenbrüchen mit reziprokem Austausch von Segmenten entstehen (Pai et al., 1980), wird durch den Einsatz der FISH ermöglicht bzw. wesentlich erleichtert (Stankiewicz et al., 1997).

Die Multilocus-FISH Analyse erlaubt das simultane *Screening* mehrerer Loci auf das Vorliegen von Mikrodeletionssyndromen bzw. *contiguous gene deletion syndromes* bei Probanden mit bisher ungeklärter Entwicklungsverzögerung oder mentaler Retardierung (Ligon et al., 1997). Das Auflösungsvermögen der FISH ist abhängig von der verwendeten Zellpopulation, der Art der verwendeten Sonden und der Präparationstechnik. Bei der Hybridisierung auf Metaphase-Chromosomen liegt die Auflösung zwischen 3-10 Mb, auf Interphase-Kernen bei 50 kb (Trask et al., 1989).

Präparationstechniken wie die *Fiber-FISH* erreichen eine Auflösung zwischen 1-500 kb (Buckle et al., 1993; van Ommen et al., 1995; Heiskanen et al., 1996) und ermöglichen so den Einsatz der FISH bei der physikalischen Kartierung. Das PAX1 Gen (Schnittger et al., 1992), das Cystatin C Gen (Schnittger et al., 1993) oder das Jagged Gen (Oda et al., 1997; Li et al., 1997) wurden u.a. mit Hilfe der FISH dem chromosomalen Locus zugeordnet.
Mit der Einführung der Multiplex-FISH (M-FISH) (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996) wurde das Einsatzgebiet der FISH erheblich erweitert. Durch unterschiedliche Kombination von mindestens 5 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kann jedes der 22 Autosomenpaare bzw. jedes X- und Y-Chromosom in einem einzigen Hybridisierungsschritt identifiziert werden. Die M-FISH ermöglicht das Screenen des gesamten Genoms auf numerische und bestimmte strukturelle Aberrationen, die mit der in der Standard-Karyotyp-Analyse angewandten Giemsa-Banden-Technik bisher nicht in jedem Fall sichtbar gemacht werden konnten (Uhrig et al., 1999). Eine weitere Stärke besteht in der Charakterisierung von Markerchromosomen, die durch bisherige Standard-Techniken nachgewiesen wurden, deren Herkunft jedoch nicht geklärt werden konnte. Einige Autoren sehen das Haupteinsatzgebiet der M-FISH in der Detektion genetischer Veränderungen in soliden Tumorgeweben, deren komplexe Veränderungen mit herkömmlichen Methoden schwer zu identifizieren waren (Speicher et al., 1996, Uhrig et al., 1999).

1.3 Syndrome

1.3.1 Das Rubinstein-Taybi Syndrom (RTS)

Nach den Erstbeschreibern Rubinstein und Taybi (1963) zählen zu den Hauptmanifestationen dieses Syndroms Gesichtsanomalien, wie eine antimongoloide Lidachse (bei 90 % der untersuchten Probanden), eine Schnabelnase mit langem tiefsitzendem Septum (93 %), Mikrognathie/ Retrognathie (75 %) und buschige Brauen, dysmorphe Ohrmuscheln, ein hoher Gaumenbogen (93 %), breite Daumen und Großzehen mit Abweichung der distalen Phalangen nach radial bzw. tibial (100 %), muskuläre Hypotonie (99 %) und mentale Retardierung (99 %) (Rubinstein et al., 1990; Bartsch et al., 1999).
De novo entstandene submikroskopische interstitielle Deletionen in dem

Chromosomenabschnitt 16p13.3 (Breuning et al., 1993; Masuno et al., 1994; Wallerstein et al. 1997; Taine et al., 1998), Inversionen (Lacombe et al., 1992) und Translokationen in diesem Bereich (Imaizumi und Kuroki, 1991; Tommerup et al., 1992) wurden bisher durch Untersuchung von insgesamt 317 Probanden mit Rubinstein-Taybi Syndrom gefunden. Jedoch nur bei 8,2 % bis 10 % (Wallerstein et al. 1997; Taine et al., 1998; Petrij et al., 2000) konnte eine Mikrodeletion nachgewiesen werden. Petrij et al. (1995) gelangten durch Eingrenzung des Deletionsbruchpunktes bei 8 Probanden zu dem Schluss, dass neben größeren strukturellen Veränderungen auf 16p auch Punktmutationen in dem *human CREB binding protein* (CBP) zum klinischen Bild des Rubinstein-Taybi Syndroms führen.

1.3.2 Das Chromosom-18q Deletionssyndrom (Synonym: DeGrouchy Syndrom II)

Die Ursache für das Chromosom-18q Deletionssyndrom (Synonym: DeGrouchy Syndrom II) konnte erstmals von dem Pariser Humangenetiker Jean de Grouchy 1964 aufgedeckt werden, indem er einen Bruchstückverlust des distalen Drittels des langen Arms von Chromosom 18 nachwies. Die kritische Region ist in dem Segment 18q23 lokalisiert (Cody et al., 1997; Strathdee et al., 1997).

Dieses Dysmorphiesyndrom mit Mittelgesichtsretraktion umfaßt nach Ghidoni et al. (1997) neben einem sehr unterschiedlich ausgeprägten Phänotyp folgende feste Kriterien: Hypotonie, konisch geformte Finger, Karpfenmund, mentale Retardierung, Schwerhörigkeit und verzögertes Wachstum (Wilson et al., 1979; Kline et al., 1993; Strathdee et al., 1995; Ghidoni et al., 1997). Zusätzliche Diagnosekriterien werden in Tabelle 8 (S. 56) aufgeführt. In der Literatur beschriebene Fälle mit abgeschwächtem oder weniger typischem klinischen Bild wurden auf ein Ringchromosom 18 zurückgeführt (Stankiewicz et al., 2001b).

Cody et al., die 33 Kinder mit De Grouchy Syndrom II untersuchten, sehen die Ursache für die verzögerte körperliche Entwicklung bei Kindern mit 18q Deletionssyndrom in der Wachstumshormoninsuffizienz (GH-Insuffizienz) (Cody et al., 1997; Ghidoni et al., 1997). Die 2 Mb umfassende *smallest region of deletion overlap* (SRO) für die GH-Insuffizienz wird in der Region 18q23 kartiert und durch die Marker AFM242YF2 und D18S462 begrenzt (Abb. 25, S. 57). Diese Region enthält u.a. das Gen für das *myelin basic protein* (MBP) und das Gen für den Galanin-Rezeptor (GALNR), welche Cody et al.

als Kandidatengene für die GH-Insuffizienz ansehen (Cody et al., 1997).

1.3.3 Das Alagille Syndrom (AGS)

Das Alagille Syndrom (Synonym: Arteriohepatische Dysplasie), von Alagille et al. 1969 erstmals beschrieben (Krantz et al., 1997a), ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung mit variabler Expressivität und einer Penetranz von 94 % (Dhorne-Pollet et al., 1994; Krantz et al., 1997a). Es ist charakterisiert durch das Auftreten folgender 5 Hauptsymptome:

- Typische Facies: bei 95 % der Probanden (Alagille et al., 1987).

Kennzeichnend sind eine triangulăre Gesichtsform mit prominenter Stirn, Hypertelorismus mit tief liegenden Augen, einer breiten Nasenwurzel mit bulböser Nasenspitze sowie einem kleinen spitz zulaufenden und vorstehenden Kinn (Alagille et al., 1987; Oda et al., 1997).

- Chronische Cholestase: bei 91 % der Probanden (Alagille et al., 1987),
- Embryotoxon posterior: bei 88 % der Probanden (Alagille et al., 1987),
- Schmetterlingswirbel: bei 87 % der Probanden (Alagille et al., 1987),
- Pulmonalarterienstenose: bei 85 % der Probanden (Alagille et al., 1987).

Bei Ausprägung aller 5 Symptome liegt ein komplettes Syndrom vor, ein partielles bei 3-4 Symptomen, die chronische Cholestase jedoch eingeschlossen (Alagille et al., 1987; Dhorne-Pollet et al., 1994). In ihren Untersuchungen schließen Dhorne-Pollet und Kollegen die Gesichtsdysmorphien jedoch als Diagnosekriterium aufgrund der ungenügenden Objektivierbarkeit aus (Dhorne-Pollet et al., 1994).

Li et al. (1997) lokalisierten den kritischen Bereich für das Alagille Syndrom auf 20p12 in einem 1,2-1,3 Mb umfassenden Bereich proximal des Locus D20S27 und distal zwischen den Loci D20S507 und D20S160 (Abb.23, S. 49). Als Hauptursache für das Auftreten dieser Erkrankung werden Mutationen des JAG1 Gens angenommen (Li et al., 1997; Oda et al., 1997; Krantz et al., 1998; Yuan et al., 1998; Raas-Rothschild et al., 2002). Das Gen umfasst einen Bereich von 36 kb (Oda et al.,1997). Es enthält einen Liganden für den NOTCH-Rezeptor, welcher Zell-Zell-Interaktionen vermittelt und damit über das Schicksal undifferenzierter Zellen entscheidet (Artavanis-Tsakonas et al., 1997; Li et al., 1997; Pollet et al., 1997; Röpke et al., 2000). Crosnier et al. (2000) konnten durch *in situ* Hybridisierung an menschlichen Embryonen und fetalem Gewebe die Expression von

JAG1 während der Embryogenese, hauptsächlich im kardiovaskulären System, in Blutgefäßen der Leber und in mesenchymalen und epithelialen Strukturen verschiedener Organanlagen nachweisen. Aufgrund ihrer Untersuchungen sehen Crosnier et al. die gestörte Angiogenese als mögliche, aber nicht einzige Pathogenese des Alagille Syndroms (Crosnier et al., 2000).

1.3.4 Das DiGeorge Syndrom (DGS)

Das DiGeorge Syndrom, alternativ bezeichnet als Syndrom der 3. und 4. Kiementasche oder Hypoplasie des Thymus und der Parathyreoidea, ist gekennzeichnet durch folgende 3 Kardinalsymptome: 1) Hypokalzämie durch Hypoplasie der Nebenschilddrüsen, 2) Thymushypoplasie und 3) Defekte des Ausflusstraktes des Herzens (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/). Als Hauptursache für das Auftreten dieses Syndroms werden Deletionen auf 22q11.2 angesehen. Diese treten mit einer Häufigkeit von 1 : 4000 Lebendgeburten in der Bevölkerung auf (Henwood et al., 2001) und stellen nach dem Down Syndrom den zweithäufigsten Grund für einen konnatalen Herzfehler dar (Goodship et al., 1998). Bei 50 % der Betroffenen einer conotruncalen Anomalie können Deletionen auf 22q11.2 nachgewiesen werden (Henwood et al., 2001). Bruchstückverluste in diesem Bereich führen zur Ausprägung weiterer Phänotypen. Diese werden unter dem Begriff Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 zusammengefaßt, welcher das 1993 durch John Burn geprägte Akronym CATCH 22 (*Cardiac defect, Abnormal facies, Thymushypoplasia, Cleft palate, Hypocalcemia, del(22q11))* abgelöst hat. Zu den Krankheitsbildern als Konsequenz einer Mikrodeletion 22q11.2 gehören neben dem DiGeorge Syndrom (DGS) das Velocardiofaziale Syndrom (VCFS), auch als Shprintzen Syndrom bezeichnet, das Syndrom der conotruncalen Anomalie und des Gesichts, auch als Takao-Syndrom bezeichnet, und isolierte Defekte des Ausflusstraktes des Herzens (Budarf et al., 1995; Wadey et al., 1995). Während das DiGeorge Syndrom durch verminderte T-Zellzahl und Hypokalzämien im Kindesalter charakterisiert ist, stehen bei dem phänotypisch sehr ähnlichen Velocardiofazialen Syndrom (Shprintzen Syndrom) kraniofaziale Anomalien mit nasaler Sprache, resultierend aus der palatalen Insuffizienz, im Vordergrund (Burn et al., 1999).

Driscoll et al. (1992), die für das DiGeorge Syndrom und für das Velocardiofaziale Syndrom die gleiche Pathogenese annehmen, beschreiben in ihrer Arbeit bei 90 % der

untersuchten Merkmalsträger eine interstitielle Deletion im Bereich 22q11. Auch Carlson et al. (1997) fanden durch die molekulare Charakterisierung von 151 Probanden mit Velocardiofazialem Syndrom bei 83% einen Bruchstückverlust in dieser Region. Bartsch et al. (2003), die 295 Probanden mit Verdacht auf DGS/VCFS mittels FISH untersuchten, fanden bei 52 der untersuchten Personen eine Deletion in der sogenannten *typical deleted region (TDR)*. Diese Region auf 22q11.2 (DiGeorge Syndrom Chromosomen Region, DGCR) umfaßt einen 3 Mb großen Abschnitt, der bei 90 % der Merkmalsträger deletiert ist (Carlson et al., 1997; Kurahashi et al., 1997). Nur 10 % der DGS/VCFS-Probanden weisen eine 1,5 Mb umfassende Deletion der sogenannten *proximal deleted region (PDR)* proximal der *TDR* auf 22q11.2 auf (Kurahashi et al., 1997). Innerhalb der DGCR wurden verschiedene Gene identifiziert, deren Verlust ätiologisch mit dem DGS in Zusammenhang gebracht wird. Dazu gehören der Transkriptionsfaktor TUPLE1 (Halford et al., 1993) und das TBX1 Gen, dessen Verlust kardiovaskuläre und parathyreoidale Defekte bei Mäusen hervorruft (Merscher et al., 2001; Bartsch et al., 2003).

Die Region 22q11.2 ist ein sehr häufiger Ausgangspunkt für chromosomale Rearrangements, welche neben dem DiGeorge Syndrom (DGS), dem Velocardiofazialen Syndrom (VCFS), dem Syndrom der conotruncalen Anomalie und des Gesichts (CAFS) und dem Katzenaugen Syndrom (CES) auch zu tumorassoziierten Veränderungen führen (Shaikh et al., 2000). Das bekannteste Beispiel hierfür ist das Philadelphia-Chromosom, ein Translokationschromosom t(9;22), das bei 90 % der Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie (CML) nachgewiesen werden kann (Chissoe et al., 1995).

Edelmann und Kollegen identifizierten an den Endpunkten der 3 Mb umfassenden *typical deleted region* und 1,5 Mb großen *proximal deleted region* Chromosom 22-spezifische *Low copy repeats* (LCR), sogenannte LCRs 22 (Edelmann et al., 1999 a und b). Interchromosomale homologe Rekombinationen zwischen den LCRs von 2 homologen Chromosomen 22 können zu den 3 Mb-Deletionen bei DiGeorge Syndrom/ Velocardiofazialem Syndrom (DGS/VCFS), aber auch zu Duplikationen bei dem Katzenaugen Syndrom führen (McTaggart et al., 1998; Edelmann et al., 1999 a und b). Eine weitere mögliche Erklärung für Deletionsereignisse bei DGS/VCFS sehen sie in intrachromosomalen Rekombinationen zwischen den LCRs 22 und Verlust der daraus resultierenden Interchromatidschleife (Edelmann et al., 1999 a und b).

Neben einer Deletion im Chromosomenbereich 22q11.2 können auch Deletionen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 10 im Bereich 10p13/p14 (Daw et al., 1996; Gottlieb et al.,

1998) bzw. 10p14/p15 (Van Esch et al., 2000) einen DGS-ähnlichen Phänotyp mit den typischen Merkmalen Herzfehler, Hypoparathyreoidismus mit Hypokalzämie, Immundefekt, sensorineurale Taubheit und renale Malformationen hervorrufen. Das durch 10p-Deletion verursachte Krankheitsbild wird als DiGeorge Syndrom 2 (DGS2) bezeichnet (Monaco et al., 1991; Fisher und Scambler, 1994; Daw et al., 1996; Schuffenhauer et al., 1998). Durch molekulare Untersuchungen von 12 Probanden mit 10p-Deletionen und Analyse einer familiären Translokation gelang es Schuffenhauer et al. (1998), die SRO für DGS 2 auf einen 1 cM-Intervall innerhalb der Loci D10S547 und D10S585 einzugrenzen (Abb. 24, S. 55).

1.4. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser im Jahr 1997 begonnenen Arbeit bestand darin, zu prüfen, inwieweit die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) in der Charakterisierung und Präzisierung chromosomaler Aberrationen zu neuen Erkenntnissen beiträgt und damit eine ergänzende und vorteilhafte Methode zu bisher angewandten Verfahren darstellt. Hierfür wurden 3 Probandengruppen zusammengestellt:

- In der ersten Probandengruppe mit zytogenetisch sichtbaren Translokationen (Probanden 1, 2 und 3) wurde die FISH zur Charakterisierung des Translokations-bruchpunktes angewandt.
- In der zweiten Gruppe, Probanden mit zytogenetisch aufgedeckter Deletion (Probanden 4 und 5), hatte der Einsatz der FISH das Ziel, den Deletionsbruchpunkt genauer zu lokalisieren.
- In der dritten Gruppe, Probanden mit klinischem Verdacht auf das Vorliegen eines Rubinstein-Taybi, Alagille oder DiGeorge Syndroms und unauffälligem Karyotyp nach GTG-Bänderung, sollte die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eingesetzt werden, um als ergänzende Methode in der Routinediagnostik Mikrodeletionen aufzudecken und zu analysieren.

2 Material

2.1 Chemikalien, Gebrauchswaren, Geräte und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Gebrauchswaren, Geräte und Lösungen wurden hinsichtlich ihrer Herkunft und Zusammensetzung den Arbeiten von Schröter (1997) und Dörr (1999) entnommen.

Soweit dies für die Durchführung der Methoden erforderlich war, wurden Gebrauchswaren vor deren Anwendung in einem Dampfdruck-Autoklaven (120°C, 1,2 bar, 20 min) sterilisiert. Die Objektträger wurden vor Gebrauch in einer Seifenlösung (Fit) gründlich gereinigt und unter demineralisiertem Wasser abgespült. Bis zum Gebrauch wurden sie entweder in einer Küvette mit demineralisiertem Wasser bei 4 °C oder trocken in einer Küvette bei -20°C aufbewahrt.
Die Lösungen wurden mit Ampuwa oder mit speziell gereinigtem Wasser aus dem Milli-Q-Water-System (Millipore) angesetzt. Wenn erforderlich, wurden die Lösungen vor deren Gebrauch in einem Dampfdruck-Autoklaven (120°C, 1,2 bar, 20 min) sterilisiert. Hitzelabile Lösungen wurden durch Membranfilter (Porengröße 0,25 µm bzw. 0,45 µm) sterilfiltriert.

2.2 Probanden und Untersuchungsmaterial

Molekularzytogenetische bzw. molekulargenetische Untersuchungen wurden an insgesamt 22 Probanden durchgeführt, die im Zusammenhang mit einer genetisch bedingten Erkrankung bzw. einer syndromalen Entwicklungsstörung der Genetischen Beratungsstelle des Institutes für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Abklärung bzw. zur genetischen Beratung vorgestellt wurden. Bei 5 Probanden hatte eine Chromosomenuntersuchung in dem Labor für postnatale Zytogenetik einen auffälligen Karyotyp ergeben (Probanden 1-5). Bei 17 Probanden mit einem lichtmikroskopisch unauffälligem männlichen bzw. weiblichen Karyotyp bestand im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Verdacht auf eine sogenannte Mikrodeletion. Diese sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen bzw. ausgeschlossen

werden. Dieses Kollektiv setzte sich aus 5 Probanden mit dem Verdacht auf ein DiGeorge Syndrom (DGS), aus 9 Probanden mit dem Verdacht auf ein Alagille Syndrom (AGS) und aus 3 Probanden mit dem klinischen Bild eines Rubinstein-Taybi Syndroms (RTS) zusammen.

Untersucht wurden auf Objektträgern fixierte Metaphase-Chromosomen. Diese wurden aus Lymphozytenkulturen hergestellt, gewonnen aus menschlichem heparinisiertem Vollblut. Im Falle des Alagille Syndroms wurden heparinisiertes Vollblut bzw. fertige Objektträger auch von auswärtigen Instituten zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung von Objektträgern, die der Kontrolle der Hybridisierung der präparierten Sonden auf Chromosomen mit einem normalen Karyotyp dienten, wurde heparinisiertes Vollblut von klinisch unauffälligen Personen verwendet. Für molekulargenetische Untersuchungen wurde EDTA-Blut verwendet und daraus DNA präpariert.

2.3 DNA-Sonden

Für die Deletionsanalyse mittels FISH wurden als Vektoren menschlicher Inserts YACs (*yeast artificial chromosomes*) der CEPH-YAC-Bibliothek und Cosmide verwendet. Die YACs wurden in Form von Agar-Kulturen vom *Resource Center/ Primary Database* (RZPD) in Berlin zur Verfügung gestellt. In Schüttelkulturen wurden die Hefen vermehrt und die Zellen vor Isolierung der Gesamt-DNA für die Nicktranslation in *Low-melting-point* Agarose eingebettet.

Für die Untersuchung bei Verdacht auf DiGeorge Syndrom kamen kommerzielle Proben der Firma Oncor, Painting-Proben, die *All Human Telomeres*-Probe und die *D22S75 DiGeorge Chromosome Region Probe with D22S39 Chromosome 22 Control Probe* (Cat.#: P5140-DG.5), zum Einsatz.

2.3.1 Sonden zur Charakterisierung der Bruchpunkte von Probanden mit zytogenetisch sichtbaren Translokationen

Translokation 46,XX,t(3;20)(p25;p13) (Probandin 1)

Die für die Analyse verwendeten Sonden sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt. Die Cosmide 3e9 und 2c12 entstammten einer etablierten Cosmid-Bibliothek aus dem YAC 940d11 (CEPH) (von der Kammer, 1995). 940d11 kartiert im Bereich 20p12 innerhalb der AGS kritischen Region (Pollet, et al., 1995; Rand et al., 1995). 3e9 enthält das JAG 1 Gen, mit einer Länge von ca. 25 kb überspannt es das proximale Ende von 2c12 (Stankiewicz et al., 2001a).

Tab. 1: Cosmide zur Charakterisierung des Bruchpunktes der Translokationen t(3;20)(p25;p13) und t(9;20)(p23;p13)

Cosmid	Insert in kb	Physikalische Lokalisierung	Referenz
3e9	40 kb	YAC 940d11, 20p12.2	Stankiewicz et al., 2001a
2c12	35 kb	YAC 940d11, 20p12.2	Stankiewicz et al., 2001a
1h4		YAC 940d11, 20p12.2	Giannakudis, persönliche Mitteilung

Tab. 2: YACs zur Untersuchung des Bruchpunktes der Translokationen t(3;20)(p25;p13) und t(9;20)(p23;p13), (* Auflistung der YACs von distal nach proximal)

YAC *	Locus	Genetische Kartierung des Locus von 20pter (cM)	Referenz
790g12	D20S179 D20S113	3 8	http://www-genome.wi.mit.edu
894d11	D20S181	9	http://www-genome.wi.mit.edu
984g12	D20S181 D20S116	9 11	http://www-genome.wi.mit.edu
987g10	D20S95	16	http://www-genome.wi.mit.edu
955f7	D20S192	22	Pollet et al., 1997
881h2	D20S175	30	Pollet et al., 1997

Translokation 45,XY,t(5;22) (Proband 2)

Die zur Untersuchung des Translokations- bzw. Deletionsbruchpunktes eingesetzten Proben (Tab. 3) wurden von der Firma Oncor bezogen und nach der beigefügten Anleitung hybridisiert.

Tab. 3: Sonden zur Charakterisierung des Translokationsbruchpunktes der Translokation t(5;22) (Proband 2)

Probe	**Physikalische Lokalisierung**	**Referenz**
Paint 5 (wcp 5)	gesamtes Chromosom 5	Oncor, Inc.
Paint 22 (wcp 22)	gesamtes Chromosom 22	Oncor, Inc.
DiGeorge-Chromosomen-Region-Probe (DGCR) mit Chromosom 22-Kontroll-Sonde	22q11.2 (D22S75) 22q13.3 (D22S39)	Oncor, Inc. Driscoll et al., 1992
All Human Telomeres	alle Telomersequenzen	Oncor, Inc.
YAC 856e9	201 cM von 5pter entfernt (D5S469)	Kingsley et al., 1997

Translokation 46,XX,t(9;20)(p23;p13) (Probandin 3)

Eingesetzt wurden, wie bereits unter Abschnitt 2.3.1 charakterisiert, das Cosmid 1h4 (Tab. 1) und der YAC 984g12 (Tab. 2).

2.3.2 Sonden zur Charakterisierung des Deletionsbruchpunktes von Probanden mit zytogenetisch sichtbaren Deletionen

46,XX,del(10p) (Probandin 4)

Zur molekularzytogenetischen Charakterisierung der Deletionsregion auf 10p wurden die YAC-Klone 889c10, 918h11, 773c3, 808a2 (Tab. 4) eingesetzt. Die Markierung der Chromosomen 10 erfolgte nach Kohybridisierung mit dem YAC 932f11 (Tab. 4).

Tab. 4: Lokalisierung der für die Deletionsanalyse der Probandin 4 verwendeten YAC- Klone; (* Auflistung der YACs von distal 10p nach distal 10q)

YAC*	**Locus**	**Insert in kb**	**Genetische Kartierung (in cM) von 10pter**	**Physikalische Lokalisierung**	**Referenz**
889c10	D10S558	1300	1	10p15	Kingsley et al., 1997
918h11	D10S547	1760	29	10p14	Schuffenhauer et al., 1998
773c3	D10S585	1100	30	10p14	Schuffenhauer et al., 1998
808a2	D10S223	1540	34	10p14	Schuffenhauer et al., 1998
932f11	D10S217	870	165	10q26	Kingsley et al., 1997

46,XX,del(18q) (Probandin 5)

Die Eingrenzung der Deletionsregion auf 18q erfolgte mit den YACs 932b10, 855e1, 954c7 und 968f4. Die Chromosomen 18 wurden durch Kohybridisierung mit YAC 854g8 markiert.

Tab. 5: Genetische bzw. physikalische Kartierung der für die Deletionsanalyse der Probandin 5 verwendeten YACs, (*Auflistung der YACs von distal18q nach distal 18p)

YAC*	Locus	Insert in kb	Genetische Kartierung (in cM) von 18pter	Physikalische Lokalisierung	Referenz
932b10	D18S554 D18S462	1400	125 118 117	18q23	Kingsley et al., 1997 Cody et al., 1997 http://www-genome.wi.mit.edu
855e1	D18S1009 afm242yf2	1640	114	18q23	http://www-genome.wi.mit.edu Cody et al., 1997
954c7	D18S469	1080	109		http://www-genome.wi.mit.edu
968f4	D18S488	1670	105	18q22.3	http://www-genome.wi.mit.edu Boghosian-Sell et al., 1996
854g8	D18S476	780	2	18p11.32	Kingsley et al., 1997

Tab. 6: Primer von anonymen DNA-Loci des Chromosom 18 zur Darstellung von Mikrosatelliten der Probandin 5 und deren Eltern

Locus	Primer (5`→ 3`)	Produktgröße in bp	Referenz
D18S1009	CCCTTATCATGCTCTATCCA CTGGTGTGGGAGACAAAT	146	Dib et al., 1996
D18S554	TAACTGAGACCNTGAGTCGTGA GCTGCATTTGGCTTGG	220	Dib et al., 1996
afm242yf2	CACTCAACATAAATCCCTAGAGG CAGGTGAATGCCTGAATAAACT	188	Dib et al., 1996

2.3.3 Proben zur Untersuchung von Probanden mit Verdacht auf eine Mikrodeletion

Rubinstein-Taybi Syndrom (RTS)

Zur Suche nach Deletionen auf Chromosom 16 im Bereich p13.3 bei Probanden mit den klinischen Merkmalen des RTS wurden die in der Arbeit von Giles et al. (1997) beschriebenen Cosmide RT166 und RT191 eingesetzt. Diese Proben wurden vom *Department of Human Genetics, Leiden University* zur Verfügung gestellt.

Alagille Syndrom (AGS)

Für die Suche nach Mikrodeletionen wurden die unter Abschnitt 2.3.1 charakterisierten Cosmide 3e9 (Tab. 1, S. 13) und 2c12 (Tab. 1, S. 13) eingesetzt.

Mikrodeletionssyndrom 22q11

Für die Mikrodeletionsanalyse im Bereich 22q11.2 wurde die DiGeorge Chromosomen Region Probe (DGCR, 22q11.2, D22S75) mit Chromosom 22-Kontroll-Sonde (22q13.3, D22S39) der Firma Oncor verwendet (Tab. 3, S. 14).

3 Methoden

3.1 Isolierung von Cosmid-DNA

Die Isolierung von Cosmid-DNA erfolgte entsprechend den Protokollen von Sambrook et al. (1989).

3.2 Präparation von YAC-DNA aus Hefezellen

Die Hefe-DNA wurde modifiziert nach Carle und Olson (1986) präpariert. Die Hefezellen wurden zunächst in Agaroseblöckchen eingebettet, um durch eine möglichst schonende Behandlung die YAC-DNA in Form von vollständigen Chromosomen präparieren zu können. Später wurde die für die FISH benötigte DNA aus den YAC-Agaroseblöckchen isoliert.

3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration wurde durch Messung im Spektralphotometer oder mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung ermittelt. Die durch Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung bestimmte DNA-Konzentration wird nicht durch die in der Lösung vorhandene RNA verfälscht.

3.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

(modifiziert nach Lichter et al., 1988 und Pinkel et al., 1988)

Das Prinzip der FISH beruht auf der Hybridisierung markierter einzelsträngiger DNA-Sonden an komplementäre denaturierte Sequenzen auf Chromosomenpräparaten. Das Hybridisierungsergebnis wird mittels eines Detektionssystems, bestehend aus an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper gegen Biotin bzw. Digoxigenin, sichtbar gemacht. Durch zusätzliche Antigen-Antikörper-Reaktionen können die Fluoreszenz-Signale verstärkt werden.

3.4.1 Vorbehandlung der Objektträger

Für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden Objektträger verwendet, die nach der Chromosomenpräparation bei Raumtemperatur vor Licht geschützt für mindestens 3 Tage gelagert wurden. Die weitere Aufbewahrung der Objektträger, z.T. über Jahre, erfolgte bei 4°C vor Licht geschützt. Chromosomenpräparate, die nicht mindestens 2 Wochen alt waren, wurden mit 2 x SSC künstlich gealtert, um Strukturveränderungen nach Durchführung der FISH zu vermeiden. Bei starkem Zytoplasmasaum erleichtert eine Pepsin-Behandlung durch Zersetzung des Zytoplasmas die Diffusion der Sonde zu den Chromosomen. Ziel dieser Behandlung ist eine verbesserte Signalstärke. Um das Signal-Hintergrund-Verhältnis durch Verringerung der unspezifischen Bindungen der Sonde zu verbessern, wurde gegebenenfalls durch eine RNase-Behandlung die endogene RNA der Präparate zerstört.

- Objektträger in Pepsin-Gebrauchslösung in einer Küvette 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren,
- RNase Lösung für 15 min kochen, abkühlen lassen,
- pro Objektträger 200 µl abgekochte RNase-Lösung auftragen,
- ein 24 x 60 mm Deckglas blasenfrei auflegen,
- 1 h bei 37 °C in feuchter Kammer inkubieren,
- Deckgläser abrutschen lassen,
- Objektträger 2 x 15 min bei RT in einer Küvette mit 2 x SSC inkubieren,
- in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 90 %, 2 x 99 %, mehrmals verwendbar) dehydrieren,
- Objektträger an der Luft trocknen lassen.

3.4.2 Denaturieren der Chromosomen

- Denaturierungslösung in einer Küvette im Wasserbad auf 70 °C erhitzen,
- Objektträger hierin jeweils 2,5-3,0 min denaturieren,
- direkt in eisgekühlte Ethanol-Reihe überführen und je 1 min darin dehydrieren,
- Objektträger an der Luft trocknen lassen.

3.4.3 Markierung der DNA-Sonde mittels Nick-Translation

(modifiziert nach Rigby et al., 1976)

Reaktionsansatz für Cosmid-DNA:	Reaktionsansatz für YAC-DNA:
200 ng DNA	10 µg DNA
4 µl Nicktranslationspuffer, 10 x	20 µl Nicktranslationspuffer, 10 x
2,8 µl Biotin-16-dUTP (0,4 mM)	5,6 µl Biotin-16-dUTP (1 mM)
6 µl dNTP-Mix (0,4mM)	12 µl dNTP-Mix (1mM)
1 µl DNase (1:1000 verdünnt)	6 µl DNase (1:1000 verdünnt)
0,8 µl DNA-Polymerase I	4 µl Polymerase I
ad 40 µl Ampuwa	ad 200 µl Ampuwa

- Reaktionsansatz in Eppendorf-Cup auf Eis mischen, Zugabe der Enzyme zuletzt,
- gründlich mischen,
- in einem Kryostat 2 h bei 14 °C inkubieren,
- Abstoppen der Reaktion durch 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 2,5 Volumen 100 %igen Ethanol,
- Ausfällen der DNA bei -20 °C für mind. 30 min.

Die DNase I-Konzentration und die Dauer der Inkubation sind entscheidend für die Größe der DNA-Fragmente und die Intensität der Markierung. Zu große Fragmente erschweren die Diffusion zu den Zielsequenzen der Chromosomen. Durch zu kleine Fragmente ist eine spezifische Hybridisierung nicht mehr gewährleistet. Nach Lichter et al. (1988) liegt die optimale Fragmentgröße zwischen 150-250 bp.

3.4.4 Kontrolle des Einbaus von Biotin-16-dUTP durch einen Dot-Blot

Der Einbau von Biotin-16-dUTP wurde durch einen Dot-Blot überprüft. Die Streptavidin-*alkaline* Phosphatase bindet hierbei an das Biotin der fixierten Sonde. Die Substanzen NBT und BCIP werden nach Entfernen von nicht gebundener Phosphatase zugegeben. Durch die alkalische Phosphatase wird ein Phosphat von BCIP abgespalten. Dabei reagiert das so entstandene Bromchlorindoyl (BCI) mit NBT zu einem unlöslichen blauen Farbstoff. Um

die markierte DNA erfolgreich für eine FISH einsetzen zu können, sollte sie bis zu einer Verdünnung von 1:100 eine Farbreaktion zeigen.

- Markierte und ausgefällte DNA-Sonde 20 min bei 4 °C und 15000 rpm zentrifugieren,
- Überstand abnehmen,
- Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol waschen,
- 10 min bei 4 °C und 15000 U/min zentrifugieren und Überstand abnehmen,
- Pellet bei 37 °C trocknen,
- in 100 µl (Cosmide) bzw. 300 µl (YAC`s) Ampuwa aufnehmen und 30 min bei 56 °C lösen,
- Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000) mit Ampuwa ansetzen,
- je 1 µl der verschiedenen Verdünnungen auf einen 2 x SSC getränkten Nitrozellulosefilter auftragen,
- DNA durch UV-Strahlung mit einem Stratalinker auf dem Filter fixieren,
- Filter 30 min bei 37 °C in Dot-Blot-Lösung 1 (Blockinglösung) inkubieren,
- Filter 30 min bei RT in Dot-Blot-Lösung 2 (Streptavidin alkaline Phosphatase) auf dem Schüttler inkubieren,
- Filter 3 x 5 min in Dot-Blot-Puffer 1 auf dem Schüttler waschen,
- Filter 2 x 5 min in Dot-Blot-Puffer 2 auf dem Schüttler waschen,
- Filter in lichtgeschützter Küvette auf dem Schüttler für 1 h in Dot-Blot-Lösung 3 inkubieren (Farbnachweis in BCIP/NBT-Lösung),
- Filter kurz in 2 x SSC spülen und trocknen lassen,
- Ausfällen der restlichen Sonde mit 0,1 Vol. Natriumacetat (pH 5,3) und 2,5 Vol. Ethanol bei -20 °C mindestens 30 min.

Wird die mit Biotin markierte DNA nicht unmittelbar eingesetzt, kann sie bei -20 °C über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

3.4.5 Suppression unspezifischer Hybridisierungen

Repetitive Sequenzen (z.B. Alu-Sequenzen, alphoide Sequenzen) innerhalb einer DNA-Sonde würden bei einer *in situ* Hybridisierung zu einer unspezifischen, einheitlichen Anfärbung aller Chromosomen führen. Aus diesem Grund wird dem Hybridisierungsansatz eine ausreichende Menge an Kompetitions-DNA zugesetzt, um in einer Vorreaktion entsprechende Sequenzen abzusättigen. In der eigentlichen Hybridisierung stehen so nur

noch die spezifischen Sequenzen der Chromosomen der Sonde als Zielsequenzen zur Verfügung. Eingesetzt werden Lachssperm-DNA (Absättigung unspezifischer Sequenzen) und Cot-1-DNA (Absättigen hochrepetitiver Sequenzen) als Kompetitions-DNA. Diese liegt durch Scherungsbehandlung mit einem Sonicator in einer Fragmentlänge zwischen 250-500 bp vor. Mit zunehmender Größe der eingesetzten Sonde steigt die erforderliche Menge an Cot-DNA an.

Lachssperm- bzw. Cot-1-DNA werden der Sonde nach erfolgtem Dot-Blot zugesetzt und mit ihr gemeinsam ausgefällt. Einem Standard-Ansatz mit 100ng Cosmid-DNA werden 9 µl Cot-1-DNA (1 mg/ml) und 6 µl Lachsspem-DNA (10 mg/ml), einem Ansatz mit 10 µg YAC-DNA werden 20 µl Cot-1- und 5 µl Lachssperm-DNA zugesetzt.

3.4.6 Hybridisierungsansatz

- Gemeinsam ausgefällte Sonde und Kompetitions-DNA 20 min bei 4 °C und 15000 rpm zentrifugieren,
- Überstand abnehmen und Pellet mit 70 %igem Alkohol waschen,
- Sonde bei 4 °C und 15000 U/min 15 min zentrifugieren,
- Überstand abnehmen und Pellet bei 37 °C trocknen lassen,
- Pellet mit 5 µl 100 %igem deionisiertem Formamid mischen,
- 30 min bei 37 °C lösen.

Wird die Sonde nicht unmittelbar verwendet, kann sie bei -20 °C gelagert werden.

- 5 µl Mastermix hinzufügen,
- 5 min in kochendem Wasser denaturieren und kurz auf Eis stellen,
- kurz abzentrifugieren.

3.4.7 Preannealing

- denaturierte Sonde bei 37 °C 15 min inkubieren

Durch diesen Schritt soll der zugesetzten Kompetitions-DNA (Cot-1- und Lachssperm-DNA) die Absättigung der repetitiven und unspezifischen Sequenzen ermöglicht werden. Die Dauer dieses Vorgangs stützt sich bei der FISH auf empirische Ermittlungen.

3.4.8 Hybridisierung

- Die Objektträger, auf denen sich die denaturierten Chromosomen befinden, in einer feuchten Kammer (Kleenex mit 2 x SSC getränkt) anordnen,
- Hybridisierungsansatz nach dem Preannealing kurz abzentrifugieren (zur Aufrechterhaltung des Wasser-Salz-Formamid-Verhältnisses im Hybridisierungspuffer),
- 10 µl des Hybridisierungsansatzes auf den Objektträger pipettieren,
- mit einem 24 x 32 mm Deckglas die entsprechende Stelle luftbblasenfrei abdecken und mit Fixogum versiegeln,
- Objektträger über Nacht bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubieren.

3.4.9 Waschen

Durch das Waschen sollen die nach der Hybridisierung nicht bzw. schwach gebundenen Sonden von den Chromosomen entfernt werden. Da die spezifisch angelagerten Sonden aufgrund der vollständig gepaarten Doppelstränge fest genug gebunden sind, werden diese durch die folgenden Schritte nicht abgewaschen. Die Stringenz der einzelnen Waschschritte kann durch verschiedene Salz- und Formamid-Konzentrationen und durch Temperaturveränderungen variiert werden.

Waschlösungen und Küvetten werden in Wasserbädern vortemperiert. Pro Objektträger müssen die für die einzelnen Lösungen angegebenen Temperaturen um 1°C erhöht werden. Alle Waschschritte erfolgen auf dem Schüttler.

- Mit der Pinzette Fixogum von den Objektträgern entfernen und Deckglas vorsichtig abrutschen lassen.

Sollten die Deckgläser etwas fester an den Objektträgern haften, die Präparate für 1 min mit Deckglas in das vorbereitete Formamid tauchen, dann das nun locker sitzende Deckglas abgleiten lassen.

- Objektträger 3 x 5 min in einer Küvette mit 50 % Formamid/ 2 x SSC bei 42 °C waschen,
- Objektträger 5 x 2 min in 2 x SSC bei 42 °C waschen,
- Objektträger 3 x 5 min in 0,1 x SSC bei 62 °C waschen,
- Objektträger 5 min in 4 x SSC/ 0,1 x Tween bei 42 °C waschen.

3.4.10 Fluoreszenzmarkierung

- Pro Objektträger werden je 500 µl Blocking-Lösung aufgetragen,
- 10 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubieren (Absättigung unspezifischer Bindungen),
- Blocking-Lösung ablaufen lassen (Objektträger dürfen dabei nicht trocknen),
- 100 µl Avidin-FITC-Lösung auftragen und ein 24 × 60 Deckglas blasenfrei auflegen, alle folgenden Schritte erfolgen unter Lichtabschluss,
- Objektträger ca. 30 min bei 37°C in feuchter Kammer (2 × SSC) inkubieren,
- Deckgläser abgleiten lassen und Objektträger 3 × 5 min in 4 × SSC/0.1% Tween bei 42°C waschen.

<u>1. Verstärkungsschritt:</u>

- Den Blocking Schritt wie oben wiederholen,
- pro Objektträger 100 µl BAAD-Lösung auftragen und ein 24 × 60 mm Deckglas auflegen,
- 30 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren,
- Deckgläser abgleiten lassen,
- 3 × 5 min bei 42°C in 4 ×SSC/0.1% Tween waschen,
- den Blocking-Schritt wie oben durchführen,
- erneut pro Objektträger 100 µl Avidin-FITC-Lösung auftragen, Deckglas auflegen,
- in feuchter Kammer 30 min bei 37°C inkubieren,
- Deckgläser abgleiten lassen,
- 3 × 5 min bei 42°C in 4 × SSC/0.1% Tween waschen.

<u>2. Verstärkungsschritt:</u>

- Dieser wird wie der 1. Verstärkungsschritt durchgeführt.

Bei sehr kleinen Sonden wie z.B. Cosmiden ist unter Umständen ein weiterer Verstärkungsschritt erforderlich.

3.4.11 Gegenfärbung der Chromosomen mit Propidiumjodid und DAPI:

- Pro Objektträger 30 µl Propidiumjodid-DAPI-Gebrauchslösung - für zweifarbige FISH nur DAPI- Gebrauchslösung auftropfen,
- ein 24 × 32 mm Deckglas blasenfrei auflegen und überschüssige Lösung durch Drücken auf das Deckglas herauslaufen lassen,
- Deckglasränder mit farblosem Nagellack verschließen,
- bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt, bleiben die Fluoreszenzsignale 2-3 Wochen sichtbar.

3.4.12 Auswertung der Präparate am Fluoreszenzmikroskop

Die Präparate wurden mit einem Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, welches mit einem Fluorescein-Propidiumjodid-Kombinationsfiltersystem ausgestattet war. Zunächst wurden gut gespreitete Metaphasen- und Interphasenkerne bei 125-facher Vergrößerung mit einem Propidiumjodidfilter (gesamtes Chromatin rot gefärbt) aufgesucht. Diese Metaphasen wurden dann unter Immersionsöl mit dem gleichen Filter bei 787,5-facher Vergrößerung auf ihre Vollständigkeit und die Beschaffenheit der Chromosomen überprüft. Mit Hilfe eines Fluorescein-Propidiumjodidfilters konnten die Fluoreszenzsignale auf den Metaphasechromosomen bzw. den Interphasekernen direkt betrachtet werden (Fluorescein = gelb-grün, Propidiumjodid = rot). Die ausschließliche Betrachtung der Signale erfolgte durch einen speziellen Fluoresceinfilter. Geeignete Metaphasen wurden auf der Festplatte gespeichert. Mit einem weiteren Filter wurde bei 787,5-facher Vergrößerung die durch DAPI-Färbung auftretende Spontanbänderung der Chromosomen analysiert. Diese Bänderung diente zur Identifizierung der Chromosomen. Ein Dreifach-Filtersystem (Fluorescein, Propidiumjodid, DAPI) ermöglichte in der Zweifarben-FISH die direkte Betrachtung der Signale zweier verschiedener Sonden auf einem Chromosom (Biotin-Fluorescein = gelb-grün, Digoxigenin = rot, DAPI-gefärbte und gebänderte Chromosomen = blau).

3.4.13 Zweifarbige FISH

Um die Lage zweier verschiedener Loci zueinander auf einem Chromosom zu charakterisieren, kam die zweifarbige FISH zum Einsatz. Hierfür wurden zwei

verschiedene Sonden mit den Detektionssystemen Digoxigenin bzw. Biotin markiert. Digoxigenin- und biotinmarkierte Sonden lagerten sich in einem Hybridisierungsschritt dem gemeinsamen Chromosom an.

3.4.14 FISH mit kommerziellen Proben

FISH-Untersuchungen mit den kommerziell verfügbaren DGCR- bzw. Painting-Proben der Firma Oncor wurden nach dem von der Firma vorgegebenem Protokoll durchgeführt.

3.5 Darstellung von Mikrosatelliten

Die Isolierung von DNA aus EDTA-Blut erfolgte entsprechend dem Protokoll von Baas et al. (1984). Die PCR wurde nach Saiki et al. (1988) durchgeführt. Die Sequenzen der Primer zur Amplifikation der Mikrosatellitenloci wurden der Arbeit von Dib et al. (1996) entnommen. Fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte wurden zur Darstellung von Mikrosatelliten denaturiert, die Einzelstränge durch denaturierende Polyacrylamidgel-elektrophorese in einem Alf-express Sequenzierautomat der Firma Pharmacia aufgetrennt. Die Auswertung der Elektrophoreseläufe erfolgte mit dem Computerprogramm Allelink der Firma Pharmacia.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung von Probanden mit zytogenetisch sichtbarer Translokation

4.1.1 Charakterisierung des Translokationsbruchpunktes bei Probandin 1 mit familiärer Translokation 46,XX,t(3;20)(p25;p13) und klinischen Merkmalen des Alagille Syndroms (AGS)

Kasuistik

Über Probandin 1, ein Kleinkind, wurde bereits in der Literatur berichtet (Rittinger et al., 1997). In der Familie des Mädchens wurde nach 2 Spontanaborten bzw. Interruptiones aufgrund sonografischer Anomalien die Translokation t(3;20)(p25;p13) (Abb.1) bei der Probandin, deren unauffälligem Vater und deren retardierter Schwester nachgewiesen. Die Probandin selbst fiel durch ein zu niedriges Geburtsgewicht, eine motorische Retardierung und durch Ausprägung einer für AGS typischen Facies auf.

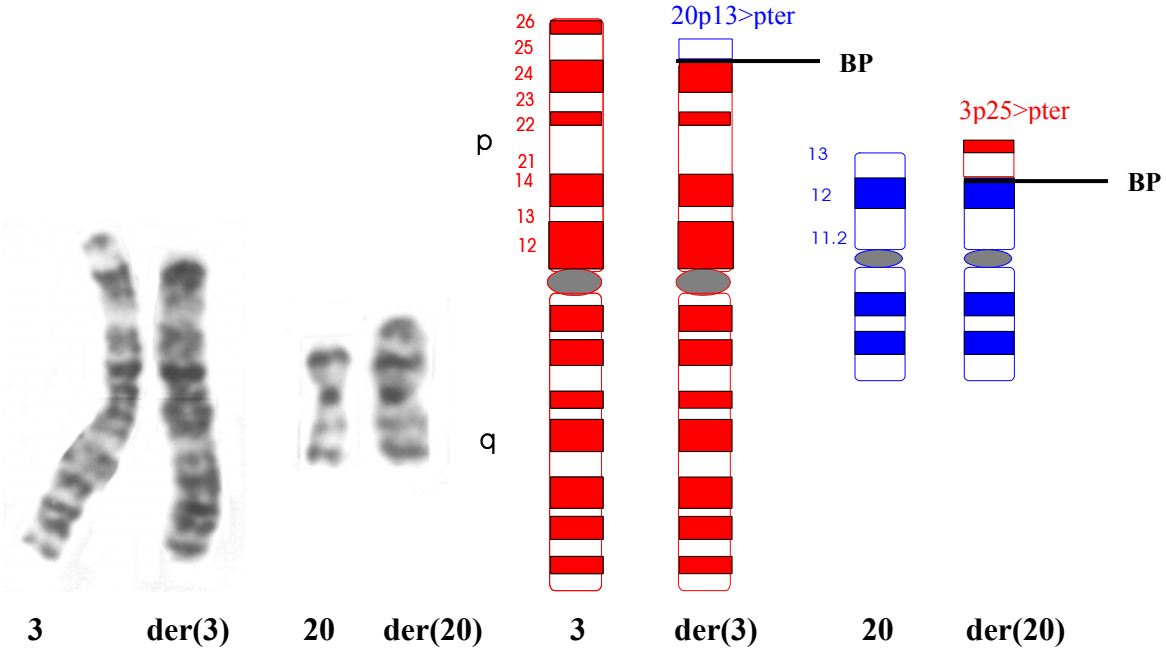


Abb. 1: Chromosomen 3 und 20 aus einer Metaphase der Probandin 1 mit dem Karyotyp 46,XX,t(3;20)(p25;p13), rechts Darstellung der Bruchpunkte (BP) der Translokation t(3;20)(p25;p13) im Ideogramm. (Bandenstadium: 400; ISCN 1985)

Molekularzytogenetische Untersuchung (FISH)

Cosmide 3e9 und 2c12

Beide Cosmide sind im Abschnitt 2.3.1 beschrieben. In je 15 untersuchten Metaphasen wurden die zu den Cosmiden 3e9 (Abb. 2) und 2c12 (ohne Abb.) korrespondierenden Sequenzen auf den Chromosomen 20 und der(20) nachgewiesen.

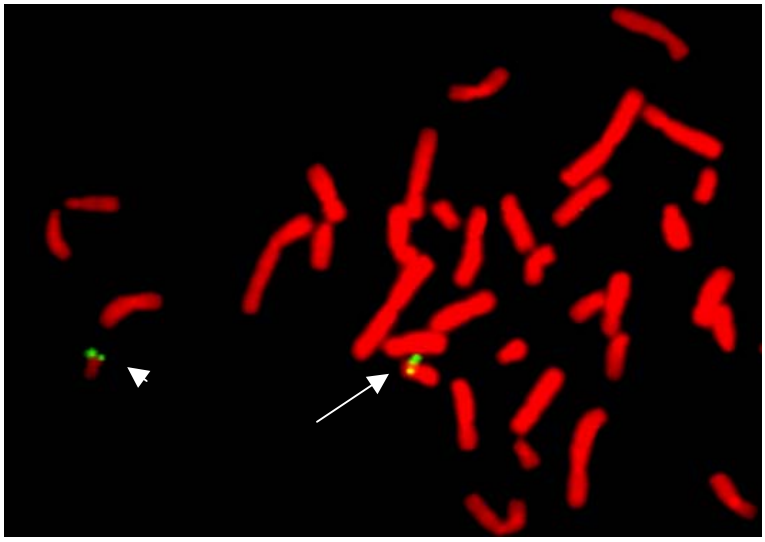


Abb.: 2 FISH mit dem Cosmid 3e9, Signale auf Chromosom 20 (kurzer Pfeil) und der(20) (langer Pfeil)

YACs 790g12, 894d11, 984g12 und 987g10

Nach Hybridisierungen mit den YACs 790g12 (ohne Abb.), 894d11 (ohne Abb.), 984g12 (ohne Abb.) und 987g10 (Abb. 3) stellten sich in je 15 untersuchten Metaphasen Signale auf dem Chromosom 20 und auf dem derivativen Chromosom 3 dar. Folglich sind die zu diesen YACs korrespondierenden Sequenzen von der Translokation betroffen.

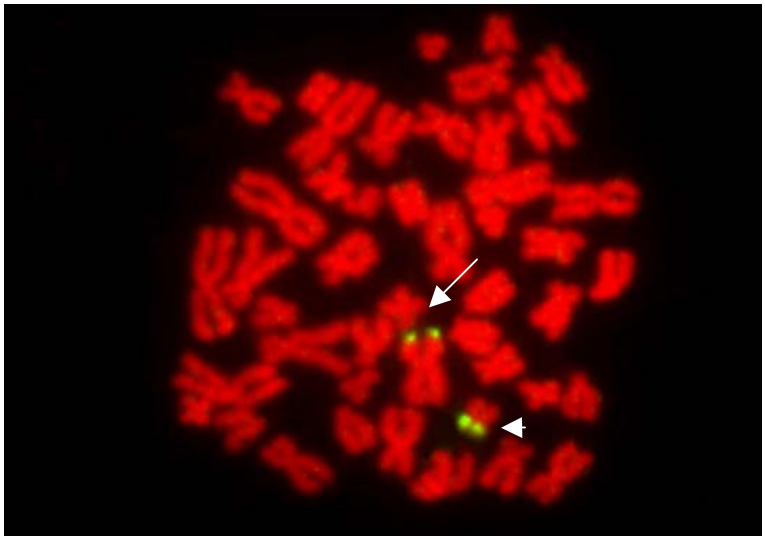


Abb. 3: FISH mit dem YAC 987g10, Signale auf Chromosom 20 (kurzer Pfeil) und auf dem derivativen Chromosom 3 (langer Pfeil)

YACs 955f7 und 881h2

In 15 untersuchten Metaphasen stellten sich die Signale der YACs 955f7 (Abb. 4) und 881h2 (ohne Abb.) auf dem Chromosom 20 und dem derivativen Chromosom 20 dar. Die zu diesen YACs korrespondierenden Sequenzen sind demzufolge von der Translokation nicht betroffen.

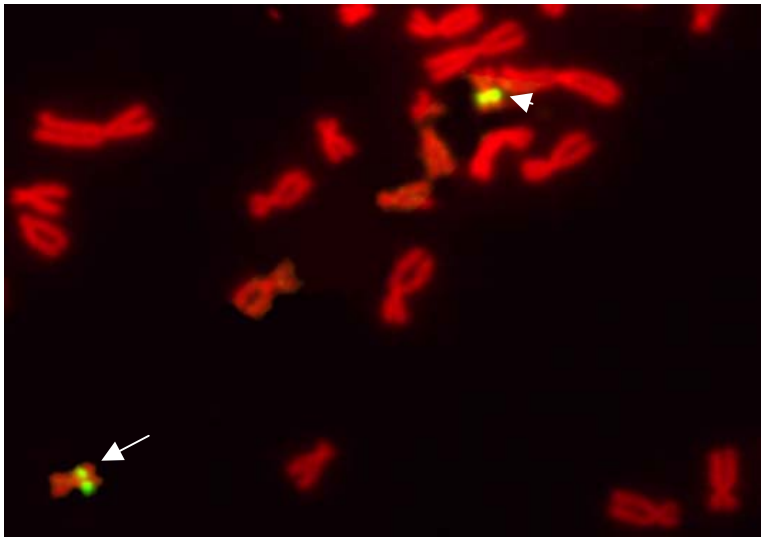


Abb. 4: FISH mit dem YAC 955f7, Signale auf Chromosom 20 (kurzer Pfeil) und der(20) (langer Pfeil)

Durch Einsatz der YACs 790g12, 894d11, 984g12, 987g10, 955f7, 881h2 und der Cosmide 3e9 und 2c12 konnte bei der Probandin 1 der durch die Translokation t(3;20)(p25;p13) entstandene Bruchpunkt distal des YACs 955f7 und proximal des YACs

987g10, also in der Region zwischen 22 cM und 16 cM von 20pter entfernt, lokalisiert werden (Abb.5). Eine Kartierung des Bruchpunktes auf 3p wurde in Zusammenhang mit der klinischen Fragestellung nicht angestrebt.

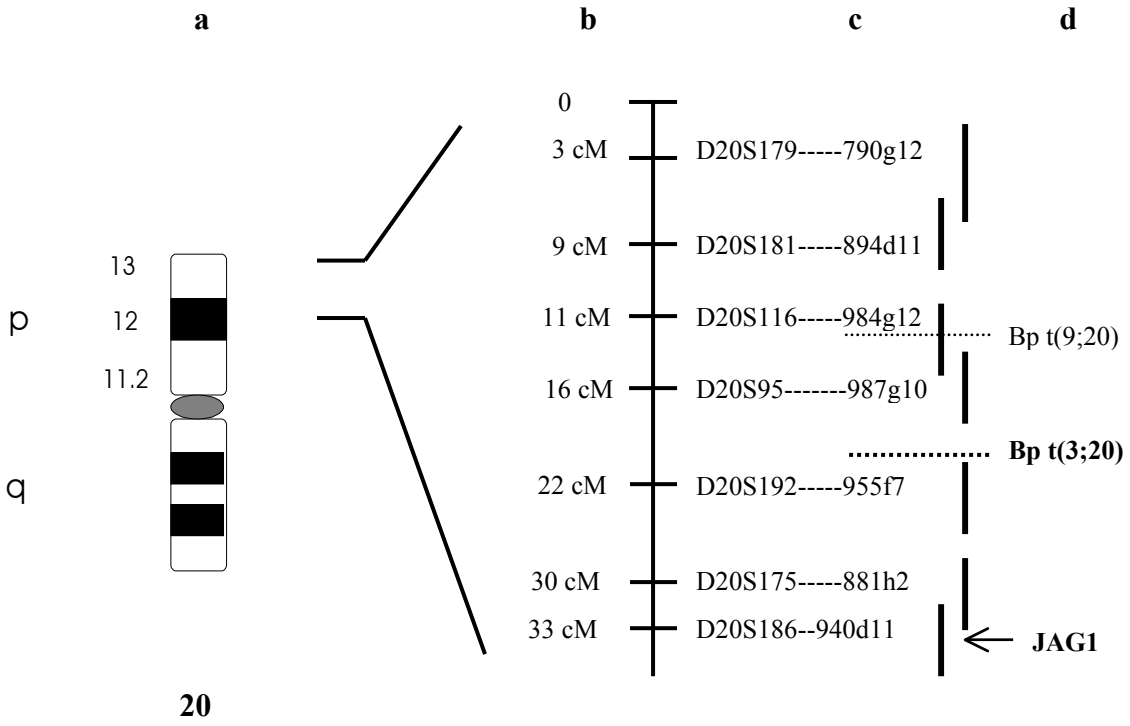


Abb. 5: Ideogramm von Chromosom 20 (a) und Lokalisierung der für die molekulare Analyse der Translokationsbruchpunkte (Bp) bei Probanden 1 und 3 verwendeten YACs (c), modifiziert nach von der Kammer (1995). **a.** Ideogramm von Chromosom 20; **b.** STS-Marker und deren Lokalisation auf der genetischen Karte von Chromosom 20 (Li et al., 1997; Pollet et al., 1997; http://www-genome.wi.mit.edu) in Bezug zu dem Bruchpunkt; **c.** Kartierung der verwendeten YACs mit Angabe des dem YAC zugeordneten Mikrosatellitenlocus (STS). Zusätzlich dargestellt der YAC 940d11 mit dem JAG1 Gen, dem die Cosmide 1h4, 2c12 und 3e9 für die Mikrodeletionsanalyse entstammen (siehe Tab. 1, S. 13 und Abb. 26, S. 59); **d.** Darstellung der Lokalisation der Bruchpunkte (Bp) bei der Probandin 1 mit der Translokation t(3;20) und der Probandin 3 mit der Translokation t(9;20)

4.1.2 Charakterisierung des Translokationsbruchpunktes bei Proband 2 mit der Translokation 45,XY,t(5;22) und den klinischen Merkmalen einer Mikrodeletion 22q11.2

Kasuistik

Der Proband ist das 2. Kind klinisch unauffälliger nicht verwandter Eltern. Nach komplikationslosem Schwangerschaftsverlauf wurde der Junge in der 39. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 3750 g (75. Perzentile) und einer Körperlänge von 52 cm (75. Perzentile) geboren. Neben tiefsitzenden dysmorphen Ohrmuscheln (Abb. 7 b, c) bestanden zu diesem Zeitpunkt keine morphologischen Abweichungen. Die motorische Entwicklung verlief normal. Anamnestisch auffällig sind rezidivierende Bronchitiden im Kleinkindalter. Zum Zeitpunkt der Untersuchung bestehen bei dem 10-jährigen Jungen eine Lernbehinderung, die besonders in einer verzögerten sprachlichen Entwicklung zum Ausdruck kommt und eine verminderte Konzentrationsfähigkeit. Bei einer Körpergröße von 130 cm (3. Perzentile) liegt das Körpergewicht von 37,9 kg (90. Perzentile) um 20 % über der Norm (Abb.7 d). Neben den dysplastischen Ohrmuscheln sind eine kleine kräftige Nase mit antevertierten Nasenlöchern, eine aufgeworfene Unterlippe und ein Diastema dentale auffällig (Abb.7 a). Die Hand-, Finger- und Fußgelenke sind überstreckbar. Die kurzen und breiten Hände verfügen über eine geringe kutane Syndaktylie im Bereich der Strahlen II bis IV (Abb.7 f). Das Knochenalter entspricht der Norm. Ein kardialer Defekt oder Hypokalzämien wurden nicht nachgewiesen.

Bei dem Probanden wurde zytogenetisch eine Translokation t(5;22) mit dem Karyotyp 45, XY,t(5;22) aufgedeckt, wobei ein Chromosom 22 an das Ende des langen Arms von Chromosom 5 transloziert ist (Abb.6 und Abb. 11, S. 34).

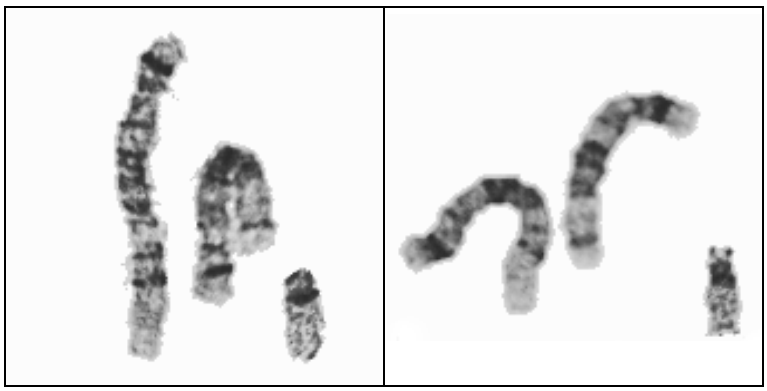
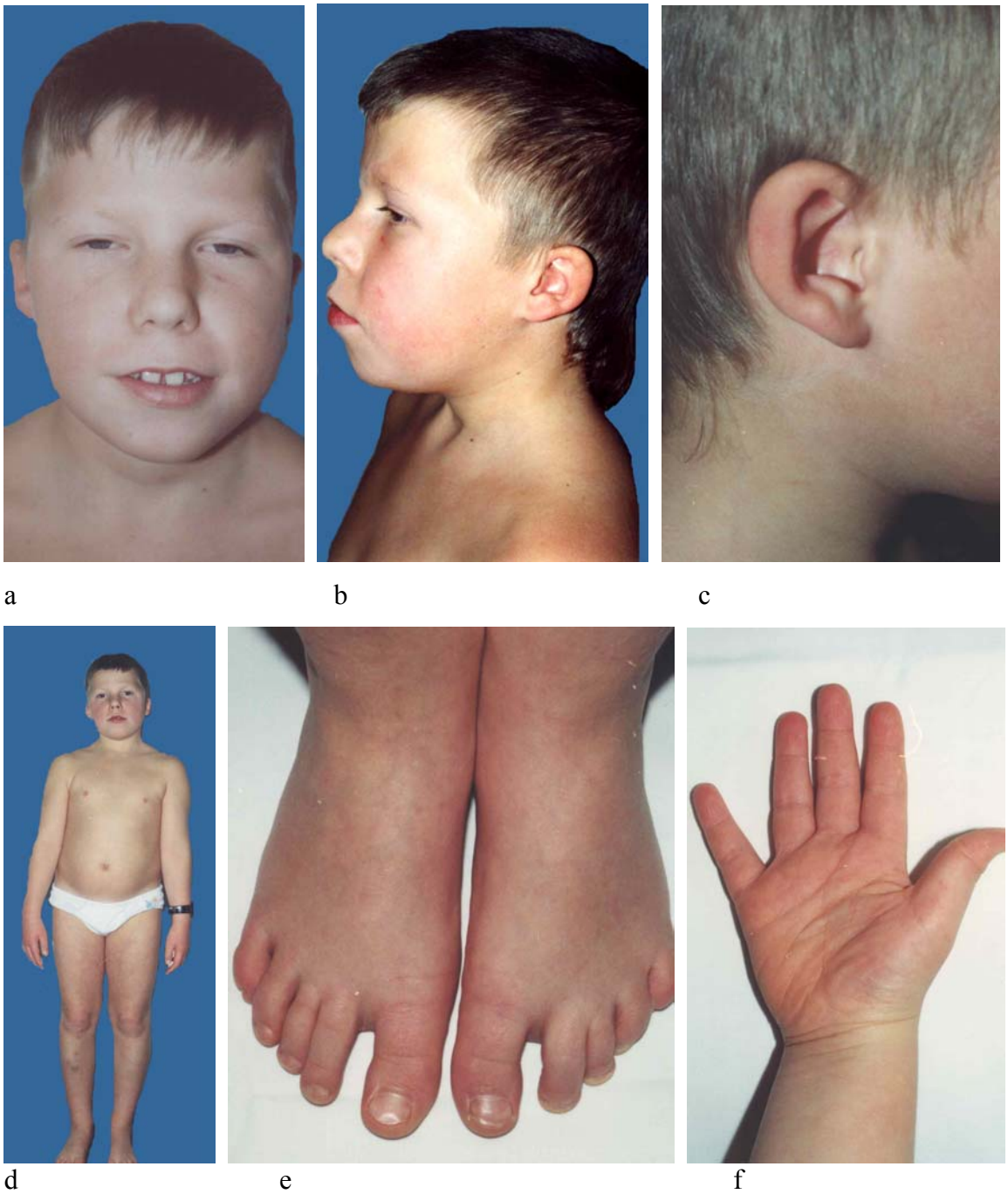


Abb. 6: Darstellung der betroffenen Chromosomen 5 und 22 aus zwei Metaphasen des Probanden 2, links jeweils das derivative Chromosom 5, in der Mitte das unveränderte Chromosom 5 und rechts das unveränderte Chromosom 22. (Bandenstadium: 400)



a b c

d e f

Abb. 7: Klinische Merkmale des Probanden 2 mit 45,XY,t(5;22)(q35.3;q11.2). **a.** Gesicht mit einer kleinen kräftigen Nase mit antevertierten Nasenlöchern, einer aufgeworfenen Unterlippe und einem Diastema dentale; **b.** Schädel lateral zur Darstellung der tiefsitzenden dysmorphen Ohrmuscheln **c.** Darstellung der dysmorphen Ohrmuschel;
d. Körper frontal mit Darstellung der Adipositas; **e.** Darstellung der Füße mit Sandalenlücke von dorsal; **f.** Darstellung der rechten Hand von palmar mit geringer kutaner Syndaktylie der Strahlen II, III, IV

Molekularzytogenetische Untersuchung (FISH)

Zur molekularen Charakterisierung der Translokation 5;22 wurden Hybridisierungen mit den Proben *Chromosome 5 painting*-Sonde, *Chromosome 22 painting*- Sonde, der D22S75 DiGeorge-Chromosomen-Region-Probe (DGCR, D22S75, 22q11.2) mit der Chromosom 22-Kontroll-Probe (D22S39, 22q13.3), der telomerspezifischen Sonde *All Human Telomeres* der Firma Oncor und mit dem in der Subtelomerregion des langen Arms von Chromosom 5 gelegenen YAC 856e9 durchgeführt. Weitere Angaben zu diesen Proben finden sich im Abschnitt 2.3.1, Tab. 3, S. 14.

Hybridisierungen mit der *Chromosome 22 painting*- Sonde zeigten neben der zu erwartenden Markierung eines homologen Chromosoms 22 zusätzliche Signale auf dem distalen Bereich des langen Arms des derivativen Chromosoms 5 (nicht gezeigt). Entsprechend ergab die Hybridisierung mit der *Chromosome 5 painting*-Sonde eine vollständige Markierung des normalen Chromosoms 5 sowie des Translokationschromosoms, ausgenommen des dem Chromosom 22 entsprechenden distalen Segments des langen Arms (nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der subtelomer gelegenen Sequenzen auf 5q wurde mit dem YAC 856e9 hybridisiert. Auf beiden Chromosomen 5 waren Signale nachweisbar, wobei sich auf dem Translokationschromosom der(5) die Signale in einem Abstand von 5q darstellten, der ungefähr der Länge des translozierten Chromosoms 22 entspricht (Abb. 8). Demzufolge sind die subtelomer gelegenen Sequenzen auf dem Chromosom der(5) durch die Translokation t(5;22) nicht betroffen.

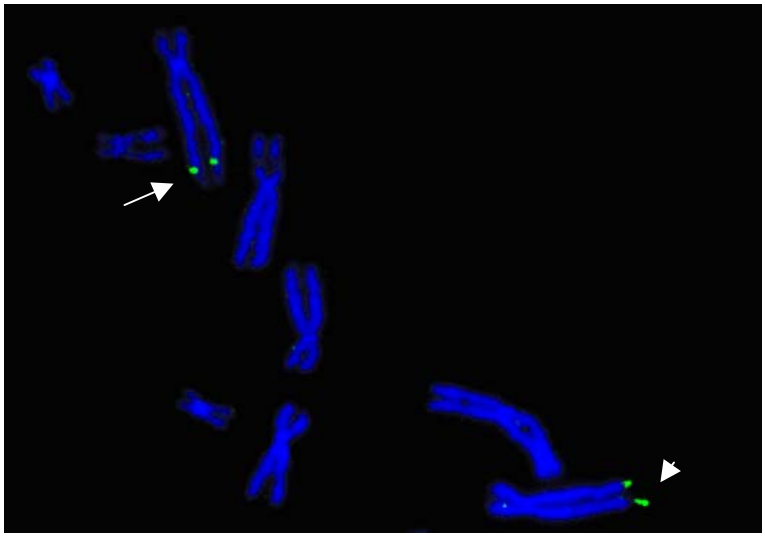


Abb. 8: FISH mit dem YAC 856e9: Auf dem Translokationschromosom der(5) sind die Signale in einem Abstand vom Telomer 5q sichtbar (langer Pfeil), der ungefähr der Länge des translozierten Chromosoms 22 entspricht. Das Signal auf dem normalen Chromosom 5 befindet sich distal auf 5q35 (kurzer Pfeil).

Die für alle Telomere spezifische Sonde *All Human Telomeres* wurde zur Überprüfung der Telomere des Translokationschromosoms hybridisiert. Im distalen Bereich des langen Arms des derivativen Chromosoms 5 ergaben sich zwei Signale (Abb.9). Neben einem für reguläre Telomerpositionen distalen Segment wurden interstitielle FISH-Signale beobachtet. Dabei dürfte es sich bei dem distalen Signal um das Telomer des Chromosoms 22 handeln. Das interstitielle Signal weist von distal nach proximal einen Abstand auf, der ca. der Größe des translozierten Chromosoms 22q entspricht und markiert somit mit großer Wahrscheinlichkeit das Telomer von 5q.

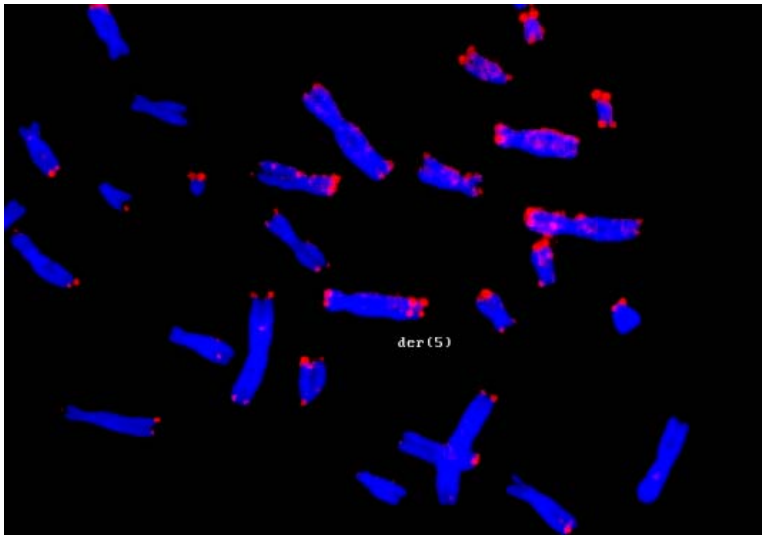


Abb. 9: FISH mit der Sonde *All Human Telomeres:* Auf dem derivativen Chromosom 5 stellen sich zwei Signale dar. Wobei das distale mit großer Wahrscheinlichkeit dem der Telomerregion 22q und proximal davon gelegen dem der interstitiellen Telomerregion 5q entspricht.

Zur Eingrenzung des Bruchpunktes auf Chromosom 22 wurde die DGS1-Sonde auf Chromosomen des Probanden 2 hybridisiert. Auf dem unverändertem Chromosom 22 wurden beide Loci, die DiGeorge-Chromosomen-Region (DGCR) und die Chromosom 22-Kontroll-Region nachgewiesen, währenddessen auf dem Translokationschromosom der(5) nur ein Signal sichtbar wurde (Abb.10). Aufgrund der zentromernahen Hybridisierung der Sonde DGCR (22q11.2) und der telomernahen Zuordnung der Chromosom 22-Kontroll-Sonde (22q13.3) handelt es sich dabei um das Kontrollsignal der Region 22q13. Daher ist von einem Verlust der DiGeorge Chromosomen Region durch das Translokationsereignis auszugehen (Abb.11). Der ermittelte Karyotyp lautet demnach:

45, XY, der(5) t (5;22)(q35.3;q11.2),-22.ish del (22)(22q11.2).

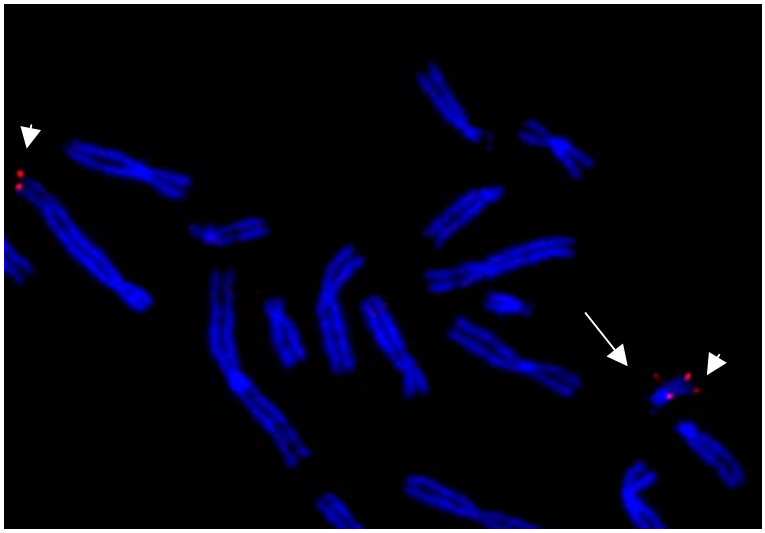


Abb. 10: FISH mit der DGCR-Probe für 22q11.2: Auf dem unveränderten Chromosom 22 sind die Signale der DGCR (langer Pfeil) und die der Chromosom 22-Kontroll-Region (kurzer Pfeil), auf dem Translokationschromosom ist nur das Signal der Chromosomen 22-Kontroll-Region mit 22q13.3 (kurzer Pfeil) sichtbar.

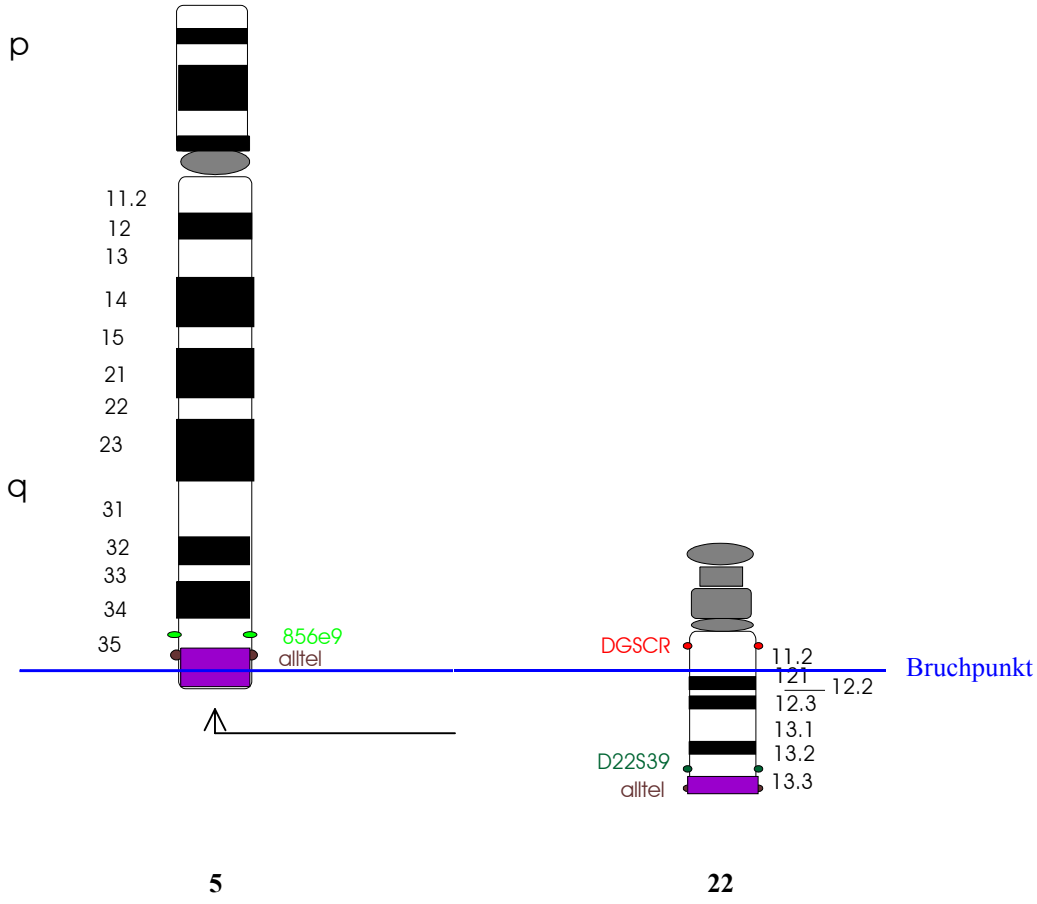


Abb. 11: Ideogramm der Chromosomen 5 (links, Bandenstadium 400) und 22 (rechts, Bandenstadium550), lila gekennzeichnet die Telomerbereiche der Chromosomen. Schema mit Angabe der Lokalisierung der verwendeten FISH-Sonden und der Bruchpunkte der Translokation 5;22 (ISCN 1985).

4.1.3 Charakterisierung des Translokationsbruchpunktes bei Probandin 3 mit der Translokation 46,XX,t(9;20) und einem klinischen Merkmal des Alagille Syndroms (AGS)

Kasuistik

Die Probandin 3, eine 33-jährige Frau, musste sich bereits im Alter von 4 Jahren aufgrund einer großen retroperitonealen galleenthaltenden Zyste einer Choledochojejunostomie unterziehen. Im Alter von 13 Jahren erfolgte bei weiterhin bestehenden ikterischen Schüben die Cholezystektomie wegen Cholelithiasis. Der postoperative histologische Befund beschreibt eine deutliche chronische Cholezystitis bei unauffälliger Leber. Auffällig bei der Auskultation des Herzens war ein 2/6 Systolikum. Durch eine zytogenetische Untersuchung wurde der Karyotyp 46,XX,t(9;20)(p23;p13) festgestellt (Abb. 12).

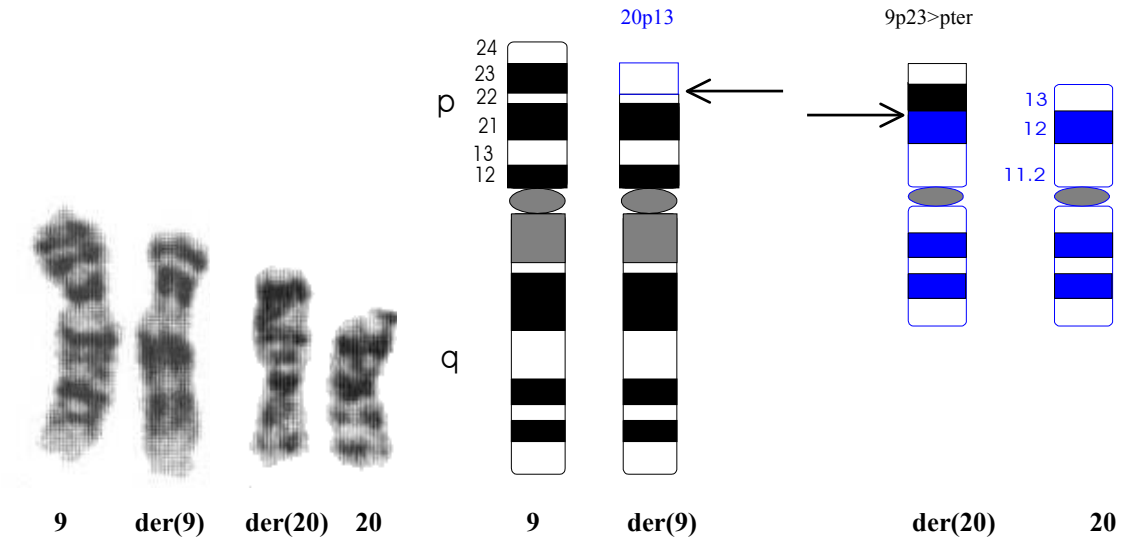


Abb. 12: Chromosomen 9 und 20 der Probandin 3 aus einer Metaphase mit der Translokation t(9;20)(p23;p13) links; rechts die Ideogramme zur Darstellung der Bruchpunkte (Pfeile) der Translokation. (Bandenstadium: 400; ISCN 1985)

Molekularzytogenetische Untersuchung (FISH)

Cosmid 1h4

Das Cosmid 1h4 ist auf dem Chromosom 20 dem Bereich 20p12 zugeordnet. Wie die Cosmide 3e9 und 2c12 entstammt es einer etablierten Cosmid-Bibliothek aus dem YAC 940d11 (Giannakudis, persönliche Mitteilung). Da sich in 15 Metaphasen Signale auf den Chromosomen 20 und der(20) darstellten, ist davon auszugehen, dass es durch die Translokation zu keinem Verlust der korrespondierenden Sequenzen auf dem Chromosom 20 gekommen ist (ohne Abbildung).

YAC 984g12

Der auf 984g12 nachgewiesene Locus D20S116 kartiert im Bandenbereich 20p13 mit einer Entfernung von 11 cM zum Telomerbereich 20p (Abb.5, S. 29) (http://www-genome.wi.mit.edu). Die Lokalisierung des YACs in Bezug zu dem Gen JAG 1 ist in der Abb. 5 (S. 29) dargestellt. Neben den zu erwartenden Signalen auf dem unveränderten Chromosom 20 ergaben sich in 15 untersuchten Metaphasen Fluoreszenzsignale sowohl auf dem derivativen Chromosom 20 (Abb. 13) als auch auf dem derivativen Chromosom 9 (Abb. 13). Da beide Signale in gleicher Intensität vorlagen, ist davon auszugehen, dass sich der Translokationsbruchpunkt im Bereich 20p13 innerhalb der zu dem YAC 984g12 komplementären Sequenzen befindet. Da der YAC 984g12 den Bruchpunkt der Translokation (9;20) überspannt, wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

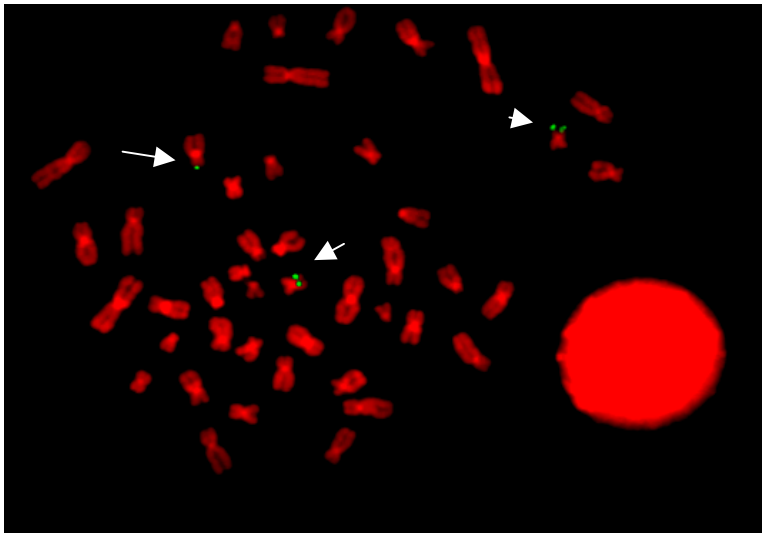


Abb. 13: FISH mit dem YAC 984g12, Signale auf Chromosom 20 (>) und in geringerer Intensität auf der(9) (langer Pfeil) sowie der(20) (kurzer Pfeil)

4.2 Untersuchungen von Probanden mit zytogenetisch sichtbaren Deletionen

4.2.1 Charakterisierung des Deletionsbruchpunktes bei der Probandin 4 mit der Deletion 46,XX,del(10p)

Kasuistik

Zum Zeitpunkt der Untersuchung war das Mädchen 5 Monate alt. Es ist das zweite Kind gesunder nicht verwandter Eltern. Nach einer unauffälligen Schwangerschaft wurde es in der 38. Schwangerschaftswoche (SSW) mit einem Gewicht von 2640 g (25. Perzentile) und einer Körpergröße von 47 cm (10. Perzentile) mittels Sectio caesarea entbunden. Anfängliche Ernährungsschwierigkeiten besserten sich nach der operativen Therapie einer bestehenden Pylorusstenose. Diese bestand anamnestisch ebenfalls beim Vater des Kindes und wird daher nicht auf die im folgenden beschriebene chromosomale Aberration zurückgeführt.

Auffällig wurde das Kind im 3. Monat durch Wachstumsretardierung und folgende kraniofaziale Merkmale: Mikrocephalie, kurzer Hals, kleine Nase mit antevertierten Nasenlöchern und breitem Nasenrücken, Hypertelorismus, Ptosis, geringfügiger Epikanthus, hoher Gaumenbogen, Mikroretrognathie, Synophris, schmales präaurikuläres Ohrgrübchen links, langgezogenes Philtrum, breiter Mund mit schmalen Oberlippen. Bei der körperlichen Untersuchung fielen außerdem eine ausgeprägte kutane Syndaktylie zwischen dem 3. und 4. Finger beiderseits und der 2. und 3. Zehe beider Füße, außerdem eine asymmetrische Rima ani mit sakralem Grübchen auf. Tiefe atypische Dermatoglyphen der Hände und Füße wurden auf eine bestehende generalisierte muskuläre Hypertonie zurückgeführt (Abb.14).

Die otologische Untersuchung zeigte verengte Gehörgänge und eine bilaterale Gehörlosigkeit. Aufgrund der ophthalmologischen Untersuchung wurde der Verdacht auf bilaterale Atrophie des Nervus opticus geäußert.

Nach der klinischen Untersuchung wurden ein 1/6 Systolikum und intermittierende Blässe beschrieben, wobei ein kongenitaler Herzfehler ausgeschlossen wurde. Röntgenaufnahmen zeigten die Anwesenheit eines großen Thymus und ein normales Knochenalter.

Durch wiederholte laborchemische Diagnostik wurden anfangs erniedrigte Kalziumwerte ermittelt, die ohne erhöhte Krampfbereitschaft einhergingen und sich ohne Therapie normalisierten. Bei dem Kind, das wiederholt an Infektionen des oberen

Respirationstraktes litt, waren die absoluten Lymphozytenzahlen erhöht, das Verhältnis der Subpopulationen jedoch altersentsprechend.

a **b** **c**

d **e** **f**

Abb. 14: Darstellung der klinischen Merkmale der Probandin 4 mit Deletion 10p. **a.** Gesicht mit kleiner Nase, antevertierten Nasenlöchern, breitem Nasenrücken, Hypertelorismus, Ptosis, breitem Mund mit schmaler Oberlippe und langgezogenem Philtrum;
b. Ansicht des Schädels von lateral mit Darstellung der Mikroretrognathie; **c.** sakrales Grübchen; **d.** kutane Syndaktylie zwischen der 2. und 3. Zehe , hier des rechten Fußes; **e.** tiefe atypische Dermatoglyphen, hier der linken Hand; **f.** kutane Syndaktylie zwischen dem 3. und 4. Finger, hier der linken Hand

Durch die zytogenetische Untersuchung des Mädchens wurde eine Deletion von 40% des kurzen Armes eines Chromosoms 10 gefunden (Abb.15). Der Karyotyp wird angegeben mit: 46,XX,del(10)(p13). Der Karyotyp der Eltern ist dagegen unauffällig 46,XX bzw. 46,XY.

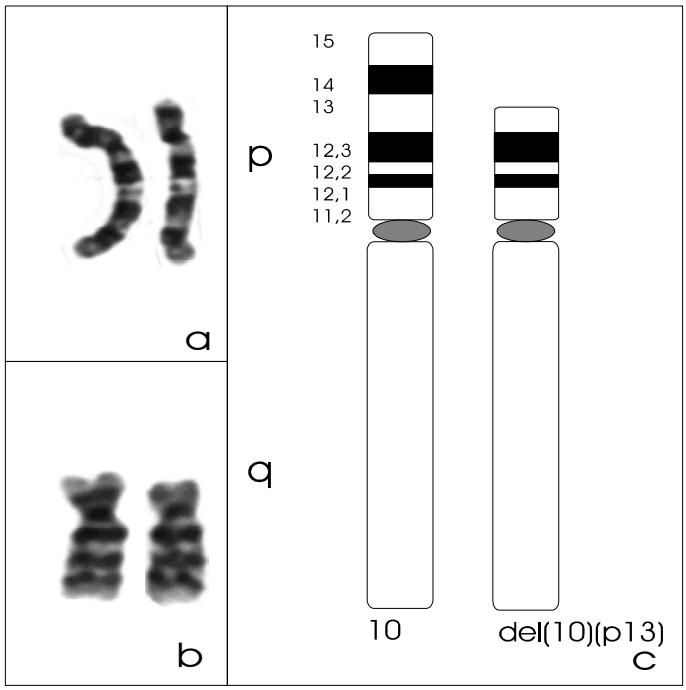


Abb. 15: Chromosomenpaare 10 aus 2 Metaphasen einer Lymphozytenkultur nach G-Bänderung (**a** und **b**), links jeweils das unveränderte Chromosom, rechts das Chromosom 10 mit Deletion 10p13; Ideogramm zur Darstellung der Deletion 46,XX, del(10)(p13) bei der Probandin 4 (**c**) (Bandenstadium 400; ISCN 1985)

Molekularzytogenetische Charakterisierung (FISH)

Da die Deletion von 10p bei oben beschriebener Probandin den kritischen Bereich für das DiGeorge Syndrom (DGS2) (Schuffenhauer et al., 1995) beinhaltet, sollte mittels FISH-Untersuchung der Deletionsbruchpunkt bestimmt und damit eine Eingrenzung des für DGS2 kritischen Chromosomensegments (SRO) angestrebt werden. Zum Einsatz kamen die YACs 889c10 und 932f11, die von Kingsley et al. (1997) zur Charakterisierung der Subtelomerbereiche verwendet worden waren. Aufschluß über das Vorliegen segmentaler Monosomie für den Bereich 10 pter sollten die YACs 918h11, 773c3, 808a2 geben, die bereits von Schuffenhauer et al. (1995) zur Charakterisierung der SRO für DGS2 zur Anwendung kamen (Abb. 17, S. 41).

YAC 889c10

Aufgrund der Entfernung des Locus D10S558 von 1 cM zum Telomer des kurzen Armes von Chromosom 10 (Kingsley et al., 1997) kam der den Locus tragende YAC 889c10 bei der Deletionsanalyse der Subtelomerregion zur Anwendung. Die Untersuchung ergab in 17 Metaphasen Signale auf dem normalen, nicht jedoch auf dem deletierten Chromosom 10 (Abb. 16). Daraus folgt, dass die Deletion 10p zu einem Verlust der korrespondierenden Sequenzen des YACs 889c10 geführt hat.

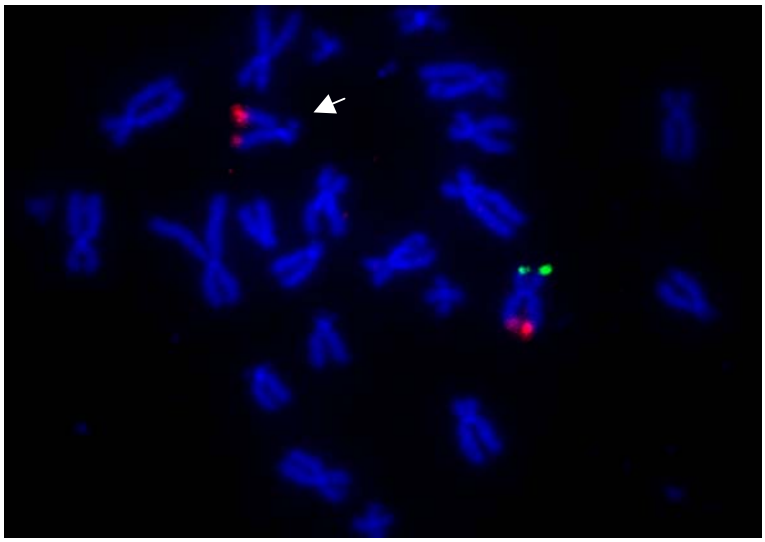


Abb. 16: Kohybridisierung mit dem YAC 889c10 (grünes Signal) und zur Markierung der Chromosomen 10 und del(10) mit dem YAC 932f11 (10q, rote Signale). Der in der Subtelomerregion 10p15 gelegene YAC 889c10 ist auf dem deletierten Chromosom 10 (Pfeil) nicht nachweisbar.

YACs 918h11 und 773c3

Die korrespondierenden Sequenzen des YACs 918h11 liegen außerhalb der SRO (*shortest region of deletion overlap*) für DGS2 und begrenzen diese nach terminal. 773c3 begrenzt überlappend die SRO für DGS2 nach proximal (Schuffenhauer et al., 1998). FISH-Analysen ergaben in je 15 Metaphasen eine symmetrische Markierung beider Chromatiden des normalen Chromosoms 10 und keine Markierung auf dem veränderten Chromosom 10 (ohne Abb.). Demzufolge liegen die korrespondierenden Sequenzen der YACs 918h11 und 773c3 innerhalb der Deletionsregion.

YAC 808a2

Dieser YAC, dessen Locus D10S223 einen Abstand von 34 cM zum Telomer 10p aufweist (Abb.17), kartiert proximal und außerhalb der kritischen Region von DGS2

(Schuffenhauer et al., 1998). In 20 untersuchten Metaphasen konnte eine Markierung der Chromatiden beider Chromosomen 10 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Somit sind die korrespondierenden Sequenzen dieses Locus auch auf dem derivativen Chromosom 10 vorhanden.

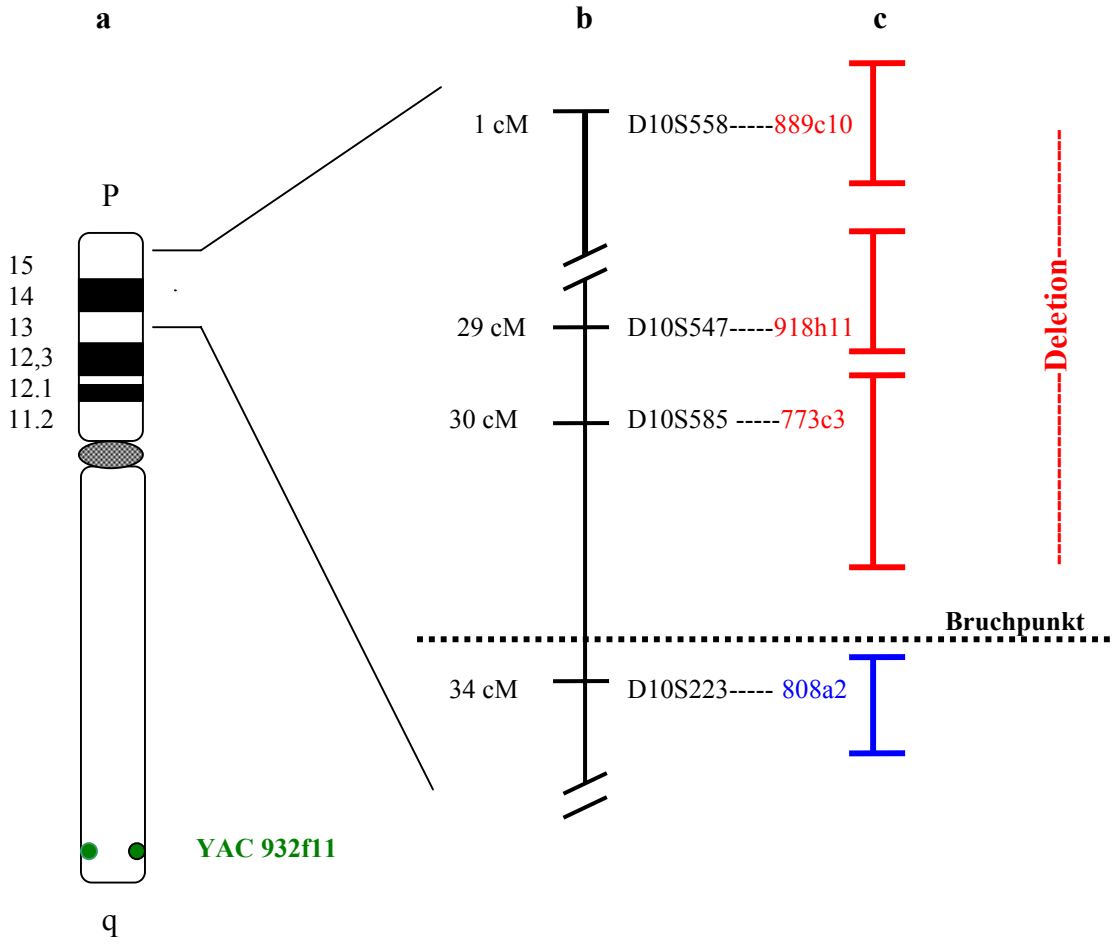


Abb. 17: Ideogramm von Chromosom 10 (a) und Lokalisierung der für die molekulare Analyse von Probandin 4 verwendeten YACs (c) mit den dazugehörigen STS-Markern auf der genetischen Karte (b) (modifiziert nach Schuffenhauer et al., 1998) (ISCN 1985). **a.** Ideogramm von Chromosom 10 mit Darstellung des zur Markierung von homologem und derivativem Chromosom 10 eingesetzten YAC 932f11; **b.** Darstellung der dazugehörigen STS-Marker und deren Entfernung zu 10pter; **c.** Darstellung der verwendeten YACs

Durch Untersuchungen mit den YACs 889c10, 918h11, 773c3 und 808a2 wurde der Bruchpunkt auf 10p proximal von 773c3 und distal des YACs 808a2, also einem Bereich zwischen 30 cM und 34 cM vom Telomerbereich 10p entfernt, zugeordnet (Abb. 17).

4.2.2 Charakterisierung des Deletionsbruchpunktes bei der Probandin 5 mit der Deletion 46,XX,del(18q)

Kasuistik

Die zum Zeitpunkt der Untersuchung 20-jährige Probandin ist das 2. Kind gesunder, nicht verwandter Eltern. Bereits im 1. Lebensjahr fiel sie durch retardierte körperliche und geistige Entwicklung auf. Zudem zeigte sie proportionierten Kleinwuchs (144,4 cm/ 47,9 kg) mit diskreten Dysmorphien: antimongoloide Lidstellung, kurzes Philtrum, leichte Progenie, Stellungsanomalien der Finger und Zehen mit deutlich verkürzten Endphalangen und eine Verdickung der Grundgelenke des 4. Fingers. Durch eine zytogenetische Untersuchung wurde eine Deletion im terminalen Bereich des langen Arms von Chromosom 18 nachgewiesen (Abb. 18). Der Karyotyp lautet: 46,XX, del(18)(q23). Für beide Elternteile der Probandin wurde ein unauffälliger Karyotyp von 46,XX bzw. 46,XY ermittelt.

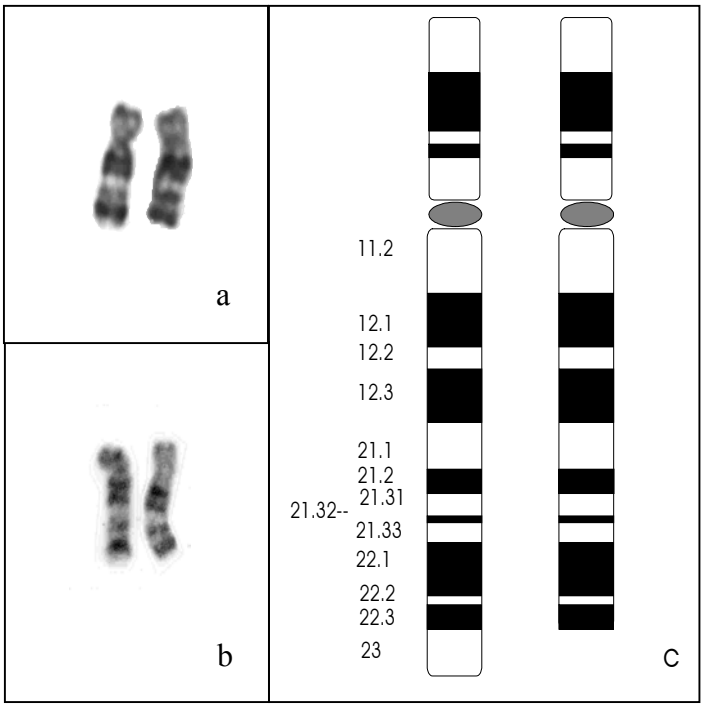


Abb. 18: Darstellung der beiden Chromosomen 18 der Probandin 5 aus 2 Metaphasen (**a**, **b**), links jeweils das unveränderte Chromosom 18, rechts das del(18q) Chromosom. Ideogramm zur Darstellung der Deletion 46,XX,del(18)(q23) (**c**). (Bandenstadium 550, ISCN 1985)

Zum Zeitpunkt der Untersuchung bestand bei der Probandin eine Schwangerschaft in der 18. Woche. Die zeitgleich mit der Beratung und Untersuchung der Ratsuchenden durchgeführte Amniozentese konnte für den Fetus das Vorliegen der o.g. Deletion ausschließen. Der Karyotyp des Kindes lautet: 46,XX. Durch eine Ultraschallfeindiagnostik wurde ein unauffälliges fetales Wachstum festgestellt. Auch nach Spontangeburt des reifen lebensfrischen Mädchens zeigten sich keine auffälligen Dysmorphien.

Da die zytogenetisch gefundene Deletion auf Chromosom 18 im Bereich q23 die SRO für das 18q-Deletionssyndrom beinhaltet, sollte mittels FISH- und Mikrosatelliten-Analyse der Bruchpunkt bestimmt und damit die von Cody et al. (1997) beschriebene SRO weiter eingegrenzt werden. Zum Einsatz kamen die YACs 932b10, 855e1, 954c7 und 968f4.

Molekularzytogenetische Charakterisierung (FISH)

YAC 932b10

Dieser YAC trägt ein 1400 kb langes genomisches Fragment, auf welchem die Loci D18S554 und D18S462 nachgewiesen wurden. Laut Strathdee et al. (1997) und Cody et al. (1997) enthält 932b10 auch den Locus für das *Myelin Basic Protein* Gen (MBP). Innerhalb der *Shortest region of deletion overlap* (SRO) für Wachstumshormon-Insuffizienz bei 18q-Deletionssyndrom liegend, begrenzt der Locus D18S462 diese nach terminal (Cody et al., 1997). D18S554 kartiert 300 kb zum Telomer des langen Arms von Chromosom 18 entfernt innerhalb der SRO (Cody et al., 1997). Der Locus D18S462 wird mit einer Entfernung von 118 cM zum Telomer 18p dem Chromosom 18 zugeordnet (http://www-genome.wi.mit.edu). 932b10 wurde aufgrund dieser Eigenschaften in Kohybridisierung mit dem YAC 854g8 (zur Markierung der beiden Chromosomen 18) zur Untersuchung der Subtelomerregion vom Chromosom 18 eingesetzt (Abb. 22, S. 47).

In 19 untersuchten Metaphasen konnten keine Signale auf dem deletierten Chromosom 18 nachgewiesen werden, während sie auf dem normalen sichtbar waren (Abb. 19). Die korrespondierenden Sequenzen zu dem YAC 932b10 liegen demzufolge innerhalb des deletierten Bereiches auf 18q.

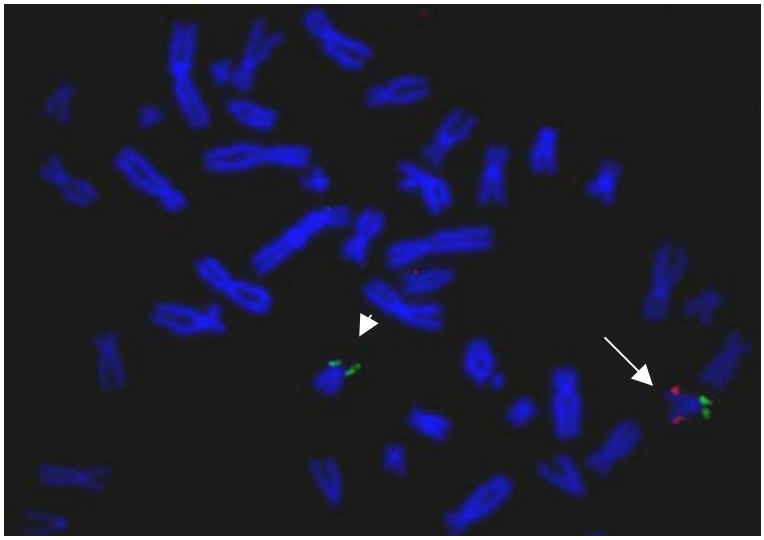


Abb. 19: Der YAC 854g8 (18p, grün) markiert das normale (langer Pfeil) und das deletierte Chromosom 18 (kurzer Pfeil). Signale des YACs 932b10 (18q, rot) sind auf dem deletierten Chromosom 18 nicht nachweisbar.

YAC 855e1

Dem YAC wurden die Loci AFM242YF2 und D18S1009 zugeordnet (http://www-genome.wi.mit.edu). AFM242YF2 begrenzt mit einer Entfernung von 2200 kb zum Telomerbereich 18q nach proximal und innerhalb die kritische Region für die Wachstumshormon-Insuffizienz bei 18q-Deletionssyndrom (Cody et al., 1997) (Abb.25, S. 57). Mit einer Entfernung von 1700 kb zu 18q liegt D18S1009 innerhalb dieser Region (Cody et al., 1997) (Abb.25). Hybridisierungen mit dem YAC 855e1 zeigten in 15 Metaphasen keine Markierung auf dem deletierten Chromosom 18, jedoch eine symmetrische Markierung beider Chromatiden des normalen Chromosoms 18 (ohne Abb.). Durch das Deletionsereignis auf dem Chromosom 18q ist es zu einem Verlust der zu dem YAC 855e1 korrespondierenden Sequenzen gekommen.

YAC 954c7

Der dem YAC-Klon zugeordnete Locus D18S469 kartiert proximal und außerhalb der SRO für die Wachstumshormon-Insuffizienz bei 18q-Deletionssyndrom (Cody et al., 1997), 109 cM vom Telomer 18p entfernt (http://www-genome.wi.mit.edu) (Abb.22, S. 47). Auffällig bei der Auswertung der FISH mit diesem YAC war, dass zwar Signale auf beiden Chromosomen 18 sichtbar waren, jedoch in jeder der 15 untersuchten Metaphasen mit deutlich geringerer Intensität auf einem der beiden Chromosomen (Abb. 20). Dies ist ein Hinweis dafür, dass der Bruchpunkt sich innerhalb der komplementären Sequenzen auf 18q befindet.

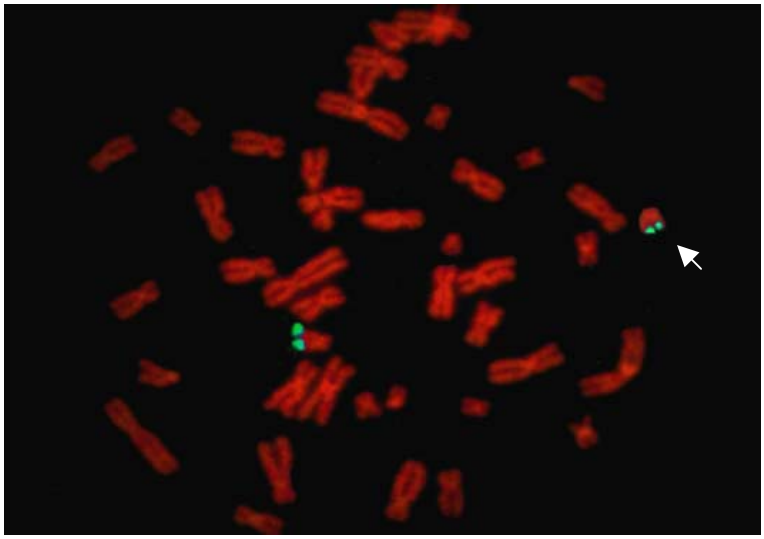


Abb. 20: FISH mit dem YAC 954c7 mit einem signifikant schwächeren Signal (Pfeil) auf einem Chromosom 18.

YAC 968f4

Dieser YAC wurde dem langen Arm des Chromosoms 18 im Bereich der Bande 18q22.3 zugeordnet (Kline et al., 1993). Auf dem 1670 kb umfassenden genomischen Fragment wurde der Locus D18S488 nachgewiesen (http://www-genome.wi.mit.edu; Boghosian-Sell et al., 1996). D18S488 befindet sich proximal und außerhalb der SRO für das 18q-Deletionssyndrom (Cody et al., 1997). In 15 untersuchten Metaphasen konnte eine Markierung der Chromatiden beider Chromosomen 18 nachgewiesen werden (ohne Abb.). Die korrespondierenden Sequenzen dieses Locus sind somit auch auf dem deletierten Chromosom vorhanden.

Nach den FISH-Ergebnissen befindet sich der Deletionsbruchpunkt distal zu YAC 968f4 und proximal zu YAC 855e1, innerhalb des YACs 954c7. Er wurde auf einen Bereich zwischen 105 cM und 114 cM vom Telomerbereich 18p entfernt eingegrenzt (Abb.22).

Darstellung von Mikrosatelliten

Die Mikrosatellitenanalyse wurde gemäß der im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. DNA der beiden Elternteile und deren Tochter (Probandin 5) wurde in den die Loci AFM242YF2, D18S1009 und D18S554 tragenden DNA-Abschnitten auf das Vorliegen einer Deletion überprüft. Die Probandin weist an allen 3 Loci jeweils nur ein Allel auf (Abb. 21). Im Vergleich zu den bei den Eltern festgestellten Genotypen liegt allerdings eine nicht informative Allelverteilung vor, somit kann an diesen Loci Homozygotie oder Hemizygotie vorliegen. Es ist daher keine Aussage darüber möglich, ob die Loci in der Deletionsregion liegen bzw. ob das paternale oder das maternale Chromosom 18 von der Deletion betroffen ist.

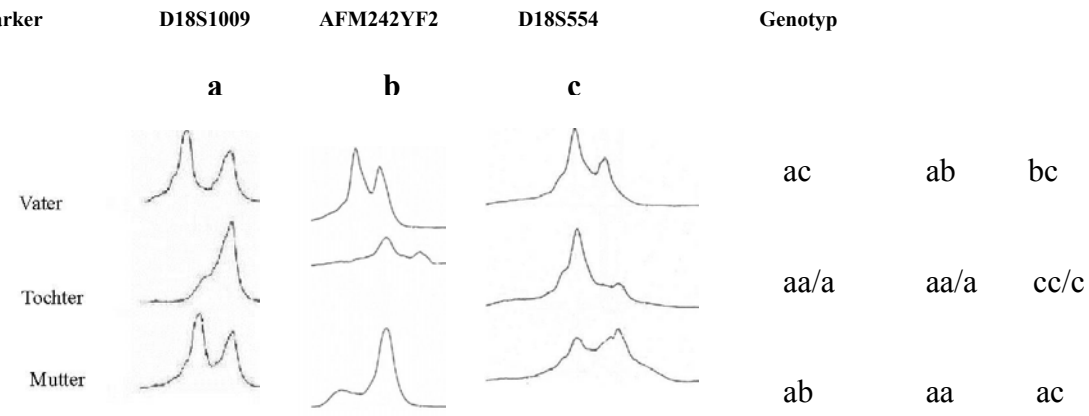


Abb. 21: Darstellung der Genotypisierung an den Mikrosatellitenloci D18S1009 (Spalte a), AFM242YF2 (Spalte b) und D18S554 (Spalte c) bei Probandin 5 und ihren Eltern. An allen 3 Loci ergibt sich eine nicht informative Allelverteilung bei Vorliegen nur eines Allels bei der Probandin 5.

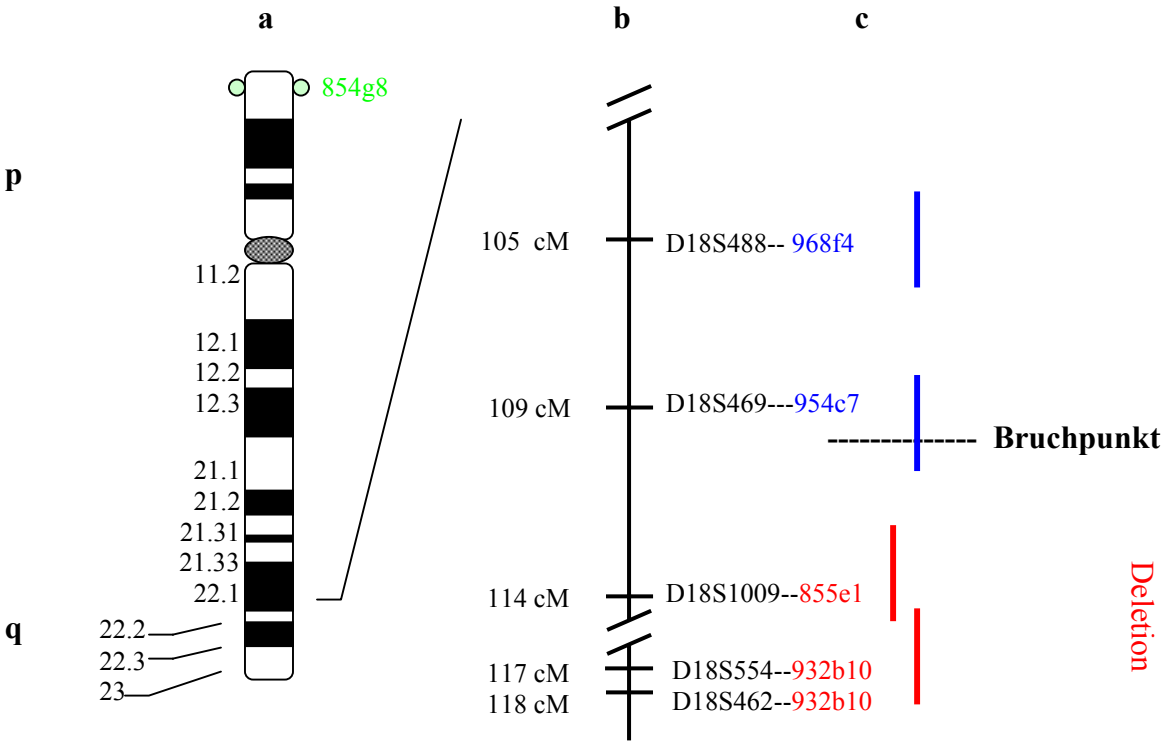


Abb. 22: Schematische Darstellung der Deletion 18q23 der Probandin 5 mittels FISH. **a.** Ideogramm von Chromosom 18 (Bandenstadium 850; ISCN 1985) mit Darstellung des zur Markierung von homologem und deletiertem Chromosom 18 eingesetzten YAC 854g8; **b.** Darstellung der dazugehörigen STS-Marker auf der genetischen Karte und deren Entfernung von 18pter (http://www.genome.wi.mit.edu); **c.** Darstellung der verwendeten YACs

4.3 Untersuchungen von Probanden mit dem klinischen Verdacht auf ein Mikrodeletionssyndrom und zytogenetisch unauffälligem Karyotyp

In dieser Gruppe wurden 3 Probanden mit Verdacht auf ein Rubinstein-Taybi Syndrom mit den Cosmiden RT166 und RT191 (Abschnitt 2.3.3, S. 15), 9 Probanden mit den klinischen Merkmalen des Alagille Syndroms mittels der Cosmide3e9 und 2c12 (Tab. 1, S.13) und 5 Probanden mit Merkmalen des DiGeorge Syndroms mit der DGCR-Probe (Tab. 3, S. 14) auf Mikrodeletionen untersucht. Bei keinem der Probanden mit zytogenetisch unauffälligem Karyotyp wurde durch FISH-Untersuchungen eine Deletion aufgedeckt.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden molekularzytogenetische bzw. molekulargenetische Untersuchungen an insgesamt 22 Probanden durchgeführt. Das Ziel bestand darin, zu überprüfen, inwieweit die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) als ergänzende Methode zur zytogenetischen Diagnostik zur Charakterisierung bzw. zum Aufdecken bisher nicht bekannter chromosomaler Aberrationen eingesetzt werden kann. Hierfür wurden FISH-Untersuchungen an 3 Probandengruppen vorgenommen. In der Probandengruppe 1 (Probanden 1-3) wurden durch zytogenetische Untersuchungen Translokationen aufgedeckt, deren Bruchpunkte durch die FISH charakterisiert wurden. Gruppe 2 besteht aus 2 Probanden (Probanden 4 und 5), deren lichtmikroskopisch sichtbare Deletion in Ausmaß und Lokalisierung durch die FISH eingegrenzt wurde. Bei 17 Probanden (Gruppe 3) bestand im Zusammenhang mit der Klinik und einem lichtmikroskopisch unauffälligen Karyotyp der Verdacht auf eine Mikrodeletion. In dieser Gruppe wurde die Einsetzbarkeit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zum Aufdecken kryptischer Aberrationen geprüft.

5.1 Probanden mit zytogenetisch sichtbaren Translokationen

Probandin 1 mit familiärer Translokation t(3;20)

Der Translokationsbruchpunkt der Probandin 1 mit familiärer Translokation t(3;20) und einer für AGS typischen Fazies sollte in Bezug zur Alagille Syndrom kritischen Region (AGSCR) näher charakterisiert werden. Durch Einsatz der Cosmide 3e9 und 2c12 wurde ein größerer Bruchstückverlust innerhalb der AGSCR ausgeschlossen. Der durch die Translokation entstandene Bruchpunkt ist distal des YACs 955f7 und proximal des YACs 987g10 in einer Region zwischen 22 und 16 cM von 20pter entfernt lokalisiert (Abb. 5, S. 29) und liegt damit mindestens 8 cM distal zu der von Li et al. (1997) beschriebenen kritischen Region (Abb. 23). Die Translokation, die in der Familie des Mädchens über 3 Generationen nachgewiesen wurde, blieb bei Vater und Großvater des Kindes ohne klinische Auswirkung. Da das Alagille Syndrom mit einer sehr hohen Penetranz von 94 % in Erscheinung tritt (Dhorne-Pollet et al., 1994; Krantz et al., 1997a), wäre eine mögliche Erklärung für den Phänotyp der Probandin eine neu aufgetretene interstitielle Deletion in der AGSCR oder eine Punktmutation des JAG1-Gens, die mit oben beschriebenen

Methoden nicht nachgewiesen werden konnten. Eine weitere Erklärung wäre ein Positionseffekt durch die Translokation t(3;20)(p25;p13). Hierbei kommt es zu einer veränderten Genexpression, die jedoch nicht durch ein Mutations- oder Deletionsereignis innerhalb des Gens verursacht wird, sondern durch eine veränderte Position des Gens relativ zu seiner normalen chromosomalen Umgebung (Kleinjan et al., 1998). Eine mögliche Erklärung für Positionseffekte sehen Kleinjan et al. (1998) in einer durch das chromosomale Rearrangement verursachten neu entstandenen Nachbarschaft zwischen einem Gen und dem *silencer* Element (Kombination kurzer Sequenzelemente, die die Transkription eines Gens unterdrücken) eines anderen Gens. Der Abstand zwischen dem betreffenden Gen und dem Bruchpunkt bei bisher veröffentlichten, durch Positionseffekte ausgelösten Erkrankungen umfasst maximal 900 kb (*X-Linked deafness;* De Kok et al., 1996). Bei einem Abstand von mindestens 8 cM zwischen der AGSCR mit dem JAG1 Gen auf dem der(20) und dem Translokationsbruchpunkt ist ein Einfluss eines *silencer* Elements aus der 3p25pter-Region eher unwahrscheinlich. Um das Auftreten weiterer klinischer Merkmale des Syndroms wie zum Beispiel Ikterus und Pruritus als Folge der Leberveränderungen auszuschließen bzw. frühestmöglich zu erkennen und zu behandeln, ist eine regelmäßige Kontrolle des Kindes zu empfehlen.

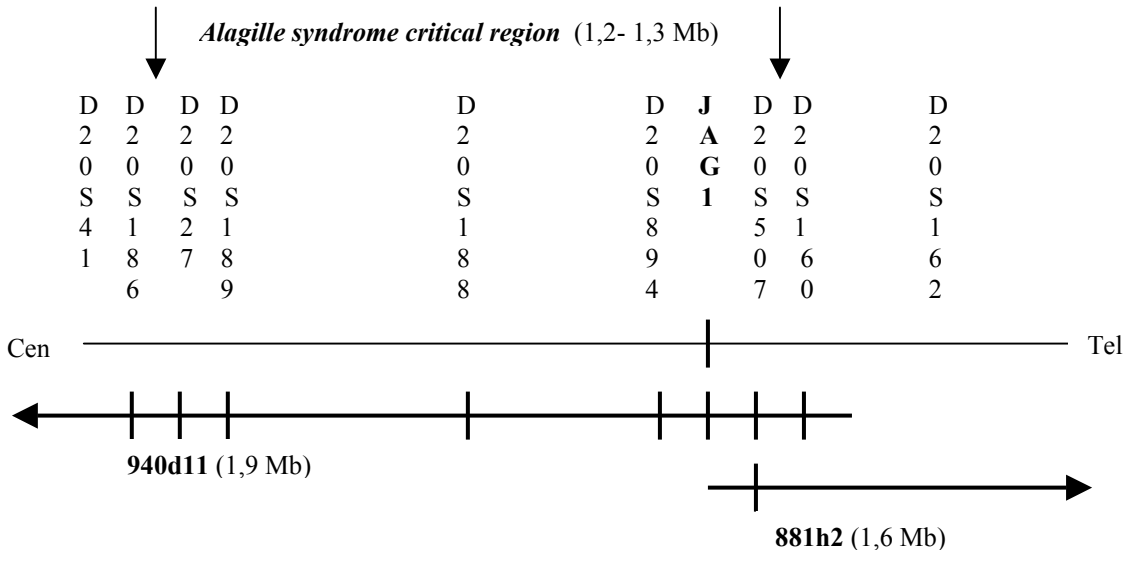


Abb. 23: Kartierung des JAG1 Gens in Bezug zur kritischen Region des Alagille Syndroms auf 20p12. Zusätzlich dargestellt die die SRO überspannenden YACs 940d11 und der sich distal überlappend anschließende YAC 881h2. Die Translokationsbruchpunkte der Probanden 1 und 3 sind mindestens 8 cM bzw. 14 cM telomerwärts dieser YACs lokalisiert. Modifiziert nach Li et al. (1997).

Probandin 3 mit einer Translokation 46,XX,t(9;20)

Der Translokationsbruchpunkt der Probandin 3 mit einer Translokation t(9;20) sollte in Bezug zur AGSCR näher charakterisiert werden. Der Bruchpunkt der Probandin 3 mit der Translokation t(9;20)(p23;p13) liegt innerhalb des YACs 984g12 auf 20p13 (Abb. 5, S. 29) und damit mindestens 14 cM distal zu der von Li et al. (1997) beschriebenen AGSCR (Abb. 23). Die zum Zeitpunkt der Untersuchung 33-jährige Frau wies bei Zustand nach Cholezystektomie wegen chronischer Cholezystitis im Alter von 15 Jahren und Operation einer großen retroperitonealen galleenthaltenden Zyste im Alter von 4 Jahren neben einem 2/6 Systolikum des Herzens keine klinischen Symptome des Alagille-Syndroms auf. Eine größere chromosomale Aberration innerhalb der AGSCR wurde durch die beschriebenen Untersuchungen ausgeschlossen und ist aufgrund des Phänotyps eher unwahrscheinlich. Mögliche Gene, die in dem Translokationsbereich kartieren und betroffen sein könnten, sind das *Centromeric protein B* Gen (CENPB), das *Cell division cycle 25B* Gen (CDC25B), das *Prion-protein* Gen (PRNP), das *Oxytocin-Neurophysin* I Gen (OXT, OT) und das *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA, *DNA polymerase delta Auxiliary protein)* (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/). Klinisch besteht jedoch kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Erscheinungsbild der Probandin 3 und der Aberration eines Chromosomenabschnitts für genannte Gene durch die Translokation.

Auch bei dieser Probandin wäre, wie bei Probandin 1 diskutiert, ein Positionseffekt als Ursache für das Auftreten eines für das Alagille Syndrom typischen Merkmals denkbar. Aufgrund einer Entfernung des Translokationsbruchpunktes von mindestens 14 cM zu dem in der AGSCR liegenden JAG1 Gen auf der(20) ist jedoch bei dieser Probandin ein Einfluss eines *silencer* Elements aus der Region 9p23pter eher unwahrscheinlich.

Proband 2 mit einer Translokation 45,XY,t(5;22)

Nach Spiteri et al. (2003) wurde bisher in der Literatur über insgesamt 60 Translokationen der Region 22q11.2 mit einem Autosom bzw. X- oder Y-Chromosom berichtet. Neben dem in dieser Arbeit beschriebenen Probanden ist in der Literatur kein Hinweis auf weitere Translokationen zu finden, die neben der Region 22q11.2 den Chromosomenabschnitt 5q35 betreffen. Eine Erklärung für den bei dem Probanden 2 beschriebenen milden Phänotyp des DiGeorge Syndroms ist die Monosomie der kritischen Region auf 22q11.2 (DGCR) infolge der Translokation t(5;22). In anderen Arbeiten finden sich ähnliche

Ergebnisse, bei denen eine Monosomie der Region 22q11.2 durch eine Translokation zur Ausprägung von Merkmalen des DiGeorge Syndroms/ Velocardiofazialen Syndroms (DGS/ VCFS) geführt hat (de la Chapelle et al., 1981; Kelley et al., 1982; Greenberg et al., 1984 und 1988; Lupski et al., 1991; Kerstjens-Frederikse et al., 1999; Li et al., 2001; Spiteri et al., 2003). Demgegenüber berichten Causey et al. (2001) von einer Probandin mit der Translokation 46,XX,t(1;22)(p36.3;q11.2), bei der trotz Ausschluss einer Deletion innerhalb der DGCR mittels FISH neben Ataxie und Psychose auch für VCFS typische Merkmale vorliegen (u.a. Lernschwierigkeiten und morphologische Kriterien). Spiteri et al. (2003) berichten über eine weitere Probandin mit der Translokation 46,XX,t(16;22)(16pter>16q24:: 22q11.2>22qter) und VCFS/DGS verwandten Merkmalen (velopharyngeale Inkompetenz mit verzögerter Sprech- und Sprachentwicklung) trotz Nachweis der DGCR. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass eine Deletion innerhalb der von Bartsch et al. (2003) beschriebenen *typical deleted region* (TDR), *proximal deleted region* (PDR) oder distalen 22q11-Deletionsregion nur durch den Einsatz mehrerer Proben aufgedeckt werden kann. Der alleinige Einsatz der Probe N25 (D22S75) der Firma Oncor wie in der Veröffentlichung von Spiteri et al. (2003) ist demzufolge als alleinige Methode zum Ausschluss einer Deletion innerhalb der DGCR nicht ausreichend.

Interstitielle Telomersequenzen, deren Anwesenheit auf dem Translokationschromosom der(5) nachgewiesen wurden (Abb. 9, S. 33), wurden bisher vorwiegend in Neoplasien im Zusammenhang mit Translokationsereignissen beschrieben (Gisselsson et al., 2001). Selten wurden interstitielle Telomer-*repeats* im humanen Karyotyp beobachtet (Park et al., 1992; Boutouil et al., 1996; Mondello et al., 2000; Mignon-Ravix et al., 2002). Diese interstitiellen *repeats* stellen *hotspots* für meiotische Rekombinationen und *jumping translocations* dar und sind instabil während der Mitose (Mignon-Ravix et al., 2002). Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Probanden besteht kein Hinweis auf eine Instabilität des Translokationschromosoms. Daraus kann geschlossen werden, dass *jumping translocations* oder Translokationsinstabilität nicht in direktem Zusammenhang mit der Anwesenheit interstitieller Telomersequenzen stehen müssen. Eine andere Erklärung für die Stabilität interstitieller Telomere sehen Mignon-Ravix et al. in der Anwesenheit spezifischer Telomerproteine wie TRF2 und TIN2 (Mignon-Ravix et al., 2002). In der kürzlich von Spiteri et al. (2003) veröffentlichten Übersichtsarbeit von insgesamt 60 Translokationen mit Beteiligung des Chromosomenabschnitts 22q11.2 wird bei 57 % eine Beteiligung

terminaler Banden der Partnerchromosomen an der Translokation beschrieben. Eine Ursache für die erhöhte Frequenz von Rearrangements zwischen telomerischen Banden der Partnerchromosomen mit der Region 22q11.2 wird darin gesehen, dass 22q11.2-Deletionen mit dem Leben vereinbar sind und eine Monosomie eines schmalen Segments der telomerischen Chromosomenabschnitte besser toleriert wird als mehr proximal gelegene Bruchpunkte. Gegenüber der Arbeit von Spiteri et al., in der die am weitesten distal gelegenen chromosomenspezifischen Sequenzen der einzelnen Partnerchromosomen untersucht wurden, wurde bei der in dieser Arbeit beschriebenen Translokation t(5;22) die Anwesenheit der für alle Chromosomen spezifischen Telomersequenzen auf der(5) nachgewiesen.

Interchromosomale homologe Rekombinationen zwischen den bereits in der Einleitung erwähnten LCRs von 2 homologen Chromosomen 22 bzw. intrachromosomale Rekombinationen können zu Deletionen auf 22q11.2 bei DGS/VCFS führen (Edelmann et al., 1999 a und b). Die Ursache für die in der Literatur berichtete konstitutionelle Translokation t(11;22)(q23;q11.2) ist in nicht homologen Rekombinationsereignissen zwischen AT-reichen Regionen auf 11q23 und 22q11.2 zu sehen (Edelmann et al., 2001; Kurahashi et al., 2000, 2001). Ähnliche molekulare Mechanismen werden auch für die von Spiteri et al. (2003) untersuchten Translokationen und für die von Kehrer-Sawatzki et al. (1997) berichtete Translokation (17;22) angenommen. Spiteri et al. (2003) lokalisierten 8 von 14 untersuchten Translokationsbruchpunkten auf 22q11.2 in einem LCR22. Die Mehrzahl davon (5 von 8) in dem LCR22-3a. Die Region LCR22-3a ist sowohl bei der Translokation t(11;22) (Edelmann et al., 2001) als auch bei der distalen 1,5-Mb Deletionsregion bei DGS/VCFS betroffen (Funke et al., 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass LCR22s an der Entstehung von Erkrankungen beteiligt sind. Weitere Studien der 22q11.2- und telomerischen Translokationen sind für das Verständnis der Entstehung chromosomaler Rearrangements und der Stabilisierung gebrochener Chromosomen wichtig (Spiteri et al., 2003).

5.2 Probanden mit zytogenetisch sichtbaren Deletionen

Probandin 4 mit der Deletion 46,XX,del(10p13)

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen bei der Probandin 4 mit zytogenetisch klassifizierter Deletion von 40 % des kurzen Arms von Chromosom 10 hatten zum Ziel, die von Schuffenhauer et al. (1998) beschriebene *smallest region of deletion overlap* (SRO) für das DiGeorge Syndrom2 (DGS2) einzugrenzen (Abschnitt 1.3.4 und Abb. 24, S. 55). Dies sollte mittels Identifizierung der Loci erfolgen, die infolge der Deletion in hemizygoter Form vorliegen und gleichzeitig der SRO zugehören. Das Kind zeigt einige typische klinische Merkmale des DGS2 (Tab.7).

Tab. 7: Vergleich der Merkmale des DGS2 (Van Esch et al., 1999a; Lichtner et al., 2000) mit denen der Probandin 4 mit Deletion 10p im Alter von 5 Monaten. ***** Merkmale infolge von Deletionen im Bereich des **DGS2-Locus** auf 10p14 (Lichtner et al., 2000); ****** Merkmale infolge von Deletionen im Bereich des **HDR1-Locus** (GATA3- Gen) auf 10p14/p15 (Lichtner et al., 2000)

Klinische Merkmale des DGS2	**Referenz**	**Probandin**
Herzdefekt* (47 %)	Van Esch et al. (1999a)	nein
signifikante Infektionen* (28 %) durch T-Zell-Defizit	Van Esch et al. (1999a)	wiederholte Infektionen des oberen Respirationstraktes, röntgenologischer Nachweis eines normalgroßen Thymus
Hypokalzämie infolge Hypoparathyreoidismus**	Lichtner et al. (2000)	ja, ohne erhöhte Krampfbereitschaft, Normalisierung ohne Therapie, alters-entsprechendes Knochenalter
Taubheit**	Lichtner et al. (2000)	verengte Gehörgänge und bilaterale Gehörlosigkeit
renale Dysplasie**	Lichtner et al. (2000)	nicht nachgewiesen
andere Merkmale		- Mikrocephalie - kurzer Hals - kutane Syndaktylie zwischen 3. und 4. Finger und 2. und 3. Zehe beidseits - tiefe atypische Dermatoglyphen der Hände und Füße durch generalisierte muskuläre Hypertonie - asymmetrische Rima ani mit sakralem Grübchen - Pylorusstenose (anamnestisch auch beim Vater des Kindes) - faziale Dysmorphien - Wachstumsretardierung

Durch FISH mit den YACs 808a2 und 773c3, welche die Loci D10S223 bzw. D10S585 tragen, konnte der Bruchpunkt zwischen diesen beiden Loci kartiert werden (Abb. 17, S 41 und 24). Eine Eingrenzung der SRO konnte durch diese Arbeit nicht erfolgen, da der ermittelte Deletionsbruchpunkt der Probandin 4 in einem 4 cM- Intervall zwischen 30 und 34 cM vom 10p-Telomer entfernt liegt. Der Bruchpunkt liegt damit proximal der von Schuffenhauer et al. (1998) beschriebenen SRO, die zwischen 28 und 29 cM vom Telomer des kurzen Arms entfernt lokalisiert wurde (Abb. 24). Die Probandin weist nur eine milde Symptomatik des DGS2 auf, obwohl ein Bruchstückverlust von ca. 40 % des kurzen Arms von Chromosom 10 nachgewiesen wurde. Während typische Merkmale, wie postnatale Wachstumsretardierung, ausgeprägt sind, liegen andere Symptome nicht vor. Das unterstreicht die Überlegung von Dasouki et al. (1997) und Gottlieb et al. (1998), dass das Ausmaß der Ausprägung des Syndroms nicht von der Größe der Deletion bestimmt und der Phänotyp durch Deletion mehrerer Regionen verursacht wird (Dasouki et al., 1997; Gottlieb et al., 1998). Nach Lichtner et al. führt die Deletion der *DiGeorge critical region II* (DGCRII) auf 10p14 (Abb. 24) zu Herzdefekten und T-Zell-Defiziten (Lichtner et al., 2000). Der Verlust der distal davon gelegenen HDR1-Region mit dem GATA3-Gen auf 10p14-p15 (Abb.24) resultiert in dem sogenannten „HDR Syndrom“ (*Hypoparathyroidism, Deafness, Renal dysplasia*) (Van Esch et al., 2000). Aufschlussreich ist der Vergleich der in dieser Arbeit beschriebenen Deletion mit der von Van Esch et al. (2000) gefundenen Region für DGCRII und HDR. Demzufolge ist die distal zu DGCRII gelegene Region für HDR deletiert. Das erklärt die bei dem Kind nachgewiesene Taubheit und die anfangs erniedrigten Kalziumwerte. Unklar ist, ob bei der Probandin eine renale Dysplasie ausgeprägt ist. Weiterführende Untersuchungen zur Abklärung dieser Fragestellung wurden nicht durchgeführt. Aufgrund der laborchemischen Parameter gab es keinen Hinweis auf eine verminderte Nierenleistung. Das unterstreicht die Ergebnisse von Van Esch et al., die bei allen untersuchten Probanden mit GATA3-Haploinsuffizienz Hypoparathyreoidismus und eine sensorineurale Schwerhörigkeit bzw. Taubheit nachwiesen, jedoch nur bei drei der fünf Probanden eine renale Dysplasie. Sie begründen diese Tatsache mit einer reduzierten Penetranz für renale Anomalien (Van Esch et al., 2000). Interessant ist der Vergleich der DGCRII (Van Esch et al., 2000) mit der bei Probandin 4 vorliegenden Deletion. Aufgrund der Größe der Inserts der verwendeten YACs (0,9- 1,5 Mb) kann nicht ausgeschlossen werden, dass es durch die Deletion zu dem

Verlust nur eines Teils der DGCRII gekommen ist. Das würde erklären, warum ein typisches Merkmal wie der kardiale Defekt bei beschriebener Probandin nicht vorliegt.

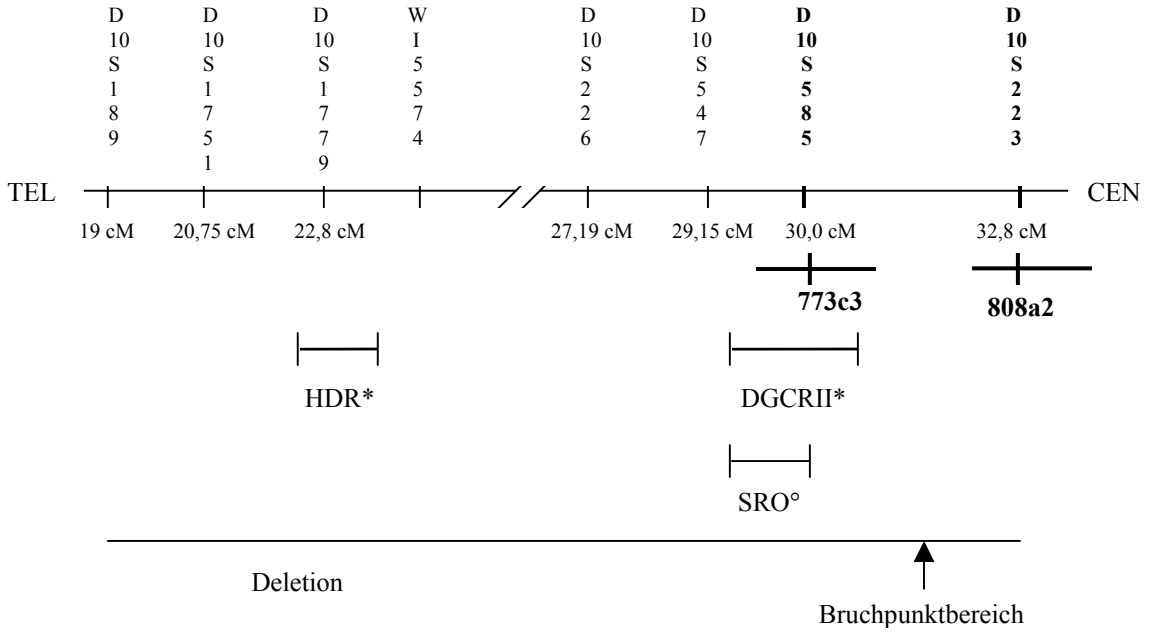


Abb. 24: Darstellung des durch die molekularzytogenetische Analyse ermittelten Bruchpunktbereiches bei Probandin 4 im Vergleich zu der von Schuffenhauer et al. (1998) ermittelten SRO für DGS2 (SRO°) und der von Van Esch et al. (2000) angegebenen Regionen für HDR und DGCRII (HDR* bzw. DGCRII*), modifiziert nach Van Esch et al. (2000).

Probandin 5 mit der Deletion 46,XX,del(18q23)

Bei der Probandin 5, die charakteristische Merkmale des Chromosom-18q Deletionssyndroms aufweist (Abschnitt 4.2.2 und Tab. 8), wurde zytogenetisch eine terminale Deletion am langen Arm des Chromosoms 18 angenommen.

Tab. 8: Vergleich der klinischen Merkmale des 18q Deletionssyndroms mit den Merkmalen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Probandin 5 mit 46,XX,del(18q23). Modifiziert nach Strathdee et al. (1997).

Klinische Merkmale	Anteil der Probanden mit Merkmalsausprägung [%] nach Strathdee et al. (1995)	Anteil der Probanden mit Merkmalsausprägung [%] nach Wilson et al. (1979); Qazi et al., (1980); Feldinger et al. (1987)	Vorliegen [+] bzw. Fehlen [-] des Merkmals bei der Probandin 5
Verzögertes Wachstum	54	>80	+
Mikrozephalie	42	50-80	-
Fazies			
Mittelgesichtshypoplasie	69	50-80	+
nach oben oder unten zeigende Lidspalte	31	30-50	+
malformierte Ohren	50	50-80	+
flaches Philtrum	38	<10	-
Karpfenmund	50	50-80	nach unten zeigende Mundwinkel
Prognathismus	19	<10	leichte Progenie
hoher Gaumen o. Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalte	50	30-50	-
flacher Nasenrücken	23	>80	+
Extremitäten			
spitz zulaufende Finger	8	>80	+
proximale Daumen	15	>80	+
Klumpfüße	11	<10	+
ZNS			
Hypotonie	73	>80	+
Krampfanfälle	31	<10	-
Taubheit	60	50-80	Schwerhörigkeit
Strabismus	38	30-50	+ (links)
Nystagmus	27	50-80	+ (links)
Entwicklungsverzögerung	96	>80	+

Das Ziel der molekularen und molekularzytogenetischen Untersuchungen bestand darin, die von Cody et al. (1997) beschriebene kritische Region für die Wachstumshormon-Insuffizienz bei Chromosom-18q Deletionssyndroms (Abb. 25) bei Probandin 5 auf das Vorliegen von Deletionen zu überprüfen und die kritische Region weiter einzugrenzen. Durch Einsatz der YACs 932b10, 855e1, 954c7 und 968f4 wurde mittels FISH-Untersuchungen der Bruchpunkt der in dieser Arbeit beschriebenen Probandin auf einen Bereich distal zu YAC 968f4 und proximal zu YAC 855e1, innerhalb des YACs 954c7 eingegrenzt (Abb. 22). Die Deletion umfasst einen Bereich von über 2 Mb. Der Bruchpunkt liegt proximal zu der von Cody et al. beschriebenen kritischen Region (Abb. 25). Eine weitere Einengung ergab sich aus diesen Daten nicht.

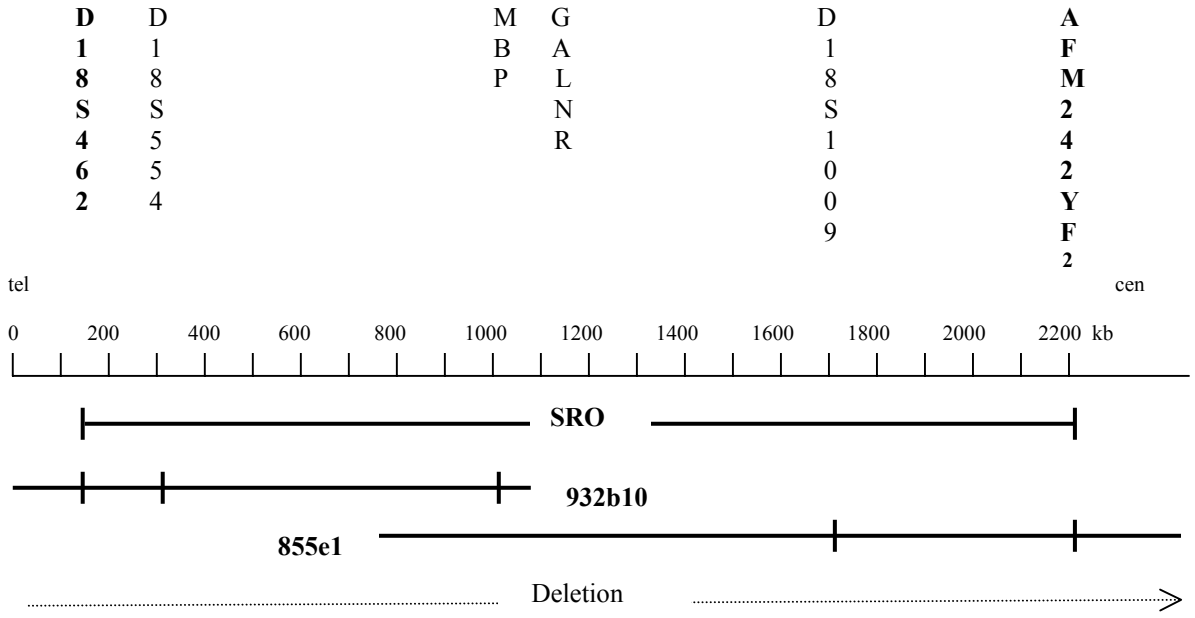


Abb. 25: Darstellung der bei der Probandin 5 deletierten YACs 932b10 (Strathdee et al., 1997) und 855e1 (Cody et al., 1997) im Vergleich zu der von Cody et al. (1997) ermittelten kritischen Region für Wachstumshormon-Insuffizienz bei 18q Deletionssyndrom. Für 855e1 ist nicht bekannt, ob MBP darauf kartiert. Die SRO auf 18q23 mit Angaben der proximalen (AFM242YF2) und distalen (D18S462) Begrenzung und der Loci für das *myelin basic protein* (MBP) und den Galaninrezeptor (GALNR) mit ihrem physikalischen Abstand in kb vom Telomer 18q ist oberhalb der YACs angegeben. Modifiziert nach Cody et al. (1997).

Ein Kandidatengen für die Wachstumshormon-Insuffizienz bei 18q Deletionssyndrom ist neben dem Gen für den Galaninrezeptor (GALNR) (Cody et al., 1997) das Gen für das *myelin basic protein* (MBP) (Kline et al., 1993; Cody et al., 1997). Die Deletion der zu dem YAC 932b10 komplementären Abschnitte beinhaltet auch den Verlust des auf ihm nachgewiesenen Locus für das MBP (Abb. 25). Zudem ist nach FISH-Untersuchungen mit dem YAC 932b10 von einem Verlust der Subtelomerregion 18q auszugehen. Dies unterstreicht die Ergebnisse von Strathdee et al. (1994, 1995), die nach Untersuchung der Telomerbereiche bei 26 Probanden mit 18q Deletionssyndrom zu dem Ergebnis kommen, dass eine terminale und keine interstitielle Deletion zur Ausprägung des Krankheitsbildes führt (Kline et al., 1993; Strathdee et al., 1994 und 1995). Brkanac und Kollegen (1998) untersuchten 35 Probanden mit 18q- „terminalen Deletionen“. Durch molekulare Analyse mit 18q-telomerspezifischen Proben konnten sie bei 3 Probanden für das Telomer

charakteristische Sequenzen nachweisen. Aufgrund der Größe des Inserts von 1,4 Mb des in dieser Arbeit für die Untersuchung der Subtelomerregion 18q verwendeten YACs 932b10 ist von einer Deletion eines großen Abschnitts in dieser Region auszugehen, ein Vorhandensein telomerspezifischer Sequenzen wird dadurch jedoch nicht ausgeschlossen. Die Mikrosatellitenanalyse der die Loci AFM242YF2, D18S1009 und D18S554 tragenden DNA-Abschnitte (Abb. 21, S. 46) erbrachte keine zusätzlichen Informationen.

5.3 Probanden mit Verdacht auf Mikrodeletionen

Probanden mit klinischem Verdacht auf ein Rubinstein-Taybi Syndrom (RTS)

Wie in dem Abschnitt Einleitung (1.3.1) bereits erwähnt, führten bisherige Untersuchungen von über 300 Probanden mit Rubinstein-Taybi Syndrom zu dem Ergebnis, dass chromosomale Aberrationen innerhalb des Bereiches für das *human CREB binding protein* (CBP) auf 16p13.3 eine wichtige Rolle in der Entstehung des Syndroms spielen (Imaizumi und Kuroki, 1991; Lacombe et al., 1992; Tommerup et al., 1992; Breuning et al., 1993; Masuno et al., 1994; Wallerstein et al. 1997; Taine et al., 1998). Die drei in dieser Arbeit beschriebenen Probanden weisen ausgeprägte klinische Merkmale des Rubinstein-Taybi Syndroms auf. Das Ziel der Untersuchungen bestand darin, mittels der in der Arbeit von Giles et al. (1997) beschriebenen Cosmide RT166 und RT191 (Abb.26) eine Deletion in dem für das *human CREB binding protein* (CBP) kritischen Bereich aufzudecken. Bei keinem der drei Probanden wurde eine Deletion mittels FISH der oben genannten Cosmide nachgewiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann jedoch eine nur wenige Kilobasen umfassende Mikrodeletion im kritischen Bereich nicht ausgeschlossen werden. So fanden Petrij et al. (1995) bei allen Probanden eine Deletion des Cosmids RT1, jedoch nur bei Probanden mit ausgedehnteren Bruchstückverlusten (zwischen 200 und 650 kb) auch einen Verlust der korrespondierenden Region für RT166 und RT191. In einer späteren Veröffentlichung (Petrij et al., 2000) gehen die Autoren davon aus, dass der Einsatz der Cosmide RT1, RT102, RT 191, RT166 und RT203 (Abb. 26) zur Detektion von Mikrodeletionen nötig ist. Selbst durch Einsatz aller 5, die Region des CBP-Gens überspannenden Cosmide, wurde durch diese Arbeitsgruppe nur bei 8,2 % der 171 analysierten Probanden eine Mikrodeletion nachgewiesen (Petrij et al., 2000).

Eine weitere Ursache für den Phänotyp der Probanden könnten Punktmutationen innerhalb der *human CREB binding protein* (CBP)-Region darstellen (Petrij et al., 1995). Eine solche Untersuchung war nicht Gegenstand der Arbeit.

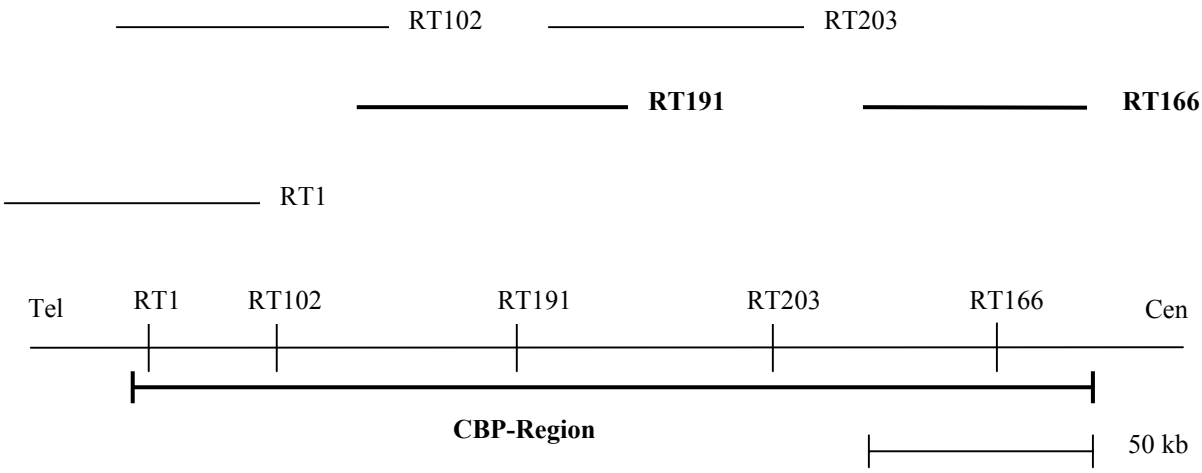


Abb. 26: Darstellung der die CBP-Region überspannenden Cosmide RT1, RT102, RT191, RT203 und RT166 im Contig auf Chromosom 16p13.3. Die Cosmide RT166 und RT191 wurden in dieser Arbeit verwendet. Abbildung modifiziert nach Petrij et al. (2000).

Probanden mit klinischem Verdacht auf ein Alagille Syndrom (AGS)

Das Ziel der FISH-Analysen bei 9 Probanden mit Verdacht auf das Vorliegen eines Alagille Syndroms und unauffälligem Karyotyp bestand darin, Mikrodeletionen in dem kritischen Bereich des Alagille Syndroms (AGSCR) aufzudecken. Bei keinem der 9 Probanden konnte durch FISH mit den Cosmiden 3e9 und 2c12 eine Deletion in der AGSCR gefunden werden. Die Arbeitsgruppe um Krantz untersuchte 54 Probanden mit AGS mittels FISH, Mikrosatellitenanalyse, SSCP (*single strand conformational polymorphism)*- und Sequenzanalyse. Bei 69 % der Probanden fanden sie eine Mutation innerhalb des JAG1 Gens, nur 6 % wiesen eine das gesamte Gen betreffende Deletion mit einer Größe zwischen 1,5- 6,5 Mb auf (Krantz et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse, eine Detektionsrate von Mutationen innerhalb des JAG1-Gens zwischen 60- 70 %, fanden Giannakudis und Kollegen (Giannakudis et al., 2001). Bei den beschriebenen Probanden

wurde daher im Anschluss an diese Arbeit die Suche nach Punktmutationen in JAG1 mittels SSCP- und Sequenzanalyse durchgeführt.

Probanden mit den klinischen Merkmalen des Mikrodeletionssyndroms 22q11

Durch Hybridisierung mit der DiGeorge-Chromosomen-Region-Probe der Firma Oncor wurde bei keinem der 6 Probanden mit unauffälligem Karyotyp eine interstitielle Deletion auf 22q11, die bei 83 % (Carlson et al., 1997) bis 90 % (Driscoll et al., 1992) der Probanden mit DGS/VCFS nachgewiesen wurde, aufgedeckt. Diese Untersuchungen schließen allerdings eine Deletion innerhalb der kürzlich von Bartsch et al. (2003) beschriebenen *typical deleted region* (TDR), *proximal deleted region* (PDR) oder distalen 22q11-Deletionsregion nicht aus. Hierfür wäre der Einsatz zusätzlicher Proben notwendig.

Tab. 9: Überblick über die klinischen Auffälligkeiten der untersuchten Probanden mit Verdacht auf DiGeorge Syndrom, die den Hauptmerkmalen des Mikrodeletionssyndroms 22q11 zugeordnet werden (Ryan et al., 1997). Das Lebensalter ist angegeben in Jahren zum Zeitpunkt der Untersuchung.

Alter	**Herzfehler**	**Gesichtsanomalie**	**Häufige Infektionen/ Thymushypoplasie**	**Anfallsleiden/ Hypokalzämie**	**Gaumenspalte/ velopharyngeale Insuffizienz**
0,5	Vorhofseptumdefekt vom Fossa ovalis-Typ, Fehlabgang der linken Koronararterie aus dem Trunkus pulmonalis	nicht beschrieben	keine unter antibiotischer Abschirmung	nicht nachgewiesen	nicht beschrieben
0,5	persistierender Ductus arteriosus Botalli, kleiner muskulärer Ventrikel-Septum-Defekt, Atriumseptum-Defekt, Typ II	nicht beschrieben	rezidivierende Pleuraergüsse mit Nachweis von Pseudomonas aeroginosa	nicht nachgewiesen	nicht beschrieben
2	nicht nachgewiesen	Epikanthus, vergröberte Gesichtszüge, vor–springende Stirn, diskrete Ptosis	Bronchopneumonie	tonisch-klonisch generalisierter Krampfanfall	nicht beschrieben
6	nicht nachgewiesen	etwas vergröberte Gesichtszüge	nicht beschrieben	nicht nachgewiesen	nicht beschrieben
16	Ventrikel-Septum-Defekt, bikuspide Aortenklappe	kleines fliehendes Kinn, breite Stirn, einfache kleine Ohren	rezidivierende Pneumonien, Bronchitiden	Hyperpyrexie mit Krampfanfällen bis zum 5. Lebensjahr	nicht beschrieben

Tab 10: Überblick über das Alter der Probanden zum Zeitpunkt der Untersuchung, deren Geschlecht und die nachgewiesenen Symptome, die nicht den Hauptmerkmalen des Mikrodeletionssyndroms 22q11 zugeordnet werden.

Alter	Geschlecht	Merkmale
0,5	weiblich	- verzögertes Wachstum bei verminderter Trinkleistung
0,5	männlich	- Ösophagusatresie vom Typ III b nach Vogt - Dünndarmstenose, - totale Lungenfehleinmündung vom infrakardialen Typ - Chylothorax beidseits - bronchopulmonale Dysplasie - subdurales Hygrom - stamm- und kopfbetonte Ödeme - Anämie
2	weiblich	- verzögerte Sprachentwicklung, statomotorische und geistige Retardierung
6	weiblich	- Hochwuchs (über 97. Perzentile) - Hypertrichose im Lumbalbereich - unsichere Koordinations- und Gleichgewichtsreaktion - motorische und feinmotorische Schwierigkeiten - geistige Retardierung, verzögerte Sprachentwicklung
16	männlich	- Z.n. Ösophagusatresie mit ösophagotrachealer Fistel - Steilgaumen, breite Epiglottis - Marfanoider Habitus - Überstreckbare Gelenke - Thoraxasymmetrie bei Wirbelsäulendeformitäten - Schalleitungsschwerhörigkeit beidseits - Myopie - Frühkindlicher Hirnschaden nach mehreren Apnoeanfällen im Neugeborenenalter

Eine weitere Ursache dafür, dass in dieser Arbeit keine Deletion im kritischen Bereich nachgewiesen wurde, könnte auch darin liegen, dass bei keinem der untersuchten Kinder alle Merkmale dieses Syndroms ausgeprägt sind (Tab. 9 und 10). Die klinische Zuordnung zu anderen Symptomenkomplexen wäre somit denkbar. So könnte z.B. der bei einer Probandin nachgewiesene Fehlabgang der linken Koronararterie aus dem Pulmonaltruncus dem Bland-White-Garland-Syndrom (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) zugeordnet werden. Ein anderer Proband zeigt u.a. Merkmale des Pierre-Robin-Syndroms, wie die frühkindlichen Asphyxien oder der hohe, sich verengende Gaumen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim).

Die Methode der FISH wurde durch Untersuchungen in dieser Arbeit als sinnvolle Ergänzung zur Routinediagnostik bestätigt. Zytogenetisch bekannte chromosomale

Aberrationen wurden in Bezug zu Ausmaß und Lokalisierung durch die FISH weiter charakterisiert. So ergaben sich durch die weiterführende Diagnostik neue Erkenntnisse, wie z.B. interstitielle Telomersequenzen bei Probanden 2 oder ein Verlust der HDR1-Region bei Probandin 4, die neue Überlegungen in der Beziehung zwischen Phänotyp und Genotyp bei chromosomalen Veränderungen ermöglichen. Durch den Einsatz von kommerziellen Proben, so z.B. der Probe *All Human Telomeres* der Firma Oncor wird die Methode der FISH wesentlich vereinfacht und der Zeitaufwand für die Untersuchung deutlich reduziert. Dieser Vorteil ermöglicht unter anderem den Einsatz der FISH für diagnostische Fragestellungen im klinischen Alltag.

Die Methode der FISH konnte in dieser Arbeit nicht zum Aufdecken von Mikrodeletionen beitragen. Zahlreiche Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen, so z.B. Schmickel et al. (1986), Scambler et al. (1992), Bettio et al. (1995) und Shaffer (1997), haben jedoch bewiesen, dass die FISH zur Suche nach Mikrodeletionen ein geeignetes Instrument darstellt.

Das Einsatzgebiet der FISH wird durch neuere Methoden, wie der Multiplex-FISH (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996), oder durch die Anwendung von z.B. Chromosomenregion-spezifischen Chip-Analysen (Yu et al., 2003) deutlich erweitert. Durch BAC-Chip-Analysen können chromosomale Veränderungen, wie Deletionen, Duplikationen, Insertionen, Rearrangements von genomischem Material bei z.B. Neoplasien, in einer Größenordnung zwischen 2 und 5 Mb mittels einer Untersuchung und damit in relativ kurzer Zeit detektiert werden (Antonarakis, 2001).

6 Zusammenfassung

Um die Einsetzbarkeit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) als ergänzende Methode zur zytogenetischen Diagnostik zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen an insgesamt 22 Probanden durchgeführt. In der Probandengruppe 1 (Probanden 1-3) wurden durch die FISH die Bruchpunkte von zytogenetisch bekannten Translokationen charakterisiert. Der Bruchpunkt der Probandin 1 mit der familiären Translokation t(3;20)(p25;p13) wurde auf Chromosom 20 distal der korrespondierenden Abschnitte des YACs 955f7 und proximal des YACs 987g10, also in einer Region zwischen 22 cM und 16 cM von 20pter entfernt, lokalisiert. Der Bruchpunkt befindet sich damit mindestens 8 cM distal zu der für das Alagille Syndrom kritischen Region (AGSCR). Durch die Cosmide 3e9 und 2c12 wurde ein mehrere Kilobasen umfassender Bruchstückverlust innerhalb der AGSCR ausgeschlossen. Bei Probanden 2 mit der Translokation t(5;22)(q35.3;q11.2) wurde mittels der DiGeorge-Chromosomen-Region-Probe auf Chromosom 22q11.2 der Verlust dieser Region auf der(5) nachgewiesen. Durch die für alle Telomere spezifische Sonde *All Human Telomeres* wurden auf dem Translokationschromosom der(5) interstitielle Telomersequenzen aufgedeckt, die aufgrund ihrer Lokalisierung mit großer Wahrscheinlichkeit das Telomer von 5q markieren. Die Anwesenheit der Subtelomerregion auf Chromosom 5 und der(5) wurde durch den YAC 856e9 nachgewiesen. Ergebnis der FISH-Untersuchungen bei Probandin 3 mit der Translokation t(9;20)(p23;p13) ist ein Bruchereignis innerhalb des YACs 984g12 und damit mindestens 14 cM distal zu der für das Alagille Syndrom kritischen Region. Ein größerer Bruchstückverlust in diesem Bereich wurde durch das Cosmid 1h4 ausgeschlossen.

In der Gruppe 2 (Probanden 4 und 5) wurden durch die FISH lichtmikroskopisch sichtbare Deletionen in Ausmaß und Lokalisierung eingegrenzt. Der Bruchpunkt der Probandin 4 mit der Deletion del(10)(p14) wurde in einen Bereich proximal zu dem korrespondierenden Abschnitt des YACs 773c3 und distal zu 808a2, also zwischen 30 cM und 34 cM vom Telomer 10p entfernt, ermittelt. Demzufolge ist die distal zu der *DiGeorge critical region II* (DGCRII) gelegene HDR1-Region deletiert. Ein Verlust eines Abschnitts der DGCRII kann nicht ausgeschlossen werden. Der Deletionsbruchpunkt der Probandin 5 mit der Deletion del(18)(q23) befindet sich distal zu YAC 968f4 und proximal zu YAC 855e1, innerhalb des YACs 954c7 in einem Bereich zwischen 105 cM und 114 cM vom

Telomerbereich 18p entfernt und damit proximal der SRO für die Wachstumshormon-Insuffizienz bei 18q Deletionssyndrom.

Bei keinem der 17 Probanden der Gruppe 3 mit klinischem Verdacht auf ein Mikrodeletionssyndrom und einem lichtmikroskopisch unauffälligen Karyotyp wurde durch FISH-Untersuchungen eine Mikrodeletion aufgedeckt. Dennoch haben zahlreiche Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen bewiesen, dass die Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zum Aufdecken von Mikrodeletionen ein geeignetes Instrument darstellt.

Untersuchungen in dieser Arbeit haben gezeigt, dass die FISH die Routinediagnostik sinnvoll ergänzt. Das Ausmaß und die Lokalisierung von zytogenetisch bekannten chromosomalen Aberrationen wurden durch die FISH weiter charakterisiert. Dadurch ergaben sich neue Erkenntnisse, wie z.B. das Vorliegen interstitieller Telomersequenzen oder die Auswirkung des Verlusts der HDR1-Region bei DiGeorge Syndrom 2, die neue Überlegungen in Bezug zur Phänotyp-Genotyp-Beziehung bei chromosomalen Aberrationen ermöglichen. Der Einsatz kommerzieller Proben vereinfacht die Durchführung der FISH und reduziert deren Zeitaufwand erheblich, was unter anderem den Einsatz dieser Methode für diagnostische Fragestellungen im klinischen Alltag erlaubt.

7 Literaturverzeichnis

1 Alagille D, Estrada A, Hadchouel M, Gautier M, Odievre M, Dommergues JP: Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia): Review of 80 cases. J Ped 110 (1987) 195-200

2 Antonarakis SE: BACking up the promises. Nat Genet 27 (2001) 230-232

3 Artavanis-Tsakonas S: Alagille syndrome- a notch up for the Notch receptor. Nat Genet 16 (1997) 212-213

4 Baas F, Bikker H, van Ommen G-J B and de Vijlder J J M: Unusual scarcity of restriction site polymorphism in the human thyroglobulin gene. A linkage study suggesting autosomal dominance of a defective thyroglobulin allele. Hum Genet 67 (1984) 301-305

5 Ballabio A: The rise and fall of positional cloning? Nat Genet 3 (1993) 277-279

6 Bartsch O, Wagner A, Hinkel GK, Krebs P, Stumm M, Schmalenberger B, Böhm S, Balci S, Majewski F: FISH studies in 45 patients with Rubinstein-Taybi syndrome: deletions associated with polysplenia, hypoplastic left heart and death in infancy. Europ J Hum Genet 7 (1999) 748-756

7 Bartsch O, Nemeckova M, Kocarek E, Wagner A, Puchmajerova A, Poppe M, Ounap K, Goetz P: DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome: FISH Studies of Chromosomes 22q11 and 10p14, and Clinical Reports on the Proximal 22q11 Deletion. Am J Med Genet 117A (2003) 1-5

8 Bauman JGJ, Wiegant J, van Duijn P: Cytochemical Hybridization with Fluorochrome-Labelled RNA. III. Increased Sensitivity by the Use of Anti-Fluorescein Antibodies. Histochemistry 73 (1981) 181-193

9 Bettio D, Rizzi N, Giardino D, Grugni G, Briscioli V, Selicorni A, Carnevale F, Larizza L: FISH Analysis in Prader-Willi and Angelman Syndrome Patients. Am J Med Genet 56 (1995) 224-228

10 Boghosian-Sell L, Comings DE, Overhauser J: Tourette Syndrome in a Pedigree with a 7;18 Translocation: Identification of a YAC Spanning the Translocation Breakpoint at 18q22.3. Am J Hum Genet 59 (1996) 999-1005

11 Boutouil M, Fetni R, Qu J, Dallaire L, Richer C-L, Lemieux N: Fragile site and interstitial telomere repeat sequences at the fusion point of a de novo (Y ;13) translocation. Hum Genet 98 (1996) 323-327

12 Breuning MH, Dauwerse HG, Fugazza G, Saris JJ, Spruit L, Wijnen H, Tommerup N, van der Hagen CB, Imaizumi K, Kuroki Y, van den Boogaard M-J, de Pater JM, Mariman ECM, Hamel BCJ, Himmelbauer H, Frischauf A-M, Stallings RL, Beverstock GC, van Ommen G-JB, Hennekam RCM: Rubinstein-Taybi Syndrome Caused by Submicroscopic Deletions within 16p13.3. Am J Hum Genet 52 (1993) 249-254

13 Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, Spalholz B, Travis SZ, Fong CKY, Hsiung GD, Ward D: Detection of Viral Genomes in Cultured Cells and Paraffin Embdeded Tissue Sections Using Biotin-Labeled Hybridization Probes. Virology 126 (1983) 32-50

14 Brkanac Z, Cody JD, Leach RJ, DuPont B: Identification of Cryptic Rearrangements in Patients with 18q- Deletion Syndrome. Am J Hum Genet 62 (1998) 1500-1506

15 Buckle VJ, Kearney L: Untwirling dirvish. Nat Genet 5 (1993) 4-5

16 Budarf ML, Collins J, Gong W, Roe B, Wang Z, Bailey LC, Sellinger B, Michaud D, Driscoll, Emanuel B: Cloning a balanced translocation associated with DiGeorge syndrome and identification of a disrupted candidate gene. Nat Genet 10 (1995) 269-278

17 Burn J: Closing time for CATCH22. J Med Genet 36 (1999) 737-738

18 Carle G F, Frank M & Olson M V: Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. Science 232 (1986) 65-68

19 Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, Patanjali SR, Weissman SM, Anyane-Yeboa K, Warburton D, Scambler P, Shprintzen R, Kucherlapati R, Morrow BE: Molecular Definition of 22q11 Deletions in 151 Velo-Cardio-Facial Syndrome Patients. Am J Hum Genet 61 (1997) 620- 629

20 Causey T, Abramson RK, Malone T, Best RG: Psychosis and Ataxia in a patient with a novel 46,XX,t(1;22)(p36.3;q11.2) translocation. Am J Hum Genet 69 (suppl.) (2001) P562

21 Cawthon RM, Weiss R, Xu G, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O`Connell P, White R: A Major Segment of the Neurofibromatosis Type 1 Gene: cDNA Sequence, Genomic Structure and Point Mutations. Cell 62 (1990) 193-201

22 Chissoe SL, Bodenteich A, Wang Y-F, Wang Y-P, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L, Ma Y, McLaury H-J, Pan H-Q, Sarhan OH, Toth S, Wang Z, Zhang G, Heisterkamp N, Groffen J, Roe BA: Sequence and Analysis of the Human

ABL Gene, the BCR Gene, and Regions Involved in the Philadelphia Chromosomal Translocation. Genomics 27 (1995) 67-82

23 Cody JD, Hale DE, Brkanac Z, Kaye CI, Leach RJ: Growth Hormone Insufficiency Associated With Haploinsufficiency at 18q23. Am J Med Genet 71 (1997) 420-425

24 Collins FS: Positional cloning: Let`s not call it reverse anymore. Nat Genet1(1992) 3-6

25 Collins FS: Positional cloning moves from perditional to traditional. Nat Genet 9 (1995) 347-350

26 Crosnier C, Attie-Bitach T, Encha-Razavi F, Audollent S, Soudy F, Hadchouel M, Meunier-Rotival M, Vekemans M: Jagged1 Gene Expression During Human Embryogenesis Elucidates the Wide Phenotypic Spectrum of Alagille Syndrome. Hepatology 32 (2000) 574-580

27 Dasouki M, Jurecic V, Phillips III JA, Whitlock JA, Baldini A: DiGeorge Anomaly and Chromosome 10p Deletions: One or Two Loci? Am J Med Genet 73 (1997) 72-75

28 Daw SC, Taylor C, Kraman M, Call K, Mao J, Schuffenhauer S, Meitinger T, Lipson T, Goodship J, Scambler P: A common region of 10p deleted in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. Nat Genet 13 (1996) 458-460

29 De Kok YJM, Vossenaar ER, Cremers CW, Dahl N, Laporte J, Hu LJ, Lacombe D, Fischel-Ghodsian N, Friedmann RA, Parnes LS et al.: Identification of a hot spot for microdeletions in patients with X-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene POU3F4. Hum Mol Genet 5 (1996) 1229-1235

30 de la Chapelle A, Herva R, Koivisto M, Aula P: A Deletion in Chromosome 22 Can Cause DiGeorge Syndrome. Hum Genet 57 (1981) 253-256

31 Dhorne-Pollet S, Deleuze J-F, Hadchouel M, Bonaiti-Pellie C: Segregation analysis of Alagille syndrome. J Med Genet 31 (1994) 453-457

32 Dib C: A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. Nature 380 (1996) 152-154

33 Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM, Stetten G, Meyers DA, Francomano CA: Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. Nature 352 (1991) 337-339

34 Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith DR, Lander ES et al.: A Genetic Linkage Map of the Human Genome. Cell 51 (1987) 319- 337

35 Dörr S.: Physikalische und transkriptionelle Kartierung der mit dem Russell-Silver-Syndrom assoziierten Chromosomenregion 17q23-q24. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen. Göttingen, 1999

36 Driscoll DA, Spinner NB, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldberg RB, Shprintzen RJ, Saal HM, Zonana J, Jones MC, Mascarello JT, Emanuel BS: Deletions and Microdeletions of 22q11.2 in Velo-Cardio-Facial Syndrome. Am J Med Genet 44 (1992) 261- 268

37 Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RSK, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE: A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. Hum Mol Genet 8 (1999a) 1157-1167

38 Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE: Low-Copy Repeats Mediate the Common 3-Mb Deletion in Patients with Velo-cardio-facial Syndrome. Am J Hum Genet 64 (1999b) 1076-1086

39 Edelmann L, Spiteri E, Koren K, Pulijaal V, Bialer MG, Shanske A, Goldberg R, Morrow BE: AT-Rich Palindromes Mediate the Constitutional t(11;22) Translocation. Am J Hum Genet 68 (2001) 1-13

40 Fisher E and Scambler P: Human haploinsufficiency- one for sorrow, two for joy. Nat Genet 7 (1994) 5-7

41 Fountain JW, Wallace MR, Bruce MA, Seizinger BR, Menon AG, Gusella JF, Michels VV, Schmidt MA, Dewald GW, Collins FS: Physical Mapping of a Translocation Breakpoint in Neurofibromatosis. Science 244 (1989) 1085-1087

42 Funke B, Edelmann L, McCain N, Pandita R K, Ferreira J, Merscher S, Zohouri M, Cannizzaro L, Shanske A and Morrow B E: Der(22) Syndrome and Velo-Cardio-Facial Syndrome/ DiGeorge Syndrome Share a 1,5-Mb Region of Overlap on Chromosome 22q11. Am J Hum Genet 64 (1999) 747-758

43 Ghidoni PD, Hale DE, Cody JD, Gay ChT, Thompson NM, McClure EB, Danney MM, Leach RJ, Kaye CI: Growth Hormone Deficiency Associated in the 18q Deletion Syndrome. Am J Med Genet 69 (1997) 7-12

44 Giannakudis J, Röpke A, Kujat A, Krajewska-Walasek M, Hughes H, Fryns J-P, Bankier A, Amor D, Schlicker M, Hansmann I: Parental mosaicism of JAG1 mutations in families with Alagille syndrome. Europ J Hum Genet 9 (2001) 209-216

45 Giles RH, Petrij F, Dauwerse HG, den Hollander AI, Lushnikova T, van Ommen G-JB, Goodman RH, Deaven LL, Doggett NA, Peters DJM, Breuning MH: Construction of a 1.2-Mb Contig Surrounding, and Molecular Analysis of the Human CREB-Binding Protein (CBP/ CREBBP) Gene on Chromosome 16p13.3. Genomics 42 (1997) 96-114

46 Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, Strömbeck B, Cin PD, Höglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N: Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. PNAS 98 (2001) 12683-12688

47 Goodship J, Cross I, LiLing J, Wren C: A population study of chromosome 22q11 deletions in infancy. Arch Dis Child 79 (1998) 348-351

48 Gottlieb S, Driscoll DA, Punnett HH, Sellinger B, Emanuel BS, Budarf ML: Chracterization of 10p deletion suggests two nonoverlapping regions contribute to the DiGeorge syndrome phenotype. Am J Hum Genet 62 (1998) 495-498

49 Greenberg F, Crowder WE, Paschall V, Colon-Linares J, Lubianski B, Ledbetter DH: Familial DiGeorge syndrome and associated partial monosomy of chromosome 22. Hum Genet 65 (1984) 317-319

50 Greenberg F, Elder FF, Haffner P, Northrup H, Ledbetter DH: Cytogenetic findings in a prospective series of patients with DiGeorge anomaly. Am J Hum Genet 43 (1988) 605-611

51 Halford S, Wadey R, Roberts C, Daw SCM, Whiting JA, O`Donnell H, Dunham I, Bentley D, Lindsay E, Baldini A, Francis F, Lehrach H, Williamson R, Wilson DI, Goodship JA, Cross I, Burn J, Scambler PJ: Isolation of a putative transcriptional regulator from the region of 22q11 deleted in DiGeorge syndrome, Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease. Hum Mol Genet 12 (1993) 2099- 2107

52 Halford S, Wilson DI, Daw SCM, Roberts C, Wadey R, Kamath S, Wickremasinghe A, Burn J, Goodship J, Mattei M-G, Moorman AFM, Scamble PJ: Isolation of a gene expressed during early embryogenesis from the region of 22q11 commonly deleted in DiGeorge syndrome. Hum Mol Genet 2 (1993) 1577-1582

53 Heiles HBJ, Genersch E, Kessler C, Neumann R, Eggers HJ: In situ hybridization with digoxygenin-labelled DNA of papilloma viruses (HPV 16/18) in HeLa and SiHa cells. Biotechniques 6 (1988) 978-981

54 Heiskanen M, Peltonen L, Palotie A: Visual mapping by high resolution FISH. TIG 12

(1996) 379-382

55 Hennekam RC, Stevens CA, Van de Kamp JJP: Etiology and Recurrence Risk in Rubinstein-Taybi Syndrome. Am J Med Genet Suppl. 6 (1990) 56-64

56 Hennekam RCM, Tilanus M, Hamel BCJ, Voshart-van Heeren H, Mariman ECM, van Beersum SEC, van den Boogaard M-JH, Breuning MH: Deletion at Chromosome 16p13.3 as a Cause of Rubinstein-Taybi Syndrome: Clinical Aspects. Am J Hum Genet 52 (1993) 255-262

57 Henwood J, Pickard Ch, Leek JP, Bennett ChP, Crow YJ, Thomson JDR, Ahmed M, Watterson KG, Parsons JM, Roberts E, Lench NJ: A region of homozygosity within 22q11.2 associated with congenital heart disease: recessive DiGeorge/velocardiofacial syndrome? J Med Genet 38 (2001) 533-536

58 Imaizumi K and Kuroki Y: Rubinstein-Taybi syndrome with de novo reciprocal translocation t (2;16) (p13.3; p13.3). Am J Med Genet 38 (1991) 636-639

59 International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409 (2001) 860-921

60 Jeffreys AJ: Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. Biochem Soc Trans 15 (1987) 309-317

61 John HA, Birnstiel ML, Jones : RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature 223 (1969) 582-7

62 Kehrer-Sawatzki H, Häussler J, Krone W, Bode H, Jenne DE, Mehnert KU, Tümmers U, Assum G: The second case of a t(17;22) in a family with neurofibromatosis type 1: sequence analysis of the breakpoint regions. Hum Genet 99 (1997) 237-247

63 Kelley RI, Zackai EH, Emanuel BS, Kistenmacher M, Greenberg F, Punnett HH: The association of the DiGeorge anomalad with partial monosomy of chromosome 22. J Ped 101 (1982) 197-200

64 Kerstjens-Frederikse W, Kurahashi H, Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS, Beatty B, Scheidl T, Siegel-Bartelt J, Henderson K, Cytrynbaum C, Nie G, Teshima I: Microdeletion 22q11.2: clinical data and deletion size. J Med Genet 36 (1999) 721-723

65 Kingsley K., Wirth J., van der Maarel S., Freier S., Ropers H.-H. and Haaf T.: Complex FISH probes for the subtelomeric regions of all human chromosomes: comparative hybridization of CEPH YACs to chromosomes of the Old World monkey Presbytis cristata and great apes. Cytogenet Cell Genet 78 (1997)12-19

66 Kleinjan D-J und van Heyningen V: Position effect in human genetic disease. Hum Mol Genet 7 (1998) 1611-1618

67 Kline AD, White ME, Wapner R, Rojas K, Biesecker LG, Kamholz H, Zackai EH, Muenke M, Scott ChI, Overhauser J: Molecular Analysis of the 18q-Syndrome and Correlation with Phenotype. Am J Hum Genet 52 (1993) 895-906

68 Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB: Alagille syndrome. J Med Genet 34 (1997a)152-157

69 Krantz ID, Rand EB, Genin A, Hunt P, Jones M, Louis AA, Graham JM, Bhatt S, Piccoli DA, Spinner NB: Deletions of 20p12 in Alagille Syndrome: Frequency and Molecular Characterization. Am J Med Genet 70 (1997b) 80-86

70 Krantz ID, Colliton RP, Genin A, Rand EB, Li L, Piccoli DA, Spinner NB: Spectrum and Frequency of Jagged1 (JAG1) Mutations in Alagille Syndrome Patients and Their Families. Am J Hum Genet 62 (1998) 1361-1369

71 Kurahashi H, Tsuda E, Kohama R, Nakayama T, Masuno M, Imaizumi K, Kamiya T, Sano T, Okada S, Nishisho I: Another criticl region for deletion of 22q11: a study of 100 patients. Am J Med Genet 72 (1997) 180-185

72 Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P, Roe BA, Emanuel BS, Budarf ML: Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). Hum Mol Genet 9 (2000) 1665-1670

73 Kurahashi H and Emanuel B: Long AT-rich palindromes and the constitutional t(11;22) breakpoint. Hum Mol Genet 10 (2001) 2605-2617

74 Lacombe D, Saura R, Taine L, Battin J: Confirmation Of Assignment Of A Locus For Rubinstein-Taybi Syndrome Gene To 16p13.3. Am J Med Genet 44 (1992) 126-128

75 Langer PR, Waldrop AA, Ward DC: Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. Proc Natl Acad Sci USA 78 (1981) 6633-6637

76 Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont MEM, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB: Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. Nat Genet 16 (1997) 243-251

77 Li MM, Jackson K, Pridjian G: A familial t(6;22) translocation resulting in both Duane syndrome and Velo-Cardio-Facial syndrome in sibblings. Am J Hum Genet 69 (suppl.) (2001) P688

78 Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward D C: Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Hum Genet 80 (1988) 224-234

79 Lichter P, Ledbetter S A, Ledbetter D H, Ward D C: Fluorescence in situ hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 87 (1990) 6634-6638

80 Lichtner P, König R, Hasegawa T, Van Esch H, Meitinger T, Schuffenhauer S: An HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the DiGeorge syndrome region on 10p13/14. J Med Genet 37 (2000) 33-37

81 Ligon AL, Beaudet AL, Shaffer LG: Simultaneous, Multilocus FISH Analysis for Detection of Microdeletions in the Diagnostic Evaluation of Developmental Delay and Mental Retardation. Am J Hum Genet 61 (1997) 51-59

82 Lupski JR, Langston C, Friedman R, Ledbetter DH, Greenberg F: DiGeorge anomaly associated with a de novo Y;22 translocation resulting in monosomy de(22)(q11.2). Am J Med Genet 40 (1991) 196-198

83 Lurie IW, Lazjuk GI, Ussova YI, Presman EB, Gurevich DB: The Wolf-Hirschhorn syndrome. I. Genetics. Clin Genet 17 (1980) 375- 384

84 Magenis RE, Donlon TA, Tomar DR: Localization of the ß-globin gene to 11p15 by in situ hybridization : Utilization of chromosome 11 rearrangements. Hum Genet 69 (1985) 300-303

85 Marx J: New Methods for Expanding the Chromosomal Paint Kit. Science 273 (1996) 430

86 Masuno M, Imaizumi K, Kurosawa K, Makita Y, Petrij F, Dauwerse HG, Breuning M, Kuroki Y: Submicroscopic Deletion of Chromosome Region 16p13.3 in a Japanese Patient With Rubinstein- Taybi Syndrome. Am J Med Genet 53 (1994) 352-354

87 McTaggart KE, Budarf ML, Driscoll DA, Emanuel BS, Ferreira P, McDermid HE: Cat eye syndrome chromosome breakpoint clustering: identification of associated with 22q11 deletion syndrome breakpoints. Cytogenetic and Genome Research 81 (1998) 222-228

88 Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BSt, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultchi AI, Morrow BE, Kucherlapati R: TBX1 is Responsible for Cardiovascular Defects in Velo-Cardio-

Facial/ DiGeorge Syndrome. Cell 104 (2001) 619-629

89 Mignon-Ravix C, Depetris D, Delobel B, Croquette M-F, Mattei M-G: A human interstitial telomere associates in vivo with specific TRF2 and TIN2 proteins. Europ J Hum Genet 10 (2002) 107-112

90 Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM: Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature 323 (1986) 646-650

91 Monaco G, Pignata C, Rossi E, Mascellaro O, Cocozza S, Ciccimarra F: DiGeorge Anomaly Associated With 10p Deletion. Am J Med Genet 39 (1991) 215-216

92 Mondello C, Pirzio L, Azzalin CM, Giulotto E: Instability of Interstitial Telomeric Sequences in the Human Genome. Genomics 68 (2000) 111-117

93 Morton CC, Kirsch IR, Taub R, Orkin SH, Brown JA: Localization of the beta-Globin-Gene by Chromosomal in Situ Hybridization. Am J Hum Genet 36 (1984) 576-585

94 Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC: Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. Nat Genet 16 (1997) 235-242

95 Pai GS, Thomas GH, Mahoney W, Migeon BR : Complex chromosome rearrangements. Clin Genet 18 (1980) 436-444

96 Pardue ML, Gall JG: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc Natl Acad Sci USA 64 (1969) 600-604

97 Park VM, Gustashaw KM, Wathen TM: The Presence of Interstitial Telomeric Sequences in Constitutional Chromosome Abnormalities. Am J Hum Genet 50 (1992) 914-923

98 Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RCM, Masuno M, Tommerup N, van Ommen G-JB, Goodman RH, Peters DJM, Breuning MH: Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. Nature 376 (1995) 349- 351

99 Petrij F, Dauwerse HG, Blough RI, Giles RH, van der Smagt JJ, Wallerstein R, Maaswinkel-Mooy PD, van Karnebeek CD, van Ommen G-JB, van Haeringen A, Rubinstein JH, Saal HM, Hennekam RCM, Peters DJM, Breuning MH: Diagnostic analysis of the Rubinstein-Taybi syndrome: five cosmids should be used for microdeletion detection and low number of protein truncating mutations. J Med Genet 37 (2000) 168-176

100 Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 83 (1986) 2934-2938

101 Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J: Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4. Proc Natl Acad Sci USA 85 (1988) 9138-9142

102 Pollet N, Dhorne-Pollet S, Deleuze JF, Boccaccio C, Driancourt C, Raynaud N, Le Paslier D, Hadchouel M, Meunier-Rotival M.: Construction of a 3.7-Mb Physical Map within Human Chromosome 20p12 Ordering 18 Markers in the Alagille Syndrome Locus. Genomics 27 (1995) 467- 474

103 Pollet N, Boccaccio C, Dhorne-Pollet S, Driancourt C, Raynaud N, Auffray C, Hadchouel M, Meunier-Rotival M: Construction of an Integrated Physical and Gene Map of Human Chromosome 20p12 Providing Candidate Genes for Alagille Syndrome. Genomics 42 (1997) 489-498

104 Raas-Rothschild A, Shteyer E, Lerer I, Nir A, Granot E, Rein AJJT: Jagged1 Gene Mutation for Abdominal Coarctation of the Aorta in Alagille Syndrome. Am J Med Genet 112 (2002) 75-78

105 Rand EB, Spinner NB, Piccoli DA, Whitington PF, Taub R: Molecular Analysis of 24 Alagille Syndrome Families Identifies a Single Submicroscopic Deletion and Further Localizes the Alagille Region within 20p12. Am J Hum Genet 57 (1995) 1068-1073

106 Rigby P W J, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P: Labeling desoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J Mol Biol 113 (1976) 237-256

107 Riordan JR , Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C: Identificatian of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. Science 245 (1989) 1066-1073

108 Risch N, Merikangas K: The Future of Genetic Studies of Complex Human Diseases. Science 273 (1996) 1516-1517

109 Rittinger O, Kronberger G, Bergendi E, Plöchl E: Familial reciprocal translocation t(3;20)(p25;p13: the puzzling problem of developmental delay in apparently balanced individuals. Klinische Genetik, Kinderspital, Landeskrankenanstalten Salzburg, 1997.

110 Robson KJ, Chandra T, MacGillivray RT, Woo SL: Polysome immunoprecipitation of phenylalanine hydroxylase mRNA from rat liver and cloning of its cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 79 (1982) 4701-4705

111 Röpke A, Kujat A, Graeber M, Hansmann I, Giannakudis I: Mutation spectrum within in the human JAG1 gene in Alagille syndrome. Am J Hum Genet 67 (suppl. 2) (2000) 379

112 Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS: Identificatian of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. Science 245 (1989) 1059-1064

113 Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH: Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease- on the basis of its chromosomal location. Nature 322 (1986) 32-38

114 Rubinstein JH, Taybi H: Broad Thumbs and Toes and Facial Abnormalities. A Possible Mental Retardation Syndrome. Am J Dis Child 105 (1963) 588-608

115 Rubinstein JH: Broad Thumb-Hallux (Rubinstein-Taybi) Syndrome 1957-1988. Am J Med Genet Suppl 6 (1990) 3-16

116 Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M et al.: Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. J Med Genet 34 (1997) 798-804

117 Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239 (1988) 487-491

118 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T: Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989

119 Scambler PJ, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Shprintzen R, Wilson DI, Goodship JA, Cross IE, Burn J: Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. Lancet 339 (1992) 1138-1139

120 Schmickel RD: Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. J Pediatr 109 (1986) 231-241

121 Schnittger S, Höfers C, Heidemann P, Beermann F, Hansmann I: Molecular and

cytogenetic analysis of an intersitial 20p deletion associated with syndromic intrahepatic ductular hypoplasia (Alagille syndrome). Hum Genet 83 (1989) 239-244

122 Schnittger S, Rao VVNG, Deutsch U, Gruss P, Balling R, Hansmann I: PAX1, a Member of the paired Box-containing Class of Developmental Control Genes, Is Mapped to Human Chromosome 20p11.2 by in Situ Hybridization (ISH and FISH). Genomics 14 (1992) 740-744

123 Schnittger S: Cystatin C (CST3), the Candidate Gene for Hereditary Cystatin C Amyloid Angiopathy (HCCAA), and Other Members of the Cystatin Gene Family are Clustered on Chromosome 20p11.2. Genomics 16 (1993) 50-55

124 Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T: Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. Science 273 (1996) 494-497

125 Schröter A.: Suche nach molekularen Deletionen in Chromosom 20p11.23-p12 bei Probanden mit Alagille-Syndrom mittels der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Medizinische Dissertation, Göttingen, 1997

126 Schuffenhauer S, Seidel H, Oechsler H, Belohradsky B, Bernsau U, Murken J, Meitinger T: DiGeorge syndrome and partial monosomy 10p: case report and review. Ann Genet 38 (1995) 162- 167

127 Schuffenhauer S, Lichtner P, Peykar-Derakhshandeh P, Murken J, Haas OA, Back E, Wolff G, Zabel B, Barisic I, Rauch A, Borochowitz Z, Dallapiccola B, Ross M, Meitinger T: Deletion mapping on chromosome 10p and definition of a critical region for the second DiGeorge syndrome locus (DGS2). Europ J Hum Genet 6 (1998) 213-225

128 Seyffert W: Lehrbuch der Genetik. Gustav Fischer Verlag, 1998

129 Shaffer LG: Diagnosis of Microdeletion Syndromes by Fluorescence in situ Hybridization (FISH). Current Protocolls in Human Genetics (1997) 8.10.1- 8.10.14

130 Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O`Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald- McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS: Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. Human Mol Genet 9 (2000) 489-501

131 Speicher MR, Ballard SG, Ward DC: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet 12 (1996) 368-75

132 Spiteri E, Babcock M, Kashork CD, Wakui K, Gogineni S, Lewis DA, Williams KM, Minoshima S, SasakiT, Shimizu N, Potocki L, Pulijaal V, Shanske A, Shaffer LG, Morrow BE: Frequent translocations occur between low copy repeats on chromosome 22q11.2 (LCR22s) and telomeric bands of partner chromosomes. Hum Mol Genet 12 (2003) 1823-1837

133 Stankiewicz P, Kostyk E, Bocian E, Stanczak H, Parczewska J, Piatkowska E, Mazurczak T, Pietrzyk JJ: Familial four breakpoint complex chromosomal rearrangement as a cause of monosomy 9p22—pter and trisomy 10p11.2—pter and 11q21 analysed by dual and triple colour FISH. J Med Genet 34 (1997) 696-699

134 Stankiewicz P, Rujner J, Löffler C, Krüger A, Nimmakayalu M, Pilacik B, Krajewska-Walasek M, Gutkowska A, Hansmann I, Giannakudis I: Alagille Syndrome Associated With a Paracentric Inversion 20p12.2p13 Disrupting the JAG1 Gene. Am J Med Genet 103 (2001a) 166-171

135 Stankiewicz P, Brozek I, Helias-Rodzewicz Z, Wierzba J, Pilch J, Bocian E, Balcerska A, Wozniak A, Kardas I, Wirth J, Mazurczak T, Limon J: Clinical and Molecular-Cytognetic Studies in Seven Patients With Ring Chromosome 18. Am J Med Genet 101 (2001b) 226- 239

136 Strachan T, Read AP: Molekulare Humangenetik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996

137 Strathdee G, Harrison W, Riethman HC, Goodart SA, Overhauser J: Interstitial Deletions Are Not the Main Mechanism Leading to 18q Deletions. Am J Hum Genet 54 (1994) 1085-1091

138 Strathdee G, Zackai EH, Shapiro R, Kamholz J, Overhauser J: Analysis of Clinical Variation Seen in Patients With 18q Terminal Deletions. Am J Med Genet 59 (1995) 476-483

139 Strathdee G, Sutherland R, Jonsson JJ, Sataloff R, Kohonen-Corish M, Grady D, Overhauser J: Molecular Characterization of Patients with 18q23 Deletions. Am J Hum Genet 60 (1997) 860-868

140 Taine L, Goizet C, Wen ZQ, Petrij F, Breuning MH, Ayme S, Saura R, Arveiler B, Lacombe D: Submicroscopic deletion of chromosome 16p13.3 in patients with Rubinstein-Taybi syndrome. Am J Med Genet 78 (1998) 267-270

141 Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RPM, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J: New strategy for multi-colour fluorescence in situ

hybridisation: COBRA: COmbined Binary RAtio labelling. Europ J Hum Gent 7 (1999) 2-11

142 Tommerup N, van der Hagen CB, Heiberg A: Tentative Assignment of a Locus for Rubinstein-Taybi Syndrome to 16p13.3 by a de Novo Reciprocal T ranslocation, t(7;16) (q34;p13.3). Am J Med Genet 44 (1992) 237- 241

143 Trask B, Pinkel D, van den Engh G: The proximity of DNA sequences in interphase cell nuclei is correlated to genomic distance and permits ordering of cosmids spanning 250 kilobase pairs. Genomics 5 (1989) 710-717

144 Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth Ch, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Müller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR: Multiplex-FISH for Pre- and Postnatal Diagnostic Applications. Am J Hum Genet 65 (1999) 448-462

145 Valentijn LJ, Bolhuis PA, Zorn I, Hoogendijk JE, Van den Bosch N, Hensels GW, Stanton VPJR, Housman DE, Fischbeck KH, Meershoek EJ, Dauwerse JG, Van Ommen GJB, Baas F: The growth arrest-specific gene GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1a. Nat Genet 1 (1992) 166-170

146 Van Esch H, Groenen P, Daw S, Poffyn A, Holvoet M, Scambler P, Fryns JP, Van de Ven W, Devriendt K: Partial DiGeorge syndrome in two patients with a 10p rearrangement. Clin Genet 55 (1999a) 269-276

147 Van Esch H, Groenen P, Fryns JP, Van de Ven W, Devriendt K: The phenotypic spectrum of the 10p deletion syndrome versus the classical DiGeorge syndrome. Genet Couns 10 (1999b) 59-65

148 Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vanderlinden G, Harding B, Beetz R, Bilous RW, Holdaway I, Shaw NJ, Fryns J-P, Van de Ven W, Thakker RV, Devriendt K: GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. Nature 406 (2000) 419- 422

149 Van Ommen GJB, Breuning MH, Raap AK: Metaphase, Interphase and DNA Fiber FISH in Genome Research and Molecular Diagnostics. GJB van Ommen (1995), Sestri 95, FISH:1-6

150 Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA et al.: The sequence of the human genome. Science 291 (2001) 1304- 1351

151 Von der Kammer S: Klonierung und physikalische Kartierung der für das Alagille-Syndrom relevanten Chromosomenregion 20p11.23-p12 mit Hilfe von künstlichen Hefechromosomen. Biologische Dissertation. Göttingen, 1995

152 Wadey R, Daw S, Taylor C, Atif U, Kamath S, Halford S, O`Donnell H, Wilson D, Goodship J, Burn J, Scambler P: Isolation of a gene encoding an integral membrane protein from the vicinity of a balanced translocation breakpoint associated with DiGeorge syndrome. Hum Mol Genet 4 (1995) 1027- 1033

153 Wallerstein R, Anderson CE, Hay B, Gupta P, Gibas L, Ansari K, Cowchock FS, Weinblatt V, Reid C, Levitas A, Jackson L: Submicroscopic deletions at 16p13.3 in Rubinstein-Taybi syndrome: frequency and clinical manifestations in a North American population. J Med Genet 34 (1997) 203-206

154 Wilson MG, Towner JW, Forsman I, Siris E: Syndromes associated with deletion of the long arm of chromosome 18[del(18q)]. Am J Med Genet 3 (1979) 155-174

155 Witkowski R, Prokop O, Ullrich E: Lexikon der Syndrome und Fehlbildungen. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1999

156 Woo SLC, Lidsky AS, Güttler F, Chandra T, Robson KJH: Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. Nature 306 (1983) 151- 155

157 Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai W-W, White LD, Liu W, Beaudet AL. Bejjani BA, Shaw CA, Shaffer LG: Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. Hum Mol Genet 12 (2003) 2145-2152

158 Yuan ZR, Kohsaka T, Ikegaya T, Suzuki T, Okano S, Abe J, Kobayashi N, Yamada M: Mutational analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families. Hum Mol Genet 7 (1998) 1363-1369

8 Thesen

1. Durch die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) können das Ausmaß und die Lokalisierung von zytogenetisch bekannten chromosomalen Aberrationen näher charakterisiert werden.
2. Die Methode der FISH trägt zum Aufdecken chromosomaler Veränderungen bei, die durch die zytogenetische Diagnostik nicht nachgewiesen werden können.
3. Die FISH stellt damit eine sinnvolle Ergänzung zur Routinediagnostik dar. Aus ihrem Einsatz ergeben sich Erkenntnisse, die neue Überlegungen in Bezug zur Phänotyp-Genotyp-Beziehung bei chromosomalen Veränderungen ermöglichen.
4. Die Translokationsbruchpunkte von 2 Probanden wurden mindestens 8 cM bzw. 14 cM distal zu der für das Alagille Syndrom kritischen Region (AGSCR) auf Chromosom 20 lokalisiert. Ein größerer Bruchstückverlust innerhalb der AGSCR wurde ausgeschlossen.
5. Durch die Translokation t(5;22)(q35.3;q11.2) ist es bei einem Probanden mit Dysmorphien zu einem Verlust der DiGeorge Syndrom Chromosomen Region (DGCR) auf dem Translokationschromosom der(5) gekommen. Auf der(5) wurden interstitielle Telomersequenzen aufgedeckt, die mit großer Wahrscheinlichkeit das Telomer von 5q markieren.
6. Die Deletion del(10)(p13) hat bei einem Probanden mit dem klinischen Bild eines DiGeorge Syndroms zu einem Verlust der HDR-Region (*Hypoparathyroidism, Deafness, Renal dysplasia*) geführt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Abschnitte der *DiGeorge critical region II* (DGCRII) von der Deletion betroffen sind.
7. Der Bruchpunkt einer Probandin mit der Deletion del(18)(q23) befindet sich proximal der *smallest region of deletion overlap* (SRO) für die Wachstumshormon-Insuffizienz bei 18q-Deletionssyndrom.
8. Bei keinem der 17 Probanden mit einem lichtmikroskopisch unauffälligen Karyotyp und dem klinischen Verdacht auf ein Mikrodeletionssyndrom wurde eine Mikrodeletion aufgedeckt.

Lebenslauf

Name:	Antje Hanni Hilde Hölsken
Geburtsname:	Krüger
Geburtsdatum:	12. Dezember 1971
Geburtsort:	Halle/Saale
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	verheiratet, eine Tochter (geb. am 26.01.02), ein Sohn (geb. am 25.09.03)

Ausbildung:

1978-1980	Polytechnische Oberschule „Bruno-Kühn“ in Leipzig
1980-1988	Karl-Liebknecht-Oberschule in Delitzsch
1988-1990	Erweiterte-Ehrenberg-Oberschule in Delitzsch
1990-1993	Ausbildung zur Krankenschwester an der Medizinischen Fachschule der Martin-Luther-Universität-Halle-Wittenberg
1993-2000	Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Ärztliche Vorprüfung: 9/95 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 8/96 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 3/99 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 6/2000 seit 1997 Doktorarbeit am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praktisches Jahr:

4/99-7/99	Innere Medizin im Städtischen Krankenhaus Martha-Maria in Halle-Dölau
8/99-11/99	Chirurgie im Städtischen Krankenhaus Martha-Maria in Halle-Dölau
12/99-3/00	Orthopädie im Städtischen Krankenhaus Martha-Maria in Halle-Dölau

Ärztin im Praktikum:

01.07.00- 31.12.01	Krankenhaus Bethanien Leipzig, Fachbereich Gynäkologie und Geburtshilfe

seit 1/2002	Erziehungszeit

Halle, den

Erklärung

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.

Halle, den

Antje Hölsken

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

Halle, den

Antje Hölsken

Publikation von Ergebnissen dieser Arbeit

Krüger A, Reichl R, Stankiewicz P, Hansmann I: Learning difficulties, minor dysmorphic features and interstitial sequencies in a boy with 45,XY and a 5;22 translocation. Am J Hum Genet 69 (2001) 321

Danksagung

Vor allem möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. I. Hansmann danken für die Auswahl des Themas, für die kontinuierliche und zeitaufwendige Betreuung dieser Arbeit und die verständnisvolle Unterstützung während des gesamten Zeitraums.

Zu Dank verpflichtet bin ich vielen, auch ehemaligen, Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Stankiewicz und Frau Dr. S. Dörr für die Betreuung des praktischen Teils dieser Arbeit.

Ich danke auch Frau Dr. Thiele für die fachliche Beratung, Frau Grasemann für die zuverlässige Bereitstellung der notwendigen Unterlagen, Frau Enders und Frau Weissflog für die Hilfe in zytogenetischen Fragen. Ein großes Dankeschön an Frau Strahl, nicht nur für die Unterstützung in organisatorischen Angelegenheiten.