

Aus dem Institut für Humangenetik und medizinische Biologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ingo Hansmann



**Molekularzytogenetische Charakterisierung einer interstitiellen Deletion 4q
bei einem Patienten mit Verdacht auf Rieger-Syndrom.**

Dissertation

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

vorgelegt

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

von Stephan Muck

geboren am 30. Juni 1979 in Berlin-Wilmersdorf

Gutachter:

Prof. Dr. I. Hansmann

Prof. Dr. W. Schrempp, Freiburg

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 24.07.2007

Datum der Verteidigung: 19.02.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013174

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013174>]

Für meinen Vater

Referat und bibliographische Beschreibung

Zielsetzung: Bei einem Patienten mit einer syndromalen Entwicklungsstörung wurde eine zytogenetisch nachgewiesene Deletion von Chromosom 4q25-q28 mittels molekularzytogenetischer Methoden charakterisiert. Damit sollte auch geprüft werden, ob Symptome des Patienten auf die Deletion des das Rieger Syndrom verursachenden Gens PITX2 in 4q25 zurückzuführen sind. Des Weiteren sollte ein Genotyp-Phänotyp-Vergleich mit Patienten aus der Literatur und ähnlichen 4q-Deletionen vorgenommen werden. In diesem Zusammenhang sollte versucht werden, einzelnen Chromosomenabschnitten dieser Region phänotypische Auffälligkeiten zuzuordnen, um darüber Kandidatengene für diese Merkmale zu identifizieren.

Methoden: Die Deletionsanalyse des PITX2-tragenden Chromosomenabschnitts sowie die Kartierung beider Bruchpunkte erfolgte durch Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) von insgesamt 19 BAC-Klonen an Metaphasechromosomen des Patienten. Des Weiteren erfolgte der Versuch einer molekularen Eingrenzung des proximalen Bruchpunktes in 4q25 mittels Mikrosatellitenanalyse.

Ergebnisse: Eine Deletion des PITX2-tragenden Chromosomenabschnittes konnte mittels FISH des BAC-Klons RP11-380D23 ausgeschlossen werden. Der proximale Deletionsbruchpunkt wurde zwischen den BAC-Klonen RP11-265M21 und RP11-326N15 kartiert. Damit befindet sich dieser Bruchpunkt nach *in-silico* Analyse genomischer Datenbanken nur ca. 550 kb telomerisch vom 5'-Ende des Gens PITX2. Eine zusätzliche Eingrenzung mittels Mikrosatellitenanalyse war nicht aussagekräftig, da eine nicht informative Allelverteilung bei dem Patienten und dessen Eltern vorlag. Der distale Bruchpunkt konnte zwischen den BAC-Klonen RP11-435P6 und RP11-1062K20 eingegrenzt werden. Beide Bruchpunkte konnten mittels FISH auf einen Bereich von ca. 250 kb eingegrenzt werden. Die Deletion erstreckt sich über die Chromosomenbanden 4q25-q31.1 und hat eine ungefähre Größe von 28 Mb.

Schlussfolgerung: Der Phänotyp des Patienten basiert nicht auf einer Deletion des Gens PITX2. Phänotypische Überschneidungen mit dem Rieger-Syndrom lassen sich jedoch eventuell durch so genannte Positionseffekte erklären, da der proximale Bruchpunkt nur etwa 550 kb telomerisch des Gens lokalisiert ist. Eine deletionsbedingte Beeinflussung der Genexpression erscheint daher möglich. Die Deletion misst ca. 28 Mb, erstreckt sich über die Banden 4q25-q31.1 und ist somit erheblich größer als zunächst aufgrund der zytogenetischen Analyse angenommen wurde. Deletionen der Banden 4q25-q31.1 gehen gehäuft mit Fehlbildungen der Hände und Füße, mentaler Retardierung und Kleinwuchs einher. Des Weiteren scheinen Deletionen der Banden 4q25-q27 gehäuft mit Herzfehlbildungen einher zu gehen. Eine Aussage über denkbare Kandidatengene in dieser Region ist anhand der bisherigen Datenlage nicht möglich.

Muck, Stephan: Molekularzytogenetische Charakterisierung einer interstitiellen Deletion 4q bei einem Patienten mit Verdacht auf Rieger-Syndrom. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2007

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Strategien zur Isolierung von Krankheitsgenen.....	2
1.2.	Contiguous gene syndromes.....	4
1.3.	Das Rieger Syndrom.....	5
1.4.	Ziel der Arbeit.....	6
2.	Material	7
2.1.	Chemikalien.....	7
2.2.	Gebrauchswaren.....	8
2.3.	Geräte.....	8
2.4.	Sterilisation/Autoklavieren von Gefäßen und Lösungen.....	9
2.5.	Gebrauchslösungen.....	9
2.6.	Enzyme.....	14
2.7.	Mikrosatelliten (Primer).....	14
2.8.	BAC-Klone.....	15
3.	Methoden	16
3.1.	Herstellung von Chromosomenpräparaten aus Lymphozyten.....	16
3.1.1.	Lymphozytenkultur.....	16
3.1.2.	Kulturabbruch und Chromosomenpräparation.....	16
3.2.	Isolierung von DNA aus Bakterien.....	17
3.2.1.	Anlage einer Bakterienkultur.....	17
3.2.2.	Anlage einer Stammkonserve (Stock).....	17
3.2.3.	Isolierung der BAC-DNA.....	18
3.2.4.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	18
3.3.	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH).....	19
3.3.1.	Markierung der DNA-Sonden mittels Nicktranslation.....	20
3.3.2.	Suppression unspezifischer Hybridisierungen.....	20
3.3.3.	Kontrolle des Einbaus von Biotin-16-dUTP mittels Dot-Blot.....	21
3.3.4.	Hybridisierungsansatz.....	21
3.3.5.	Preannealing.....	22
3.3.6.	Vorbehandlung der Objektträger.....	22

3.3.7.	Hybridisierung.....	23
3.3.8.	Waschen nach der Hybridisierung.....	23
3.3.9.	Detektion und Amplifikation der Biotin-markierten Sonden.....	24
3.3.10.	Färbung der Chromosomen mit Propidiumiodid und DAPI.....	25
3.3.11.	Auswertung der Objektträger am Fluoreszenzmikroskop.....	25
3.4.	DNA-Präparation aus Blut.....	25
3.5.	Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....	26
3.6.	Mikrosatellitenanalyse.....	27
4.	Ergebnisse	28
4.1	Der Proband.....	28
4.2	Ausschluss einer Deletion des Gens PITX2.....	30
4.3.	FISH-Untersuchungen zur Identifizierung der Deletionsbruchpunkte.....	32
4.3.1.	Lokalisierung des proximalen Bruchpunktes.....	32
4.3.2.	Darstellung der proximalen Bruchpunktregion.....	38
4.3.3.	Lokalisierung des distalen Bruchpunktes.....	40
4.3.4.	Darstellung der distalen Bruchpunktregion.....	47
4.4.	Mikrosatellitenanalyse.....	49
5.	Diskussion	51
5.1.	Das Rieger-Syndrom.....	52
5.2.	Der mit einer Deletion 4q25-q31.1 assoziierte Phänotyp.....	56
5.3	Kandidatengene.....	63
5.4	Ausblick.....	66
6.	Zusammenfassung	67
7.	Literaturverzeichnis	69
8.	Thesen	80

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BAAD	biotinyliertes Anti-Avidin D
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat-p-Toluidinsalz
bp	Basenpaare
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
dTTP	2`-Desoxy-thymidin-5`-triphosphat
dUTP	2`-Desoxy-uridin-5`-triphosphat
et al.	et altera
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GTG	<i>G-bands by trypsin using Giemsa</i>
h	Stunde
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molarität
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar (mmol/l)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
PAC	<i>P1-derived artificial chromosome</i>
p-Arm	kurzer Arm eines Chromosoms
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
q-Arm	langer Arm eines Chromosoms
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RZPD	<i>Resource Center/ Primary Database</i>
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
STS	<i>sequence tagged site</i>
u.a.	unter anderem
U	Unit (Enzymaktivität)
V	Volt
Vol.	Volumen
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Das Wissen und Verständnis für genetische und epigenetische Prozesse hat seit den 1990er Jahren rasant zugenommen. Grundlage dieses Wissenszuwachses bildeten die Bemühungen um die Sequenzierung des humanen Genoms, die zum einen gewaltige Datenmengen sowohl über die Strukturen des gesamten Genoms, als auch über die Funktionen einzelner Gene lieferte und zum anderen mit der Einführung einer Reihe neuer Methoden einherging (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

Das *Human Genome Project (HGP)* wurde 1990 unter der Leitung des *National Institute of Health (NIH)* und des *U.S. Department of Energy* initialisiert, nachdem bereits Mitte der 80er Jahre erste Vorschläge über die Möglichkeit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms geäußert wurden (Sinsheimer, 1989; Collins, 2003). Das HGP nutzte die Methode der *clone by clone* Sequenzierung (Green, 1997), bei der das Genom zunächst in so genannte *Bacterial Artificial Chromosomes (BAC)* kloniert wurde. Diese konnten anschließend kartiert und individuell sequenziert werden. Daraufhin wurden die einzelnen Sequenzbruchstücke wieder zu einer Gesamtsequenz zusammengefügt. Dieses, durch öffentliche Gelder geförderte Projekt, bekam durch die privatwirtschaftlichen Bemühungen der Firma *Celera Genomics*, die die gewonnenen Daten kommerziell nutzen wollte, erhebliche Konkurrenz. Im Gegensatz zum HGP favorisierte *Celera Genomics* die bis dahin ausschließlich an prokaryotischen Genomen getestete Methode des so genannten *whole genome shotgun approach*. Dabei wird die genomische DNA in Segmente unterschiedlicher Größe fragmentiert, in Vektoren kloniert, sequenziert und mit Hilfe verschiedener Computerprogramme zusammengefügt, ohne vorher ein so genanntes Kloncontig durch Anordnung überlappender Klone zu erstellen (Venter *et al.*, 1998). Bei den Bemühungen ihre jeweiligen Ziele zu erreichen, verschmolzen die idealisierten Strategien der konkurrierenden Gruppen jedoch mit der Zeit zu Hybriden, in denen sowohl das HGP als auch *Celera Genomics* durch die Methoden und Informationen des jeweils anderen profitierten (Peltonen *et al.*, 2001)

Seit der Initialisierung des HGP und der im Jahre 2004 veröffentlichten, nahezu vollständigen Genomsequenz (Venter *et al.*, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001/2004) wird zunehmend deutlich, dass die Anzahl der Gene im menschlichen Genom weit niedriger ist, als dies zuvor angenommen wurde (Liang *et al.*, 2000; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001/2004). Durch diese Erkenntnis rücken epigenetische Phänomene, posttranslationale Proteinprozessierung (*Proteomics*) sowie Umwelteinflüsse zunehmend ins Blickfeld der Wissenschaft und haben zu einer erheblichen Erweiterung des

Begriffes der genomischen Erkrankungen (*genomic disorders*) geführt. Während zuvor der Fokus meist auf Veränderungen der Sequenz einzelner Gene gerichtet war, werden die Krankheitsursachen mittlerweile vielmehr als Veränderungen der gesamten Genomarchitektur interpretiert. In diesem Zusammenhang wird zunehmend die Bedeutung von Rekombinationsprozessen deutlich, die zu Deletionen, Duplikationen, Translokationen oder Inversionen unterschiedlich großer Chromosomensegmente führen können und mit Verlust von Genmaterial, Brüchen innerhalb von Genen oder Strukturveränderungen in Kontrollelementen einhergehen (Lupski, 1998/2003; Inoue *et al.*, 2002).

Trotz der Kenntnis von nahezu der gesamten Genomsequenz gestaltet sich die Identifizierung aller menschlichen Gene mit Hilfe automatisierter und manueller Verfahren (*cDNA*, *EST*, *cross-species-homology*) weiterhin schwierig. Zum einen können die Ergebnisse durch Pseudogene verfälscht werden, und zum anderen viele, insbesondere sehr kleine Gene, der Detektion mit den bisherigen Methoden entgehen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Doch selbst bei Kenntnis aller einzelnen Gene müssten deren zelluläre und organische Funktion erst noch aufgeklärt werden. Für die Klinik ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, einen Bezug zwischen dem phänotypischen Erscheinungsbild eines Patienten und einem möglicherweise verantwortlichen Gen zu erstellen.

1.1. Strategien zur Isolierung von Krankheitsgenen

Bisher erfolgte die Identifizierung und Zuordnung von Genen, die im mutierten Zustand eine genetische Erkrankung bedingen können, durch zwei unterschiedliche Herangehensweisen - der funktionellen und der positionellen Klonierung (Collins, 1992; Ballabio, 1993). Bei der funktionellen Klonierung (*functional cloning*) bildet das Wissen über den zugrunde liegenden biochemischen Defekt und die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins den Ausgangspunkt für die Identifizierung des verantwortlichen Gens. Durch diese Methode gelang bereits Mitte der achtziger Jahre die Beschreibung des Gens für die Phenylalanin-Hydroxylase, die ursächlich an der Entstehung der Phenylketonurie beteiligt ist (Kwok *et al.*, 1985), sowie die Klonierung des Faktor IX-Gens, dessen Defekt mit der Hämophilie B assoziiert ist (Giannelli *et al.*, 1983; Camerino *et al.*, 1984).

Die Identifizierung von Genen bei Erkrankungen, deren biochemische Grundlagen unbekannt sind, gelingt mit dieser Methode jedoch nicht, so dass sich in der darauf folgenden Zeit die Methode des *positional cloning* durchsetzte (Collins *et al.*, 1992). Dabei wird das krankheitsverursachende Gen über dessen genetische und physikalische Lokalisierung im Genom identifiziert und im Anschluss auf dessen biologische Funktion untersucht. So konnten

beispielsweise das für die Muskeldystrophie Typ Duchenne verantwortliche Dystrophin-Gen (Kunkel, 1986; Koenig *et al.*, 1987), das WASP-Gen als verantwortliches Gen für das Wiskott-Aldrich-Syndrom (Derry *et al.*, 1994) und das CFTR-Gen identifiziert werden, für das eine Reihe von Mutationen bekannt sind, die zur Ausbildung der zystischen Fibrose beitragen (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

Die Lokalisierung der Erkrankung und des mutierten Gens kann durch eine Kopplungsanalyse in Familien, bei denen die Erkrankung mit einem genetischen Marker kosegregiert, sowie durch Analyse von chromosomalen Veränderungen wie Deletionen, Inversionen, oder Translokationen eingeleitet werden. Anschließend wird die betroffene genomische Region beispielsweise durch Erstellen einer Folge überlappender Cosmid-, Phagen-, PAC- (künstliches P1-Chromosom), BAC- (künstliches Bakterienchromosom) oder YAC- (künstliches Hefechromosom) Klone, so genannter „*Contigs*“, weitestgehend eingegrenzt (*chromosome jumping, chromosome walking*). Die so eingegrenzten Segmente werden dann auf dort bereits lokalisierte Gene oder bisher nicht näher charakterisierte ESTs (*expressed sequence tag*) hin untersucht.

Eine Fortentwicklung des *positional cloning* ist der so genannte *positional candidate approach* (Ballabio, 1993, Collins, 1995). Dabei wird ebenfalls zunächst die das krankheitsverursachende Gen tragende chromosomale Subregion identifiziert und anschließend in Datenbanken nach möglichen Kandidatengen gesucht. Diese Gene werden dann bei syndromalen Patienten auf Mutationen hin analysiert. Ist das krankheitsverursachende Gen erfasst, schließen sich weitere Analysen zur Aufklärung der Funktion des Gens an. Bereits 1990 konnte durch diese Methode das Fibrillin-Gen auf Chromosom 15q als verantwortliches Gen für das Marfan-Syndrom identifiziert werden (Kainulainen *et al.*, 1990; Dietz *et al.*, 1991; Magenis *et al.*, 1991). Durch die gewaltigen methodischen Fortschritte bei der Identifizierung und Lokalisierung humaner Gene im Rahmen des HGP wird dieser Ansatz zunehmend für die Analyse krankheitsverursachender Gene genutzt. Außerdem werden dazu verstärkt komparative genomische Analysen und Tiermodelle eingesetzt (Walz *et al.*, 2004), bei denen homologe Gene anhand der Sequenz identifiziert und anschließend bei Versuchstieren gezielt ausgeschaltet werden können (Ramirez-Solis *et al.*, 1995). Hilfreich ist dies besonders bei der Analyse komplexer genetischer Erkrankungen, die nicht auf Veränderungen eines einzelnen Gens, sondern auf dem Zusammenspiel multipler Gene und zusätzlicher Umweltfaktoren basieren.

1.2. Contiguous gene Syndromes

Der Begriff des *contiguous gene syndrome* (CGS) wurde erstmals 1986 (Schmickel, 1986) für genetische Erkrankungen verwendet, die mit spezifischen chromosomalen Veränderungen wie Deletionen oder Duplikationen assoziiert sind und deren phänotypische Manifestationen durch die Veränderung der Gendosis multipler, voneinander unabhängiger, jedoch physikalisch verbundener Gene bedingt werden (Shaffer *et al.*, 2001). Die verantwortlichen DNA-Defekte sind zumeist relativ klein (< 5Mb) und können daher häufig nicht durch zytogenetische Analysen dargestellt werden. Mittlerweile stehen jedoch molekularbiologische Techniken zur Verfügung, wie beispielsweise die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH), mit deren Hilfe auch deutlich kleinere DNA-Defekte analysiert werden können.

Beispiele für *contiguous-gene-syndromes* sind das Williams-Beuren-Syndrom bei Deletion del(7)(q11.23q11.23), das Langer-Giedion-Syndrom bei Deletion del(8)(q24.1q24.1) oder das Miller-Dieker-Syndrom bei Deletion del(17)(p13.3). Diese Deletionen bedingen eine Haploinsuffizienz dosissensitiver Gene in der betroffenen Region, die dann zur Ausprägung eines jeweils spezifischen Phänotyps führt. Ein Hauptinteresse liegt dabei auf der Identifizierung und Analyse dieser Gene und deren Funktion im phänotypischen Kontext. So wurden beispielsweise für das Williams-Beuren-Syndrom 3 Gene identifiziert, die zu dem phänotypischen Erscheinungsbild voneinander unabhängig beitragen – ELN für die supraaortale Aortenstenose (Li *et al.*, 1998), LIMK1 für die Beeinträchtigung der visuellen Wahrnehmung (*impaired visuospatial constructive cognition*) (Meng *et al.*, 2002) und CYLN2 für die neurologischen Entwicklungsstörungen (Hoogenraad *et al.*, 2002). Für derartige Untersuchungen ist die Analyse von Punktmutationen in Kandidatengenen bei Patienten mit dem entsprechenden phänotypischen Erscheinungsbild hilfreich, die ansonsten keine zytogenetischen Veränderungen aufweisen. Eine andere Möglichkeit ist der phänotypische Vergleich von Patienten mit ähnlichen, jedoch nicht identischen Chromosomenanomalien, deren Phänotypen sich in einem wichtigen Symptom unterscheiden. Bei einigen, zuvor als CGSs vermuteten Syndromen zeigte sich, dass die Dysmorphien entgegen aller Erwartungen durch die Haploinsuffizienz eines einzelnen Gens bedingt waren, auch wenn weitere Gene durch den chromosomalen Umbau betroffen waren. Beispiele dafür sind das Gen JAG1 für das Alagille-Syndrom (Schnittger *et al.*, 1989, Li *et al.*, 1997), oder das CBP-Gen für das Rubinstein-Taybi-Syndrom (Petrif *et al.*, 1995).

Bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Patienten, der sich zur Abklärung eines unklaren Dysmorphiesyndroms in der genetischen Beratungsstelle des Instituts für Humangenetik und

Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorstellte, wurde in der zytogenetischen Routineuntersuchung eine de novo entstandene interstitielle Deletion der Banden 4q25-q28 diagnostiziert. Da bei einer Deletion dieser Größe anzunehmen war, dass der Phänotyp des Patienten ebenfalls durch die Deletion mehrerer Gene bedingt war, schlossen sich die in dieser Arbeit aufgeführten Untersuchungen zur Analyse der betroffenen Chromosomenregion an. In diesem Zusammenhang war insbesondere das Gen PITX2 von Interesse, bei dessen Deletion es zur Ausprägung des so genannten Rieger-Syndroms kommt. Aufgrund phänotypischer Überschneidungen mit diesem Syndrom war eine Assoziation mit dem Phänotyp des Patienten vermutet worden.

1.3. Das Rieger-Syndrom

Das Rieger-Syndrom wurde erstmals 1935 als genetisches Syndrom klassifiziert (Rieger, 1935). Es handelt sich dabei um ein autosomal dominant vererbtes Dysmorphiesyndrom das in unterschiedlichen Ausprägungsgraden auftreten kann. Die mildeste Variante wird als Axenfeld-Anomalie bezeichnet. Dazu gehören Verwachsungen zwischen Iris und Cornea, so genannte vordere Synechien, sowie eine prominente und nach vorn verlagerte Schwalbe-Linie des Trabekelnetzwerkes im iridocornealen Winkel (Embryotoxon posterior). Durch diese Fehlbildungen wird die Glaukomentwicklung begünstigt. Zeigen die Patienten zusätzlich zu diesen Dysmorphien weitere okuläre Anomalien, z.B. hypoplastisches Irisstroma, Corectopie oder Polycorie, wird dies als Rieger-Anomalie bezeichnet. Beim Rieger-Syndrom treten zusätzlich zu den okulären auch nicht-okuläre Fehlbildungen, insbesondere Zahnhypoplasie, milde kraniofaziale Dysmorphien und Nabelstumpfanomalien auf. Die Zahnhypoplasie kann in Form fehlender, kleiner oder dysmorpher Zähne auftreten. Weitere Symptome können die Herzentwicklung, den Urogenitaltrakt und die Hypophysenentwicklung betreffen (Amendt *et al.*, 2000). Durch Kopplungsanalyse konnte das Syndrom zunächst mit Chromosom 4q25 in Verbindung gebracht werden (Murray *et al.*, 1992). Anschließend wurde das Gen PITX2 durch *positional cloning* isoliert (Semina *et al.*, 1996). Ein zweiter Locus ist auf Chromosom 13q14 lokalisiert worden, wobei das verantwortliche Gen bisher nicht identifiziert werden konnte (Phillips *et al.*, 1996). Des Weiteren wurden bei Patienten mit kongenitalem Glaukom und Rieger-Anomalie chromosomale Veränderungen des Chromosom 6q25 identifiziert und durch Bruchpunkt- und Mutationsanalysen Veränderungen im so genannten *forkhead transcription factor* (FKHL7) Gen nachgewiesen (Nishimura *et al.*, 1998).

PITX2 ist ein Mitglied der *bicoid-like homeobox transcription factor* – Familie (Gage *et al.*, 1999), die eine wichtige Rolle in der genetischen Kontrolle der Entwicklung spielt (Holland

1992) und verantwortlich für 4q25-gekoppeltes Rieger-Syndrom ist. Eine Haploinsuffizienz des Gens wurde schon früh als mögliche Ursache für das Auftreten dieses Syndroms vermutet, da Deletionen eines der beiden Allele von PITX2 bei einigen Patienten beschrieben wurden (Schinzel *et al.*, 1997; Flomen *et al.*, 1998). Des Weiteren konnten äquivalente Fehlbildungen im Tiermodell nachgewiesen werden, nachdem das homologe Gen der Maus identifiziert worden war. Bei Mäuseembryonen zeigte sich eine gesteigerte Expression im periokkularen Mesenchym, dem Mesenzephalon, der Hypophyse, dem Maxilla- und Mandibulaepithel, sowie im Bereich des Nabels. Außerdem wurde seine gendosisabhängige Bedeutung für die Genese weiterer Organe, beispielsweise die Herz- und Lungenentwicklung, gezeigt (Semina *et al.*, 1996; Gage *et al.*, 1997; Logan *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999; Hjalt *et al.* 2000).

1.4. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die molekularzytogenetische Charakterisierung der Deletionsbruchpunkte einer de novo entstandenen Deletion [46XY, del4(q25q31.1)] bei einem Patienten mit unklarem Dysmorphiesyndrom. Aufgrund phänotypischer Überschneidungen mit dem Rieger-Syndrom sollte dabei insbesondere auf eine Beteiligung des Gens PITX2 eingegangen werden.

Des Weiteren sollte der Versuch unternommen werden, durch phänotypischen und genotypischen Vergleich mit bekannten Fällen ähnlicher Deletionsregion einen gemeinsamen Phänotyp bei interstitiellen Deletionen der Banden 4q25-q31.1 zu definieren.

2. Material

2.1. Chemikalien

Agar	Fluka, Ulm
Agarose	GibcoBRL, Eggenstein
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Bacto Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
Biotinylated anti-Avidin D	Roche, Mannheim
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
5-Bromo-3-chloro-3-indoly-phosphat (BCIP)	Roche, Mannheim
4-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Vysis, Downers Grove, IL, USA
Desoxynucleosid Triphosphat Set	Roche, Mannheim
Dextransulfat	Amresco, Solan, OH, USA
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Cot-I-Human DNA	Roche, Mannheim
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka, Ulm
Fluorescein Avidin D	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Fluka, Ulm
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Lachssperm-DNA	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
tri-Natiumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid (NBT)	Boehringer, Mannheim
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tris	GibcoBRL, Eggenheim

TritonX	Serva, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectashield	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
Yeast extract	GibcoBRL, Eggenstein

2.2. Gebrauchswaren

Einmalkanülen	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Faltenfilter	Schleichel & Schuell, Dassell
Fixgum	Marabuwerke, Tamm
Glaswaren	Schott, Jena
Handschuhe	Safeskin, Neufahrn
Küvetten	
Nylonmembranen (Nybond N+)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Objektträger/Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Papierwaren	Whatman, Maidstone, UK
Parafilm [®]	American National Can [™] , Chicago, IL, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nürnbergrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbergrecht
Plastikwaren	Sarstedt, Greiner, Falcon
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnbergrecht
Spritzenfilter	Heinemann, Duderstadt
Steril-Filtersystem	Milipore, Bedford, MA, USA

2.3. Geräte

ALFexpress-DNA-Analyser	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Autoklav, „Sanoclav“	Schütt, Göttingen
Bilddokumentationssystem/Transilluminator	Herolab, Wiesloch
Blockthermostat	Kleinfeld Labortechnik
Elektrophoresesysteme	OWL Scientific Inc., Woburn, MA, USA
Inkubatoren	Heraeus, Osterode
Kryostat	Heraeus, Osterode
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg

Mikroskope

- Axiophot
- Axioplan 2

Zeiss, Jena

Zeiss, Jena

pH-Meter, Typ CG810

Schott, Mainz

Schüttelinkubator Innova 4000/4300

New Brunswick Scientific, Edison, NJ,
USA

Spannungsgeräte

Schütt, Göttingen

Sterilbank Nuair

Zapf, Sarstedt

Thermocycler, Master Gradient

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer

Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge (Biofuge pico)

Heraeus, Osterode

UV-Spektrometer GeneQuant pro

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

UV-Stratalinker

Stratagene, La Jolla, CA, USA

Waagen

Schütt, Göttingen

Wasseraufbereitungssysteme

Millipore, Eschborn

Wasserbad

Lauda, Lauda-Königshofen

Vortex

Schütt, Göttingen

Zentrifugen

- Megafuge 1,0R
- 3K20

Heraeus, Osterode

Sigma, Deisenhofen

2.4. Sterilisation/Autoklavieren von Gefäßen und Lösungen

Lösungen, die keine hitzeempfindlichen Bestandteile enthielten, sowie Gebrauchswaren wurden bei 120°C und 10⁵ Pascal für 20 Minuten im Dampfdruck-Autoklaven autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Steril-Filtrationssystems (Millipore) sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm).

2.5. Gebrauchslösungen

Alle Lösungen wurden entweder mit „Ampuwa“ oder mit „Milli-Q“ Wasser (Millipore) angesetzt und, falls erforderlich, sterilisiert.

Avidin-FITC-Stammlösung: 5 mg/ml in Ampuwa
beim 4°C lichtgeschützt lagern

Avidin-FITC-Gebrauchslösung:	1 ml	Blocking-Lösung
	5 µl	Avidin-FITC-Stammlösung
		frisch ansetzen
		lichtgeschützt lagern
BAAD-Stammlösung:	0,5 mg/ml	in Ampuwa (bei 4°C lagern)
BAAD-Gebrauchslösung:	1 ml	Blocking-Lösung
	10 µl	BAAD-Stammlösung
		frisch ansetzen
Blocking-Lösung:	10 ml	10%iges BSA
	4 ml	20x SSC
	6 ml	Aqua dest.
		frisch ansetzen, filtrieren
Clontech-Puffer S1:	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
		nach RNase-A Zugabe bei 4°C lagern
Clontech-Puffer S2:	200 mM	NaOH
	1 %	SDS
Clontech-Puffer S3:	2,8 M	KOAc, pH 5,1
		bei 4°C lagern
Clontech-Puffer N2:	100 mM	Tris
	15 %	Ethanol
	900 mM	KCl pH 6,3 mit H ₃ PO ₄ einstellen
Clontech-Puffer N3:	100 mM	Tris
	15 %	Ethanol
	1,15 M	KCl
		pH 6,3 mit H ₃ PO ₄ einstellen

Clontech-Puffer N5:	100 mM	Tris
	15 %	Ethanol
	1 M	KCl
		pH 8,5 mit H ₃ PO ₄ einstellen
Chloramphenicol-Stammlösung:	34 mg/ml	in Ethanol
DAPI-Stammlösung:	0,1 mg/ml	in Ampuwa
		lichtgeschützt bei 4°C lagern
Denaturierungslösung:	70 %	Formamid in 2x SSC
		frisch ansetzen
		auf pH 7,0 einstellen
DNase:	1 mg/ml	in Ampuwa
		aliquotiert bei -20°C lagern
dNTP-Mix:	1 Vol.	dATP (1,0 mM)
	1 Vol.	dGTP (1,0 mM)
	1 Vol	dCTP (1,0mM)
	0,2 Vol.	dTTP (1,0mM)
Dot-Blot-Lösung 1:	7 ml	Dot-Blot-Puffer 1
	3 ml	10%iges BSA
Dot-Blot-Lösung 2:	9,5 ml	Dot-Blot-Puffer 1
	0,5 ml	10%iges BSA
	5 µl	Streptavidin alkaline
		Phosphatase (0,8mg/ml)
Dot-Blot-Lösung 3:	5 ml	Dot-Blot-Puffer 2
	20 µl	NBT
	20 µl	BCIP
Dot-Blot-Puffer 1:	25 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	50 mM	NaCl
	0,05 %	Triton-X-100

Dot-Blot-Puffer 2:	25 mM 50 mM	Tris-HCl, pH 9,5 NaCl
EDTA, 0,5 M:	186,1 g	EDTA in 1l Aqua dest. pH 8,0 einstellen autoklavieren
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml	in Ampuwa lichtgeschützt bei 4°C lagern
Ethidiumbromid-Gebrauchslösung:	10 µl	Stammlösung 100ml Aqua dest.
Formamid-Waschlösung:	50 %	Formamid in 2x SSC pH 7,0 einstellen frisch ansetzen
Lachssperm-DNA:	10 mg/ml	in TE-Puffer (pH 7,6) durch Ultraschallbehandlung geschert, aliquotiert bei -20°C lagern
LB-Agar + Chloramphenicol:	15 g/l 34 mg/l	Bacto-Agar/1l LB-Medium Chloramphenicol bei 4°C lagern
LB-Medium:	7,5 g/l 7,5 g/l 10,0 g/l	NaCl Yeast-Extract Peptone autoklavieren
Lysis-Puffer:	155 mM 10 mM 0,1 mM	NH ₄ Cl KHCO ₃ EDTA in Aqua dest. pH 7,4 einstellen
Mastermix:	20 %	Dextransulfat in 2x SSC bei -20°C lagern

Natriumacetat 3M:	246 g/l	in Aqua dest. pH 5,3 mit Essigsäure einstellen
Nicktranslationspuffer, 10x:	0,5 M 0,1 M 1 mM 500 µg/ml	Tris-HCl (pH 7,5) MgSO ₂ Dithiothreitol BSA aliquotiert bei -20°C lagern
Propidiumjodid-Stammlösung:	1 mg/ml	in Aqua dest. lichtgeschützt bei 4°C lagern
Propidiumjodid-DAPI: (Gebrauchslösung)	10 µg/ml 100 ng/ml	Propidiumiodid DAPI in Vectashield
Proteinkinase K-Lösung:	10 mg/ml	Proteinkinase K in TE-Puffer bei -20°C lagern
RNase-A-Stammlösung:	10 mg/ml	in Ampuwa aliquotiert bei -20°C lagern
RNase-A-Lösung (FISH):	900 µl 100 µl 10 µl	Ampuwa 20x SSC RNase (10mg/ml) vor Gebrauch 15 min abkochen
SE-Puffer:	75 mM 1 mM	NaCl EDTA in Aqua dest. pH 8,0 einstellen
SSC, 20x:	3 M 0,3 M	NaCl Na-Citrat pH 7,0 einstellen
SSC, 2x:	100 ml	20x SSC ad 900ml mit Aqua dest.

SSC, 4x / 0,1% Tween 20:	200 ml	20x SSC
	1,0 ml	Tween 20
	800 ml	Aqua dest.
TBE, 5x:	225 mM	Tris
	225 mM	Borsäure
	10 mM	EDTA
		pH 8,3 einstellen
TE-Puffer:	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0

2.6. Enzyme

DNA-Polymerase I	Roche, Mannheim
DNase I	Boehringer, Mannheim
Proteinkinase K	Boehringer, Mannheim
RNase A	Sigma, Deisenhofen
Streptavidin-Alkaline-Phosphatase Conjugate	Boehringer, Mannheim
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

2.7. Mikrosatelliten (Primer)

STS Marker AFM343WF9 (D4S1616)

Forward-Primer	5`-AGTAATGTGAACAATTCAGTCACTC-3`
Backward-Primer	5`-AGCCTCCCAAAGCCAG-3`
Produktgröße	245-257 bps.

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Um die entstandenen PCR-Produkte mit Hilfe des ALFexpress-DNA-Analysers analysieren zu können wurde der Forward-Primer Fluoreszenz-markiert (Cy5-Markierung am 5`-Ende des Primers).

2.8. BAC-Klone

Die folgenden BAC-Klone wurden vom RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung – Primärdatenbank – bezogen. Ausgewählt wurden die Klone zunächst anhand der zytogenetisch mit Hilfe des G-Banding ermittelten Informationen über die ungefähre Größe der deletierten Region. Daraufhin wurden die Bruchpunkte jeweils systematisch eingengt.

Library Human BAC (RPCI-11)

Library No: 753

Source: Blood

Vector: pBACe 3.6

Stamm: *E.coli* DH10B

Resistenz: Chloramphenicol

BAC-Name	Lokalisation	BAC-Name	Lokalisation
RP11-81J9	4q25	RP11-42H6	4q25
RP11-380D23	4q25	RP11-313B13	4q25
RP11-57A4	4q25	RP11-265M21	4q25
RP11-326N15	4q25	RP11-18D18	4q25
RP11-91E23	4q25	RP11-79I18	4q28.1
RP11-11P20	4q28.1-28.2	RP11-94J9	4q28.3
RP11-60A1	4q28.3	RP11-733C7	4q28.3
RP11-89I24	4q31.1	RP11-435P6	4q31.1
RP11-1062K20	4q31.1	RP11-258E17	4q31.1
RP11-22O8	4q31.1		

3. Methoden

Nicht gesondert beschriebene Methoden sind nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt worden.

3.1. Herstellung von Chromosomenpräparaten aus Lymphozyten

3.1.1. Lymphozytenkultur

Kulturansatz: 1 ml Vollblut
 100 µl Phytohämagglutinin
 10 ml MIM oder AM-Medim

Der Kulturansatz wird steril in eine Kulturflasche pipettiert und mit verschlossenem Schraubverschluss bei 37°C für 72 h inkubiert. Täglich sollten die Kulturansätze einmal geschwenkt werden.

3.1.2. Kulturabbruch und Chromosomenpräparation

Hypotone Lösung: 5,92 g/l Kaliumchlorid
 4 g/l Natriumcitrat
 bei 4°C lagern

Fixativ: 3 Vol. Methanol
 1 Vol. Essigsäure

- Nach 72 Stunden werden den Kulturen 200 µl Colcemidlösung zur Arretierung der Zellen in der Mitose hinzu gegeben.
- Nach weiteren 90 Minuten den Ansatz auf vorgewärmte Zentrifugenröhrchen aufteilen und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Den Überstand bis ca. 0,5 cm oberhalb des Sedimentes abnehmen und das Sediment in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendieren.
- Tropfenweise 10 ml hypotone Lösung unter Schwenken hinzugeben.
- Den Ansatz für 20 min bei 37°C inkubieren.
- 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Überstand bis auf 0,5 cm über dem Pellet abnehmen, resuspendieren und tropfenweise 10 ml eiskaltes Fixativ, unter vorsichtigem Mischen, hinzugeben.
- Ansatz für 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren.

- Überstand bis ca. 0,5 cm oberhalb des Pellets abnehmen, Pellet resuspendieren und erneut mit 10 ml Fixativ auffüllen und vorsichtig mischen.
- 15 min bei -20°C inkubieren.
- 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren, Überstand bis 0,5 cm abnehmen und das Pellet resuspendieren.
- Mit 10 ml Fixativ auffüllen vorsichtig mischen und erneut für 15 min bei -20°C inkubieren.
- 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren, Überstand bis auf 0,5 cm abnehmen, 3 ml Fixativ hinzugeben und das Pellet resuspendieren.
- 3-5 Tropfen der Zellsuspension aus ca. 50 cm Höhe auf feuchte Objektträger auftropfen. Falls die Präparate für G-Banding benutzt werden, Objektträger kurz abflammen.
- Objektträger bei hoher Luftfeuchtigkeit langsam trocknen lassen.
- Kontrolle der Zell- und Metaphasendichte im Phasenkontrastmikroskop bei 160-facher Vergrößerung.

3.2. Isolierung von DNA aus Bakterien

Die Bakterien wurden jeweils auf Agar-Nährböden mit dem entsprechenden Antibiotikum angezüchtet.

3.2.1. Anlage einer Bakterienkultur

- 150 ml LB-Medium mit 150 µl Stammlösung des entsprechenden Antibiotikums steril in einen 500 ml Erlenmeyerkolben pipettieren.
- mit einer sterilen Impföse eine Einzelkolonie von der Agarplatte abnehmen, die Kultur damit beimpfen und bei 37°C für 24 h in einem Schüttelinkubator inkubieren.

3.2.2. Anlage einer Stammkonserve (Stock)

Stammkonserven dienen zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen bei -80°C. Die Kristallisation des Zytoplasmas und die damit verbundene Zerstörung der Zellen werden durch die Zugabe von Glycerin verhindert.

- 700 µl einer Übernachtskultur mit 150 µl sterilem Glycerin in ein autoklaviertes Eppendorfggefäß geben, gründlich mit einem Vortex mischen und sofort auf Trockeneis, oder in flüssigem Stickstoff einfrieren. Lagerung bei -80°C.

3.2.3. Isolierung der BAC-DNA

Bei der Isolierung von BAC-DNA kamen das „NucleoBond® BAC Maxi Kit“ der Firma Clontech und die darin enthaltenen Pufferlösungen zum Einsatz (vgl. NucleoBond® Nucleic Acid Purification Tools User Manual PT3167-1 (PR9X392) veröffentlicht am 28.10.1999), wobei die eingesetzten Puffermengen leicht verändert wurden.

- Die 150 ml Bakterienkultur (siehe 3.2.1) wird nach 24 h Wachstum in einem Falconröhrchen in 3 aufeinander folgenden Schritten für jeweils 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert und pelletiert, wobei jeweils nach der Zentrifugation der Überstand verworfen und das Röhrchen mit weiteren 50 ml Kultur aufgefüllt wird.
- Das Pellet in 6 ml Clontech-Puffer S1 resuspendieren.
- 6 ml Clontech-Puffer S2 hinzugeben, vorsichtig schwenken und bei Raumtemperatur für maximal 5 min inkubieren.
- 6 ml Clontech-Puffer S3 hinzufügen und vorsichtig mischen. Für 5 min auf Eis inkubieren.
- Das Lysat für 10 min bei 4000 rpm zentrifugieren und danach den Überstand durch einen NucleoBond Folded Filter filtrieren.
- Die NucleoBond Säulen AX 20 mit 2,5 ml Clontech-Puffer N2 äquilibrieren.
- Das gefilterte Lysat auf die Säule geben und durchlaufen lassen.
- Die Säule zweimal mit 5 ml Clontech-Puffer N3 waschen.
- Die DNA mit 2 ml Clontech-Puffer N5 eluieren.
- DNA durch die Zugabe von 0,7 ml Isopropanol fällen und für 30 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugieren.
- Überstand abnehmen.
- Pellet mit 70 % Ethanol waschen, abzentrifugieren und trocknen lassen.
- DNA in 20 µl 1x TE lösen.
- DNA-Konzentration bestimmen (siehe 3.2.4)
- Falls die DNA nicht direkt weiter verwendet wird, kann sie bei 4 °C gelagert werden.

3.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann spektralphotometrisch bestimmt werden, wobei eine lineare Beziehung zwischen dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm Wellenlänge und ihrer Konzentration besteht. Dazu werden die Extinktion bei den

Wellenlängen 230 nm (Absorptionsmaximum für Salze), 260 nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) gemessen.

- Von der betreffenden DNA (gelöst in TE) eine 1:100 Verdünnung herstellen.
- Eine 1:100 Verdünnung von 1x TE in Ampuwa dient als Referenzwert für die Messung.
- Die DNA-Probe in die Quarzküvette (1cm Schichtdicke) überführen und die Extinktion bei 230 nm, 260 nm und 280 nm Wellenlänge messen.

Die Konzentration der Nukleinsäuren errechnet sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

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

Hierbei gilt: c = Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

f = Verdünnungsfaktor

k = Konzentration an Nukleinsäure, die 1 OD bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht. Für doppelsträngige Nukleinsäuren nimmt k den Wert $47,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ an.

E = Extinktion

Der Quotient aus E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren und sollte bei $2,0 \pm 0,2$ liegen. Ein Quotient unter 1,5 spricht für eine hohe Verunreinigung durch Proteine.

3.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

(modifiziert nach Lichter et al., 1988)

Das Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Chromosomenpräparaten beruht auf der Hybridisierung einzelsträngiger, mit Biotin markierter DNA-Sonden an den komplementären DNA-Sequenzen der auf den Objektträgern befindlichen, denaturierten Chromosomen. Nach der spezifischen Bindung wird das Hybridisierungsergebnis mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper gegen Biotin detektiert und sichtbar gemacht.

3.3.1. Markierung der DNA-Sonden mittels Nicktranslation

(modifiziert nach Rigby et al., 1977)

Als DNA-Sonden diente jeweils zuvor präparierte BAC-DNA.

Reaktionsansatz:	250 ng	BAC-DNA
	8 µl	10x Nicktranslationspuffer
	1,12 µl	Biotin-16-dUTP (0,3 M)
	2,4 µl	dNTP-Mix
	2,0 µl	DNase I (1:1000 verdünnt)
	1,6 µl	DNA-Polymerase I (5U/l)
	ad 30 µl Ampuwa	

- Den Reaktionsansatz auf Eis in ein Eppendorf-Tube pipettieren, gut mischen (Vortex) und kurz abzentrifugieren.
- Ansatz für 2 h bei 14°C im Kryostat inkubieren.
- Dem Ansatz nach 2 h 2 µl zur Kontrolle des Biotineinbaus mittels Dot-Blot entnehmen
- Die Reaktion wird nach 2 h durch Zugabe von 0,1 Vol. NaAc (pH 5,3) und 2,5 Vol. 100 %igen Ethanol gestoppt.
- 6 µl Lachssperm-DNA und 9 µl Cot-I-Human-DNA zur Absättigung unspezifischer Sequenzen hinzufügen.
- DNA für 30 min bei -80°C, oder für 12 h bei -20°C ausfällen.

3.3.2. Suppression unspezifischer Hybridisierungen

Aus eukaryotischer DNA isolierte, rekombinante DNA enthält oft über das gesamte Genom verteilte, repetitive Sequenzen (z.B. Alu-Sequenzen, alphanucleäre Sequenzen). Diese repetitiven Sequenzen innerhalb einer DNA-Sonde würden bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zu unspezifischen Bindungen und somit zu fehlerhaften Anfärbungen führen. Daher wird dem Hybridisierungsansatz eine ausreichende Menge an vermehrt unspezifische Sequenzen enthaltender Kompletions-DNA hinzugefügt und in einer Vorreaktion die unspezifischen Sequenzen einer DNA-Sonde abgesättigt. In der nachfolgenden Hybridisierung (FISH) binden dann nur noch die nicht abgesättigten, spezifischen Sequenzen der Sonde an die komplementären Zielsequenzen der Chromosomen. Als Kompletions-DNA werden Lachssperm-DNA (Absättigung unspezifischer Sequenzen) und Cot-I-Human-DNA (Absättigung sämtlicher hochrepetitiver Sequenzen) mit Fragmentlängen zwischen 250 – 500

Basenpaaren eingesetzt. Die Menge der eingesetzten Kompletions-DNA steigt mit der Größe der DNA-Sonde (Plasmid < Cosmid < BAC < YAC).

Die Kompletions-DNA wird nach der Nicktranslation zu der markierten Sonde hinzu gegeben und zusammen mit ihr ausgefällt. Einem Standard-Ansatz mit 250 ng markierter DNA werden 6 µl Lachssperm-DNA (10 mg/ml) und 9 µl Cot-I-Human-DNA (1 mg/ml) zugegeben.

3.3.3. Kontrolle des Einbaus von Biotin-16-dUTP mittels Dot-Blot

- 2 µl aus dem Reaktionsansatz der Nicktranslation nach der Inkubation entnehmen und eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000) mit Ampuwa ansetzen.
- Je 2 µl der drei verschiedenen Konzentrationen auf einen Nitrozellulosefilter auftragen und durch UV-Strahlung (Crosslinker) fixieren.
- Filter für 5 min bei Raumtemperatur in Dot-Blot-Lösung 1 (Blocking) auf dem Schüttler inkubieren.
- Filter für 15 min bei Raumtemperatur in Dot-Blot-Lösung 2 (mit Streptavidin alkaline Phosphatase) auf dem Schüttler inkubieren.
- Filter 2 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 lichtgeschützt in einer Petrischale für 1 h in Dot-Blot-Lösung 3 inkubieren.
- Filter mit 2 x SSC spülen und dann trocknen lassen.

Die markierte DNA sollte mindestens noch bei einer 1:100-Verdünnung eine Farbreaktion erzeugen um erfolgreich für eine FISH eingesetzt werden zu können.

3.3.4. Hybridisierungsansatz

- Die 250 ng markierte, mit Kompletions-DNA versetzte und ausgefallte Sonde für 30 min. bei 4°C und 22000 rpm zentrifugieren.
- Überstand abnehmen und Pellet mit 70 %igem Ethanol waschen.
- Erneut für 10 Minuten bei 22000 rpm zentrifugieren, Überstand abnehmen und Pellet trocknen lassen.
- Pellet in 6 µl 100 %igem deionisierten Formamid aufnehmen, mischen, kurz abzentrifugieren und 30 min. bei 37 °C inkubieren. Wird die in Formamid gelöste Sonde nicht unmittelbar weiterverwendet, kann sie bei -20°C für längere Zeit aufbewahrt werden.

- 6 µl Mastermix hinzugeben, kurz mischen und abzentrifugieren.
- 5 min. bei 95°C denaturieren, kurz auf Eis stellen und kurz abzentrifugieren.

3.3.5. Preannealing

- die denaturierte Sonde für 15 min. bei 37°C inkubieren.

Dieser Schritt dient der Absättigung der hochrepetitiven Sequenzen der markierten DNA durch die zugesetzte Kompetitions-DNA. Die Preannealing-Dauer wurde empirisch ermittelt.

3.3.6. Vorbehandlung der Objektträger

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden Objektträger eingesetzt, die nach der Chromosomenpräparation lichtgeschützt bei -20°C ca. 6 Monate gelagert wurden. Die Lagerungsdauer von 6 Monaten wurde empirisch ermittelt. Präparate, die kürzer gelagert wurden, wiesen vermehrte Verunreinigungen und unspezifische Sondenbindung an Hintergrundstrukturen auf, wohingegen ältere (über 2 Jahre Lagerungsdauer) Präparate schlechte Hybridisierungsergebnisse lieferten.

RNAse-Behandlung der Objektträger

Eine RNAse-A-Behandlung der Objektträger soll bei den Präparaten die endogene RNA abbauen und somit eine Verringerung der unspezifischen Bindung der Sonde und eine Reduktion der störenden Hintergrundsignale bewirken.

- RNAse-A Lösung für 15 min kochen, danach abkühlen lassen.
- 200 µl RNAse-A-Lösung auf den Objektträger auftragen und mit einem 24 x 60 mm Deckglas blasenfrei abdecken und 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- Deckgläser abgleiten lassen und die Objektträger 2 x 15 min in 2 x SSC bei RT waschen. Direkt im Anschluss mit der Denaturierung der Chromosomen fortfahren.

Denaturierung der Chromosomen

- Denaturierungslösung in einer Küvette im Wasserbad auf 72°C erhitzen.
- Objektträger je 1 min. durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe führen (70%, 80%, 90%, 99%, 99%) und an der Luft trocknen lassen.
- Objektträger für 2 min.45sec. in Denaturierungslösung inkubieren.
- Objektträger direkt im Anschluss je 1 min. durch eine eiskalte, aufsteigende Ethanol-Reihe führen (70%, 80%, 90%, 99%, 99%) und an der Luft trocknen lassen.

3.3.7. Hybridisierung

- Die vorbehandelten Objektträger liegend in einer, mit in 2 x SSC getränkten Einwegtüchern ausgelegten, feuchten Kammer anordnen.
- Den Hybridisierungsansatz nach dem Preannealing kurz abzentrifugieren.
- 12 µl des Ansatzes auf die Objektträger an einer geeigneten Stelle pipettieren (Mitoseindex und Spreitung der Chromosomen vor Verwendung der Objektträger für FISH kontrollieren)
- Mit 24 x 40 mm Deckglas blasenfrei abdecken und mit Fixgum versiegeln.
- Die Objektträger für mindestens 8h bei 37°C inkubieren.

3.3.8. Waschen nach der Hybridisierung

Die Waschschritte dienen der Entfernung nicht, oder nur schwach und unspezifisch gebundener Sonden, um unspezifische Signale und so genannte Hintergrundprobleme auf dem Objektträger zu verringern. Die Stringenz der Waschschritte wird durch Temperaturveränderungen, Salz- und Formamidkonzentrationsvarianz erheblich variiert.

Die Waschlösungen und Küvetten werden in Wasserbädern auf die entsprechenden Temperaturen vortemperiert. Die Waschschritte werden in einem mit einem Schüttler ausgestatteten Wasserbad durchgeführt um die Lösungen konstant warm zu halten. Bei Wechsel zwischen den verschiedenen Puffern wurde jeweils eine frische, zuvor gesäuberte Küvette benutzt.

Die angegebenen Temperaturen gelten für jeweils 2 Objektträger pro Küvette und sollten bei höherer Anzahl um 2°C pro Objektträger erhöht werden.

- Fixgum von den Präparaten entfernen und die Deckgläser vorsichtig abgleiten lassen.
- Objektträger 3 x 5 min in einer Küvette mit 50 % Formamid/2 x SSC bei 50 °C waschen.
- Objektträger 5 x 2 min in 2 x SSC bei 50 °C waschen.
- Objektträger 3 x 5 min in 0,1 x SSC bei 66°C waschen.
- Objektträger 2 x 5 min in 4x SSC/0,1% Tween bei 50°C waschen.

3.3.9. Detektion und Amplifikation der Biotin-markierten Sonden

Diese Schritte schließen sich direkt an den letzten Waschschrift (3.3.8.) an. Alle Inkubationsschritte der Objektträger erfolgen in einer feuchten Kammer unter völligem Lichtabschluss um das Ausbleichen der fluoreszierenden Farbstoffe zu verhindern. Die Waschschriffe werden in einem geschlossenen Wasserbad mit Schüttler ebenfalls unter Lichtabschluss durchgeführt. Alle Zwischenschritte, die notwendigerweise im Licht stattfinden, sollten möglichst zügig durchgeführt werden.

- Objektträger in feuchte Kammer legen und pro Objektträger jeweils 500 µl Blocking-Lösung auftragen und 10 min bei RT inkubieren.
- Blocking-Lösung ablaufen lassen (Objektträger nie völlig trocknen lassen).
- Pro Objektträger 100 µl Avidin-FITC-Lösung auftragen, blasenfrei mit einem 24 x 60 mm Deckglas abdecken.
- Objektträger 30 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.
- Objektträger 5 x 5 min in 4 x SSC/0,1 % Tween bei 50°C waschen.

Verstärkungsschritt:

- Pro Objektträger 500 µl Blocking-Lösung auftragen und 10 min bei RT in feuchter Kammer inkubieren.
- Blocking-Lösung ablaufen lassen, pro Objektträger 100 µl BAAD-Lösung auftragen und blasenfrei mit einem 24 x 60 mm Deckglas abdecken.
- Objektträger 30 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.
- Objektträger 5 x 5 min in 4 x SSC/0,1 % Tween bei 50°C waschen.
- Pro Objektträger 500 µl Blocking-Lösung auftragen und in feuchter Kammer 10 min bei RT inkubieren.
- Blocking-Lösung ablaufen lassen, pro Objektträger 100 µl Avidin-FITC-Lösung auftragen und blasenfrei ein 24 x 60 mm Deckglas auflegen.
- Objektträger 30 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.
- Objektträger 5 x 5 min in 4 x SSC/0,1 % Tween bei 50°C waschen.

Falls nötig kann ein weiterer Verstärkungsschritt durchgeführt werden. Dies empfiehlt sich besonders für kleine Sonden (Cosmid-Sonden), wohingegen bei BAC- bzw. YAC- Sonden zumeist ein einfacher Verstärkungsschritt genügt.

3.3.10. Färbung der Chromosomen mit Propidiumiodid und DAPI

- Pro Objektträger 35 µl Propidiumiodid-DAPI-Vectashield-Lösung auftragen.
- Objektträger mit einem 24 x 40 mm Deckglas blasenfrei abdecken und das Deckglas leicht andrücken um überschüssiges Flüssigkeitsvolumen zu entfernen und mit durchsichtigem Nagellack versiegeln.
- Objektträger bei 4°C lichtgeschützt bis zur Auswertung aufbewahren (Fluoreszenzsignale bleiben ca. 2 Wochen sichtbar).

3.3.11. Auswertung der Objektträger am Fluoreszenzmikroskop

Die Präparate wurden mit einem Zeiss Axioplan2 Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dabei wurden die Metaphasen zunächst bei 100-facher Vergrößerung aufgesucht und dann bei 1008-facher Vergrößerung mit Immersionsöl auf Vollständigkeit und Morphologie der Chromosomen hin untersucht. Mit Hilfe verschiedener Filtersysteme konnten sowohl die Propidiumiodid-, die DAPI- und die Fluoresceinsignalfärbung, als auch Kombinationen derselben, sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe einer CCD-Kamera und des Metasystems-Dokumentationssystems sowie der ISIS 3 Software wurden die Metaphasen fotografiert und digital gespeichert.

3.4. DNA-Präparation aus Blut

(modifiziert nach Miller *et al.*, 1988)

- 10 ml Vollblut mit 30 ml Lysis-Puffer in einem Sarstedt-Röhrchen vorsichtig mischen, 30 min auf Eis inkubieren und 15 min bei 2000 rpm 4°C zentrifugieren.
- Überstand abnehmen, 10 ml Lysis-Puffer hinzugeben und das Pellet resuspendieren und weitere 15 min auf Eis inkubieren.
- 15 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugieren. Diese Schritte solange fortführen, bis das Pellet weißlich erscheint.
- Überstand abnehmen, 5 ml SE-Puffer hinzufügen und Pellet resuspendieren.
- Dem Ansatz 12,5 µl Proteinkinase K-Lösung und 250µl 20 % SDS hinzufügen vorsichtig mischen und bei 55°C für 12 Stunden in Wasserbad inkubieren.
- Nach Abkühlung auf Raumtemperatur 1,5 ml gesättigte Kochsalzlösung hinzugeben, 15 s vortexen und dann 15 min bei 4000 rpm und RT zentrifugieren.
- DNA durch Zugabe von 2 Vol. 100% Ethanol aus dem Überstand fällen und DNA-Präzipitat in ein Reaktionsgefäß mit 70%igem Ethanol überführen.

- DNA 10 min bei 12000 rpm und RT pelletieren, den Überstand abnehmen und die DNA leicht antrocknen lassen.
- DNA in 1 ml TE-Puffer lösen (auf dem Schüttler) und dann bei 4°C aufbewahren.

3.5. Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

(modifiziert nach Saiki *et al.*, 1988)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, spezifische DNA-Bereiche *in vitro* zu amplifizieren. Die Methode basiert auf einer zyklischen Abfolge von Denaturierung der Template-DNA, Anlagerung sequenzspezifischer Primer und Synthese einer komplementären DNA-Kopie durch eine, bis 95°C thermostabile, aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte, Taq-DNA-Polymerase. Durch die zyklischen Wiederholungen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz im Reaktionsansatz.

Reaktionsansatz:

- | | | | |
|----|---|-------|-----|
| ▪ | Template-DNA (100ng/μl) | 0,5 | μl |
| • | dNTPs (10mM) | 1 | μl |
| • | 10x Taq-Polymerase Puffer (-MgCl ₂) | 2 | μl |
| • | MgCl ₂ -Lösung (25mM) | 2 | μl |
| • | Primer FORWARD (10pmol/μl) | 1 | μl |
| • | Primer REVERSE (10pmol/μl) | 1 | μl |
| • | Taq-Polymerase (5U/μl) | 0,15 | μl |
| • | H ₂ O | ad 20 | μl |
| • | Standard-PCR-Programm: | | |
| 1. | 95 °C | 2 | min |
| 2. | 40 Zyklen | | |
| | • 94°C | 30s | |
| | • 50-70°C | 30s | |
| | • 72°C | 30s | |
| 3. | 72 °C | 5 | min |

Die einzelnen Temperatur- und Zeitparameter richten sich nach den jeweiligen Oligonuklotidzusammensetzungen und den zu amplifizierenden Fragmentlängen und müssen genau auf das verwendete Primerpaar abgestimmt werden. Die Reaktionen wurden im Mastercycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt.

3.6. Mikrosatellitenanalyse

Mikrosatelliten Polymorphismen (oftmals als „short tandem repeat polymorphism, STRPs bezeichnet) bestehen aus sich wiederholenden Einheiten, bestehend aus zwei, drei oder vier Nukleotiden (di-, tri-, oder tetranucleotide repeats), die interindividuell unterschiedliche Größen erreichen können. Diese interindividuellen Unterschiede in Bezug auf die Fragmentlängen können somit zur Charakterisierung von Individuen herangezogen werden.

Um die Mikrosatelliten-PCR-Produkte auszuwerten, wurden Polyacrylamid-Gele verwendet, die aus Standardlösungen (ReproGel High Resolution-Gel, Amersham Biosciences (17-6001-08), Freiburg) zusammengesetzt wurden. Diese wurden mit Hilfe des ALFexpress-DNA-Analysers (Amersham Biosciences, Freiburg) ausgewertet. Aufgrund der fluoreszenzmarkierten Primer wurden die entsprechenden Fragmente im Gel beim Passieren der Photozelle nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen Laserstrahl detektiert und mit Hilfe der Computerprogramme ALFwin 1.10 und des Fragment Analyser 1.01 (Amersham Biosciences, Freiburg) als Chromatogramm dargestellt. Außerdem ermöglicht das Computerprogramm die Umformatierung der Kurvendarstellung in Gel-Bandenmuster.

- Ein ReproGel High Resolution-Gel mit 0,3 mm Dicke blasenfrei gießen.
- 2 x 10min UV-Vernetzen (UV-Polymerisation)
- Gelkammer in ALFexpress-DNA-Analyser mit 0,5x TBE-Laufpuffer einsetzen, auf 55°C aufheizen und den Gelkamm herausziehen.
- Elektrophoresebedingungen:
 - V = 1500 V
 - I = 60 mA
 - P = 25 W
 - Temp: 55°C
 - Laufzeit: 300 bp ca. 100min
- Vorbereitung der Proben:
 - 0,5 µl PCR-Produkt
 - 1,5 µl Alf express™ Sizer™ 100
 - 17,5 µl Dye-Loading-Puffer
- Proben 3min bei 82°C denaturieren und auf Eis stellen.
- 2 µl ALFexpress™ Sizer™ 50-500 auf das Gel auftragen.
- 2 µl Probe pro Geltasche auftragen und Elektrophorese beginnen.

4. Ergebnisse

4.1 Der Proband

Die Vorstellung des Patienten in der genetischen Beratungsstelle des Instituts für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erfolgte zur Abklärung eines bis dahin ungeklärten Dysmorphiesyndroms. Der zum Zeitpunkt der Vorstellung 33 Jahre alte Patient war aufgrund diverser Fehlbildungen schon seit der Kindheit in ärztlicher Behandlung gewesen, eine Analyse der genetischen Grundlagen seiner Dysmorphien war jedoch zuvor noch nicht erfolgt.

Geboren wurde der Patient als fünftes von insgesamt 5 Kindern einer gesunden Mutter und eines, vor der Erstkonsultation bereits an einem unklaren Tumorleiden verstorbenen Vaters. Über den genauen Schwangerschafts- und Geburtsverlauf lagen keine Daten vor, anamnestisch waren diese laut der Mutter komplikationslos verlaufen. Bei der klinischen Untersuchung zeigte sich ein 1,56m (< 3 Perzentile) großer und 49,7kg (< 3. Perzentile; BMI 20,5) schwerer Patient. Die Gesichtsdysmorphien umfassten eine antimongoloide Lidachse, leicht hervorstehende Augen mit Ptosis der Augenlider, ein geringer Epikanthus, eine hohe Nasenwurzel, schmale Wangen, ein kurzes Philtrum, eine schmale Ober- sowie eine breite, hervorstehende Unterlippe, sehr enge Kiefer mit Zahnfehlstellungen und ein hypoplastisches Kinn. Die Ohren waren tiefsitzend und im oberen Anteil hypoplastisch. Bei der ophthalmologischen Untersuchung fielen eine geringe Irishypoplasie und ein Strabismus concomitans convergens auf. Die Haut an den Händen und Füßen war hyperkeratotisch und im Bereich der Daumen wurde eine Beugekontraktur der Daumengrundgelenke diagnostiziert. Zusätzlich zeigten sich eine beidseitige 4-Fingerfurche und hypoplastische Fingernägel. Zwischen den 2. und 3. Zehen beider Füße bestand eine partielle kutane Syndaktylie. Bereits 1989 war eine membranöse Aortenstenose sowie ein subaortaler Ventrikelseptumdefekt operativ korrigiert worden. Ein AV-Block Grad I wurde medikamentös therapiert. Des Weiteren zeigte sich eine linksseitige Beckeniere mit normalen Ausscheidungsparametern im durchgeführten Urogramm. Die rechte Niere befand sich in normaler Position. Die psychomotorische Entwicklung des Patienten war verzögert, der Besuch einer Sonderschule mit Schulabschluss jedoch möglich. Zur Zeit der Erstvorstellung war der Patient in einem Gartenbaubetrieb berufstätig.

Abbildung 4.1 zeigt den Stammbaum der Familie. Die farbig markierten Familienmitglieder standen für eine genetische Untersuchung zur Verfügung.

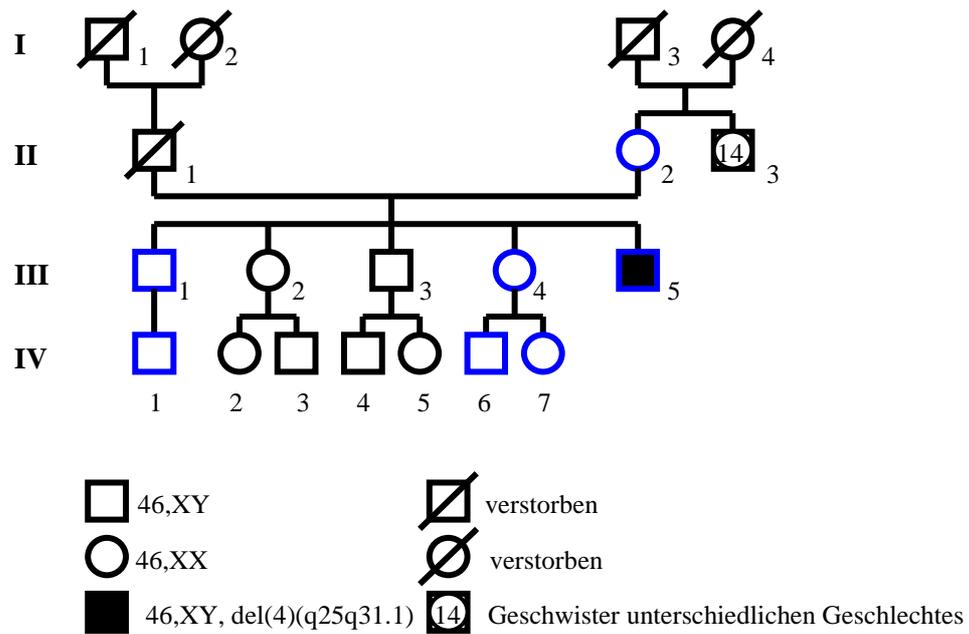


Abb. 4.1: Stammbaum der Familie. Die farbig markierten Personen standen für eine genetische Analyse zur Verfügung.

In der zytogenetischen Routineuntersuchung fiel bei dem Patienten eine de novo entstandene interstitielle Deletion der Banden 4q25-q28 auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Zusammenhang mit den phänotypischen Auffälligkeiten eine Assoziation mit dem so genannten Rieger-Syndrom vermutet. Abbildung 4.2 zeigt die beiden Chromosomen 4 des Patienten in der zytogenetischen Darstellung mittels *G-Banding* (500 G-Bandenstadium) sowie als Ideogramm mit den auf zytogenetischen Daten basierenden Bruchpunktregionen.

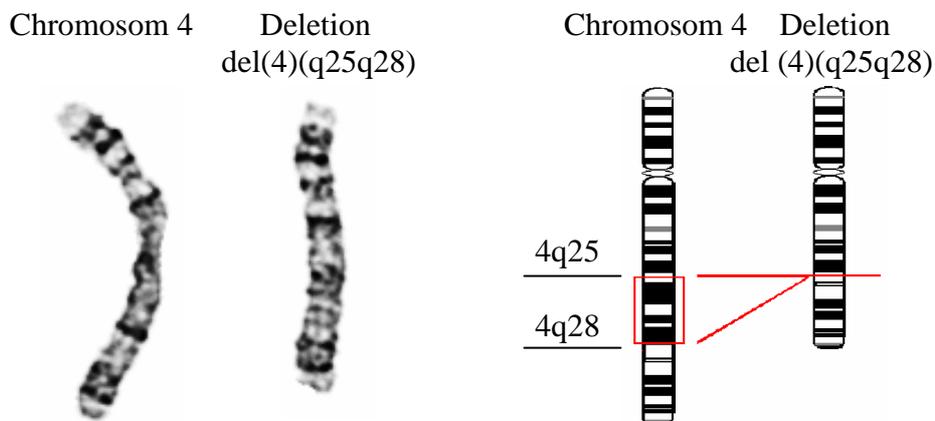


Abb. 4.2: *G-Bandendarstellung* und *Ideogramm* der beiden Chromosomen 4 des Patienten mit zytogenetisch ermittelter Deletion del(4)(q25q28).

4.2. Ausschluss einer Deletion des Gens PITX2

Zum Ausschluss eines Rieger-Syndroms sollte eine mit der Deletion der Bande 4q25 einhergehende Haploinsuffizienz des betreffenden Gens – PITX2 – ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurde ein BAC-Klon ausgewählt, der den Bereich, in dem das Gen lokalisiert wurde, überspannt. Als geeigneter Klon erwies sich BAC-Klon RP11-380D23, dessen Lokalisation schematisch in Abbildung 4.3 dargestellt ist.

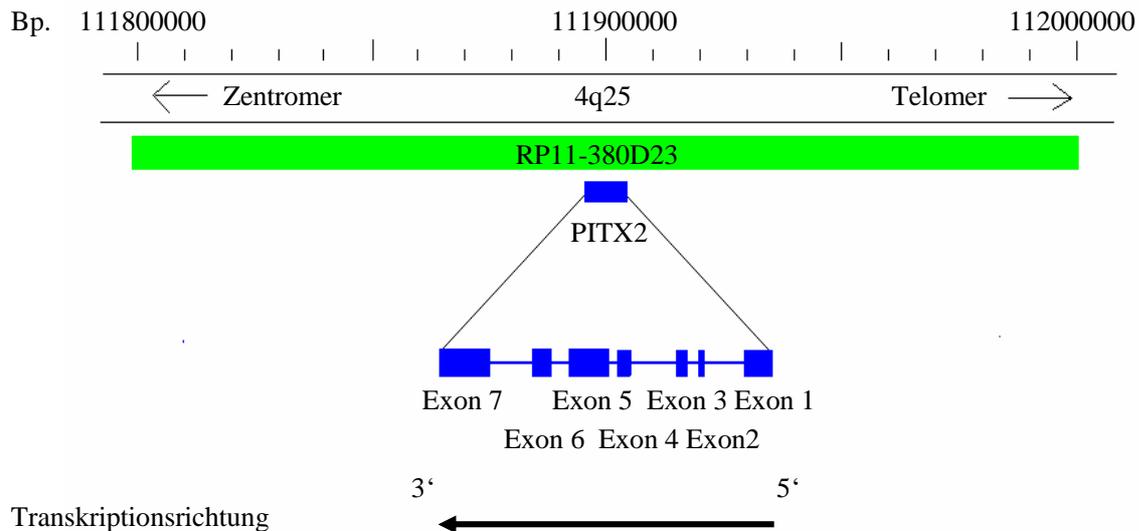


Abb. 4.3: Schematische Darstellung des BAC-Klons RP11-380D23, sowie des Gens PITX2.

Bei der Auswertung der FISH an 50 Metaphasen konnte keine Deletion des Klons RP11-380D23 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis sollte anschließend durch eine genaue Bruchpunktanalyse verifiziert werden.

Eine erste Orientierung dazu ergab die mittels *G-Banding* durchgeführte Deletionsanalyse, in der die Deletion im Bereich der Banden 4q25-q28 vermutet wurde. Da das Auflösungsvermögen der für die Chromosomenuntersuchung in der Routine gebräuchlichen GTG-Technik (*G-bands by trypsin using Giemsa*) nur zwischen 5-10 Mb (Shaffer, 1997, Uhrig et al. 1999), bzw. zwischen 2-5 Mb bei der später eingeführten hochauflösenden *High-Resolution*-Technik (Uhrig et al. 1999) liegt, schloss sich im weiteren Verlauf der Arbeit eine genauere, molekulargenetische Analyse der betroffenen Regionen an. Zu diesem Zweck sollten die Bruchpunktregionen zunächst mit Hilfe von BAC-Klonen durch Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) möglichst exakt eingegrenzt werden. BAC-Klone stellen auf Grund einer mittleren Insertgröße von etwa 150 kb besonders geeignete Proben für eine

Hybridisierung an Metaphasechromosomen dar. Um geeignete BAC-Klone auswählen zu können, wurde eine *in-Silico*-Analyse der deletierten Region vorgenommen. Zu diesem Zweck bietet die Online-Datenbank der *University of California* (UCSC) den Service eines *Genome Browsers* an, mit dessen Hilfe es möglich ist, Sequenzdaten des humanen Genoms sowie ständig aktualisierte Versionen zytogenetischer, genetischer und physikalischer Karten einzusehen. Unter anderem sind darin anhand ihrer Start- und Endsequenzen lokalisierte BAC-Klone graphisch im Rahmen eines genomischen *Contigs* dargestellt. Tabellen 4.1a/b zeigen eine Liste der für diese Arbeit ausgewählten BAC-Klone. Deren Lage wurde als Start- und Endpunkt in Basenpaaren aufgrund der vorliegenden Sequenzdaten von Chromosom 4 angegeben.

Tab. 4.1a: *Liste der zur Bruchpunktcharakterisierung des proximalen Bruchpunktes verwendeten BAC-Klone.*

RZPD – Name	Name	Lokalisation	Start * (bp)	End * (bp)
RPCIB753J0981Q2	RP11-81J9	4q25	109950873	110105012
RPCIB753H0642Q2	RP11-42H6	4q25	111569952	111749862
RPCIB753D23380Q2	RP11-380D23	4q25	111798602	112000228
RPCIB753B13313Q2	RP11-313B13	4q25	111998229	112064708
RPCIB753A0457Q2	RP11-57A4	4q25	112214219	112371395
RPCIB753M21265Q2	RP11-265M21	4q25	112380189	112545500
RPCIB753N15326Q2	RP11-326N15	4q25	112453996	112642941
RPCIB753D1818Q2	RP11-18D18	4q25	112622694	112639941
RPCIB753E2391Q2	RP11-91E23	4q25	112736421	112882443

Tab. 4.1b: *Liste der zur Bruchpunktcharakterisierung des distalen Bruchpunktes verwendeten BAC-Klone.*

RPCIB753I1879Q2	RP11-79I18	4q28.1	126075388	126253109
RPCIB753P2011Q2	RP11-11P20	4q28.1-28.2	128874744	129034162
RPCIB753J0994Q2	RP11-94J9	4q28.3	134472730	134624523
RPCIB753A0160Q2	RP11-60A1	4q28.3	137581626	137761312
RPCIB753C07733Q2	RP11-733C7	4q28.3	139503214	139664503
RPCIB753I2489Q2	RP11-89I24	4q31.1	140215007	140355384
RPCIB753P06435Q2	RP11-435P6	4q31.1	140311160	140502686
RPCIB753K201062Q2	RP11-1062K20	4q31.1	140469428	140650003
RPCIB753E17258Q2	RP11-258E17	4q31.1	140582003	140725924
RPCIB753O0822Q2	RP11-22O8	4q31.1	141028896	141088687

*Lokalisation anhand der Start- und Endsequenzen in Basenpaaren aufgrund der vorliegenden Sequenzdaten von Chromosom 4 (<http://genome.ucsc.edu>)

4.3. FISH-Untersuchungen zur Identifizierung der Deletionsbruchpunkte

Die ausgewählten BAC-Klone wurden gemäß der in 3.2 dargestellten Art und Weise präpariert und auf Metaphasechromosomen des Patienten hybridisiert. Nach Detektion und Amplifikation der Sonden, sowie DAPI- und Propidiumiodidfärbung der Präparate konnten diese am Mikroskop mit Hilfe der ISIS 3 Computersoftware analysiert werden. Dazu wurden jeweils 50 Metaphasen sowohl auf ihre Vollständigkeit, als auch auf die korrekte Lage der Signale hin untersucht. Die Identifizierung der beiden Chromosomen 4 erfolgte dabei anhand des charakteristischen DAPI-Bandenmusters. Zeigten sich auf beiden Chromosomen 4 spezifische Signale, so wurden die jeweiligen Regionen als „nicht deletiert“ gewertet. Ließen sich nur auf einem Chromosom Signale nachweisen, wurde diese Region als „deletiert“ angesehen, sofern in keiner der analysierten Metaphasen Signale auf dem deletierten Chromosom in diesem Bereich beobachtet werden konnten. Im Folgenden sind die Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse der Bruchpunktregionen mittels der FISH Methode dargestellt.

4.3.1. Lokalisierung des proximalen Bruchpunktes

Wie bereits erwähnt, konnte der proximale Bruchpunkt durch zytogenetische Voruntersuchungen im Bereich der Bande 4q25 lokalisiert werden. Zur genaueren Eingrenzung standen insgesamt 9 BAC-Klone zur Verfügung. Für jeden dieser BAC-Klone sind im Folgenden die Ergebnisse der FISH-Analysen dargestellt.

BAC RP11-81J9

Die Größe des BAC-Insert beträgt ca. 154 kb. Wie in Abbildung 4.4 dargestellt, konnten sowohl auf dem veränderten, als auch auf dem unauffälligen Chromosom 4 spezifische Signale im Bereich der Bande 4q25 lokalisiert werden. Der BAC-Klon wurde daher als „nicht deletiert“ gewertet und liegt proximal des zentromerischen Bruchpunktes.

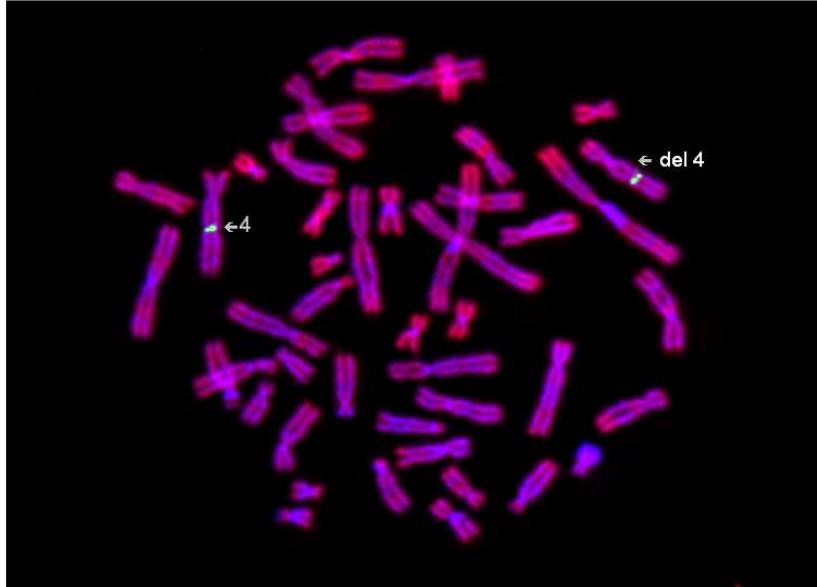


Abb. 4.4: *FISH mit dem BAC RP11-81J9 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4, mit jeweils deutlichen Fluoreszenzsignalen.*

BAC RP11-42H6

Das Insert dieses BAC-Klons ist etwa 180 kb groß. Auf beiden Chromosomen 4 konnten spezifische FISH-Signale auf Bande 4q25 lokalisiert werden. Die durch den BAC-Klon analysierte Region liegt somit proximal des oberen Bruchpunktes und ist nicht deletiert. Hybridisierungsbeispiele zeigt Abbildung 4.5.

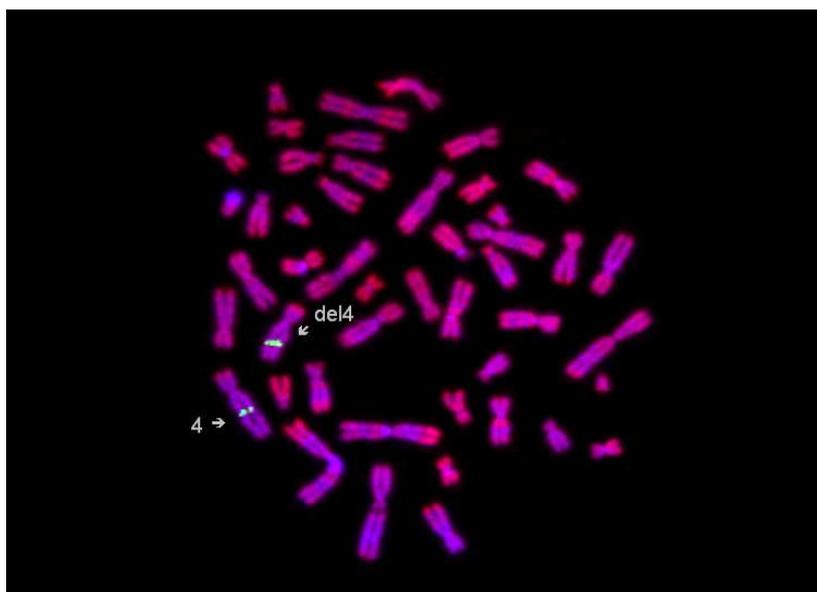


Abb. 4.5: *FISH mit dem BAC RP11-42H6 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die Chromosom 4, mit jeweils deutlichen Fluoreszenzsignalen*

BAC RP11-380D23

Dieser Klon wurde bereits im Abschnitt 3.2 zum Ausschluss einer Deletion des Gens PITX2 schematisch dargestellt. Die Insertgröße dieses Klons beträgt 202 kb. Spezifische Signale konnten sowohl auf dem normalen, als auch auf dem deletierten Chromosom 4 im Bereich der Bande 4q25 lokalisiert werden. BAC RP11-380D23 liegt somit proximal des oberen Bruchpunktes und wurde als nicht deletiert bewertet. Hybridisierungsbeispiele zeigt Abbildung 4.6.

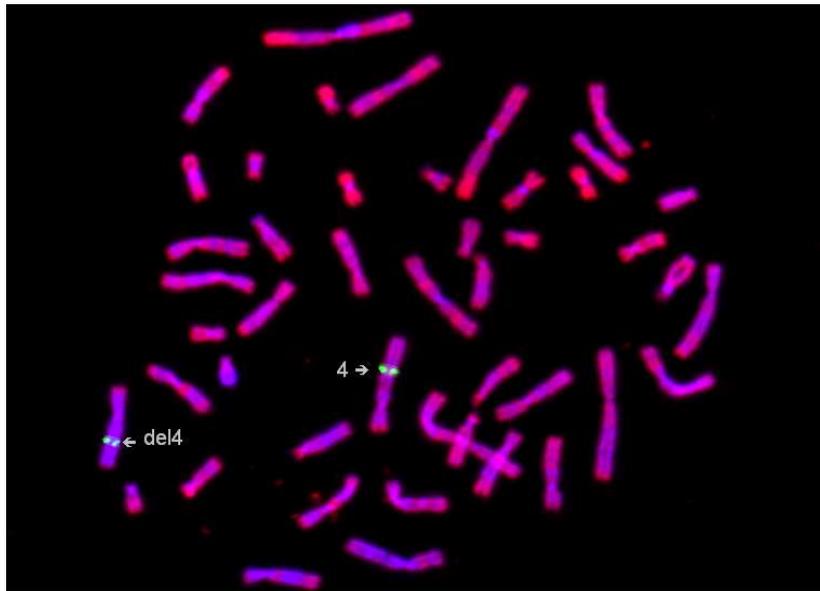


Abb. 4.6: *FISH mit dem BAC RP11-380D23 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4, mit jeweils deutlichen Fluoreszenzsignalen.*

BAC RP11-313B13

Abbildung 4.7 zeigt ein Hybridisierungsbeispiel einer FISH, in der auf beiden Chromosomen 4 im Bereich der Bande 4q25 spezifische Signale identifiziert werden konnten. Der Insertgröße entsprechend, ist der ca. 66 kb große, durch den BAC-Klon überspannte Bereich nicht deletiert.

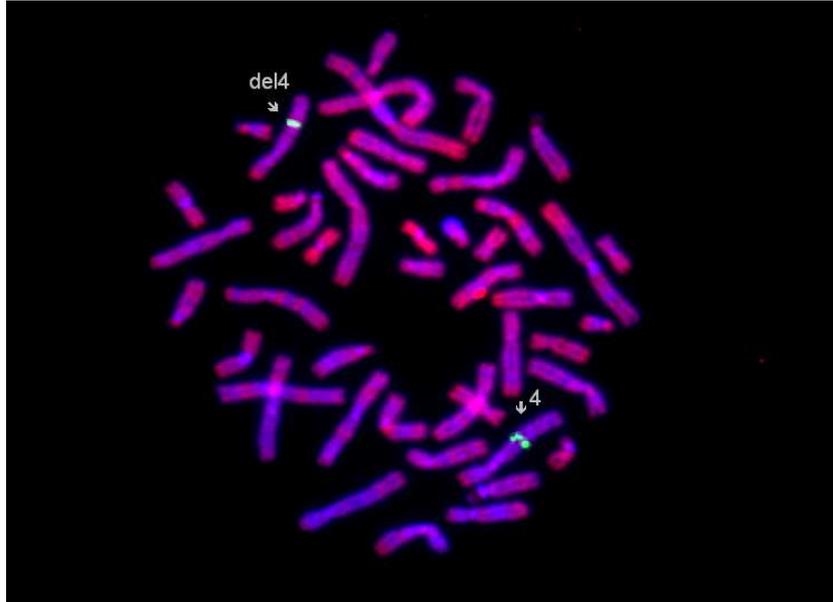


Abb. 4.7: *FISH mit dem BAC RP11-313B13 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4 mit jeweils deutlichen Fluoreszenzsignalen.*

BAC RP11-57A4

Die Größe des Insert beträgt 157 kb. Spezifische Signale zeigten sich auf beiden Chromosomen 4 im Bereich der Bande 4q25. Dieser BAC ist daher als „nicht-deletiert“ zu werten und liegt proximal des zentromerischen Bruchpunktes. Ein Hybridisierungsbeispiel an einer Metaphase zeigt Abbildung 4.8.

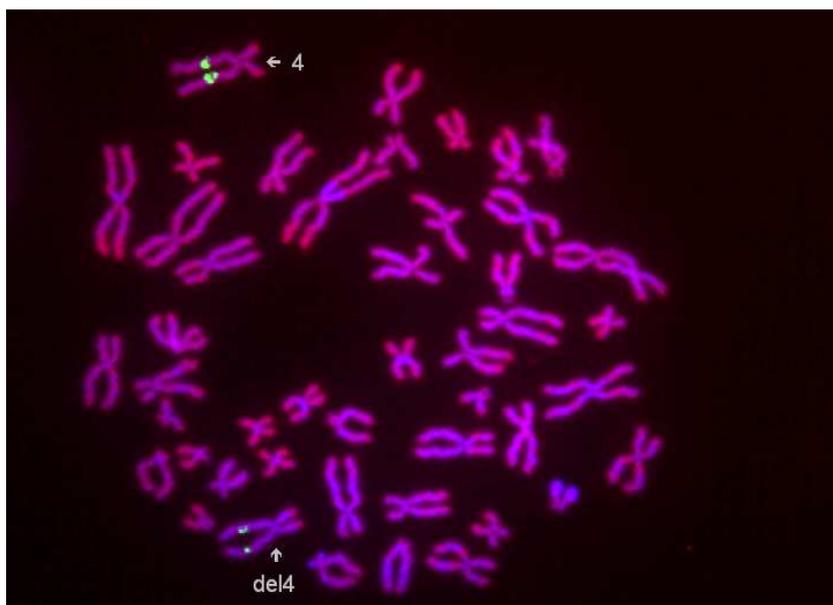


Abb. 4.8: *FISH mit dem BAC RP11-57A4 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4, mit jeweils deutlichen Fluoreszenzsignalen.*

BAC RP11-265M21

Wie in Abbildung 4.9 dargestellt, konnten Signale auf beiden q-Armen der Chromosomen 4 im Bereich der Bande 4q25 lokalisiert werden. Die Größe des Insert ist ca. 165 kb. Dieser Klon ist somit als nicht-deletiert zu werten und liegt proximal des oberen Bruchpunktes.

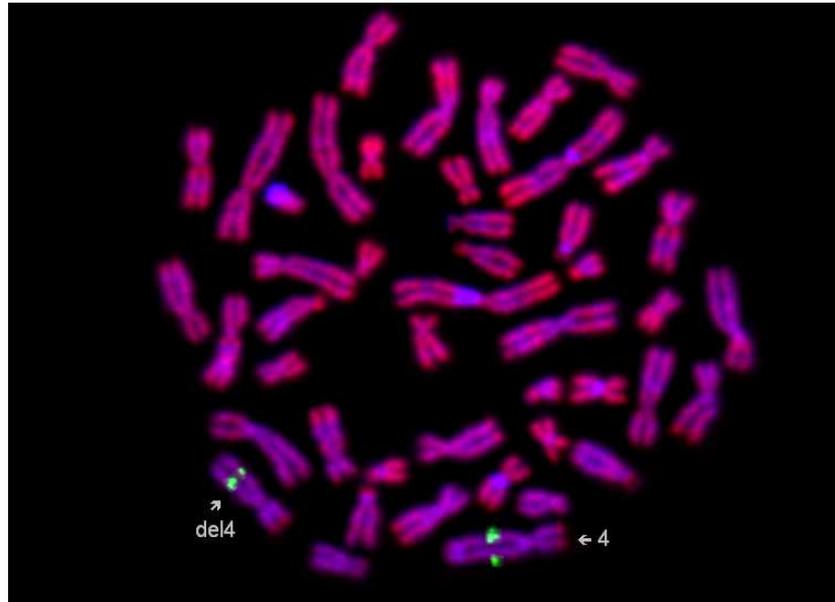


Abb. 4.9: *FISH mit dem BAC RP11-265M21 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4, mit jeweils deutlichen Fluoreszenzsignalen.*

BAC RP11-326N15

Signale konnten, wie in Abbildung 4.10 dargestellt, jeweils nur auf dem unauffälligen Chromosom 4 im Bereich 4q25 lokalisiert werden. Es wurden keinerlei Signale auf dem deletierten Chromosom 4 beobachtet, so dass die der ca. 189 kb großen Insert entsprechende genomische Sequenz zum größten Teil deletiert ist.

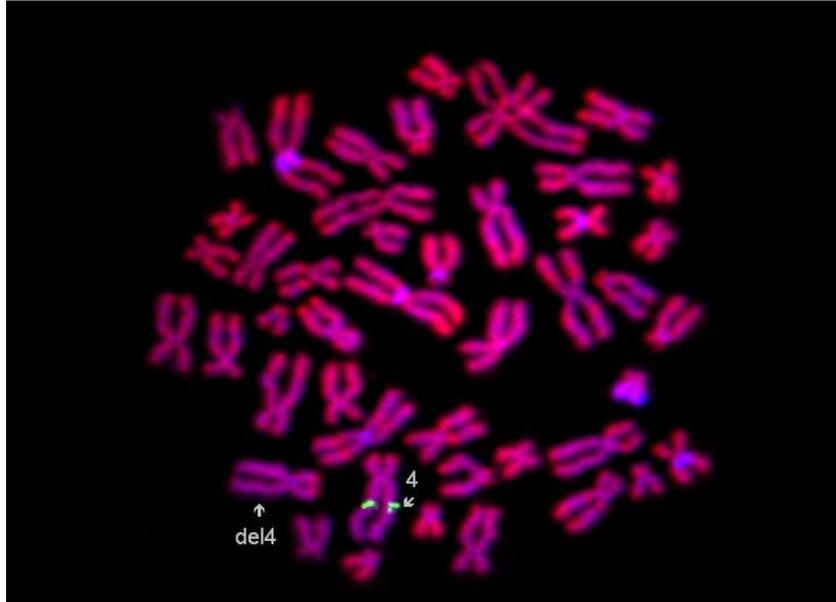


Abb. 4.10: *FISH mit dem BAC RP11-326N15 an einer Metaphase des Patienten. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Deutlich erkennbar ist, dass Fluoreszenzsignale nur auf dem unauffälligen Chr. 4 detektierbar sind.*

BAC RP11-18D18

Spezifische Signale traten ausschließlich auf dem unauffälligen Chromosom 4 im Bereich der Bande 4q25 auf. Es wurden keinerlei Signale auf dem deletierten Chromosom 4 beobachtet. Die durch den Klon überspannte 17kb große Region ist somit als deletiert charakterisiert worden. Ein Hybridisierungsbeispiel zeigt Abbildung 4.11.

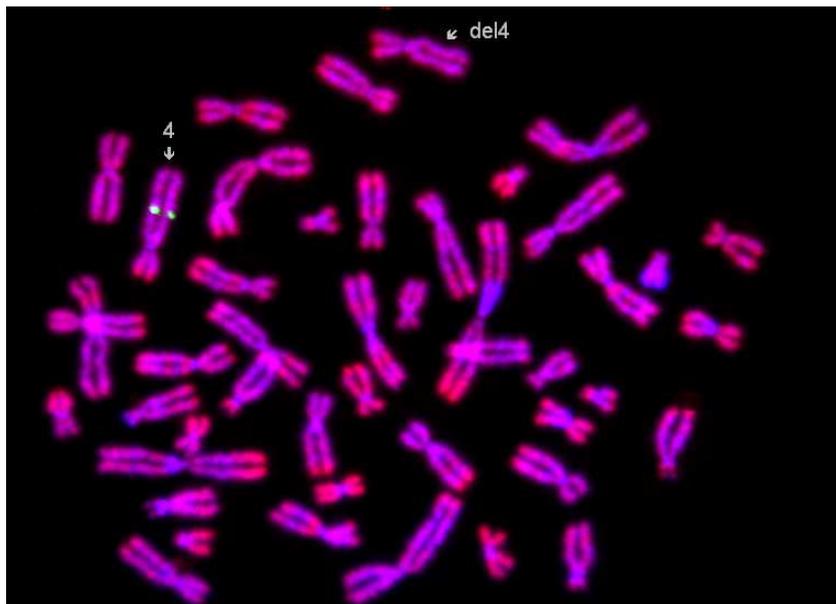


Abb. 4.11: *FISH mit dem BAC RP11-18D18 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind nur auf dem unauffälligen Chr. 4 Signale erkennbar.*

BAC RP11-91E23

Ausschließlich auf dem unauffälligen Chromosom 4 im Bereich 4q25 waren Fluoreszenzsignale sichtbar, während auf dem deletierten Chromosom 4 keine Signale beobachtet werden konnten. Daraus folgt, dass der Klon 91E23 deletiert ist. Die Insertgröße beträgt ca. 146 kb. Hybridisierungsbeispiele zeigt Abbildung 4.12.

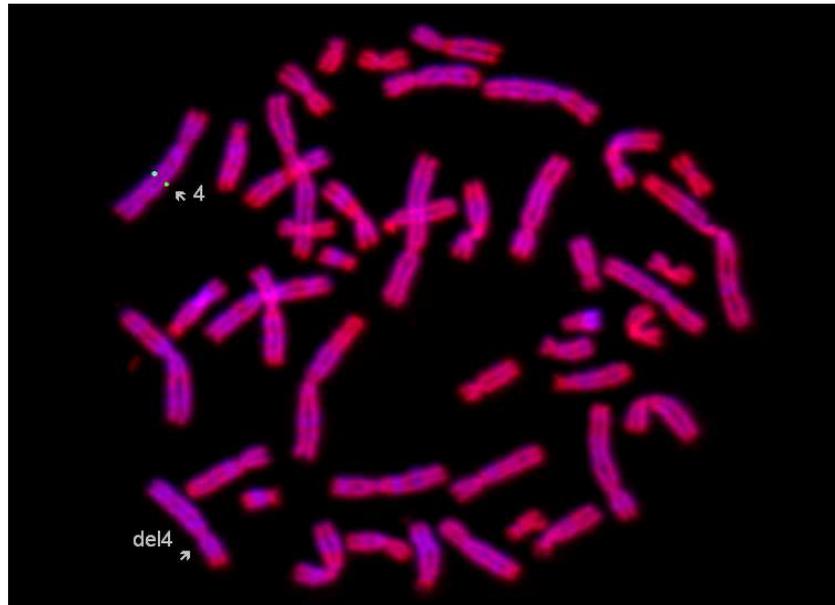


Abb. 4.12: FISH mit dem BAC RP11-91E23 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind nur auf dem unauffälligen Chr. 4 Signale erkennbar.

4.3.2. Darstellung der proximalen Bruchpunktregion

Bei 6 von insgesamt 9 verwendeten BAC-Klonen konnten Signale auf beiden Chromosomen 4 nachgewiesen werden. Diese wurden daher allesamt als nicht deletiert eingestuft. Als deletiert hingegen konnten insgesamt 3 BAC-Klone klassifiziert werden, die in der FISH-Analyse ausschließlich auf dem nicht betroffenen Chromosom 4 Fluoreszenzsignale ergaben. Aufgrund der unter 4.3.1 beschriebenen Hybridisierungsergebnisse kann der proximale Bruchpunkt in der Region 4q25 auf den Sequenzbereich eingegrenzt werden, den die beiden BAC-Klone RP11-265M21 und RP11-326N15 abdecken. Diese überlappen sich in einem ca. 92 kb großen Segment. Der Bruchpunkt wird zusätzlich durch den ebenfalls deletierten BAC-Klon RP11-18D18 weiter eingegrenzt. Dessen Lokalisation überschneidet sich teilweise mit derjenigen von RP11-326N15. In Tabelle 4.2 sind die FISH-Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst. Zusätzlich sind in Abbildung 4.13 die Anordnung der BAC-Klone sowie der eingegrenzte, ca. 242 kb große Bruchpunktbereich schematisch dargestellt.

Tab. 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der FISH-Analysen zur Charakterisierung des proximalen Bruchpunktes.

Name	Lokalisation	Start *	End *	FISH-Ergebnis
RP11-81J9	4q25	109950873	110105012	Nicht deletiert
RP11-42H6	4q25	111569952	111749862	Nicht deletiert
RP11-380D23	4q25	111798602	112000228	Nicht deletiert
RP11-313B13	4q25	111998229	112064708	Nicht deletiert
RP11-57A4	4q25	112214219	112371395	Nicht deletiert
RP11-265M21	4q25	112380189	112545500	Nicht deletiert
RP11-326N15	4q25	112453996	112642941	Deletiert
RP11-18D18	4q25	112622694	112639941	Deletiert
RP11-91E23	4q25	112736421	112882443	Deletiert

*Lokalisation anhand der Start- und Endsequenzen in Basenpaaren vom Telomer des p-Armes des Chromosom 4 aus gezählt (<http://genome.ucsc.edu>)

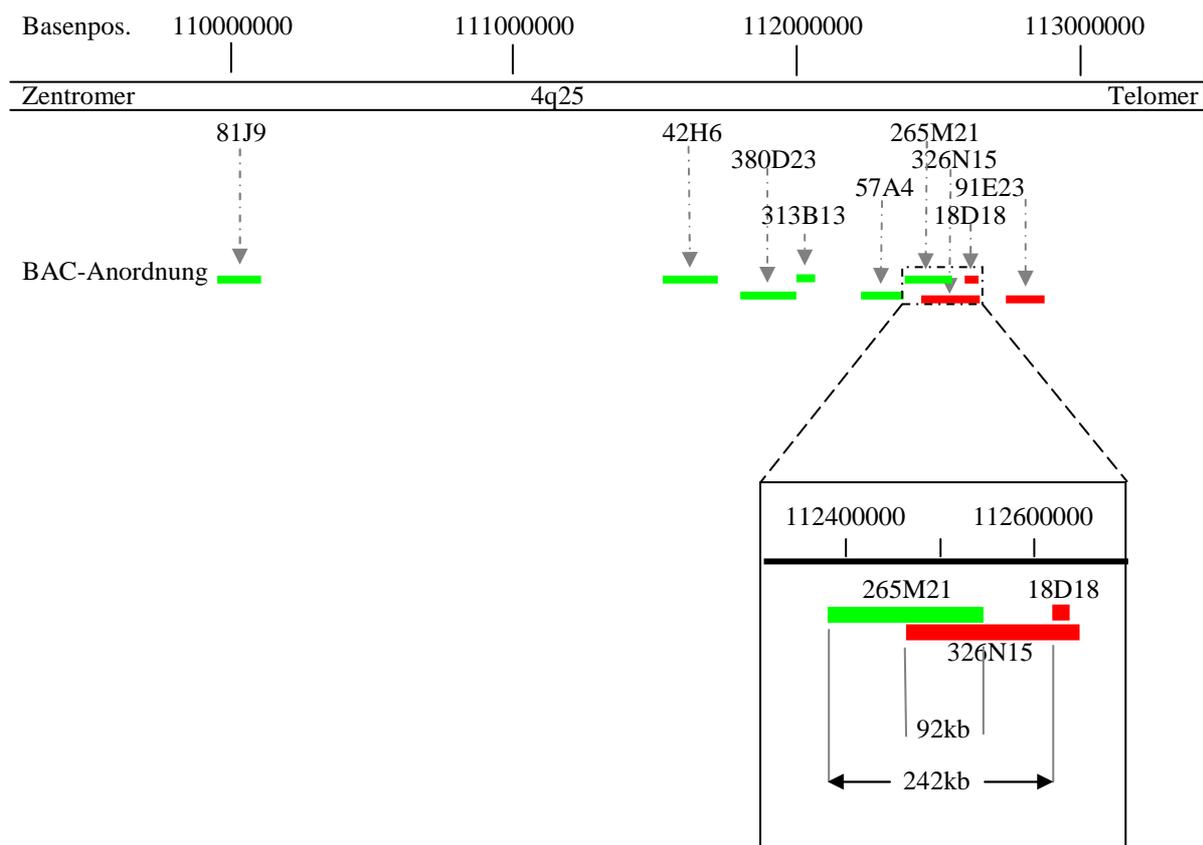


Abb. 4.13: Schematische Darstellung der Position der zur Bruchpunktanalyse des proximalen Bruchpunktes ausgewählten BAC-Klone sowie der proximalen Bruchpunktregion mit den eingrenzenden BAC-Klonen RP11-265M21, -326N15 und -18D18. Deletierte BAC-Klone sind rot, nicht deletierte BAC-Klone grün dargestellt.

In Abbildung 4.14 ist des Weiteren die Lokalisation der proximalen Bruchpunktregion in Bezug auf den Genlocus des Gens PITX2 dargestellt. Das Gen wird in Richtung des Zentromers transkribiert. Der Bruchpunkt ist etwa 550 kb vom 5' Anfang des Gens entfernt lokalisiert. Mit Hilfe einschlägiger Datenbanken (OMIM, UCSC Genome Browser) konnten in diesem Bereich bisher keine weiteren Gene identifiziert werden.

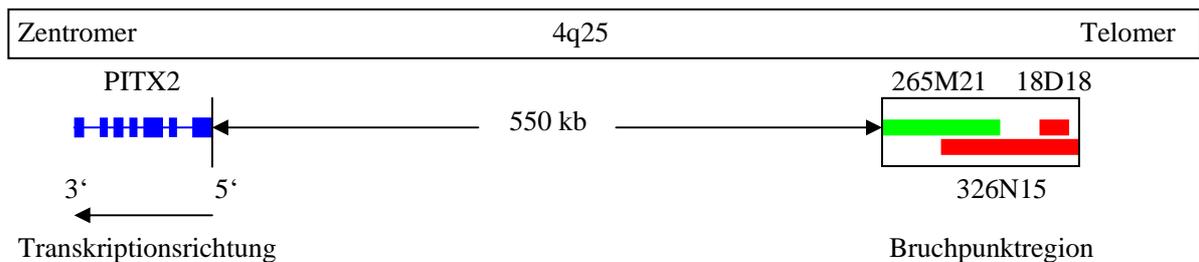


Abb. 4.14: Schematische Darstellung des proximalen Bruchpunktes (mit den eingrenzenden BAC-Klonen RP11-265M21, -326N15 und -18D18) in Bezug auf das Gen PITX2.

4.3.3. Lokalisierung des distalen Bruchpunktes

Zur Charakterisierung des distalen Deletionsbruchpunktes wurden insgesamt 10 BAC-Klone ausgewählt, welche bereits in Tabelle 4.1b aufgeführt wurden. Die durch zytogenetische Analyse mittels *G-Banding* zu erwartende Bruchpunktregion wurde im Bereich der Bande 4q28 festgelegt. Ziel war es, entsprechend der Charakterisierung des proximalen Bruchpunktes, überlappende BAC-Klone zu identifizieren, die den Bereich des distalen Bruchpunktes tragen. Im Folgenden sind Hybridisierungsbeispiele der einzelnen BAC-Klone aufgeführt.

BAC RP11-79I18

178 kb misst das Insert dieses Klons. Bei der FISH Auswertung zeigten sich spezifische Signale auf dem unauffälligen Chromosom 4 in dem erwarteten Bereich der Bande 4q28, jedoch keine auf dem deletierten Chromosom 4. Aufgrund dieser Beobachtung ist zu folgern, dass der Bruchpunkt distal des durch den Klon überspannten Bereiches liegt. Ein Hybridisierungsbeispiel zeigt Abbildung 4.15.

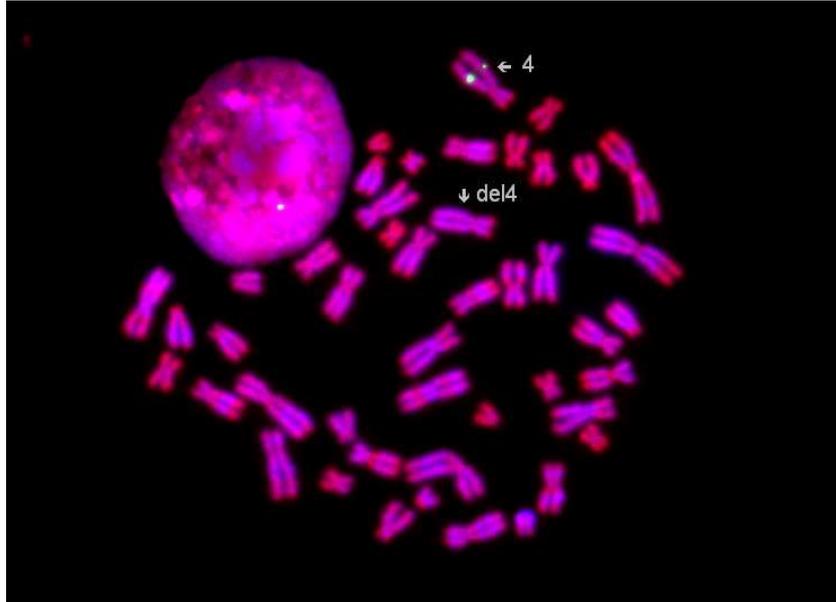


Abb. 4.15: *FISH mit dem BAC RP11-79118 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind nur auf dem unauffälligen Chr. 4 Signale erkennbar.*

BAC RP11-11P20

Signale, nach Hybridisierung des 159 kb großen BAC-Inserts, konnten jeweils nur auf dem unauffälligen Chromosom 4, nicht jedoch auf dem Deletierten beobachtet werden. In Abbildung 4.16 ist ein Hybridisierungsbeispiel dargestellt. Die analysierte Region wurde als deletiert gewertet.

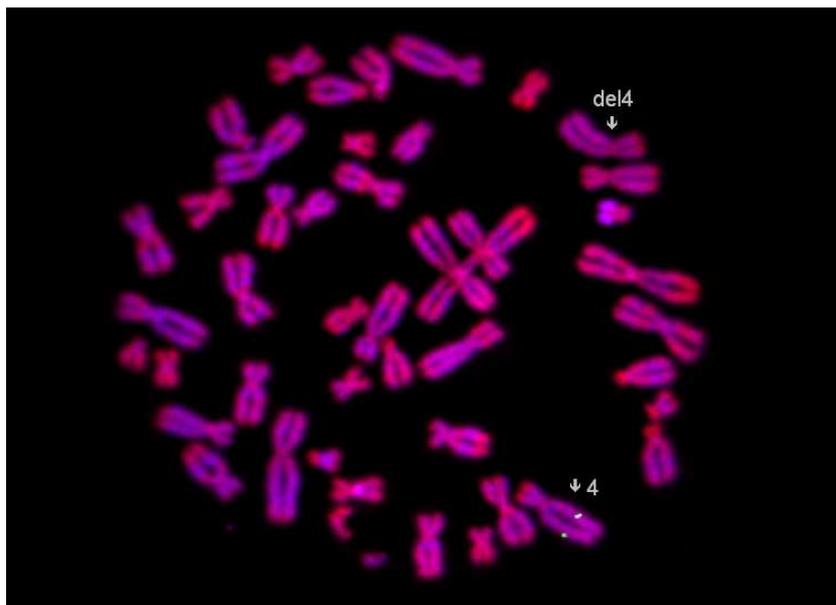


Abb. 4.16: *FISH mit dem BAC RP11-11P20 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind nur auf dem unauffälligen Chr. 4 Signale erkennbar.*

BAC RP11-94J9

Das Insert dieses BAC-Klones hat eine Größe von 152 kb. Bei der FISH-Auswertung konnten spezifische Signale ausschließlich auf dem unauffälligen, jedoch nicht auf dem deletierten Chromosom 4 identifiziert werden. Daraus ist zu schließen, dass dieser Bereich deletiert ist. Ein Hybridisierungsbeispiel zeigt Abbildung 4.17.

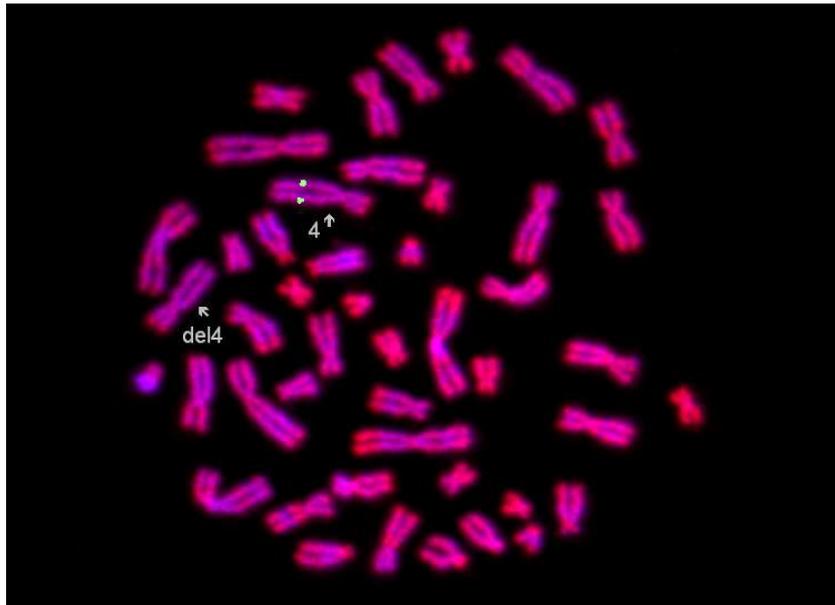


Abb. 4.17: *FISH mit dem BAC RP11-94J9 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind nur auf dem unauffälligen Chr. 4 Signale erkennbar.*

BAC RP11-60A1

Es konnten auf dem normalen Chromosom 4 Signale lokalisiert werden, während auf dem deletierten Chromosom keinerlei Signale beobachtet werden konnten. Dieser Bereich, entsprechend des Inserts mit einer Größe von etwa 180 kb, gilt somit als deletiert. Ein Hybridisierungsbeispiel zeigt Abbildung 4.18.

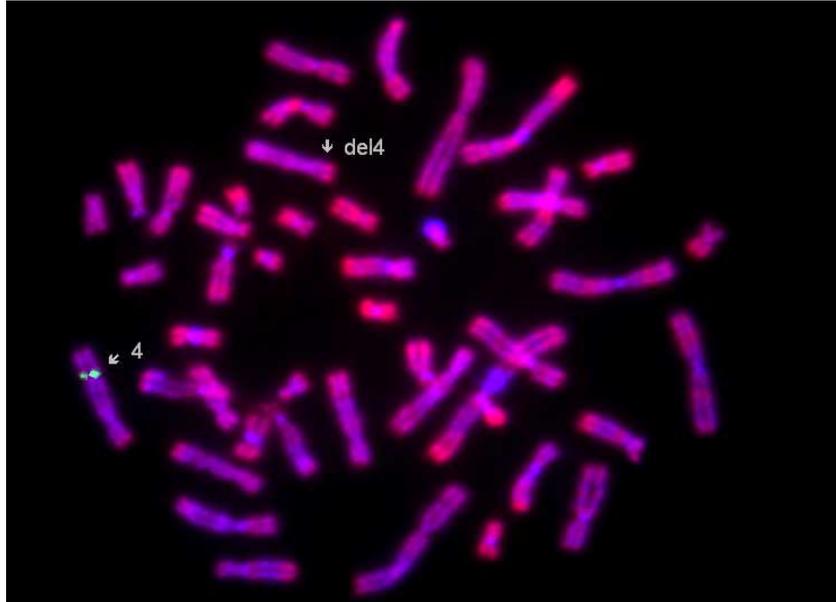


Abb. 4.18: *FISH mit dem BAC RP11-60A1 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind nur auf dem unauffälligen Chr. 4 Signale erkennbar.*

BAC RP11-733C7

Die Insertgröße beträgt etwa 161 kb. In den ausgewerteten Metaphasen konnten jeweils auf dem unauffälligen, nicht jedoch auf dem deletierten Chromosom 4 auf Bande 4q28.3 Fluoreszenzsignale beobachtet werden. Daraus ist zu folgern, dass die genannte Region deletiert ist. Ein Hybridisierungsbeispiel zeigt Abbildung 4.19.

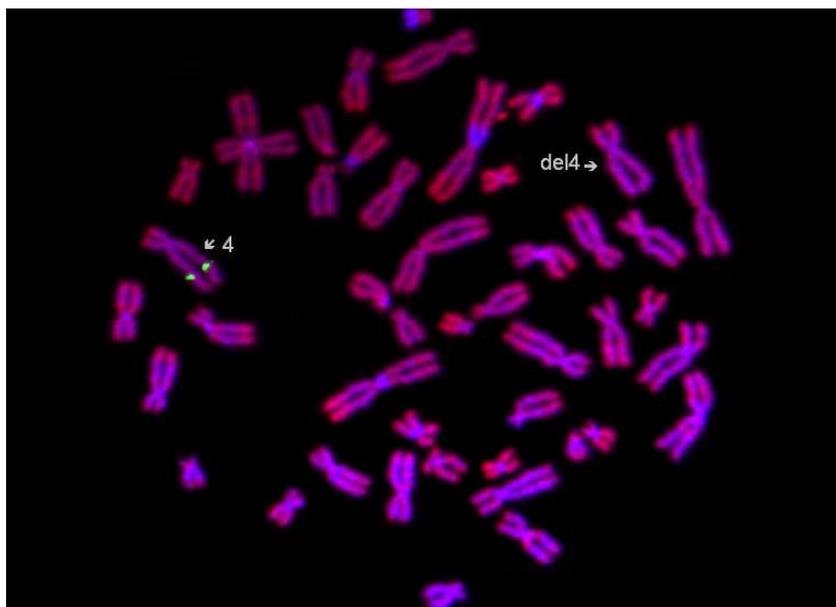


Abb. 4.19: *FISH mit dem BAC RP11-733C7 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind nur auf dem unauffälligen Chr. 4 Signale erkennbar.*

BAC RP11-89I24

140 kb im Bereich der Bande 4q31.1 überspannt das Insert dieses BAC-Klons. In den 50 ausgewerteten Metaphasen konnten Signale in dem erwarteten Bereich auf dem unauffälligen Chromosom 4, nicht jedoch auf dem deletierten beobachtet werden. Dieser Klon wurde somit als deletiert charakterisiert. Ein Hybridisierungsbeispiel zeigt Abbildung 4.20.

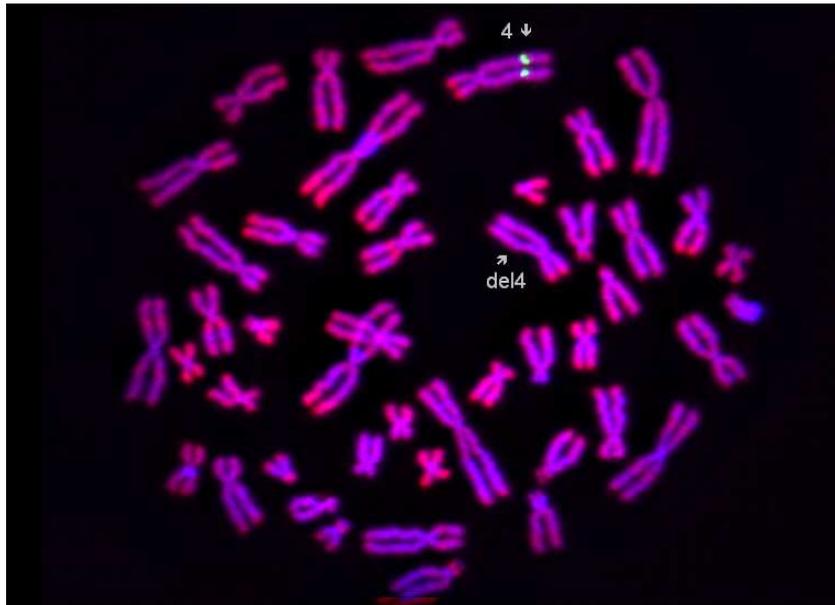


Abb. 4.20: *FISH mit dem BAC RP11-89I24 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind nur auf dem unauffälligen Chr. 4 Signale erkennbar.*

BAC RP11-435P6

Die Größe des Inserts beträgt etwa 192 kb. Bei der FISH-Analyse zeigten sich auf dem unauffälligen Chromosom 4 deutliche Fluoreszenzsignale. Auf dem deletierten Chromosom 4 wurden keinerlei Signale beobachtet. Die durch den Klon analysierte Region wurde somit als deletiert betrachtet. Ein Hybridisierungsbeispiel zeigt Abbildung 4.21.

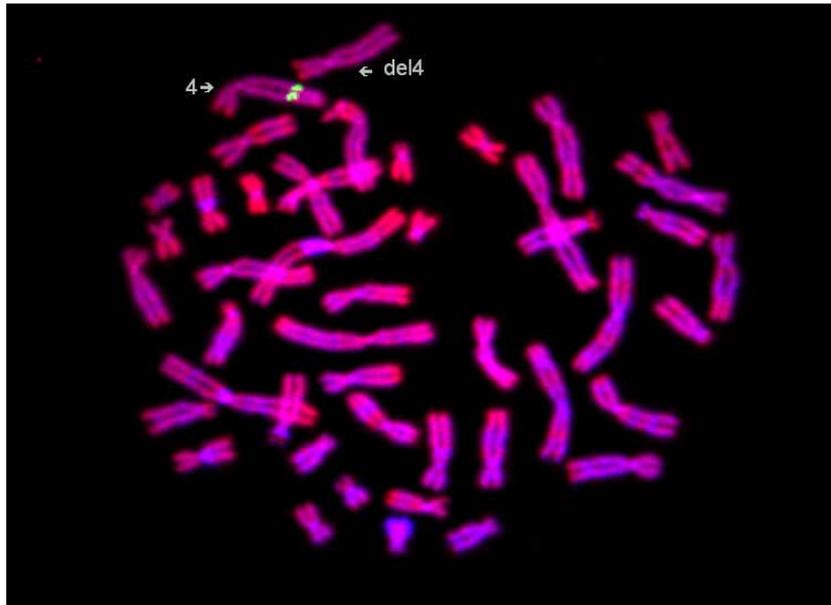


Abb. 4.21: *FISH mit dem BAC RP11-435P6 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind nur auf dem unauffälligen Chr. 4 Signale erkennbar.*

BAC RP11-1062K20

Bei diesem BAC-Klon konnten anhand der DAPI-Färbung Signale sowohl auf dem deletierten, als auch auf dem unauffälligen Chromosom 4 auf Bande 4q31.1 beobachtet werden. Entsprechend der Insertgröße des BAC-Klons hat die analysierte Region eine Größe von 181 kb. Ein Hybridisierungsbeispiel der FISH zeigt Abbildung 4.22. Den Ergebnissen zufolge ist die analysierte Region nicht deletiert.

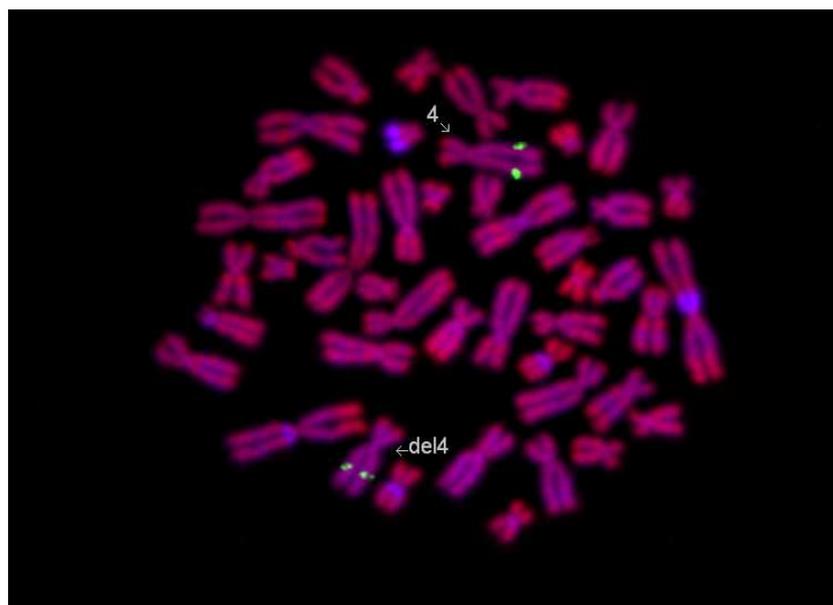


Abb. 4.22: *FISH mit dem BAC RP11-1062K20 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind auf beiden Chr. 4 Signale erkennbar.*

BAC RP11-258E17

Die Insertgröße dieses BAC-Klons beträgt 144 kb. Bei der Auswertung der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung konnten in den Metaphasen Signale auf Bande 4q31.1 bei beiden, anhand der DAPI-Färbung identifizierten, Chromosomen 4 lokalisiert werden. Daraus folgt, dass diese Region nicht deletiert ist. Ein Hybridisierungsbeispiel zeigt Abbildung 4.23.

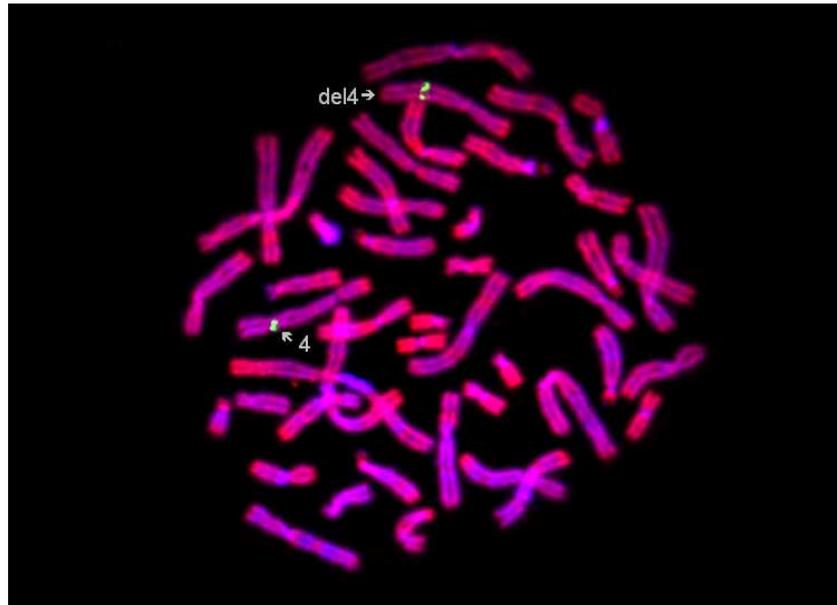


Abb. 4.23: *FISH mit dem BAC RP11-258E17 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind auf beiden Chr. 4 Signale erkennbar.*

BAC RP11-2208

Sowohl auf dem deletierten, als auch auf dem unauffälligen Chromosom 4 konnten im Bereich der Bande 4q31.1 Signale geortet werden. Die durch den BAC-Klon überspannte, 60 kb große Region, muss somit als nicht deletiert gelten. Ein Hybridisierungsbeispiel zeigt Abbildung 4.24.

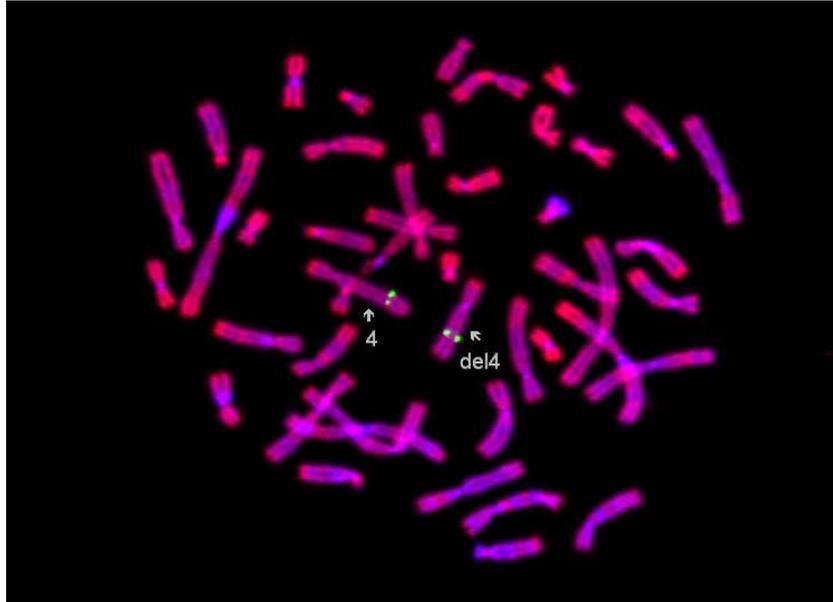


Abb. 4.24: FISH mit dem BAC RP11-22O8 an einer Metaphase des Probanden. Die Pfeile deuten auf die beiden Chr. 4. Es sind auf beiden Chr. 4 Signale erkennbar.

4.3.4. Darstellung der distalen Bruchpunktregion

Bei 7 von insgesamt 10 verwendeten BAC-Klonen konnten Signale ausschließlich auf dem nicht betroffenen Chromosom 4 nachgewiesen werden. Diese wurden daher allesamt als deletiert eingestuft. Als nicht-deletiert hingegen konnten insgesamt 3 BAC-Klone klassifiziert werden, die in der FISH-Analyse auf beiden Chromosomen 4 Fluoreszenzsignale ergaben. In Tabelle 4.3 sind die FISH-Ergebnisse aus 4.3.3 tabellarisch aufgeführt. Zusätzlich sind in Abbildung 4.25 die Anordnung der BAC-Klone sowie der eingegrenzte Bruchpunktbereich schematisch dargestellt. Der distale Bruchpunkt konnte mit Hilfe der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung zwischen den BAC-Klonen RP11-435P6 (deletiert) und RP11-1062K20 lokalisiert werden. Diese BAC-Klone überlappen sich in einem 33 kb großen Fragment. Zusätzlich wird der Bruchpunkt durch die BAC-Klone RP11-89I24 (deletiert) und RP11-258E17 weiter eingegrenzt. Die Bruchpunktregion konnte somit auf ein 226 kb großes Segment im Bereich der Bande 4q31.1 eingegrenzt werden. Verglichen mit den Resultaten der zytogenetischen Analyse mittels *G-Banding*, bei der der distale Bruchpunkt im Bereich der Bande 4q28 vermutet wurde, liegt der Deletionsbruchpunkt somit deutlich weiter distal.

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der FISH-Analysen zur Charakterisierung des distalen Bruchpunktes.

Name	Lokalisation	Start *	End *	FISH-Ergebnis
RP11-79I18	4q28.1	126075388	126253109	Deletiert
RP11-11P20	4q28.1-28.2	128874744	129034162	Deletiert
RP11-94J9	4q28.3	134472730	134624523	Deletiert
RP11-60A1	4q28.3	137581626	137761312	Deletiert
RP11-733C7	4q28.3	139503214	139664503	Deletiert
RP11-89I24	4q31.1	140215007	140355384	Deletiert
RP11-435P6	4q31.1	140311160	140502686	Deletiert
RP11-1062K20	4q31.1	140469428	140650003	Nicht deletiert
RP11-258E17	4q31.1	140582003	140725924	Nicht deletiert
RP11-22O8	4q31.1	141028896	141088687	Nicht deletiert

*Lokalisation anhand der Start- und Endsequenzen in Basenpaaren aufgrund der Sequenz vom Telomer des p-Armes des Chromosom 4 aus gezählt (<http://genome.ucsc.edu>).

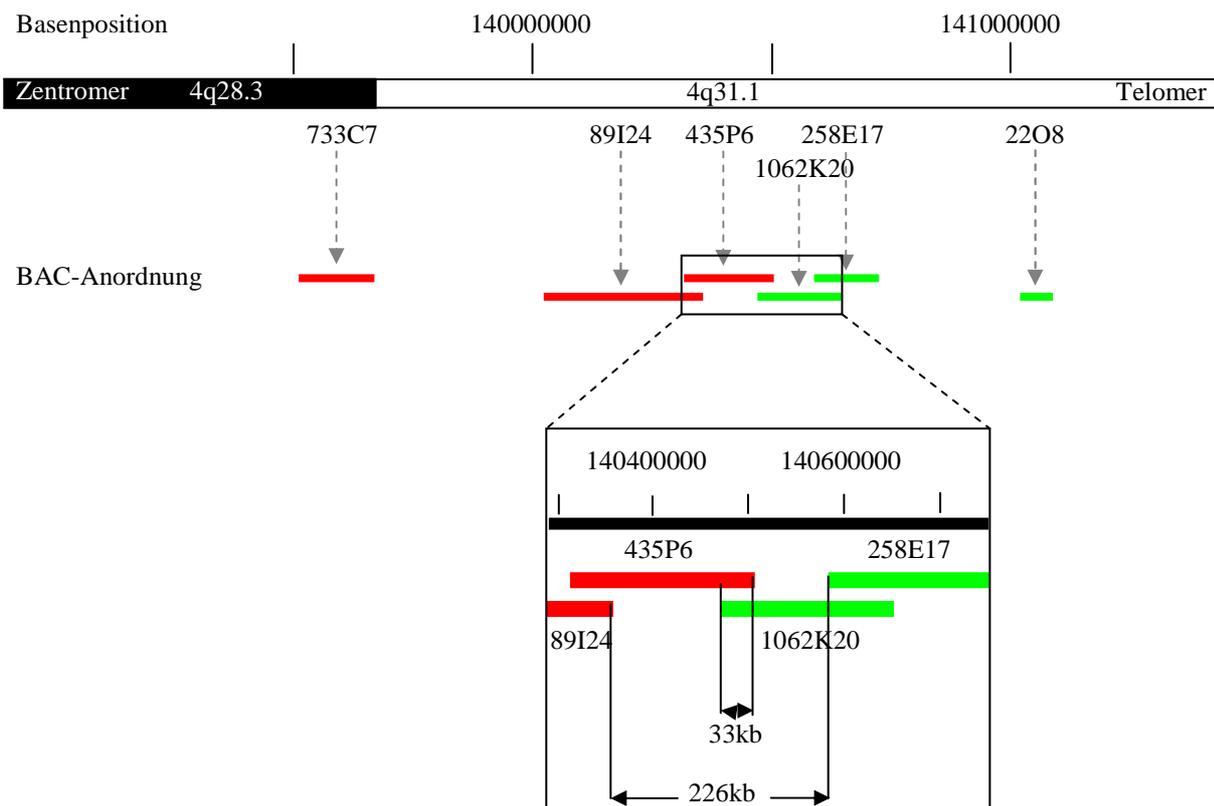


Abb. 4.25: Schematische Darstellung der zur Bruchpunktanalyse des distalen Bruchpunktes ausgewählten BAC-Klone sowie der distalen Bruchpunktregion mit den eingrenzenden BAC-Klonen RP11-89I24, -435P6, -1062K20 und -258E17. Deletierte BAC-Klone sind rot, nicht deletierte Klone sind grün dargestellt. Die BAC-Klone RP11-79I18, -11P20, -94J9 und -60A1 wurden aus Gründen des gewählten Maßstabes nicht dargestellt. Diese befinden sich allesamt zentromerisch der dargestellten Region im Bereich der Chromosomenbande 4q28.1q28.3.

4.4 Mikrosatellitenanalyse

Im Zuge einer genaueren Eingrenzung des proximalen Bruchpunktes wurde eine Mikrosatellitenanalyse der DNA mittels STS Marker D4S1616 bei dem Probanden und 7 weiteren Familienmitgliedern durchgeführt. Dieser Marker weist Allele mit einer Längenvarianz von 245-257 Basenpaaren auf und erschien auf Grund seiner Lokalisation bei 112,5 Mb auf Chromosom 4q25 (<http://genome.ucsc.edu>) bezüglich des zuvor eingegrenzten Bruchpunktes besonders geeignet. Da er innerhalb der von BAC-Klon RP11-326N15 überspannten Sequenz lokalisiert ist, könnte der Bruchpunkt anhand der Ergebnisse weiter eingegrenzt werden. Für den distalen Bruchpunkt konnte kein entsprechender Marker gefunden werden, so dass eine Mikrosatellitenanalyse entfiel. In Abbildungen 4.26 ist der Stammbaum der Familie mit den für eine genetische Untersuchung zur Verfügung stehenden Familienmitgliedern aufgeführt.

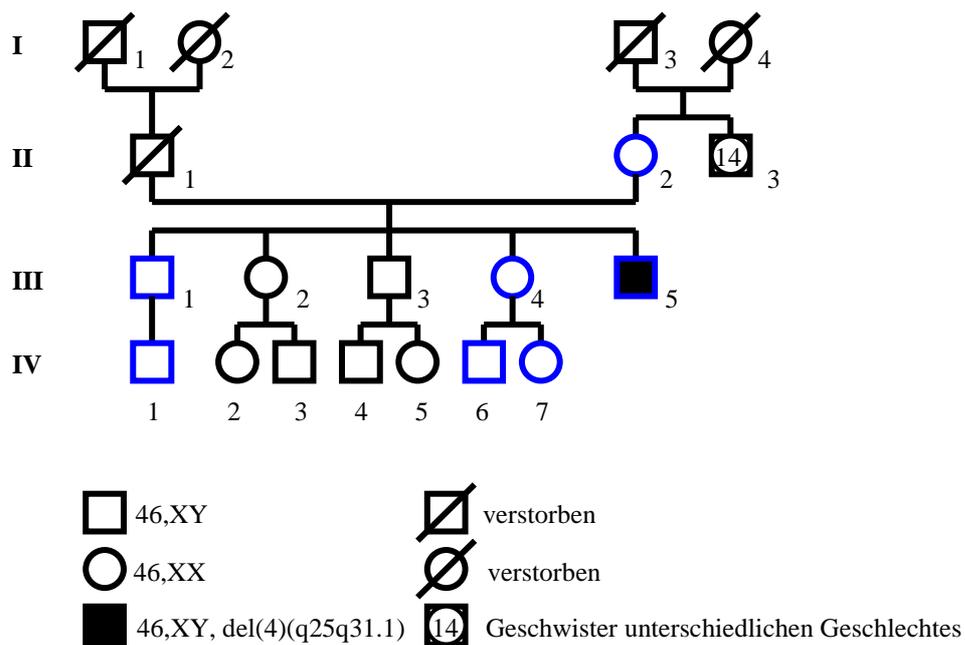


Abb. 4.26: Stammbaum der Familie des Probanden mit *del(4)(q25-q31.1)*. DNA der farblich markierten Individuen stand für eine Mikrosatellitenanalyse zur Verfügung.

In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse der in Abbildung 4.27 dargestellten Genotypisierung von D4S1616 tabellarisch aufgeführt.

Tab. 4.4: Genotypen für D4S1616 der mittels Mikrosatelliten analysierten Familienmitgliedern des Probanden mit interstitieller Deletion *del(4)(q25-q31.1)*.

Stammbaumnr.	Karyotyp	D4S1616 Genotyp
III-5	46, XY, <i>del(4)(q25q31.1)</i>	B - /BB
II-2	46, XX	AB
III-1	46, XY	AA
III-4	46, XX	BB
IV-1	46, XX	BB
IV-6	46, XX	BC
IV-7	46, XY	BB

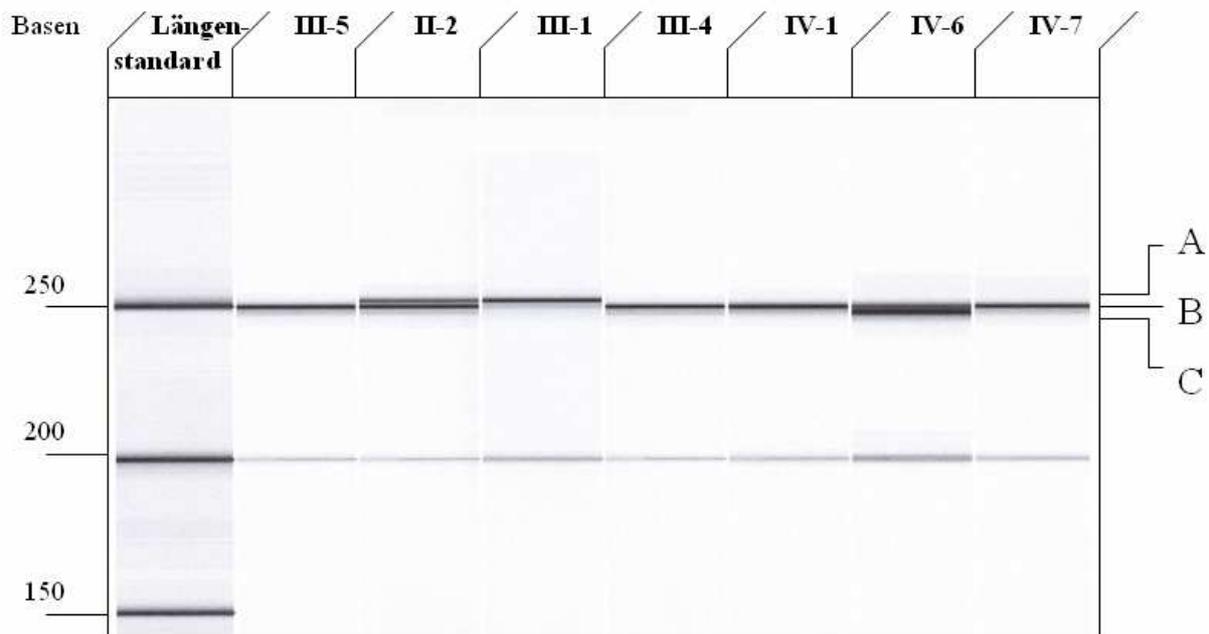


Abb.4.27: Genotypisierung von D4S1616 bei dem Probanden mit interstitieller Deletion *del(4)(q25-q31.1)* und weiteren Familienmitgliedern.

Die Analyse der Probanden-DNA (III-5) zeigt ein Fragment mit einer Größe von 250 Basen (Allel B). Die mütterliche DNA (II-2) weist ebenfalls ein Allel mit einer Größe von 250 Basen auf, sowie eines mit einer Größe von 248 Basen (Allel A). Das Allel C hat eine Größe von 252 Basen. Die Analyse der Bandenmuster der Geschwister (III-1; III-4) lässt auf eine Heterozygotie des entsprechenden Locus der väterlichen DNA, ebenfalls mit den Allelen A und B, schließen. Die elterlichen Allele stimmen somit überein und es besteht eine nicht informative Allelverteilung bei den Eltern und dem Probanden. Dieser kann entweder homozygot oder hemizygot für das Allel B sein.

5. Diskussion

Eine der Hauptursachen für die Entstehung genetischer Krankheitsbilder und Syndrome, können, neben Translokationen und Inversionen, auch Deletionen unterschiedlich großer Chromosomenabschnitte sein. Eine Untergruppe der Deletionssyndrome bilden die so genannten *contiguous-gene-syndromes*. Wie in der Einleitung bereits dargelegt wurde, basieren Phänotypen derartiger Syndrome auf der Deletion mehrerer, physikalisch gebundener, jedoch funktionell unabhängiger Gene. Durch Genotyp-Phänotyp-Studien konnten für einige dieser Syndrome, zu denen beispielsweise das *Wilms-Tumor-Aniridia-Genitourinary-Anomalies-Mental-Retardation Syndrome* (WARG) und das Langer-Giedion Syndrom zählen, einzelne Symptome unterschiedlichen Loci und Kandidatengenen zugeordnet werden (Kreidberg *et al.*, 1993; Malik *et al.*, 2002).

Auch der hier vorgestellte Fall eines Patienten mit einer in dieser Arbeit analysierten, ca. 28 Mb großen interstitieller Deletion des Chromosom 4 ist ein Beispiel für die Ausbildung eines *contiguous gene syndrome*. Die in Abschnitt 4.3 dargestellten Deletionsbruchpunkte konnten mit Hilfe der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung jeweils zwischen zwei sich überlappenden BAC-Klonen (RP11-265M21 und RP11-326N15 für den Proximalen; RP11-435P6 und RP11-1062K20 für den Distalen) lokalisiert und auf einen Bereich von maximal 250 kb eingegrenzt werden. Im Zuge der vorhergegangenen zytogenetischen Untersuchungen waren die Bruchpunkte im Bereich der Banden 4q25 und 4q28 lokalisiert worden. Während der proximale Bruchpunkt im Bereich der Bande 4q25 durch die FISH bestätigt wurde, konnte der distale Bruchpunkt im Gegensatz zu diesen Ergebnissen erst im Bereich der Bande 4q31.1 dargestellt werden. Im weiteren Verlauf der hier vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe einer durchgeführten Mikrosatellitenanalyse eine weitere Bruchpunkteingrenzung erfolgen. Aufgrund der vorliegenden, nicht informativen Allelverteilung konnte jedoch keine weitere Aussage über die Lage des Bruchpunktes getroffen werden.

Im Zusammenhang mit der Darstellung und Analyse der Deletionsbruchpunkte ist es wissenswert, aus welchen Gründen es zum Verlust des genetischen Materials gekommen sein könnte. Eine wichtige Rolle bei derartigen Prozessen spielen so genannte *Duplicons*. Dabei handelt es sich um Chromosomenabschnitte mit über 1 kb Länge und über 90%iger Sequenzhomologie zu anderen Segmenten, aus denen etwa 5% des humanen Genoms aufgebaut sind (Bailey *et al.*, 2002; Cheung *et al.*, 2003). Durch Rekombination können diese *Duplicons* zu Deletionen, Inversionen oder Translokationen führen (Emanuel und Shaikh,

2001; Shaw und Lupski, 2004). Im Bereich der analysierten Deletionsbruchpunkte konnten mit Hilfe von Online-Datenbanken (*UCSC Genome Browser*) bisher jedoch keine *Duplicons* dargestellt werden.

Wie bereits erwähnt ist es ein Hauptinteresse durch genotypischen und phänotypischen Vergleich mit bereits bekannten Fällen ähnlicher Deletionsregionen, zunächst einen klinisch reproduzierbaren Phänotypen zu beschreiben und anschließend einzelnen Chromosomenabschnitten bestimmte phänotypische Charakteristika zuzuordnen. Daraufhin können dann in diesen Abschnitten lokalisierte Gene identifiziert, deren Funktion aufgeklärt und mit dem Phänotyp in Zusammenhang gebracht werden (*positional candidate approach*). Aufgrund des Erscheinungsbildes des hier dargestellten Patienten und der Ergebnisse der zytogenetischen Voruntersuchungen war zunächst vermutet worden, dass einige der Dysmorphiemerkmale mit dem Rieger-Syndrom (Rieger, 1935) in Zusammenhang stehen. Daher sollten nicht nur die Bruchpunkte der Deletion charakterisiert, sondern insbesondere deren Beziehung zu dem Rieger-Syndrom assoziierten Gen *PITX2* geklärt werden.

5.1. Das Rieger-Syndrom

Dieses genetisch heterogene Syndrom wurde mehrfach im Zusammenhang mit Deletionen der Bande 4q25 beschrieben (Ligutic *et al.*, 1981; Vaux *et al.*, 1992; Flomen *et al.*, 1997; Schinzel *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 2003). Fehlbildungen des Auges, mit Irishypoplasie und Colobom, vorderen Synechien, Mikrocorna mit Eintrübungen, prominenter Schwalbe-Linie, Glaukom und Strabismus (Axenfeld, 1920; Rieger, 1935; Shields *et al.*, 2001) gelten als charakteristisch. Weitere Kardinalsymptome sind Zahnfehlbildungen, Mikro- und Hypodontie (Flomen *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003), Fehlbildungen des Nabels, mit gehäuft auftretender verlängerter Retention des Nabelstumpfes nach der Geburt, Nabelhernien und Omphalozelen (Shields *et al.*, 1985; Katz *et al.*, 2004), sowie Kleinwuchs. Ferner wurde eine Assoziation mit kardiovaskulären Fehlbildungen beobachtet (Mammi *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 1998; Bekir *et al.*, 2000; Amendt *et al.*, 2000).

Wie in Abschnitt 1.4 erläutert wurde, wird das Syndrom durch Haploinsuffizienz des Gens *PITX2* hervorgerufen, das für ein *paired-type bicoid-related homeobox containing protein* codiert (Gage *et al.*, 1999). Proteine dieser Familie tragen eine Homeodomäne von 60 Aminosäuren Länge, die über ein Helix-turn-helix-Motiv an spezifische DNA-Sequenzen bindet. Durch diese Wechselwirkung regulieren sie die Expression weiterer Gene während der Embryonalentwicklung und üben Einfluss auf verschiedene biologische Prozesse, wie beispielsweise die Zelltypdifferenzierung, aus (McGinnis und Krumlauf, 1992). Weitere

Regionen außerhalb der Homeodomäne modulieren die Spezifität der Bindung sowie die Aktivität der Proteine durch zusätzliche Protein-Protein-Wechselwirkungen. Ein Beispiel für ein Gen, dessen Expression durch PITX2 modifiziert, wird ist das PLOD-1-Gen (Hjalt *et al.*, 2001). Dieses codiert für eine Prokollagen-Lysyl-Hydroxylase, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Ehlers-Danlos-Syndroms (EDS) spielt (Hautala *et al.*, 1993). Obwohl das Rieger-Syndrom relativ klar vom EDS zu unterscheiden ist, zeigen sie doch auffällige Gemeinsamkeiten bezüglich der betroffenen Gewebe, beispielsweise der glatten Gefäßmuskulatur der Aorta, der Cornea oder der Haut. Die genauen pathogenetischen Zusammenhänge sind zurzeit jedoch noch ungeklärt (Hjalt *et al.*, 2001).

Die eigentlichen Kardinalsymptome des Rieger-Syndrom – Augen-, Zahn- und Nabelfehlbildungen – konnten bei dem vorgestellten Patienten nicht, bzw. nur in sehr milder Form – milde Irishypoplasie, Strabismus concomitans convergens, Zahnfehlstellungen – diagnostiziert werden. Da allerdings auch Herzfehlbildungen und Kleinwuchs mit diesem Syndrom in Verbindung gebracht wurden und die Fazies des Patienten Gemeinsamkeiten mit derjenigen bei Rieger-Syndrom aufwies, war eine Assoziation zunächst zu untersuchen. Insbesondere wäre zu klären gewesen, warum es bei Deletion des gesamten Gens nicht zum Vollbild eines Rieger-Syndroms gekommen ist, bzw. in wie weit ein Bruch innerhalb der Gensequenz eine Funktionsbeeinflussung hervorgerufen hat, die zu den phänotypischen Veränderungen führen konnte. Auf Grund der bereits dargestellten Wirkungsweise des Gens bei der Expressionsregulierung verschiedener Gene in unterschiedlichen Geweben wäre ein deletionsbedingter Wirkungsverlust in den fehlgebildeten Organen denkbar, während andere, normalerweise betroffene Gewebe in ihrer Entwicklung unbeeinflusst blieben.

Eine Deletion des betreffenden Gens konnte, wie in Abschnitt 4.2 dargestellt, durch FISH des BAC-Klons RP11-380D23, der den Genlocus von PITX2 überspannt, ausgeschlossen werden. Dieses Resultat wird zusätzlich durch die Ergebnisse der Bruchpunktcharakterisierung gestützt, bei der gezeigt werden konnte, dass weitere, in der Nähe lokalisierte BAC-Klone nicht deletiert waren und der proximale Bruchpunkt ca. 550 kb telomerisch vom 5'-Anfang des Gens lokalisiert ist. Anhand dieser Erkenntnisse ist zu diskutieren, aus welchen Gründen es dennoch zu den phänotypischen Überschneidungen mit dem Rieger-Syndrom gekommen sein könnte.

Durch die wachsende Einsicht in die genomische Organisation und die unterschiedlichen Level der Transkriptionsregulation (Levine *et al.*, 2003) wurden bis dahin unbekannte Wege aufgedeckt, die ohne direkte Schädigung der codierenden Region, zu einer gestörten Genfunktion führen können. So zeigte sich, dass für eine Reihe von Genen neben dem

Promotor viele weitere Regulatoren für eine zeitlich und örtlich korrekte Genexpression notwendig sind. Derartige *Enhancer*- oder *Repressorelemente* können der eigentlichen codierenden Sequenz sowohl vor- oder nachgeschaltet sein, als sich auch in Introns befinden (Kleinjan *et al.*, 2004). Bei einigen Genen mit hochkomplexem Expressionsmuster kann sich diese *cis*-regulatorische Domäne über eine Länge über 1,1Mb erstrecken (Pop *et al.* 2004; Bien-Willner *et al.* 2007). Störungen dieser fein abgestimmten Regulationsmechanismen können zu Syndromen führen, deren phänotypisches Bild von demjenigen bei direkter Schädigung der codierenden Region abweicht.

Ein Beispiel für ein derartiges Syndrom ist die Campomelische Dysplasie (CD). Dieses autosomal dominante Syndrom ist charakterisiert durch skelettale Malformationen mit gebogenen Femora und Tibiae, hypoplastischen Scapulae, 11 Rippenpaaren und Beckenfehlbildungen. Die Atemwege sind häufig aufgrund tracheobronchialer Knorpeldefekte stenotisch und die Lungen hypoplastisch, wodurch eine hohe neonatale Sterblichkeit bedingt ist (Mansour *et al.*, 1995). Geschlechtsumkehr von männlichem zu weiblichem Geschlecht tritt in unterschiedlicher Ausprägung bei etwa 2/3 der XY-Patienten auf (Mansour *et al.*, 1995). Das Syndrom basiert auf Mutationen innerhalb des SOX9-Gens auf Chromosom 17q, jedoch wurden bei einer Reihe von CD-Patienten mit Translokationen und Inversionen Bruchpunkte außerhalb der codierenden Region beschrieben. Diese Veränderungen können bis zu 1 Mb proximal des eigentlichen Gens lokalisiert sein. Eine Detailanalyse der genomischen Sequenz dieser Region ergab keinen Anhalt für ein proteincodierendes Gen, so dass die chromosomalen Veränderungen vermutlich zu Schäden oder Verlust in einem oder mehreren *cis*-regulatorischen Elementen der Kontrollregion führen (Leipoldt *et al.* 2007). Der Phänotyp dieser Fälle ist demjenigen bei intragenischen *loss of function*-Mutationen generell sehr ähnlich, wenn auch weniger ausgeprägt.

Auch in Zusammenhang mit dem Rieger-Syndrom wurden translokationsbedingte chromosomale Veränderungen beschrieben, bei denen die Bruchpunkte nicht zu direkten Veränderungen der Gensequenz führten, sondern dem Gen 15 kb bzw. 90 kb im 5' Bereich vorgelagert waren (Flomen *et al.*, 1998; Trembath *et al.*, 2004). Angesichts der bereits dargestellten, vielfältigen Funktionen des Gens während der Embryonalentwicklung und der damit notwendigerweise einhergehenden, vielschichtigen zeitlich-örtlichen Expressionsregulation erscheint eine komplexe, dem Gen vorgeschaltete regulatorische Region durchaus denkbar. Möglicherweise führt auch die in dieser Arbeit dargestellte Deletion zu einem Verlust *cis*-regulatorischer Elemente im 5' Bereich des Gens PITX2, die für seine kontrollierte Expression notwendig sind. Möglich wäre auch eine Beeinflussung der PITX2-Expression durch *Enhancer*- oder *Repressorelemente* anderer Gene, die aufgrund der Deletion in

unmittelbare Nähe von PITX2 gelangt sind. Mit Hilfe einschlägiger Datenbanken (OMIM, UCSC Genome Browser) konnten im unmittelbaren Bereich des distalen Bruchpunktes eine Reihe von Genen identifiziert werden. Aufgrund des hypomorphen Erscheinungsbildes des Patienten mit milder Irishyoplasie, Strabismus und Zahnfehlstellungen erscheint eine Beeinflussung der Expressionsregulation durch ein „fremdes“ *Repressorelement* wahrscheinlicher als durch einen *Enhancer*, da das klinische Bild eines Rieger-Syndroms zumeist durch Haploinsuffizienz von PITX2 hervorgerufen wird. Im Tiermodell konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch eine Überexpression des Gens zu Rieger-Syndrom-ähnlichen Fehlbildungen führen kann (Holmberg *et al.* 2004), so dass eventuell auch eine gesteigerte Expression von PITX2 zu dem klinischen Erscheinungsbild des Patienten geführt haben könnte.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine von der analysierten Deletion unabhängige, mutationsbedingte Gendosisreduktion. Eine Reihe unterschiedlicher Mutationen des Gens, die zu einem Kontinuum klinischer Symptome führen, wurden bereits beschrieben (Perveen *et al.*, 2000; Priston *et al.*, 2001). Dieses reicht von einer Irishyoplasie über Iridogoniodysgenese bis zum Vollbild des Rieger-Syndroms mit extraokulären Fehlbildungen, wobei eine Korrelation zwischen dem Schweregrad des klinischen Bildes und der verbliebenen DNA-Bindungsfähigkeit und Transaktivierungsaktivität von PITX2 besteht (Kozłowski *et al.*, 2000). Eine Mutation des Gens, deren Auswirkung primär die extraokulären Gewebe, weniger jedoch die Entwicklung der Augen betrifft, wurde bisher nicht beschrieben. Da im Zusammenhang mit dieser Arbeit keine Mutationsanalysen durchgeführt wurden, kann bisher über mögliche Mutationen oder Mikrodeletionen innerhalb eines der beiden Allele keine Aussage gemacht werden.

Ferner wäre es möglich, dass nicht PITX2 selbst, sondern eines seiner „Zielgene“, deren Expression es beeinflusst, durch die Deletion betroffen ist. In diesem Fall kämen die phänotypischen Gemeinsamkeiten dadurch zustande, dass nicht der Expressionsregulator, sondern das regulierte Gen selbst betroffen ist. In denjenigen Organen, für deren Genese dieses Gen von Bedeutung ist, käme es so zu Entwicklungsstörungen. Die Expression nicht-deletierter Zielgene würde jedoch uneingeschränkt funktionieren, wodurch für das Rieger-Syndrom charakteristische Fehlbildungen – beispielsweise Nabelfehlbildungen – nicht aufträten. Bisher wurden jedoch keine PITX2-regulierten Gene auf Chromosom 4 lokalisiert.

Um eine Korrelation zwischen den phänotypischen Auffälligkeiten und dem Genotyp des Patienten herzustellen, soll im folgenden versucht werden, durch Vergleich mit bereits bekannten Fällen ähnlicher Deletionslokalisation einen reproduzierbaren Phänotyp bei interstitieller Deletion 4q25-q31.1 zu beschreiben. Dabei soll der Versuch unternommen

werden, einzelnen Symptomen bestimmte Chromosomenbanden zuzuordnen und auf weitere Kandidatengene aufmerksam zu machen.

5.2. Der mit einer Deletion 4q25-q31.1 assoziierte Phänotyp

Die Beschreibung der Zusammenhänge zwischen genotypischen Veränderungen und phänotypischen Erscheinungsbildern bei Patienten mit Dysmorphiesyndromen ist der erste Schritt, um genetische Mechanismen aufzuklären, die für die Symptome verantwortlich sind und bildet die Basis für das klinische Management des Patienten (Zhang *et al.*, 2005). Der Versuch, einen klinisch reproduzierbaren Phänotyp bei Deletionen unterschiedlicher Chromosomen zu beschreiben, wurde bereits mehrfach unternommen. Gelungen ist dies beispielsweise für Deletionen des kurzen Armes von Chromosom 5, was zur Ausprägung des *Cri du Chat*-Syndroms (Lejeune *et al.*, 1963) führt. Dieses Syndrom ist charakterisiert durch Mikrozephalus, ein rundes Gesicht, Hypertelorismus, Mikrognathie, tief sitzende Ohren, muskuläre Hypotonie und schwere psychomotorische Retardierung. Des Weiteren geht es mit einem hohen, katzenartigen Schrei bei Neugeborenen einher, worin der Name des Syndroms begründet ist. Es basiert auf Deletion von Teilen des Chromosom 5p, wobei einzelnen Symptomen unterschiedliche Bereiche des Chromosoms bzw. verschiedene Gene zugeordnet werden konnten (Mainardi *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Beispielsweise wurde die Region 5p15.2 mit Mikrozephalie und mentaler Retardierung in Zusammenhang gebracht. In diesem Bereich wurde das Semaphorin-F-Gen kloniert (SEMAF), das bei Mäusen eine wichtige Rolle bei der Axonaussprossung und -orientierung während der kortikalen Entwicklung spielt (Simmons *et al.*, 1998). Ein weiteres Kandidatengenes dieser Region ist das δ -Catenin-Gen (CTNND2). Dieses codiert für ein neuronenspezifisches Protein, das für die Zellmigration von Bedeutung ist und ebenfalls mit mentaler Retardierung bei den Patienten in Verbindung gebracht wird (Medina *et al.*, 2000).

Auch für Deletionen des langen Armes von Chromosom 4 wurde im Rahmen einer Zuordnung von typischen Symptomen zu bestimmten chromosomalen Abschnitten in der Literatur von einigen Autoren eine Einteilung in proximal-interstitielle-, distal-interstitielle- und terminale Deletionen vorgeschlagen (Kulharya *et al.*, 1995; Nowaczyk *et al.*, 1997).

So gehen beispielsweise Deletionen der Banden 4q31-qter, verschiedentlich als so genanntes *4q-terminal-deletion-syndrome* bezeichnet (Lin *et al.*, 1988; Robertson *et al.*, 1998; Keeling *et al.*, 2001; Giuffrè *et al.*, 2004), mit charakteristischen Gesichtsdysmorphien mit Hypertelorismus, Epikanthus, antimongoloider Lidachse, breiter Nasenwurzel mit kleiner Nase und nach vorn gerichteten Nasenlöchern, schmaler Oberlippe und Mikrognathie sowie

Cheilognathopalatoschisis und Pierre Robin Sequenz einher. Kongenitale Herzfehler, postnatale Wachstumsretardierung und Entwicklungsverzögerung mit mentaler Retardierung wurden ebenfalls häufig beobachtet. Des Weiteren treten typischerweise Fehlbildungen an Händen und Füßen auf, insbesondere eine Klinodaktylie des 5. Fingers, dessen Nagel auf eine eigentümliche Weise hakenförmig gebogen ist (Robertson *et al.*, 1998; Zackai *et al.*, 1999; Keeling *et al.*, 2001; Guiffre *et al.*, 2004), sowie eine Aplasie der Ulna (Tomkins *et al.*, 1982; Menko *et al.*, 1992; Keeling *et al.*, 2001). Zwar wurden Deletionen distal der Bande 4q31 mit dem Auftreten dieses Phänotyp in Zusammenhang gebracht (Lin *et al.*, 1988; Sarda *et al.*, 1992), jedoch gelang es bisher nicht, geeignete Kandidatengene zu identifizieren (Robertson *et al.*, 1998; Guiffre *et al.*, 2004).

Demgegenüber gehen Deletionen proximal der Bande 4q25 gehäuft mit einem Makrozephalus einher, der auf einen zerebralen Überwuchs und konsekutiver Enzephalomegalie zurückgeführt wird. Neben der charakteristischen Kopfform wurden des Weiteren gehäuft kleine Hände und Füße, kurze Extremitäten, Entwicklungsverzögerung, mentale Retardierung und ausgeprägte Hypotonie beobachtet. Der Bereich 4q21q22 wurde als kritische Region mit dem Syndrom in Verbindung gebracht (Nowaczyk *et al.*, 1997), jedoch gelang auch hier bisher keine genauere Eingrenzung eines verantwortlichen Gens.

Bei interstitiellen Deletionen der Region 4q25-q31 gelang es bisher nicht, einen spezifischen Phänotyp zu beschreiben (Raczenbek *et al.*, 1991; Kulharya *et al.*, 1995). Insgesamt sind interstitielle Deletionen dieser Region äußerst rar (bisher 12 Fälle), so dass es schwierig ist, statistisch fundierte Aussagen über ein phänotypisches Bild zu machen. Trotzdem soll versucht werden, auf einige wichtige Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinzuweisen. Der hier vorgestellte Patient ist dabei der Erste, bei dem eine Deletion der gesamten Region vorliegt, so dass er als „Prototyp“ eines „4q-distal-interstitial-deletion-syndrome“ gelten kann. Zur besseren Übersicht wurden in Tabelle 5.1 die phänotypischen Auffälligkeiten der bisher beschriebenen Patienten mit interstitiellen Deletionen der Banden 4q25-q31.1 aufgelistet. In 8 Fällen handelte es sich um Deletion der Banden 4q25q27 (Kulharya *et al.*, 1995)³, (Ligutic *et al.*, 1997)⁴, (Vaux *et al.*, 1992)⁵, (Schinzel *et al.*, 1997)⁶, (Becker *et al.*, 2003)⁷, (Chudley *et al.*, 1988)⁸, (Raczenbek *et al.*, 1991)⁹. Des Weiteren handelte es sich um Deletionen der Banden 4q25q26 (Fryns *et al.*, 1992)¹, 4q26 (Motegi *et al.*, 1988)², 4q27q31.3 (Mitchell *et al.*, 1981)¹⁰ und 4q28q31.3 (Copelli *et al.*, 1995)¹¹. In der Tabelle wurden die in den genannten Arbeiten beschriebenen Symptome mit „+“ als vorhanden gekennzeichnet, nicht genannte Auffälligkeiten durch ein „leeres“ Feld dargestellt. Eine Schwierigkeit bei phänotypischen Vergleichen ergibt sich durch die teils sehr unterschiedliche Genauigkeit und Schwerpunktlage der klinischen Beschreibung in den Veröffentlichungen, insbesondere bei

der Beschreibung nicht messbarer Veränderungen, beispielsweise der Gesichtsdysmorphien. So ist es teilweise nur schwer einschätzbar, in wie weit sich die Phänotypen der Patienten wirklich ähneln. Wie wichtig eine detaillierte Beschreibung einer Fazies sein kann, zeigt das Beispiel des Williams-Beuren-Syndroms. Dieses geht mit einem so genannten „Elfengesicht“ einher (White *et al.*, 1977; Grimm und Wesselhoeft, 1980), wodurch die klinische Diagnose vereinfacht werden kann.

Gehäuft wurden bei den Patienten mit interstitieller Deletion 4q25-q31 mentale Retardierung (10/12), Fehlbildungen der Hände und Füße (9/12), Kleinwuchs (8/12) und Herzfehlbildungen (5/12) beobachtet. Zumeist handelte es sich dabei um Vorhof- oder Ventrikelseptumdefekte. Auffallend ist, dass diese nur bei Deletion der Banden 4q25-q27 beschrieben wurden [Proband, 6,7,8,9], so dass diskutiert werden muss, welche Gene in diesem Bereich eine Rolle bei der Kardiogenese spielen könnten. Wie bereits erwähnt, wäre das Gen PITX2 ein möglicher Kandidat, da im Tiermodell seine Rolle bei der Herzentwicklung nachgewiesen wurde. Allerdings traten nur bei zwei der fünf Patienten mit Rieger-Syndrom [6,7] Herzfehlbildungen auf. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine variable Expressivität des verantwortlichen Gens sein, eine andere Möglichkeit, die ebenfalls im Tiermodell nachgewiesene Gendosisabhängigkeit der Herzentwicklung (Gage *et al.*, 1999). So könnte bei einigen Patienten die verbliebene Gendosis gerade noch für eine ungehinderte Herzentwicklung ausreichen, während sie bei anderen nicht mehr genügt. Die dafür verantwortlichen Ursachen sind bisher noch nicht geklärt. Unabhängig davon kann PITX2 jedoch nicht das einzige für die Herzentwicklung relevante Gen dieser Region sein, da auch bei 3 Patienten ohne Rieger-Syndrom [Proband,8,9] Herzfehlbildungen nachgewiesen wurden. Unklar bleibt außerdem, warum bei einigen Patienten Herzfehlbildungen auftreten, bei anderen mit der gleichen Deletion jedoch nicht. Auf mögliche Erklärungen soll im weiteren Verlauf der Diskussion noch eingegangen werden.

Bei den Fehlbildungen der Hände und Füße handelte es sich zumeist um eine Klinodaktylie oder Kamptodaktylie, also eine Fehlstellung eines oder mehrerer Fingerglieder. Die bei dem hier vorgestellten Patienten aufgetretene Beugekontraktur der Daumen wurde zuvor noch nie beschrieben. Auch die auffallend trockene und hyperkeratotische Haut palmar und plantar wurde zuvor nur von Kulharya *et al.* (1995) [3] beobachtet.

Tabelle 5.1: Phänotypische Auffälligkeiten von Patienten mit del (4)(q25q31.1)

Referenz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	P	10	11
Deletiertes Segment	4(q25 q26)	4(q26)	4(q25 q27)	4(q25 q27)	4(q25 q27)	4(q25 q27)	4(q25 q27)	4(q25 q27)	4(q25 q27)	4(q25- q31.1)	4(q27 q31.3)	4(q28 q31.3)
Diagnostik	G; R	G; R	G	G; R	G; R	G; Fi; Mi	G; Fi; C	G	G	G; Fi	G	R
Geschlecht	F	F	F	F	F	M	F	F	F	M	F	F
ZNS												
Geistige Retardierung/Psychom.	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+
Krämpfe				+	+		+		+			
Muskuläre Hypotonie			+	+			+	+	+			
Auge												
Rieger Anomalie	+			+	+	+	+					
Gesicht												
Mikrozephalus			+			+	+				+	+
Antimongoloide Lidachse			+			+				+	+	+
Hypertelorismus			+	+						+	+	
Epikanthus		+	+							+	+	+
Ptosis			+							+	+	+
tief sitzende, hypopl. Ohren		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Breite Nasenwurzel		+	+	+					+			
Oral												
Hoher/schmalere Gaumen			+	+		+		+		+		+
Spaltbildung				+			+	+	+			
Mikrognathie		+		+			+	+	+	+	+	+
Kurzes Philtrum										+		
Schmale Oberlippe	+	+		+				+		+		
Zahnfehlstellungen			+	+		+				+	+	+
Viszeral												
Herzfehlbildungen						+ ^{o,m}	+ ^{r,l}	+	+	+ ^{o,k}		
Gastrointestinale Fehlbildungen					+				+			
Nierenfehlbildungen		+ ^l	+							+ ⁱ		
Umbilicalhernie/Omphalozele					+	+	+					
Skelett/Haut												
Finger/Zehenanomalien		+ ^c	+ ^d		+ ^a		+ ^e	+ ^d	+ ^d	+ ^{f,g}	+ ^{a,g}	+ ^{a,c}
Hypoplastische Nägel										+	+	+
Dünnes, schütteres Haar			+			+				+		+
hypopl. Brustwarzen			+									+
Kleinwuchs		+	+			+	+	+		+	+	+

a – Klinodaktylie des 5. Fingers; b – Überlappende Finger/Zehen; c – Syndactylie 2./3 Finger; d – Kamptodaktylie; e – abnorme Zehenposition; f – Beugekontraktur der Daumen; g – Vier-Finger-Furche; h – Polydaktylie i – Beckenriere; j – Aminoacidurie; k – Aortenklappenstenose; l – persistierender Ductus arteriosus; m – Wolf Parkinson-White-Syndrom; n – Tricuspidalatresie; o – Ventrikelseptumdefekt; r – Vorhofseptumdefekt; C – CGH; G – G-Banding; Fi – FISH; Mi – Mikrosatelliten; P – Proband; R – R-Banding

Hinsichtlich der mentalen Retardierung scheint eine große Varianz zu bestehen. Bei Patienten mit sehr ähnlicher Deletionsregion sind teils sehr unterschiedliche Grade der mentalen Retardierung beschrieben worden. Beispielsweise berichteten Chudley *et al.* (1988) [6] bei einem Patienten mit Deletion 4q25-q27 von einer Aphasie und schweren Retardierung, während Kulharya *et al.* (1995) [9] bei einer Patientin nur milde Lern- und Verhaltensstörungen beschrieben hat. Auch der hier vorgestellte Patient weist trotz erheblich größerer Deletion, nur relativ milde mentale Defizite auf.

Die Fazies der Patienten weist gehäuft tief sitzenden, hypoplastische Ohren (10/12) und eine Mikrognathie (8/12) auf, häufig assoziiert mit einer schmalen Oberlippe (5/12) und einer hervorstehenden Unterlippe. Bei dem hier vorgestellten Patienten erschien zusätzlich das Kinn hypoplastisch. In Kontrast dazu beschrieb Kulharya *et al.* (1995) eine Patientin mit insgesamt schmalen Mund und sehr schmaler Unterlippe. Des weiteren wurde ein hoher, schmaler Gaumen (6/12), teils mit Spaltbildung (4/12) assoziiert, von verschiedenen Autoren beschrieben. Weitere Auffälligkeiten, Hypertelorismus (4/12), Epikanthus (5/12), antimongoloide Lidstellung (5/12) und eine breite Nasenwurzel (4/12) traten weniger konstant auf. Erwähnenswert ist, dass bei 4 Patienten [Proband, 9,10,11] eine deutliche Ptosis diagnostiziert wurde. Die damit assoziierten Deletionen überschneiden sich nur in Bande 4q27 [Proband,9,10], bzw. erstreckt sich die von Copelli *et al.* (1995) [11] beschriebene Deletion von Bande 4q28-q31.3. Da die Bruchpunktanalyse, abgesehen von dem hier vorgestellten Fall, mit Hilfe von *Banding*-Methoden erfolgte und somit nur eine Genauigkeit von ca. 2-5 Mb aufweist (Uhrig *et al.*, 1999), ist es durchaus möglich, dass sich die deletierten Regionen im Bereich der Bande 4q27q28 überschneiden.

Um Hinweise für eventuelle Gendosiseffekte zu erhalten ist es im Zuge der klinischen Beschreibung des Phänotyps bei Deletion 4q25-q31.1 von Interesse, diesen mit demjenigen bei Duplikation des gleichen Chromosomenabschnitts im Sinne eines „Typ-Antityp-Vergleiches“ gegenüberzustellen. Idealerweise stünde dabei der Phänotyp bei deletionsbedingten Dysmorphien, aufgrund der unterschiedlichen Kopienanzahl von Genen in dem betroffenen Segment, im kompletten Gegensatz zu demjenigen bei Duplikation des gleichen Chromosomenabschnitts.

Duplikationen unterschiedlicher Abschnitte von Chromosom 4q wurden in der Literatur bereits über 60-mal beschrieben (Celle *et al.*, 2000), wobei es sich nur in 17 der beschriebenen Fälle um reine Duplikationen handelte. Gleichsam wie bei interstitiellen Deletionen von Chromosom 4q ließ sich auch dabei bisher kein charakteristischer Phänotyp beschreiben (Rinaldi *et al.*, 2003). In insgesamt 9 dieser Fälle stimmte die Duplikation zumindest teilweise mit der in dieser Arbeit beschriebenen Deletion überein. Häufig beobachtete Dysmorphien

sind Kleinwuchs, psychomotorische Retardierung unterschiedlicher Ausprägung, Fehlbildungen der Hände und Füße mit hypoplastischen Zehennägeln, Clinodactylie und Hypoplasie des Daumens, sowie ein Mikrozephalus. Die Fazies weist gehäuft einen Hypertelorismus, Epikanthus, antimongoloide Lidstellung und Ptosis sowie eine breite Nasenwurzel, tief sitzende, große und fehlgebildete Ohren, und Mikroretrognathie auf (Celle *et al.*, 2000; Rinaldi *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004). Des Weiteren wurden Herzfehlbildungen beobachtet, die mit einer Duplikation der Banden 4q26-q27 in Verbindung gebracht wurden (Rinaldi *et al.*, 2003).

Bei der direkten Gegenüberstellung der Phänotypen fällt demnach auf, dass sie sich weitestgehend ähneln. Auch die Assoziation der Herzfehlbildung mit strukturellen Veränderungen der Chromosomenbanden 4q26-q27 tritt sowohl bei Deletionen, als auch bei Duplikationen auf. Anhand der bisherigen Falldarstellungen in der Literatur ergibt sich demnach kein Hinweis für die Abhängigkeit der phänotypischen Ausprägung von der Kopienanzahl betroffener dosissensitiver Gene in bestimmten Regionen von Chromosom 4q25-q31.1. Wie schwierig es jedoch sein kann, die Gendosisabhängigkeit phänotypischer Auffälligkeiten korrekt zu deuten, zeigt das Beispiel zweier Erkrankungen, die auf einer Duplikation bzw. Deletionen desselben Gens beruhen. Die Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie (CMT1A) basiert auf einer Duplikation des Gens PMP22 auf Chromosom 17p12, während die Hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Drucklähmungen (HNPP) mit einer Deletion des Gens assoziiert ist (Inoue *et al.*, 2001; Boerkoel *et al.*, 2002). Zwar handelt es sich bei diesen Krankheiten um neurologisch eindeutig abgrenzbare Erkrankungen, doch verdeutlicht dieses Beispiel die Relevanz einer ausführlichen klinischen Beschreibung, um sie mit eventuellen Gendosiseffekten in Verbindung bringen zu können. Eine größere Anzahl detaillierter Phänotyp-Genotypdarstellungen ist daher notwendig, um klarer zwischen dem klinischen Erscheinungsbild bei Deletionen und Duplikationen von Chromosom 4q zu differenzieren.

Insgesamt wird jedoch deutlich, dass die meisten Symptome bei Patienten mit strukturellen Veränderungen von Chromosom 4q25q31.1 nicht konstant auftreten und sich bisher nur eingeschränkt einer bestimmten Chromosomenregion zuordnen lassen. Auffällig ist auch, dass es bei identischen Deletionen teilweise zu sehr unterschiedlichen Ausprägungen der Symptome kommen kann. Diskutiert werden muss daher, welche Gründe es für eine derartige Varianz der Phänotypen geben könnte.

Eine denkbare methodisch bedingte Ursache wurde bereits erwähnt. Bei Deletionsanalysen mit Hilfe eines *Banding*verfahrens können die eigentlichen Bruchpunkte nur relativ grob eingegrenzt werden, da das Auflösungsvermögen der für die Chromosomenuntersuchung in der Routine gebräuchlichen GTG-Techniken (*G-bands by trypsin using Giemsa*) zwischen 5-

10 Mb (Shaffer, 1997), das der später eingeführten hochauflösenden *High-Resolution-Technik* zwischen 2-5 Mb (Uhrig *et al.*, 1999) liegt. Wie aus Tabelle 4.1 ersichtlich, wurde in 9 von 12 Fällen ein solches Verfahren gewählt [1,2,3,6,7,8,9,10,11]. Daher ist es durchaus möglich, dass sich die tatsächliche Deletionsgröße und somit die Anzahl der betroffenen Gene bei zytogenetisch identisch erscheinenden Deletionen in Wahrheit deutlich unterscheidet. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits auf die Bedeutung molekularer Analysetechniken für die Deletionsanalyse hingewiesen (Kulharya *et al.*, 1995; Becker *et al.*, 2003). Möglicherweise können zukünftige Falldarstellungen, deren Bruchpunkte wie in der vorliegenden Arbeit mittels modernerer Analyseverfahren – z.B. FISH, oder Mikrosatellitenanalyse – eingegrenzt werden, diese Unklarheiten beseitigen.

Neben dieser methodischen Ursache muss auch eine deletionsbedingte Beeinflussung epigenetischer Phänomene, z.B. der so genannten „Prägung“ (*Imprinting*) von Genen, diskutiert werden. Als „Prägung“ wird die Markierung eines Gens auf der Grundlage seines parentalen Ursprungs verstanden, wodurch es zu einer monoallelischen Expression kommt. Die Mechanismen der Prägung sind sehr komplex und bis heute nicht vollständig verstanden. Jedoch scheint gesichert, dass die „Prägung“ eines Gens unter anderem in einer elternspezifischen Methylierung CpG-reicher Domänen während der Gametogenese besteht (Constancia *et al.*, 1998).

Die geprägte, d.h. allelspezifische Expression von Genen, wurde erstmals 1991 für den den Wachstumsfaktor Igf2 (insulin-like-growth-factor 2) und seinen Rezeptor Igf2r, sowie für das H19-Gen bei der Maus nachgewiesen (DeChiara *et al.*, 1991; Barlow, 1991; Bartolomei *et al.*, 1991). Mittlerweile wurden auch eine Reihe humangenetischer Erkrankungen mit Prägungseffekten in Verbindung gebracht. Zwei unterschiedliche genetische Erkrankungen, die mit einer genomischen Prägung auf Chromosom 15q11-q13 assoziiert sind, sind das Prader-Willi-Syndrom (PWS) und das Angelman-Syndrom (AS). Kardinalsymptome des PWS sind Hypotonie, Hyperphagie und Adipositas, Hypogonadismus und Entwicklungsverzögerung (Holm *et al.*, 1993). Patienten mit AS zeigen hingegen häufig Ataxie, Schlafstörungen, Krämpfe und Hyperaktivität sowie ein fröhliches Gemüt mit plötzlichen Lachanfällen (Williams *et al.*, 1995). Veränderungen des maternal-exprimierten Gens UBE3A, durch Deletionen oder Mutationen, wurden mit dem Auftreten eines AS in Verbindung gebracht (Matsuura *et al.*, 1997). Bei PWS-Patienten scheint hingegen das SNRPN-Gen eine entscheidende Rolle zu spielen. Veränderungen des Methylierungsmusters der Promotorregion dieses Gens verhindern die Expression seines paternalen Allels, wodurch es zur Abschaltung weiterer paternaler Gene desselben *Clusters* kommt (Sutcliffe *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1995).

Insgesamt wird die Zahl der geprägten Gene im menschlichen Genom auf etwa 200 geschätzt (Barlow, 1995), von denen zur Zeit nur etwa 80 bekannt sind (Datenbank *geneimprint.com*, 2006). Bisher konnte keine Prägungsphänomene auf Chromosom 4 nachgewiesen werden. Es bleibt daher abzuwarten, ob auch auf diesem Chromosom epigenetische Phänomene eine Rolle spielen, wodurch die Ausprägung eines Phänotyps beeinflusst werden könnte.

Im Zuge der Suche nach Ursachen für interindividuelle phänotypische Varianz wird zusehends deutlich, dass durch chromosomale Strukturveränderungen primär betroffene Gene häufig in hochkomplexe Systeme eingebettet sind, in denen genetische Polymorphismen und Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle spielen (Dipple *et al.*, 2000). Beispielsweise wurde eine Reihe von Genen beschrieben, die in der Pathogenese atrioventrikulärer Septumdefekte (AVSD) eine wichtige Rolle spielen. Mutationen im CRELD2-, GATA4- oder BMP-4-Gen sind mit Herzfehlbildungen assoziiert, jedoch scheinen Mutationen dieser Gene allein weder nötig, noch ausreichend zu sein um AVSD hervorzurufen (Maslen, 2004). Vielmehr wird mittlerweile vermutet, dass diese Mutationen nur einzelne Bausteine in dem komplexen System der Herzfehlbildungen darstellen. Möglicherweise ist demnach bei den beschriebenen Patienten mit kardialen Fehlbildungen die diagnostizierte Deletion nur ein weiterer Baustein in diesem komplexen System, während bei nicht betroffenen Patienten zusätzliche Faktoren fehlen. Weitere Untersuchungen und Identifizierung von Kandidatengenen werden notwendig sein um diese Prozesse zu verstehen.

5.3. Kandidatengene

Unabhängig von einer eventuellen Assoziation zwischen dem Phänotyp des Patienten und einer Funktionsänderung des Gens PITX2, bleibt die Frage nach weiteren möglichen Kandidatengenen. Mit Hilfe einschlägiger Datenbanken (OMIM, UCSC Genome Browser) ist es möglich, Chromosomen auf dort lokalisierte Gene und deren physiologische Bedeutung hin zu untersuchen. Die Ergebnisse der Analyse der hier dargestellten deletierten Region sind in Tabelle 5.2 aufgelistet. So weit bekannt, wurden mit den Genen assoziierte Syndrome ebenfalls erfasst. In den meisten Fällen ist jedoch über die Funktion der Genprodukte in übergeordneten physiologischen Prozessen nur sehr wenig bekannt, so dass es kaum möglich ist, eine Verbindung zu phänotypischen Ausprägungen zu erstellen.

Tabelle 5.2: Liste der in der deletierten Region lokalisierten Gene.

Symbol	Omim	Name	Syndrom	Position
PRSS12	606709	Neurotrypsin (Serinprotease)	Mentale retard., autosomal rezessiv	4q25-27
ANK2	106410	Ankyrin-2	Long-QT- syndrome-4	4q25-27
DAPPI	605768	Dual adaptor of phosphotyrosine		4q25-27
FGF2	134920	Fibroblast growth factor 2		4q25-27
GENEX	607406	Genethonin 1		4q25-34
ARSJ	610010	Arylsulfatase J		4q26
CGT	601291	Cerebroside synthase		4q26
PDE5A	603310	Phosphodiesterase 5A		4q26
PGRMC2	607735	Progesterone receptor membrane comp. 2		4q26
IL 2	147680	Interleukin-2	Severe combined immunodeficiency	4q26-27
IL21	605384	Interleukin-21		4q26-27
ANXA	131230	Annexin A5		4q26-28
BBS 7	607590	BBS7-Gen	Bardet-Biedel Syndrom	4q27
CCNA	123835	Cyclin A		4q27
MAD2L1	601467	Mitotic arrest deficient-like 1		4q27
PET112L	603645	Pet112 S.cerevisiae homolog-like		4q27-28
PLK4	605031	Polo-like kinase 4		4q27-28
DFNA52	607683	Deafness, autosomal dominant 52	Taubheit, aut. dominant	4q28
FGA	134820	Fibrinogen, alpha polypeptid	Dysfibrinogenämie	4q27
FGB	134820	Fibrinogen, beta polypeptid	Afibrinogenämie, congenital	4q27
FGG	134850	Fibrinogen, gamma polypeptide	Dysfibrinogenämie	4q27
MADH1	601595	Mothers against decapentaplegic		4q27-28
FABP2	134640	Fatty acid-binding protein, intestinal		4q28-31
GYPB	111740	Glycophorin B	Blutgruppe, Ss	4q28-31

GYPE	138590	Glycophorin E		4q28-31
HCL2	266300	Haarfarbe 2, rot	Haarfarbe rot	4q28-31
MGST2	601733	Microsomal glutathione S-transferase 2		4q28-31
SF	111800	Stoltzfus Blutgruppe	Blutgruppe, Stoltzfus-System	4q28-31
HHIP	606178	Hedgehog-interacting protein		4q28-32
GYPA	111300	Glycophorin A	Blutgruppe, MN	4q28.1
NDUFC1	603844	NADH-ubiquinone-oxidoreductase		4q28.2- 31.1
MAML3	608991	Mastermind-like 3		4q28.3
PCDH10	608286	Protocadherin 10		4q28.3
ABCE1	601213	Ribonuclease L Inhibitor		4q31.1
DFNB26	605428	Deafness, autosomal recessive 26	Taubheit, aut. rezessiv	4q31.1

Ein interessanter Kandidat könnte das Neurotrypsin-Gen (PRSS-12) sein, das im Bereich der Bande 4q26 lokalisiert wurde (OMIM 606709). Neurotrypsin ist eine neuronale Serinprotease, die hauptsächlich im zerebralen Kortex, dem Hippocampus und den Corpora amygdaloidea exprimiert wird (Gschwend *et al.*, 1997). Während der ZNS-Entwicklung haben Serinproteasen eine wichtige Funktion bei der Zellmigration, Axonaussprossung und Synaptogenese. Bei Erwachsenen spielen sie eine Schlüsselrolle bei der Neuropeptidverarbeitung, Regulation des Neuronenüberlebens und der Strukturplastizität bei Lern- und Gedächtnisprozessen (Wolfer *et al.*, 2001). Im Zusammenhang mit autosomal rezessiv vererbter mentaler Retardierung wurde eine 4 bp große Deletion in Exon 7 des Gens beschrieben, wodurch es zu einem verkürzten Protein unter Verlust des katalytischen Zentrums kommt (Molinari *et al.*, 2003).

Möglichweise spielt dieses Protein auch bei interstitiellen Deletionen der Bande 4q26 eine Rolle. Wie bereits erwähnt, zeigen Patienten mit Deletionen dieser Region eine große Varianz in der Ausprägung der mentalen Retardierung. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Deletion eines Allels von PRSS12 einen modulierenden Effekt auf die Ausbildung einer mentalen Retardierung hat, ähnlich wie dies zuvor für verschiedene Gendefekte im Zusammenhang mit atrioventrikularen Septumdefekten dargelegt wurde. Die sorgfältige Beschreibung von Phänotypen, zusammen mit Mutationsanalysen und Tiermodellen werden möglicherweise das Verständnis dahingehend erweitern.

5.4. Ausblick

Um eine Assoziation zwischen dem dargestellten Phänotyp des Patienten und dem Gen PITX2 nachzuweisen, erscheinen unter anderem Expressionsanalysen sinnvoll, um den Einfluss der Deletion auf die Expression des Gens besser beurteilen zu können. PITX2 wird in der Hypophyse, der Plazenta, in Herzmuskelzellen, der Appendix sowie der Zunge vermehrt exprimiert (*UCSC Genome Browser*). Eine Expressionsanalyse an Zellen dieser Gewebe wäre daher wünschenswert, um möglichst aussagekräftige Daten zu erheben. Die Gewinnung einer Gewebeprobe eines dieser Organe birgt jedoch die Risiken eines invasiven Eingriffes und erscheint nur im Bereich der Zunge vertretbar.

Des Weiteren sollte das ca. 550 kb große Segment zwischen dem proximalen Bruchpunkt und dem Gen eingehender analysiert werden. Insbesondere sollte eine genauere Suche nach eventuell vorhandenen *cis*-regulatorischen Elementen im 5' Bereich des Gens erfolgen und anschließend deren Funktion geklärt werden. Um in diesem Zusammenhang die Auswirkung der Deletion auf die Expressionsregulation besser beurteilen zu können wäre es sinnvoll, die Deletionsbruchpunkte weiter einzugrenzen. Dazu könnten zunächst die den Bruchpunkt eingrenzenden BAC-Klone restriktionsenzymatisch in Subfragmente gespalten und mit Hilfe der Long-range-PCR kloniert werden. Diese Fragmente könnten anschließend als FISH-Sonden verwendet und deren Lage zum Bruchpunkt evaluiert werden, so dass letztendlich die Sequenzierung eines solchen Fragmentes zur molekularen Charakterisierung des Bruchpunktes führen sollte. Dabei könnten möglicherweise auch Hinweise auf eventuelle Ursachen, die zu der Deletion führten, in der genomischen Architektur gefunden werden.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es bei einem Patienten mit unklarem Dysmorphiesyndrom die zytogenetisch bereits dargestellte Deletion des Chromosom 4q25-q28 mittels Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung und Mikrosatellitenanalyse weiter einzugrenzen und zu analysieren. Insbesondere sollte dabei auf eine, auf Grund phänotypischer Überschneidungen vermutete Assoziation mit dem Rieger-Syndrom eingegangen werden.

Zum Ausschluss einer Deletion des mit dem Rieger-Syndrom assoziierten Gens PITX2 wurde zunächst der BAC-Klon PR11-380D23 ausgewählt, der den Genlocus des Gens überspannt. Mit Hilfe der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) an Metaphasechromosomen des Patienten konnte so nachgewiesen werden, dass die dem ca. 202 kb großen Insert entsprechende genomische Sequenz nicht deletiert ist. Anschließend wurden die beiden Bruchpunkte der Deletion mit Hilfe der FISH genau lokalisiert. Diese konnten jeweils der Region zweier sich überlappender BAC-Klone (RP11-265M21 und RP11-326N15 für den Proximalen; RP11-435P6 und RP11-1062K20 für den Distalen) zugeordnet werden, so dass sich die Bruchpunktregionen jeweils auf einen Bereich von ca. 250 kb eingrenzen ließen. Der Versuch einer weiteren Eingrenzung mittels Mikrosatellitenanalyse war nicht aussagekräftig, da eine nicht informative Allelverteilung vorlag. Die Deletion erstreckt sich somit nicht, wie zytogenetisch dargestellt, von Bande 4q25-q28, sondern über die Banden 4q25-q31.1 und hat eine ungefähre Größe von 28 Megabasen. Des Weiteren konnte durch die Bruchpunktlokalisierung gezeigt werden, dass der proximale Bruchpunkt ca. 550 kb telomerisch von dem Gen PITX2 entfernt liegt, so dass die phänotypischen Überschneidungen mit dem Rieger-Syndrom eventuell durch so genannte Positionseffekte bedingt sein könnten. Weitere mögliche Erklärungen wurden eingehend dargelegt.

Da es für die Klinik von großer Relevanz ist, phänotypische Auffälligkeiten mit genotypischen Veränderungen zu assoziieren, wurde anschließend, basierend auf den Ergebnissen der Bruchpunktanalyse, durch phänotypischen und genotypischen Vergleich mit zuvor in der Literatur beschriebenen Fällen ähnlicher Deletionen versucht, einen charakteristischen Phänotyp für Deletionen der Banden 4q25-q31.1 zu definieren. Deutlich wurde, dass Patienten mit derartigen Deletionen zwar eine Reihe phänotypischer Gemeinsamkeiten aufweisen, insgesamt jedoch eine große Variabilität bezüglich der Ausprägung besteht. Mentale Retardierung unterschiedlichen Ausmaßes, Fehlbildungen der Hände und Füße, Kleinwuchs und Herzfehlbildungen wurden gehäuft beschrieben. Die Fazies der Patienten weist häufig tief

sitzende, hypoplastische Ohren, eine Mikrognathie und eine schmale Oberlippe bei hervorstehender Unterlippe auf. Auffällig war, dass Herzfehlbildungen nur bei Deletion der Bande 4q25-q27 auftraten, so dass postuliert werden kann, dass Gene in diesem Bereich für die Kardiogenese von Bedeutung sind. Denkbare Ursachen für die phänotypische Variabilität und mögliche Kandidatengene wurden ausführlich diskutiert.

Mit Hilfe zukünftiger klinischer Beschreibungen phänotypisch auffälliger Patienten in Kombination mit modernen genetischen Analyseverfahren (FISH, Mikrosatellitenanalyse) wird die Genotyp-Phänotyp-Assoziation zunehmend differenzierter werden. Dadurch wird die Eingrenzung und Identifizierung verantwortlicher Gene zunehmend erleichtert werden. Zusätzlich sind molekulare Untersuchungen notwendig, um das komplexe Zusammenspiel unterschiedlicher Gene und die Bedeutung von Umwelteinflüssen und epigenetischen Prozessen zu analysieren und zu verstehen.

7. Literaturverzeichnis

1. Amendt BA, Semina EV, Alward WL: *Rieger Syndrome: a clinical, molecular, and biochemical analysis*. Cell Mol Life Sci 57 (2000) 1652-1666. Review
2. Axenfeld T: *Embryotoxon cornea posterius*. Berl Deutsch Ophthalmol Ges 42 (1920) 301-302
3. Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE: *Recent segmental duplications in the human genome*. Science 297 (2002) 1003-1007
4. Ballabio A: *The rise and fall of positional cloning?* Nat Genet 3 (1993) 277-279
5. Barlow DP, Stöger R, Herrmann BG, Saito K, Schweifer N: *The mouse insulin-like growth factor type 2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus*. Nature 349 (1991) 84-87
6. Barlow DP: *Gametic Imprinting in Mammals*. Science 270 (1995) 1610-1613
7. Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM: *Parental imprinting of the mouse H19 gene*. Nature 351 (1991) 153-155
8. Becker SA, Popp S, Rager K, Jauch A: *A new case of an interstitial deletion (4)(q25q27) characterised by molecular cytogenetic techniques and review of the literature*. Eur J Pediatr 162 (2003) 267-270
9. Bekir NA, Gungor K: *Atrial septal defect with interatrial aneurysm and Axenfeld Rieger syndrome*. Acta Ophthalmol Scand 78 (2000) 101-103
10. Bien-Willner GA, Stankiewicz P, Lupski JR: *SOX9^{cre1}, a cis-acting regulatory element located 1,1Mb upstream of SOX9, mediates its enhancement through the SHH pathway*. Hum Mol Genet 16 (2007) 1143-56
11. Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K, Russo P, Kennedy S, Teebi AS, Scavina M, Williams LL, Mancias P, Butler IJ, Krajewski K, Shy M, Lupski JR: *Charcot-Marie-Tooth Disease and related neuropathies: Mutation distribution and genotype-phenotype correlation*. Ann Neurol 51 (2002) 190-201
12. Buiting K, Saihoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B: *Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15*. Nature Genet 9 (1995) 395-400
13. Camerino G, Grzeschik KH, Jaye M, De La Salle H, Tolstoshev P, Lecocq JP, Heilig R, Mandel JL: *Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (hemophilia B locus)*. Proc Natl Acad Sci USA 81 (1984) 498-502

14. Celle L, Lee L, Rintoul N, Savani RC, Long W, Mennuti MT, Krantz ID: *Duplication of chromosome region 4q28.3-qter in monozygotic twins with discordant phenotypes*. Am J Med Genet 94 (2000) 125-140
15. Cheung J, Estivill X, Khaja R, MacDonald JR, Lau K, Tsui LC, Scherer SW: *Genome-wide detection of segmental duplications and potential assembly errors in the human genome sequence*. Genome Biol 4 (2003) R25
16. Chudley AE, Verna MR, Ray M, Riordan D: *Interstitial deletion of the long arm of chromosome 4*. Am J Med Genet 31 (1988) 549-551
17. Collins FS: *Positional cloning: Let's not call it reverse anymore*. Nat Genet 1 (1992) 3-6
18. Collins FS: *Positional cloning moves from perdictional to traditional*. Nat Genet 9 (1995) 347-350
19. Collins FS, Morgan M, Patrinos A: *The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology*. Science 300 (2003) 286-290
20. Constancia M, Pickard B, Kelsey G, Reik W: *Imprinting Mechanisms*. Genome Res 8 (1998) 881-900
21. Copelli S, del Rey G, Heinrich J, Coco R: *Interstitial deletion of the long arm of chromosome 4, del (4)(q28q31.3)*. Am J Med Genet 55 (1995) 77-79
22. Cunningham ET, Elliott D, Miller NR, Maumenee IH, Green WR: *Familial Axenfeld-Rieger-Anomaly, atrial septal defect and sensorineural hearing loss: a possible new genetic syndrome*. Arch Ophthalmol 116 (1998) 78-82
23. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A: *Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene*. Cell 64 (1991) 849-859
24. Derry JM, Ochs HD, Francke U: *Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome*. Cell 78 (1994) 635-644
25. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM, Stetton G, Meyers DA, Francomano CA: *Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene*. Nature 352 (1991) 337-339
26. Dipple KM, McCabe ER: *Phenotypes of patients with "simple" mendelian disorders are complex traits: thesholds, modifiers and system dynamics*. Am J Hum Genet 66 (2000) 1729-1735
27. Emanuel BS, Shaikh TH: *Segmental duplications: An expanding role in genomic instability and disease*. Nat Rev Genet 2 (2001) 791-800
28. Flomen RH, Gorman PA, Vatcheva R, Groet J, Barisic I, Ligutic I, Sheer D, Nizetic D: *Rieger syndrome locus: a new reciprocal translocation(4;12)(q25;q15) and a deletion*

- del(4)(q25q27)* both break between markers *D4S2945* and *D4S193*. *J Med Genet* 34 (1997) 191-195
29. Flomen RH, Vatcheva R, Gorman PA, Baptista PR, Groet J, Barisic I, Ligutic I, Nizetic D: *Construction and analysis of a sequence-ready map in 4q25: Rieger syndrome can be caused by haploinsufficiency of RIEG, but also by chromosome breaks approximately 90 kb upstream of this gene.* *Genomics* 47 (1998) 409-413
 30. Fryns JP, van den Berghe H: *Rieger syndrome and interstitial 4q26 deletion.* *Genet Couns* 3 (1992) 153-154
 31. Gage PJ, Camper SA: *Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation.* *Hum Mol Genet* 6 (1997) 457-464
 32. Gage PJ, Suh H, Camper SA: *Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs.* *Development* 126 (1999) 4643-4651
 33. Giannelli F, Choo KH, Rees DJ, Boyd Y, Rizza CR, Brownlee GG: *Gene deletions in patients with haemophilia B and anti-factor IX antibodies.* *Nature* 303 (1983) 181-182
 34. Green P: *Against a whole-genome shotgun.* *Genome Res* 7 (1997) 410-417
 35. Grimm T, Wesselhoeft H: *Zur Genetik des Williams-Beuren-Syndroms und der isolierten Form der supraaortalen Aortenstenose.* *Z Kardiol* 69 (1980) 168-172
 36. Gschwend TP, Krueger SR, Kozlov SV, Wolfer DP, Sonderegger P: *Neurotrypsin, a novel multidomain serine protease expressed in the nervous system.* *Mol Cell Neurosci* 9 (1997) 207-219
 37. Guiffrè M, la Placa S, Carta M, Cataliotti A, Marino M, Piccione M, Pusateri F, Meli F, Corsello G: *Hypercalciuria and kidney calcifications in terminal 4q deletion syndrome: further evidence for a putative gene on 4q.* *Am J Med Genet* 126 (2004) 186-190
 38. Hautala T, Heikkinen J, Kivirikko KI, Myllylä R: *A large duplication in the gene for lysyl hydroxylase accounts for the type VI variant of Ehlers-Danlos syndrome in two siblings.* *Genomics* 15 (1993) 399-404
 39. Hjalt TA, Amendt BA, Murray JC: *PITX2 regulates procollagen lysyl hydroxylase (PLOD) gene expression: implications for the pathology of Rieger syndrome.* *J Cell Biol* 152 (2001) 545-552
 40. Hjalt TA, Semina EV, Amendt BA, Murray JC: *The Pitx2 protein in mouse development.* *Dev Dyn* 218 (2000) 195-200
 41. Holland P: *Homeobox genes in vertebrate evolution.* *Bioessays* 14 (1992) 267-273

42. Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F: *Prader-Willi-syndrome: consensus diagnostic criteria*. Pediatrics 91 (1993) 398-402
43. Holmberg J, Liu CY, Hjalt TA: *PITX2 Gain-of-Function in Rieger Syndrome eye model*. Am J Pathol 165 (2004) 1633-1641
44. Hoogenraad CC, Koekkoek B, Akhmanova A, Krugers H, Dortland B, Miedema M, van Alphen A, Kistler WM, Jaegle M, Koutsourakis M, Van Camp N, Verhoye M, van der Linden A, Kaverina I, Grosveld F, De Zeeuw CI, Galjart N: *Targeted mutation of Cyln2 in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice*. Nat Genet 32 (2002) 116-127
45. Inoue K, Dewar K, Katsanis N, Reiter LT, Lander ES, Devon KL, Wyman DW, Lupski JR, Birren B: *The 1.4-Mb CMT1A Duplication/HNPP Deletion genomic region reveals unique genome architectural features and provides insights into the recent evolution of new genes*. Genome Res 11 (2001) 1018-1033
46. Inoue K, Lupski JR: *Molecular Mechanisms for genomic disorders*. Annu Rev Genomics Hum Genet 3 (2002) 199-242
47. International Human Genome Sequencing Consortium: *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature 409 (2001) 860-921
48. International Human Genome Sequencing Consortium: *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature 431 (2004) 931-945
49. Kainulainen K, Pulkkinen L, Savolainen A, Kaitila I, Peltonen L: *Location on chromosome 15 of the gene defect causing Marfan syndrome*. N Engl J Med 323 (1990) 935-939
50. Katz LA, Schultz RE, Semina EV, Torfs CP, Krahn KN, Murray JC: *Mutations in PITX2 may contribute to cases of omphalocele and VATER-like syndromes*. Am J Med Genet 130 (2004) 277-283
51. Keeling SL, Lee-Jones L, Thompson P: *Interstitial deletion 4q32-34 with ulnar deficiency: 4q33 may be the critical region in 4q terminal deletion syndrome*. Am J Med Genet 99 (2001) 94-98
52. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cos TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC: *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis*. Science 245 (1989) 1073-1080
53. Kleinjan DA, Seawright A, Childs AJ, van Heyningen V: *Conserved elements in Pax6 intron 7 involved in (auto)regulation and alternative transcription*. Dev Biol 265 (2004) 462-477

54. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM: *Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals.* Cell 50 (1987) 509-517
55. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R: *WT-1 is required for early kidney development.* Cell 74 (1993) 679-691
56. Kozlowski K, Walter MA: *Variation in residual PITX2 activity underlies the phenotypic spectrum of anterior segment developmental disorders.* Hum Mol Genet 9 (2000) 2131-2139
57. Kulharya AS, Maberry M, Kukolich MK, Day DW, Schneider NR, Wilson GN, Tonk V: *Interstitial deletions 4q21.1q25 and 4q25q27: phenotypic variability and relation to Rieger anomaly.* Am J Med Genet 55 (1995) 165-170
58. Kunkel LM, Hejtmancik JF, Caskey CT, Speer A, Monaco AP, Middlesworth W, Colletti CA, Bertelson C, Müller U, Bresnan M, Shapiro F, Tantravahi U, Speer J, Latt SA, Bartlett R, Pericak-Vance MA, Roses AD, Thompson MW, Ray PN, Worton RG, Fischbeck KH, Gallano P, Coulon M, Duros C, Boue J, Junien C, Chelly J, Hamard G, Jeanpierre M, Lambert M, Kaplan JC, Emery A, Dorkins H, McGlade S, Davies KE, Boehm C, Arveiler B, Lemaire C, Morgan GJ, Denton MJ, Amos J, Bobrow M, Benham F, Boswinkel E, Cole C, Dubowitz V, Hart K, Hodgson S, Johnson L, Walker A, Roncuzzi L, Ferlini A, Nobile C, Romeo G, Wilcox DE, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Lindolf M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Ionasescu V, Searby C, Ionasescu R, Bakker E, van Ommen GJ, Pearson PL, Greenberg CR, Hamerton JL, Wrogemann K, Doherty RA, Polakowska R, Hyser C, Quirk S, Thomas N, Harper JF, Darras BT, Francke U: *Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy.* Nature 322 (1986) 73-77
59. Kwok SC, Ledley FD, DiLella AG, Robson KJ, Woo SL: *Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase.* Biochemistry 24 (1985) 556-561
60. Leipoldt M, Erdel M, Bien-Willner GA, Smyk M, Theurl M, Yatsenko SA, Lupski JR, Lane AH, Shanske AL, Stankiewicz P, Scherer G: *Two novel translocation breakpoints upstream of SOX9 define borders of the proximal and distal breakpoint cluster region in campomelic dysplasia.* Clin Genet 71 (2007) 67-75
61. Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R: *Trois cas de deletion partielle du bras court d'un chromosome 5.* C R Hebd Seances Acad Sci 257 (1963) 3098-3102

62. Levine M, Tjian R: *Transcription regulation and animal diversity*. Nature 424 (2003)147-151
63. Li DY, Faury G, Taylor DG, Davis EC, Boyle WA, Mecham RP, Stenzel P, Boak B, Keating MT: *Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin*. J Clin Invest 102 (1998) 1783-1787
64. Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont ME, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB: *Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged 1, which encodes a ligand for Notch 1*. Nat Genet 16 (1997) 243-251
65. Liang F, Holt I, Pertea G, Karamycheva S, Salzberg SL, Quackenbush J: *Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes*. Nat Genet 25 (2000) 239-240
66. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC: *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
67. Ligutic I, Brecevic L, Petkovic I, Kalogjera T, Rajic Z: *Interstitial deletion 4q and Rieger syndrome*. Clin Genet 20 (1981) 323-327
68. Lin AE, Garver KL, Diggans G, Clemens M, Wenger SL, Steele MW, Jones MC, Israel J: *Interstitial and terminal deletions of the long arm of chromosome 4: further delineation of phenotypes*. Am J Med Genet 31 (1988) 533-548
69. Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG: *Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis*. Nature 401(1999) 279-282
70. Lin S, Kirk EP, McKenzie F, Francis C, Shalhoub C, Turner AM: *De novo interstitial duplication 4(q28.1q35) associated with choanal atresia*. J Paediatr Child Health 40 (2004) 401-403
71. Logan M, Pagan-Westphal SM, Smith DM, Paganessi L, Tabin CJ: *The transcription factor PITX2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals*. Cell 94 (1998) 307-317
72. Lu MF, Pressman C, Dyer R, Johnson RL, Martin JF: *Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development*. Nature 401 (1999) 276-278
73. Lupski JR: *Genomic disorders: Structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits*. Trends Genet 14 (1998) 417-422
74. Lupski JR: *Genomic disorders recombination-based disease resulting from genomic architecture*. Am J Hum Genet 72 (2003) 246-252

75. Magenis RE, Maslen CL, Smith L, Allen L, Sakai LY: *Localization of the fibrillin (FBN) gene to chromosome 15, band q21.1*. Genomics 11 (1991) 346-351
76. Malik TH, von Stechow D, Bronson RT, Shivdasani RA: *Deletion of the GATA domain of TRPS1 causes an absence of facial hair and provides new insights into the bone disorder in inherited tricho-rhino-phalangeal syndromes*. Mol Cell Biol 22 (2002) 8592-8600
77. Mammi I, De Giorgio P, Clementi M, Tenconi R: *Cardiovascular anomaly in Rieger syndrome: heterogeneity or contiguity?* Acta Ophthalmol Scand 76 (1998) 509-512
78. Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Coucourde G, Pastore G, Cavani S, Zara F, Overhauser J, Pierluigi M, Bricarelli FD: *Clinical and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation*. J Med Genet 38 (2001) 151-158
79. Mansour S, Hall CM, Pembrey ME, Young ID: *A clinical and genetic study of campomelic dysplasia*. J Med Genet 32 (1995) 415-420
80. Maslen CL: *Molecular genetics of atrioventricular septal defects*. Curr Opin Cardiol 19 (2004) 205-210
81. Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL: *De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome*. Nat Genet 15 (1997) 74-77
82. McGinnis W, Krumlauf R: *Homeobox genes and axial patterning*. Cell 68 (1992) 283-302
83. Medina M, Marinescu RC, Overhauser J, Kosik KS: *Hemizyosity of δ -catenin (DTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome*. Genomics 63 (2000) 157-164
84. Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Janus C, Cruz L, Jackson M, Lu WY, MacDonald JF, Wang JY, Falls DL, Jia Z: *Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice*. Neuron 35 (2002) 121-133
85. Menko FH, Madan K, Baart JA, Beukenhorst HL: *Robin sequence and a deficiency of the left forearm in a girl with a deletion of chromosome 4q33-qter*. Am J Med Genet 44 (1992) 696-698
86. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res 16 (1988) 1215
87. Mitchell JA, Packman S, Loughman WD, Fineman RM, Zackai E, Patil SR, Emanuel B, Bartley JA, Hanson JW: *Deletions of different segments of the long arm of chromosome 4*. Am J Med Genet 8 (1981) 73-89

88. Molinari F, Meskanaite V, Munnich A, Sonderegger P, Colleaux L: *Extracellular proteases and their inhibitors in genetic diseases of the central nervous system*. Hum Mol Genet 12 (2003) 195-200
89. Motegi T, Nakamura K, Terakawa T, Oohira A, Minoda K, Kishi K, Yanagawa Y, Hayakawa H: *Deletion of a single chromosome band 4q26 in a malformed girl: exclusion of Rieger syndrome associated gene from the 4q26 segment*. J Med Genet 25 (1988) 628-633
90. Murray JC, Bennett SR, Kwitek AE, Small KW, Schinzel A, Alward WL, Weber JL, Bell GI, Buetow KH: *Linkage of Rieger syndrome to the region of the epidermal growth factor gene on chromosome 4*. Nat Genet 2 (1992) 46-49
91. Nishimura DY, Swiderski RE, Alward WL, Searby CC, Patil SR, Bennet SR, Kanis AB, Gastier JM, Stone EM, Sheffield VC: *The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25*. Nat Genet 19 (1998) 140-147
92. Nowaczyk MJ, Teshima IE, Siegel-Bartelt J, Clarke JT: *Deletion 4q21/4q22 syndrome: Two Patients with de novo 4q21.3q23 and 4q13.2q23 deletions*. Am J Med Genet 69 (1997) 400-405
93. Peltonen L, McKusick VA: *Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era*. Science 291 (2001) 1224-1229
94. Perveen R, Lloyd IC, Clayton-Smith J, Churchill A, van Heyningen V, Hanson I, Taylor D, McKeown C, Super M, Kerr B, Winter R, Black GC: *Phenotypic variability and asymmetry of Rieger syndrome associated with PITX2 mutations*. Invest Ophthalmol Vis Sci 41 (2000) 2456-2460
95. Petrif F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, Breuning MH: *Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP*. Nature 376 (1995) 348-351
96. Phillips JC, del Bono EA, Haines JL, Pralea AM, Cohen JS, Greff LJ, Wiggs JL: *A second locus for Rieger syndrome maps to chromosome 13q14*. Am J Hum Genet 59 (1996) 613-619
97. Pop R, Conz C, Lindenberg KS, Blesson S, Schmalenberger B, Briault S, Pfeifer D, Scherer G: *Screening of the 1 Mb SOX9 5' control region by array CGH identifies a large deletion in a case of campomelic dysplasia with XY sex reversal*. J Med Genet 41 (2004) e47
98. Priston M, Kozlowski K, Gill D, Letwin K, Buys Y, Levin AV, Walter MA, Héon E: *Functional analysis of two newly identified PITX2 mutants reveal a novel molecular mechanism for Axenfeld-Rieger syndrome*. Hum Mol Genet 10 (2001) 1631-1638

99. Raczenbek C, Krassikoff N, Cosper P: *Second case report of del(4)(q25q27) and review of the literature*. Clin Genet 39 (1991) 463-466
100. Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A: *Chromosome engineering in mice*. Nature 378 (1995) 720-724
101. Rieger H: *Beiträge zur Kenntnis seltener Missbildungen der Iris: über Hypoplasie des Irisvorderblattes mit Verlagerung und Entrundung der Pupille*. Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthal 133 (1935) 602-635
102. Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P: *Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I*. J Mol Biol 113 (1977) 237-251
103. Rinaldi R, De Bernardo C, Assumma M, Grammatico B, Buffone E, Poscente M, Grammatico P: *Cytogenetic and molecular characterization of a de novo 4q24qter duplication and correlation of the associated phenotype*. Am J Med Genet 118 (2003) 122-126
104. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC: *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science 245 (1989) 1066-1073
105. Robertson SP, O'Day K, Bankier A: *The 4q-syndrome: delineation of the minimal critical region to within band 4q31*. Clin Genet 53 (1998) 70-73
106. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS: *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping*. Science 245 (1989) 1059-1065
107. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science 239 (1988) 487-491
108. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Laboratory Press (1989)
109. Sarda P, Lefort G, Fryns JP, Humeau C, Rieu D: *Interstitial deletion of the distal long arm of chromosome 4*. J Med Genet 29 (1992) 259-261
110. Schinzel A, Brecevic L, Dutly F, Baumer A, Binkert F, Largo RH: *Multiple congenital anomalies including the Rieger eye malformation in a boy with interstitial deletion of (4)(q25q27) secondary to a balanced insertion in his normal father: evidence for*

- haplotype insufficiency causing the Rieger malformation. J Med Genet 34 (1997) 1012-1014*
111. Schmickel RD: *Contiguous gene syndromes: A component of recognizable syndromes. J Pediatr 109 (1986) 231-241*
 112. Schnittger S, Höfers C, Heidemann P, Beermann F, Hansmann I: *Molecular and cytogenetic analysis of an interstitial 20p deletion associated with syndromic intrahepatic ductular hypoplasia (Alagille syndrome). Hum Genet 83 (1989) 239-244*
 113. Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC: *Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. Nat Genet 14 (1996) 392-399*
 114. Shaffer LG: *Diagnosis of Microdeletion Syndromes by Fluorescence in situ Hybridization (FISH). Current Protocols in Human Genetics (1997) John Wiley & Sons, New York, S. 8.10.1-8.10.14*
 115. Shaffer LG, Ledbetter DH, Lupski JR: *Molecular cytogenetics of contiguous gene syndromes: Mechanisms and consequences of gene dosage imbalance. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8 Edition. V.L. The McGraw-Hill Companies, Inc. (2001) S. 1291-1327*
 116. Shaw CJ, Lupski JR: *Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. Hum Mol Genet 13 (2004) R57-R64*
 117. Shields MB, Buckley E, Klintworth GK, Thresher R: *Axenfled-Rieger Syndrome. A spectrum of developmental disorders. Surv Ophthalmol 29 (1985) 387-409*
 118. Shields MB: *Axenfled-Rieger and iridocorneal endothelial syndromes: two spectra of disease with striking similarities and differences. J Glaucoma 10 (2001) 36-38*
 119. Simmons AD, Püschel AW, McPherson JD, Overhauser J, Lovett M: *Molecular cloning and mapping of human Semaphorin F from the cri-du-chat candidate interval. Biochem Biophys Res Commun 242 (1998) 685-591*
 120. Sinsheimer RL: *The Santa Cruz Workshop, May 1985. Genomics 5 (1989) 954-956*
 121. Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S, Örstavik KH, Tommerup N, Ledbetter DH, Beaudet AL: *Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. Nat Genet 8 (1994) 52-58*
 122. Tomkins DJ, Hunter AG, Uchida IA, Roberts MH: *Two children with deletion of the long arm of chromosome 4 with breakpoint at band 4q33. Clin Genet 22 (1982) 348-355*
 123. Trembath DG, Semina EV, Jones DH, Patil SR, Qian Q, Amendt BA, Russo AF, Murray JC: *Analysis of two translocation breakpoints and identification of a negative regulatory*

- element in patients with Rieger's syndrome. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70 (2004) 82-91
124. Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, 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
 125. Vaux C, Sheffield L, Keith CG, Voullaire L: *Evidence that Rieger syndrome maps to 4q25 or 4q27. J Med Genet* 29 (1992) 256-258
 126. Venter JC, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M: *Shotgun sequencing of the human genome. Science* 280 (1998): 1540-1542
 127. 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
 128. Walz K, Fonseca P, Lupski JR: *Animal models for human contiguous gene syndromes and other genomic disorders. Genet Mol Biol* 27 (2004) 305-320
 129. Wang Y, Zhao H, Zhang X, Feng H: *Novel identification of a four-base-pair deletion mutation in PITX2 in a Rieger syndrome family. J Dent Res* 82 (2003) 1008-1012
 130. White RA, Preus M, Watters GV, Fraser FC: *Familial occurrence of the Williams syndrome. J Pediatr* 91 (1977) 614-616
 131. Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JH, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM: *Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. Am J Med Genet* 56 (1995) 237-238
 132. Wolfer DP, Lang R, Cinelli P, Madani R, Sonderegger P: *Multiple roles of neurotrypsin in tissue morphogenesis and nervous system development suggested by the mRNA expression pattern. Mol Cell Neurosci* 18 (2001) 407-433
 133. Wu Q, Niebuhr E, Yang H, Hansen L: *Determination of the critical region for cat-like cry of Cri-du-chat syndrome and analysis of candidate genes by quantitative PCR. Eur J Hum Genet* 13 (2005) 475-485
 134. Zackai EH: *Deletion 4q34.2. Am J Med Genet* 86 (1999) 197-198
 135. Zhang X, Snijders A, Seagraves R, Zhang X, Niebuhr A, Albertson D, Yang H, Gray J, Niebuhr E, Bolund L, Pinkel D: *High-Resolution mapping of genotype-phenotype relationships in Cri du Chat syndrome using array comparative genomic hybridization. Am J Hum Genet* 76 (2005) 312-326

Thesen

1. Der Phänotyp des in dieser Arbeit beschriebenen Patienten mit unklarem Dysmorphiesyndrom bei interstitieller Deletion 4q weist Übereinstimmungen mit dem Rieger-Syndrom auf, das durch eine Deletion des Gens PITX2 auf Chromosom 4q25 verursacht wird.
2. Die nach zytogenetischer Analyse definierte Deletion del(4)(q25q28) ist nach der molekularzytogenetischen Untersuchung mit Hilfe der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung neu zu definieren, wobei die Bruchpunkte den Banden 4q25 und 4q31.1 zuzuordnen sind.
3. Auch wenn das PITX2 Gen außerhalb und zentromerwärts der Deletion kartiert, kann dieses Gen durch den ca. 550 kb entfernten proximalen Bruchpunkt in seiner Funktion beeinträchtigt sein und u.a. für einzelne Merkmale des Patienten – wie den Augenbefund – verantwortlich sein. Zu begründen ist dies durch mögliche Positionseffekte in *cis*, die selbst über Entfernungen von ca. 1.000 kb zu einem Funktionsverlust eines Gens führen können.
4. Untersuchungen zur Genotyp-Phänotyp Beziehung sollten berücksichtigen, mit welchen Analyseverfahren eine Bruchpunktkartierung bei den betreffenden Patienten erfolgte.
5. Durch phänotypischen und genotypischen Vergleich des dargestellten Patienten mit zuvor beschriebenen Fällen ähnlicher Deletionen können phänotypische Auffälligkeiten einzelnen chromosomalen Regionen zugeordnet werden. Konkrete Kandidatengene für diese Merkmale lassen sich nicht benennen.

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Stephan Muck
Anschrift: Heinrichstr. 6
45128 Essen
Geburtsdatum: 30.06.1979
Geburtsort: Berlin-Wilmersdorf
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Berufliche Erfahrung

seit 01/2007 Assistenzarzt der Neurologie
Neurologische Klinik des Alfried Krupp Krankenhauses Essen
Leitender Arzt: Prof. Dr. med. Peter Berlit

Studium

11/2006 Abschluss des Studiums und Approbation, Gesamtnote: gut (1,66)
11/2006 **3. Staatsexamen** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Gesamtnote: sehr gut (1,0)
10/2005-09/2006 Praktisches Jahr
Neurologie
Neurologische Klinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. S. Zierz
Innere Medizin
Medizinische Klinik des Universitätsspitals Basel (Schweiz)
Direktor: Prof. Dr. med. J.A. Schifferli
Chirurgie
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie am Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara Halle
Chefarzt: Dr. med. Asperger
09/2005 **2. Staatsexamen** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Gesamtnote: gut (2,0)
09/2002 **1. Staatsexamen** an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Gesamtnote: gut (2,0)
09/2001 **Physikum** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Gesamtnote: gut (2,0)
ab 10/1999 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Famulaturen

- 09/2004 **Innere Medizin**, Asklepios Klinik, Langen/Hessen
Chefarzt: PD Dr. med. H.G. Olbrich
- 09/2004 **Neurologie**, Neurologische Klinik
der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. S. Zierz
- 05/2004 **Gynäkologie**, Clinica Ginecologica e Ostetrica,
Università degli studi di Padova, Padua (Italien)
Direktor: Prof. Dr. med. Mario Rondinelli
- 04/2004 **Augenheilkunde**, Clinica Oculistica,
Università degli studi di Padova, Padua (Italien)
Direktor: Prof. Dr. med. Antonio G. Secchi
- 09/2003 **Hämatologie/Onkologie**, Medizinische Klinik II
des Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara Halle
Chefarzt: Dr. med. T. Langer
- 03/2002 **Innere Medizin** (Praxisfamulatur)
Praxis Dr. med. Peter Muck (Essen)

Zivildienst

- 08/1998-09/1999 Johanniter-Unfall-Hilfe e.V., Essen
Ausbildung zum Rettungssanitätshelfer und Leitstellendisponent

Schulbildung

- 08/1989-06/1998 Gymnasium Essen-Werden, Essen, Abiturnote: 1,9

Auslandsaufenthalte

- 05/2006-08/2006 Praktisches Jahr an der Medizinischen Klinik des Universitätsspitals
Basel (Schweiz)
- 02/2004-07/2004 Studium an der Università degli studi di Padova,
Padua/ Italien
Erasmus-Stipendium der EU
- 08/1995-07/1996 Lafayette-High-School, Lexington, Kentucky (USA)
Förderung durch „Rotary International Exchange Program“

Studienbegleitende Tätigkeiten

- 11/2002-01/2003 Wissenschaftliche Hilfskraft
Institut für Humangenetik und medizinische Biologie der Martin-
Luther Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. I. Hansmann
- 11/2001-01/2002 Wissenschaftliche Hilfskraft
Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther
Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. B. Fischer

Selbstständigkeitserklärung

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

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

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

Essen, den 12.07.2007

Stephan Muck*

* Mit der Unterschrift bestätige ich sowohl die Korrektheit der Angaben im Lebenslauf, als auch der Selbstständigkeitserklärung.

Veröffentlichung

Muck S, Wand D, Thiele H, Schlote D, Hansmann I: *De novo interstitial deletion of 4q [46,XY,del(4)(q25q31.1)] in a 35 year old patient with multiple congenital anomalies but without Rieger anomaly*. Medgen 17: 66 (2005)

Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ingo Hansmann für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation unter seiner Leitung anfertigen zu können. Des Weiteren danke ich ganz besonders Dr. rer. nat. Dietmar Schlote für die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung während der praktischen Arbeiten im Labor und für die unendliche Geduld und Hilfe im Rahmen der Niederschrift dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön auch an die Mitarbeiter/innen des Institutes für Humangenetik und medizinischen Biologie der Martin-Luther-Universität Halle für die freundliche Unterstützung und gute Zusammenarbeit bei dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch meiner Familie für die permanente Unterstützung und den festen Zusammenhalt. Doreen Hoffmann danke ich für ihre Liebe und dafür, dass sie mich gelegentlich an die wirklich wichtigen Dinge erinnert.