

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit
„Bacterial Artificial Chromosome“(BAC)-Sonden bei zwei Patienten
mit „Disease-associated balanced chromosome rearrangement“

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Ira Schwaab
aus Bad Schwalbach

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1.Gutachter:

2.Gutachter:

Tag der Promotion:

07.12.2021

Widmung:

Diese Dissertation widme ich meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung und Ziel der Arbeit	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Angeborene Entwicklungsauffälligkeiten	3
2.2 Diagnostische Möglichkeiten bei unklaren Entwicklungsstörungen	3
2.2.1 Genetische Beratung.....	3
2.2.2 Chromosomenanalyse.....	4
2.2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	5
2.2.4 CGH	5
2.2.5 Array-CGH.....	6
2.2.6 Next-Generation-Sequencing	6
2.3 Ursachen für Entwicklungsauffälligkeiten	7
3 Material und Methoden	8
3.1 Fallbeschreibungen.....	8
3.2 Material	12
3.3 Eingesetzte BACs im Fall 1	13
3.4 Eingesetzte BACs im Fall 2.....	15
3.5 Reagenzien	15
3.6 Methoden	16
3.6.1 Allgemeines zur FISH-Diagnostik.....	16
3.6.2 Herstellung der Metaphasepräparate	16
3.6.3 Herstellung der DNS-Sonden	17
3.6.4 Hybridisierung der DNS-Sonden auf Chromosomenpräparate.....	19
3.6.5 Hybridisierungsanalyse	20
3.6.6 Mikroskop	21
4 Ergebnisse.....	22
4.1 Fall 1	22
4.2 Fall 2	36
5 Diskussion.....	41

5.1	Fall 1	41
5.1.1	Duplikation 1p32.3.....	41
5.1.2	Insertion in 1q32.....	41
5.1.3	Deletion 1q41.1	43
5.1.4	Bruchpunkte auf Chromosom 7q32.1 und 7q35	56
5.2	Fall 2	62
5.2.1	Bereich 9p10-9p11.2	62
5.2.2	Bereich 4p16.3	62
6	Zusammenfassung	68
7	Literaturverzeichnis.....	71
8	Danksagung	83
9	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten BACs in Fall 1, welche auf Chromosom 1 hybridisieren	13
Tabelle 2: Liste der verwendeten BACs in Fall 1, welche auf Chromosom 7 hybridisieren	14
Tabelle 3: Liste der verwendeten BACs in Fall 2, welche auf Chromosom 4 hybridisieren	15
Tabelle 4: Liste der verwendeten BACs in Fall 2, welche auf Chromosom 9 hybridisieren	15
Tabelle 5: Erstes Sonden-Panel Fall 1	22
Tabelle 6: Zweites Sonden-Panel Fall 1	24
Tabelle 7: Drittes Sonden-Panel Fall 1	26
Tabelle 8: Viertes Sonden-Panel Fall 1	27
Tabelle 9: Fünftes Sonden-Panel Fall 1	29
Tabelle 10: Sechstes Sonden-Panel Fall 1	31
Tabelle 11: Siebtes Sonden-Panel Fall 1	32
Tabelle 12: Erstes Sonden-Panel Fall 2	37
Tabelle 13: Zweites Sonden-Panel Fall 2	38
Tabelle 14: Fall 1, DNS-Strukturen im Bereich 1q32	43
Tabelle 15: Fall1, DNS-Strukturen im deletierten Bereich 1q41	46
Tabelle 16: Fall1, DNS-Strukturen im Bereich 7q35	57
Tabelle 17: Fall 1, Hybridisierte BACs im Bereich des CNTNAP2-Gens	58
Tabelle 18: Fall 2, Protein codierende Gene im Bruchpunktbereich 4p16.3	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Foto Patient 1 im Alter von acht Jahren	9
Abbildung 2: Initial erstelltes Karyogramm von Patient 1: 46,XYqs,inv(7)(q35q36.2)	10
Abbildung 3: Initial erstelltes Karyogramm von Patient 2: 46,XY,t(4;9)(p16.3;q11)..	12
Abbildung 4: Fall 1, RP11-697B15 (grün) auf 7q und 1q; RP11-519M4 (rot) auf 7q (Pfeile).....	23
Abbildung 5: Fall 1, 7pter (grün); RP11-374N8 (rot) auf 7q (invertiert und normal) (Pfeile).....	24
Abbildung 6: Fall 1, RP11-274B21 (rot) invertiert und nicht invertiert (Pfeile) auf 7q, mit Kreuzhybridisierungen.....	25
Abbildung 7: Fall 1, RP11-654P5 (rot) nicht invertiert auf 7q (Pfeile)	25
Abbildung 8: Fall1, RP11-6E3 (grün) zentomerseitig von RP11-643A21 (rot) (Pfeil)	26
Abbildung 9: Fall 1, RP11-135A15 (grün) telomerseitig von RP11-643A21 (rot) auf 1q (Pfeil).....	27
Abbildung 10: Fall 1, RP11-49G5 (rot) auf Derivat 1, Chromosom 7 und Derivat 7 (Pfeile).....	28
Abbildung 11: Fall 1, RP4-777G9 (rot) auf Derivat 1, Chromosom 7 und Derivat 7 (Pfeile).....	28
Abbildung 12: Fall1, RP11-475H14 (rot) auf Chromosom 7 und Derivat 7 (invertiert) (Pfeile).....	29
Abbildung 13: Fall 1, RP11-309K22 (rot) auf Chromosom 7 und Derivat 7 (invertiert) (Pfeile).....	30
Abbildung 14: Fall 1, RP11-791P08 (rot) gesplittet auf Derivat 7 (Pfeil).....	30
Abbildung 15: Fall 1, RP4-630F1(grün) auf den Chromosomen 7 (Pfeile).....	32
Abbildung 16: Fall 1, RP11-766K8(grün) nur auf einem Chromosom 7(Pfeil)	33
Abbildung 17: Fall 1, RP4-969D4(grün) auf beiden Chromosomen 7 (Pfeile).....	33
Abbildung 18: Fall 1, Idiogramm des paternalen Derivat 1.....	35
Abbildung 19: Fall 1, Idiogramm des maternalen Derivat 1.....	35
Abbildung 20: Fall, Idiogramm des paternalen Derivat 7.....	36
Abbildung 21: Fall 2, RP11-216M21 (grün) doppelt auf Chromosom 9, einfach auf Derivat 9 und einfach auf Derivat 4 (Pfeile).....	37

Abbildung 22: Fall 2, RP11-339F4 (rot) zweifach auf Chromosom 9, einfach auf Derivat 9 und Derivat 4 (Pfeile)	38
Abbildung 23: Fall 2, Alphasatelliten von Chromosom 4 (rot) und Chromosom 9 (grün) beide auf dem Derivat 4 (Pfeile)	39
Abbildung 24: Fall 2, Idiogramm der Translokationschromosomen 4 und 9.....	40
Abbildung 25: Fall 1, BAC-Klone im Bereich des CNTNAP2-Gens.....	57
Abbildung 26: Fall 1, Veränderung des CNTNAP2-Gens durch die Chromosomenveränderungen.....	58

Abkürzungsverzeichnis

APGAR	Apgar-Index, standardisiertes Punkteschema für den klinischen Zustand von Neugeborenen nach 1, 5 und 10 Minuten (A tmung, P uls, G rundtonus, A ussehen, R eflexe)
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
CCR	Complex-Chromosome-Rearrangement
CENPA	Zentromer-Protein A
CGH	Comperative Genomic Hybridisation
CNV	Copy-Number-Variation
DBCR	Disease-associated balanced chromosome rearrangement
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EEG	Elektroenzephalografie
ENSEMBL	Genom-Suchmaschine für Wirbeltier-Genome zur Unterstützung der Forschung vergleichender Genetik, Evolution, Sequenzvariation und transkriptionaler Regulation. Ensembl annotiert Gene, berechnet multiple Alignments, sagt regulatorische Funktionen voraus und sammelt Krankheitsdaten. Zu den Ensembl-Tools gehören BLAST, BLAT, BioMart und der Variant Effect Predictor (VEP) für alle unterstützten Spezies
ENTREZ	NCBI Datenbank für Gen-spezifische Informationen
ESRR	Östrogen-Rezeptor-verwandte Rezeptoren
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
lincRNS	long non-coding RNS
Mb	Megabasen
miRNS	microRNS
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MRT	Magnetresonanztomographie
NCBI	National Library of Medicine

NGS	Next-Generation-Sequenzig
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDE	Phosphodiesterase
PHA	Phytohaemagglutinin
RNS	Ribonukleinsäure
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

1 Einleitung und Ziel der Arbeit

Allgemeines

Einer der großen Fortschritte in der Geschichte der Genetik ist die Darstellbarkeit der Chromosomen eines Individuums. Konnte man anfangs aufgrund der fehlenden Unterscheidungsmerkmale der Chromosomen nur numerische und sehr grobe strukturelle Veränderungen detektieren, lieferte die Einführung der Chromosomenbänderungsmethoden im Jahre 1968 den Auftakt zur routinemäßigen Anwendung der Karyotypisierung in der Medizin und in der Forschung (Casperson et al. 1968, Casperson et al. 1970a, Casperson et al. 1970b). Eine wichtige Bedeutung für die Bänderungsmöglichkeit der Chromosomen liegt im unterschiedlichen Kondensierungsgrad der in ihnen enthaltenen DNS. So hat jedes Chromosom eine mit verschiedenen Färbungen darstellbare charakteristische Abfolge von Heterochromatin und Euchromatin, welche sich durch die unterschiedlichen Charakteristika der Chromosomen in den einzelnen Banden ergibt (Comings 1978). Störungen der Bandenabfolge werden unter dem Begriff „Strukturveränderungen“ zusammengefasst.

Chromosomen dienen in der Mitose und Meiose als Träger des Erbguts und vereinfachen die symmetrische Verteilung der DNS auf die Tochterzellen. Bei diesem Vorgang kommt es ständig spontan oder aufgrund physikalischer oder chemischer Noxen zu Brüchen in den Chromosomen, welche durch verschiedene Reparaturmechanismen beseitigt werden können. Dabei kann es jedoch zu strukturellen Veränderungen auf chromosomaler Ebene kommen (Haber 2000). Verursachen die entstandenen Brüche und Umlagerungen einen Verlust oder Zugewinn von Chromosomenmaterial, spricht man von einem unbalancierten Karyotyp. Je nach Größe und Bedeutung des verlorenen oder hinzukommenden Materials führt dies von keinen oder mehr oder weniger schweren phänotypischen Auffälligkeiten bis hin zur Lebensunfähigkeit des betroffenen Individuums. Bei balancierten Veränderungen besteht zwar eine Veränderung der Struktur der Chromosomen, die Gesamtheit der genetischen Information bleibt jedoch unverändert vorhanden.

Bei einem klinisch unauffälligen Patienten ist eine balancierte Strukturveränderung meist ein Zufallsbefund. Oft wird jedoch eine balancierte Veränderung bei Paaren mit Fertilitätsproblemen oder einem gesunden Elternteil eines phänotypisch auffälligen Kindes mit unbalanciertem Karyotyp gefunden (Pantzar et al. 1984).

In den Fällen, bei denen eine balanciert erscheinende Chromosomenanomalie bei einem auffälligen Patienten beobachtet wird, besteht der Verdacht auf ein „Disease-associated balanced chromosome rearrangement“ (DBCR). Manchmal kann eine detaillierte Analyse der Bruchpunkte Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang zwischen genotypischen und phänotypischen Veränderungen liefern. In einigen wenigen Fällen kann so ein Hinweis auf die Funktion eines bislang noch nicht genauer untersuchten Gens gefunden werden. Da die Auflösung der Chromosomenbänderung mittels Strukturanalyse mit bester Qualität der Chromosomenpräparate bei nur etwa 5-10 Mb (Menten et al. 2006) liegt, müssen höherauflösende Verfahren herangezogen werden, beispielsweise die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH, s. Kapitel Methoden). Durch den Einsatz dieser Methode konnten bereits in anderen Fällen detailliertere Informationen zur Karyotyp-Phänotyp-Korrelation erzielt werden (Schröder et al. 1998, Bartsch et al. 1999, Zhu et al. 2001, Walter et al. 2004, Spielmann et al. 2016).

Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit werden die Chromosomenabschnitte zweier phänotypisch auffälliger Patienten analysiert. Bei beiden Kindern wurde eine strukturelle Chromosomenanomalie nachgewiesen, die sich zytogenetisch balanciert darstellte. Mittels FISH wurden die Chromosomenbruchpunkte untersucht, um Aufschluss über die genaue Lokalisation und die in dieser Region befindlichen Gene zu erhalten. Durch die Identifizierung der Bruchstellen und eventuell in ihrer Funktion beeinträchtigten Gene, können Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp der Patienten gezogen werden.

Des Weiteren können die detaillierten Untersuchungen über die Ebene der klassischen Zytogenetik hinaus dazu beitragen, unser molekulares Verständnis des komplexen Vorgangs der Vererbung und der Entwicklungskinetik zu erweitern.

2 Literaturdiskussion

2.1 Angeborene Entwicklungsauffälligkeiten

Werden bei einem Kind Entwicklungsauffälligkeiten diagnostiziert, stellt sich in vielen Fällen die Frage nach der Ursache. Das Risiko gesunder, nicht miteinander verwandter Eltern, ein Kind mit einer angeborenen Erkrankung zu bekommen, liegt bei etwa 2-3% (Patricia 1977, Warburton 1991, Dolk et al. 2010). In etwa 20% der Fälle kann der Auslöser geklärt werden, wovon rund 95% auf chromosomale oder genetische Ursachen fallen. Bei den verbleibenden Fällen ist die Ursache unbekannt (Feldkamp et al. 2017). Es wird ein Zusammenhang zwischen äußeren Faktoren, wie zum Beispiel chemischen oder physikalischen Noxen, Mangel- oder Fehlernährung oder dem Alter der Eltern und dem Risiko für eine embryonale oder fetale Schädigung beobachtet (Lentze et al. 2003, Harris et al. 2017).

2.2 Diagnostische Möglichkeiten bei unklaren Entwicklungsstörungen

Bei einem Kind mit unklarer Entwicklungsstörung ist zur Abklärung oft eine breite Palette an körperlichen Untersuchungen nötig. Es muss versucht werden, eine Differenzierung zwischen isolierter Fehlbildung oder Vorliegen eines Syndroms, also eines Symptomenkomplexes aufgrund einer gemeinsamen Ursache, zu erzielen.

2.2.1 Genetische Beratung

Neben der Erhebung einer Vielzahl klinischer Parameter, ist eine ausführliche Schwangerschafts- und Geburtsanamnese für die Feststellung möglicher Ursachen wichtig. In diesem Zusammenhang ist eine Vorstellung bei einem Humangenetiker zu empfehlen. Zur genetischen Abklärung gehört zudem auch die Erhebung einer ausführlichen Familienanamnese über 3 Generationen sowie die Information der Eltern über eventuelle Möglichkeiten und Grenzen der genetischen Abklärung.

2.2.2 Chromosomenanalyse

Neben gezielten genetischen Untersuchungen bei Verdacht auf monogene Erkrankungen spielt die Durchführung einer Chromosomenanalyse im Rahmen der Abklärung von Entwicklungsstörungen unklarer Genese eine große Rolle.

War es zu Beginn der Einführung der Chromosomenanalysen nur möglich, numerische oder grobstrukturelle Veränderungen zu erkennen, eröffnete die Entdeckung der Chromosomenanalyse mit verschiedenen Bänderungsverfahren Mitte des letzten Jahrhunderts neue Möglichkeiten zur Ursachenforschung bei angeborenen Auffälligkeiten. Im Karyotyp des Menschen können mehr Veränderungen auftreten, als man zunächst angenommen hatte.

Ein Chromosomenscreening an einer umfassenden Zahl an Neugeborenen im Rahmen der Studie von Nielsen und Wohlert im Jahre 1991 an 34.910 Neugeborenen zeigte vielfältige Veränderungen der Chromosomen sowohl bei gesunden, als auch klinisch auffälligen Kindern. Zusammengefasst haben Chromosomenveränderungen eine Inzidenz von etwa 1:118, wovon strukturelle Besonderheiten etwa 49 % der Fälle ausmachen (Nielsen und Wohlert 1991).

Während bei unbalancierten autosomalen Chromosomenveränderungen fast immer eine Korrelation zum Phänotyp hergestellt werden kann, ergibt sich bei balancierten Veränderungen in Zusammenhang mit angeborenen Auffälligkeiten die Frage nach Ursache und Wirkung.

Im Rahmen vorgeburtlicher Untersuchungen aufgrund erhöhten maternalen Alters werden gelegentlich balanciert erscheinende Translokationen oder Inversionen beobachtet. In den meisten Fällen wurde die balancierte Veränderung von einem Elternteil an das Kind vererbt. Die Häufigkeit einer neu entstandenen balanciert erscheinenden reziproken Translokation liegt bei 1 von 2000 Neugeborenen, für Inversionen bei 1 zu 10000 (Warburton 1991). Das statistische a-priori Risiko für angeborene Gesundheitsstörungen liegt bei diesen Kindern mit 6,7% etwas mehr als doppelt so hoch wie das allgemeine Basisrisiko in der Normalbevölkerung von 2-3%. (Warburton 1991, Patricia 1977).

2.2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Eine wichtige Rolle bei der weiteren Abklärung spielt die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (siehe auch Kapitel Methoden) als eine schon länger ergänzenden Untersuchungen bei Verdacht auf Chromosomenimbancen (Pardue und Gall 1969). Sie ermöglicht es, unter Zuhilfenahme genomweiter BAC-Bibliotheken, genau definierte Chromosomenabschnitte auf die korrekte Kopienzahl und die Lokalisation im Karyogramm zu untersuchen. Bei unklaren Entwicklungsstörungen kommt die gezielte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung jedoch nur zum Einsatz, wenn der zu untersuchende Abschnitt bereits durch einen klinischen Verdacht oder durch eine auffällige Karyotypisierung eingegrenzt werden konnte.

2.2.4 CGH

Die comparative genomische Hybridisierung wurde 1992 eingeführt und ist eine Anwendungsmöglichkeit der Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung. Die CGH ermöglicht es, genomweit nach Imbalancen im Erbgut zu suchen, ohne eine Zellkultur und Karyotypisierung durchzuführen oder den vermuteten Bereich weiter einschränken zu müssen. Bei dieser Methode wird das gesamte zu untersuchende Genom amplifiziert, zu fluoreszenzmarkierten Sonden gestaltet, zu gleichen Teilen mit einer andersfarbig gelabelten Referenz-DNS gemischt und auf ein weiteres Referenz-Genom in Form einer Chromosomenmetaphase hybridisiert. Deletionen, bzw. Duplikationen erscheinen dann als Verschiebung der Fluoreszenz-Mischung in den betroffenen Abschnitten. Anwendung fand die CGH vor allem in der Tumorgenetik, da bei Tumoren oft komplexe Deletionen und Amplifikationen gefunden werden können und eine Zellkultur von soliden Tumoren sich oft schwierig gestaltet (Kallioniemi et al. 1992). Die Auflösung der CGH erreichte jedoch in der Anwendung nicht die erhoffte Sensitivität, je nach Art der Veränderung liegt sie bei bis zu 10-20 Mb (Weiss et al. 1999).

2.2.5 Array-CGH

Die Array-CGH ist eine Weiterführung der herkömmlichen (Metaphasen-) CGH, bei der anstelle einer Referenzmetaphase viele auf eine Matrix gebundene Referenz-DNS-Abschnitte (meist Verwendung von BAC-Sequenzen) eingesetzt werden. Die Referenz-Sequenzen sind über das ganze Genom verteilt, durch die Anzahl der Referenz-Abschnitte und die Verteilungsdichte kann die Auflösung bestimmt werden (1Mb bis 30Kb) (Lipshutz et al. 1995).

Ein breites Einsatzgebiet findet die Array-CGH im Bereich der genetischen Diagnostik bei Kindern mit ungeklärten Entwicklungsstörungen, mentaler Retardierung, Fehlbildungen und Symptomen aus dem Autismus Spektrum. Der diagnostische Zugewinn durch die Array-CGH wurde bei dieser Patientengruppe mit 10-20% gegenüber einer konventionellen Chromosomenanalyse beziffert (Sagoo et al. 2009, Miller et al. 2010) und die Array-CGH als erste diagnostische Maßnahme bei der o.g. Indikation angegeben. Andererseits müssen auch ihre Grenzen und Limitierungen bedacht werden (Manning et al. 2010). Waggoner et al (2018) haben kürzlich im Rahmen des „American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)“ Leitlinien über Zusatzuntersuchungen nach unauffälliger Array-CGH erarbeitet. Schließlich hat die Array-CGH auch Eingang in die Pränataldiagnostik gefunden (Cheng et al. 2019).

2.2.6 Next-Generation-Sequencing

Der Fortschritt in der Technik neuer Sequenzierverfahren in der genetischen Diagnostik hat inzwischen einen großen Durchsatz an Untersuchungen in relativ kurzer Zeit möglich gemacht (Next-Generation-Sequencing, NGS). Auf die Methode wird hier nicht weiter eingegangen, es ist jedoch inzwischen durch den Einsatz der NGS möglich, alle bekannten codierenden Bereiche eines Genoms (Whole-Exome-Sequencing) (Nuytemans und Vance 2010) oder auch ein gesamtes Genom (Whole-Genome-Sequencing) zu sequenzieren (Ng und Kirkness 2010). Während die NGS anfangs aufgrund der großen Datenfülle sowie des enormen zeitlichen finanziellen Aufwands nur in der Forschung zum Einsatz kam, findet sie ab etwa 2010 zunehmende Anwendung in der molekulargenetischen Routinediagnostik. Neuere Arbeiten berichten von Diagnoseraten durch WES von 57,7 % (Stark et al, 2016) bei

Kindern mit vermuteten monogenen Erkrankungen, oder 42 % bei Kindern mit unklaren Entwicklungsstörungen und unspezifischen neurologischen Symptomen durch die Kombination Index- und Elternuntersuchung (Trio-WES) (Mahler et al. 2019). Malinowski et al. (2020) stellten in ihrer Metanalyse von 167 Publikationen, bei denen wegen kongenitalen Fehlbildungen, Entwicklungsstörungen oder Intelligenzminderung eine WES, bzw. eine WGS durchgeführt wurde, deren Überlegenheit gegenüber bisherigen diagnostischen Methoden bezüglich des Outcomes für Patienten und Familienangehörige heraus. Wie die Array-CGH hat auch die WES mittlerweile Eingang in die Pränataldiagnostik gefunden (Lord et al. 2019)

2.3 Ursachen für Entwicklungsauffälligkeiten

Als mögliche Ursachen für Entwicklungsauffälligkeiten bei scheinbar balancierten Strukturveränderungen kommen mehrere Mechanismen in Betracht. In einigen Fällen verbirgt sich hinter einer zunächst vermuteten einfachen reziproken Translokation ein komplexes Chromosomenrearrangement mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für Imbalancen (CCR, mehr als 3 Bruchpunkte) (Patsalis et al. 2004). Die Untersuchung einer Gruppe Patienten mit balanciert erscheinenden Translokationen oder CCRs mittels Array-CGH zeigte, dass in etwa 40% der Patienten Deletionen festgestellt werden können (De Gregori et al. 2007). Dabei wurden Deletionen sowohl bruchpunktassoziiert als auch bruchpunktunabhängig beobachtet.

Eine weitere Erklärung für Entwicklungsstörungen in diesem Zusammenhang stellen Duplikationen dosisabhängiger Gene dar, dies scheint jedoch im Vergleich zu Deletionen seltener der Fall zu sein (Gribble et al. 2005).

In manchen Fällen kann eine Unterbrechung eines einzelnen Gens als Ursache für phänotypische Auffälligkeiten ausfindig gemacht werden (Millar et al. 2000, Curran et al. 1993, Budarf et al. 1995).

Neben Deletionen oder Unterbrechungen entwicklungsrelevanter Gene kann auch die Neupositionierung im Genom eine Rolle bei der Aktivierung oder Deaktivierung der Genexpression spielen (Kleinjan und va Heyningen 1998). Eine Untersuchung

auf das Vorhandensein dieses Positionseffekts gestaltet sich jedoch schwierig, da viele Transkriptionsfaktoren bisher unbekannt sind. Eine Expressionsanalyse auf RNS-Ebene könnte Aufschluss geben, allerdings ist die Genexpression nicht in allen Geweben gleich ausgeprägt und variiert in den unterschiedlichen embryonalen Entwicklungsstadien.

Bietet eine heterozygote Deletion oder Unterbrechung eines rezessiven Gens keine ausreichende Erklärung für den Phänotyp des Trägers, sollte erwogen werden, ob es durch die Deletion zu einer Offenlegung einer pathogenen Mutation auf dem verbliebenen Allel gekommen sein könnte (Patsalis et al. 2004)v.

Betrachtet man die möglichen Ursachen für Entwicklungsauffälligkeiten wird deutlich, dass es zum gegenwärtigen Zeitpunkt mit den zur Verfügung stehenden Techniken auch bei unauffälligen Befunden noch nicht möglich ist, auszuschließen, dass eine balancierte Translokation kausal für einen auffälligen Phänotyp ist. Es sollte aber auch daran gedacht werden, dass bei diesen Kindern andere nichtgenetische Ursachen oder unabhängige genetische und epigenetische Faktoren eine Rolle spielen können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die weiterführende Diagnostik bei balanciert erscheinenden Chromosomenrearrangements eine wichtige Quelle für die Grundlagenforschung in Bezug auf Genotyp-Phänotyp-Korrelation darstellt (Brugge et al. 2000) und uns weitere Puzzleteilchen zum Verständnis molekulargenetischer Mechanismen liefern kann.

3 Material und Methoden

3.1 Fallbeschreibungen

Untersucht wurden Metaphasechromosomen zweier Patienten. Bei beiden Jungen wurde aufgrund geistiger Retardierung und leichter phänotypischer Auffälligkeiten eine Chromosomenanalyse durchgeführt. Dabei wurde in beiden Fällen ein auffälliger Karyotyp erhoben, der sich mikroskopisch balanciert darstellte. Eine Untersuchung

der jeweiligen Eltern ergab unauffällige Befunde, so dass die Veränderungen im Chromosomensatz der Kinder sehr wahrscheinlich de novo entstanden sind.

Fall 1

Patient 1, geb. 1996

Patient 1 ist der erste Sohn gesunder, nicht verwandter Eltern. Er hat zwei gesunde Brüder, es gibt keine Hinweise auf angeborene Fehlbildungen oder Erkrankungen in seiner Familie.



Abbildung 1: Foto Patient 1 im Alter von acht Jahren

Patient 1 wurde nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf am Termin mittels sekundärer Sectio wegen kindlichem Stress entbunden. Der Ein-Minuten APGAR-Wert betrug 5, der Fünf-Minuten APGAR-Wert 7. Das Gewicht lag mit 2750 Gramm zwischen der 2. und 9. Perzentile. Der Patient wies Klumpfüße auf, die jedoch keiner operativen Behandlung bedurften. Bis auf eine leichte Hypospadie wurde ein unauffälliges Genitale beobachtet. Die postpartale Zeit gestaltete sich unauffällig, er konnte am 5. Tag nach Hause entlassen werden.

Der Patient lernte mit sechs Monaten sitzen und mit 10 Monaten krabbeln. Das erste

Mal auffällig wurde er mit 16 Monaten. Seine Eltern stellten ihn beim Kinderarzt vor, weil er weder laufen noch sprechen konnte und sie der Meinung waren, er sei ungeschickt. Aufgrund einer leichten globalen Entwicklungsverzögerung bekam er Physiotherapie und Logopädie.

Im Alter von zwei Jahren wurde er beim Neurologen vorstellig. Er hatte mit 21 Monaten das Laufen gelernt, war aber sehr unsicher und wurde aufgrund einer milden Rumpf-Ataxie und einer Entwicklungsverzögerung untersucht. Zu diesem Zeitpunkt sprach er einzelne Worte.

Bei einer Chromosomenanalyse wurde eine zunächst balanciert erscheinende perizentrische Inversion eines Chromosoms 7 beobachtet [initial erhobene Karyotypformel: 46,XYqs,inv(7)(q35q36.2)][Abb. 2].

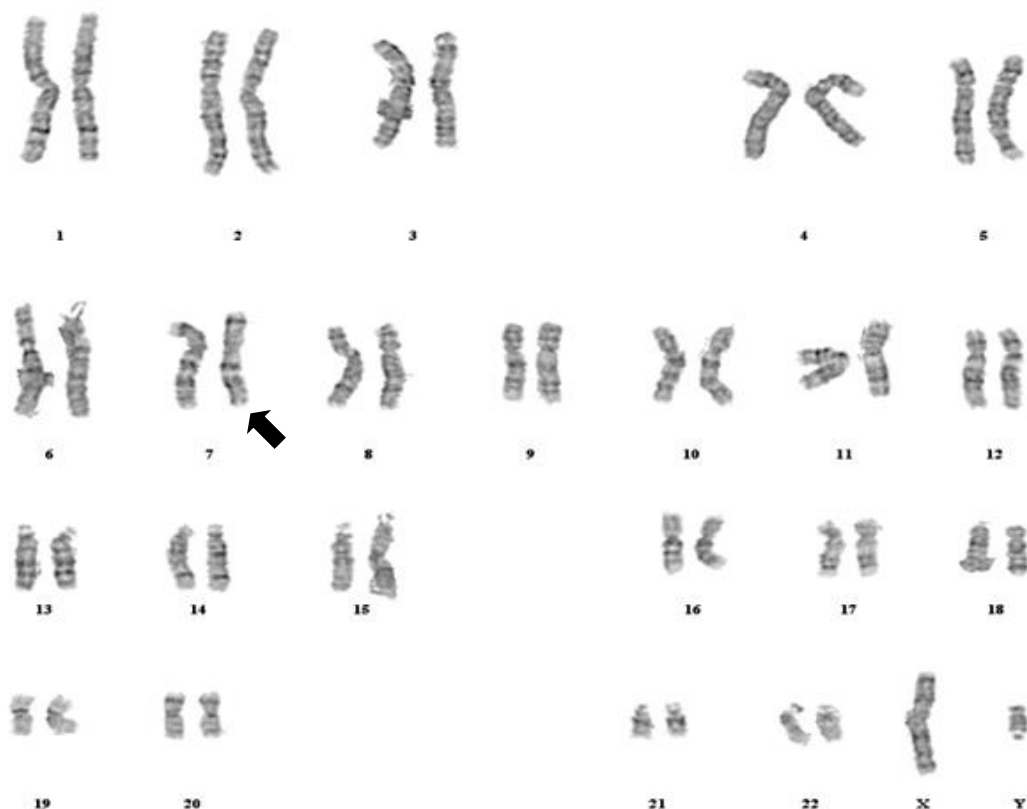


Abbildung 2: Initial erstelltes Karyogramm von Patient 1: 46,XYqs,inv(7)(q35q36.2)

Die Untersuchungen auf das Vorliegen eines Fragilen-X- oder Prader-Willi-Syndroms ergaben unauffällige Befunde. Die Chromosomenanalyse der Eltern zeigte jeweils

einen unauffälligen Karyotyp.

Die Untersuchungen von Metaboliten wie Aminosäuren, Stoffwechselprodukten, Hormonen und Antikörpern lagen im Normbereich. Im EEG zeigten sich unreife Muster, es lagen keine Anzeichen für das Vorliegen einer Epilepsie vor. Eine MRT-Untersuchung des Schädels war ohne pathologischen Befund.

Im Alter von drei Jahren fiel der Patient vor allem durch seine motorische Ungeschicklichkeit und seine Sprachentwicklungsverzögerung auf. Seine Gelenke waren zudem überstreckbar. Obwohl keine eindeutigen Dysmorphiezeichen vorlagen, fehlte die faziale Ähnlichkeit zu den Eltern.

In den folgenden acht Jahren entwickelte der Patient ein hyperaktives und selbstbezogenes Verhalten mit autistischen Zügen. Er besucht eine Schule für Kinder mit moderaten Lernstörungen.

Fall 2

Patient 2, geb. 1996

Der Patient ist der zweite Sohn gesunder, nicht miteinander verwandter Eltern. Schwangerschaft und Geburt verliefen unauffällig. Im Entwicklungsverlauf fiel er durch eine Sprachentwicklungsverzögerung und motorische Dyspraxie auf. Er neigte zu aggressivem Verhalten mit Wutanfällen. Es lagen keine Schwachsichtigkeit oder Schwerhörigkeit vor, die Nahrungsaufnahme und das Schlafverhalten wiesen keine Auffälligkeiten auf. In der Krankheitsanamnese wurden wiederholte Infekte, eine Allergieneigung mit Asthma und Ekzemen und eine Anfälligkeit für Nasenbluten geschildert.

Körpergröße und Gewicht lagen auf der fünfundsiebzigsten Perzentile. Es bestanden nur geringfügige körperliche Auffälligkeiten: Sommersprossen, eine nur dünn ausgebildete Oberlippe und Karies. Der Ohrknorpel hatte eine weiche Konsistenz, Finger und Zehen waren kurz. Die Chromosomenanalyse ergab eine balanciert

erscheinende reziproke Translokation zwischen dem kurzen Arm eines Chromosoms 4 und dem langen Arm eines Chromosoms 9.

Karyotypformel: 46,XY,t(4;9)(p16.3;q11) [Abb. 3]

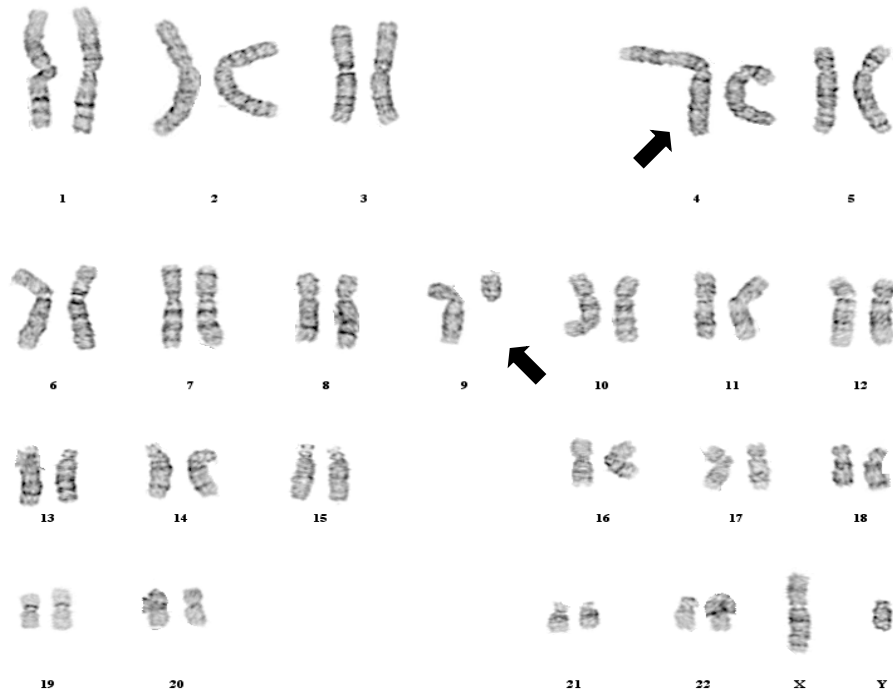


Abbildung 3: Initial erstelltes Karyogramm von Patient 2: 46,XY,t(4;9)(p16.3;q11)

Beide Elternteile wiesen einen unauffälligen Karyotyp auf.

3.2 Material

Als Ausgangsmaterial dienen heparinisierte Blutproben der Patienten und ihrer Eltern. Nach der Kultivierung und PHA-Stimulierung der im Blut vorhandenen Lymphozyten wurden Objektträger mit Metaphasechromosomen hergestellt. Auf diese Metaphasechromosomen wurden die für die jeweiligen DNS-Sequenzen spezifischen DNS-Sonden hybridisiert und detektiert.

Die verwendeten DNS-Abschnitte zu Herstellung der Sonden wurden aus bereits

bekanntes und katalogisiertes DNS-Sequenzen aus BACs (bacterial artificial chromosome) isoliert und amplifiziert. Die hierbei eingesetzten BACs stammen aus der Ensembl-Bibliothek für humane Genome [Ensembl.org].

3.3 Eingesetzte BACs im Fall 1

BAC-Nummer	Lokalisation	Position / Größe
RP11-382D12	1q25.3	182.516.029-182.632.280 / 116.252 bps
RP11-445P19	1q31.1	185.670.954-185.755.794 / 84.841 bps
RP11-6E3	1q31.2	189.843.455-190.027.923 / 184.469 bps
RP11-92K2	1q31.2	190.888.976-191.018.664 / 129.689 bps
RP11-379L12	1q31.3	193.875.768-194.009.185 / 133.418 bps
RP11-135A14	1q31.3	140.524.574-140.678.443 / 153.870 bps
RP11-172L10	1q41	213.231.455-213.293.477 / 62.023 bps
RP11-5F19	1q41	213.843.688-214.005.803 / 162.116 bps
RP11-332J14	1q41	218.698.681-218.866.026 / 167.346 bps
RP11-322F10	1q41	218.864.021-218.985.621 / 121.601 bps

Tabelle 1: Liste der verwendeten BACs in Fall 1, welche auf Chromosom 1 hybridisieren

BAC-Nummer	Lokalisation	Position / Größe
RP11-313M4	7q31.33	123.973.902-124.124.128 / 150.227 bps
RP11-791P08	7q32.1	125.542.411-125.692.927 / 150.517 bps
RP11-105E03	7q32.1	125.859.365-126.027.400 / 168.036 bps
RP11-475H14	7q32.1	126.130.514-126.312.406 / 181.893 bps
RP11-309K22	7q32.1	126.310.437-126.465.834 / 155.398 bps
RP11-224A1	7q32.1	127.107.823-127.266.849 / 159.027 bps

RP11-62J1	7q32.1	127.648.902-127.812.452 / 163.551 bps
RP11-274B21	7q32.1	128.038.544-128.215.418 / 176.875 bps
RP11-307I2	7q34-35	143.102.265-143.211.337 / 109.073 bps
RP11-374N8	7q35	144.066.655-144.274.335 / 207.681 bps
RP11-49G5	7q35	144.233.518-144.384.550 / 151.033 bps
RP11-409M7	7q35	144.359.003-144.516.051 / 157.049 bps
RP11-697B15	7q35	145.051.154-145.187.440 / 136.287 bps
RP4-630F1	7q35	145.654.135-145.781.660 / 127.526 bps
RP11-766K8	7q35	145.781.461-145.799.233 / 17.773 bps
RP5-969D4	7q35	146.102.541-146.178.149 / 75.609 bps
RP11-643A21	7q35	146.553.728-146.706.612 / 152.885 bps
RP11-291N9	7q35	146.706.412-146.787.701 / 81.290 bps
RP4-811H12	7q35	146.787.501-146.949.716 / 162.216 bps
RP4-777G9	7q35	146.949.516-147.038.613 / 89.098 bps
RP11-654P5	7q35	147.038.413-147.084.470 / 46.058 bps
RP11-1150H5	7q35	147.259.181-147.317.996 / 58.816 bps
RP11-519M4	7q36.1	147.542.899-147.689.274 / 146.376 bps
RP11-312C1	7q36.1	152.089.700-152.229.850 / 140.151 bps
RP11-422E4	7q36.2	153.750.370-153.901.568 / 151.199 bps

Tabelle 2: Liste der verwendeten BACs in Fall 1, welche auf Chromosom 7 hybridisieren

3.4 Eingesetzte BACs im Fall 2

BAC-Nummer	Lokalisation	Position / Größe
RP11-478C6	4p16.3	200.623-354.887 / 154.265 bps
RP11-1191J2	4p16.3	592.222-722.011 / 129.790 bps
RP11-440L14	4p16.3	722.012-906.785 / 184.774 bps
RP11-460I19	4p16.3	906.786-1.083.016 / 176.231 bps
RP11-386I15	4p16.3	1.271.479-1.356.459 / 84.981 bps
RP11-1197E19	4p16.3	1.782.574-1.850.023 / 67.450 bps
RP11-478C1	4p16.3	2.145.195-2.321.533 / 176.339 bps
RP11-324I10	4p16.3	4.175.374-4.366.969 / 191.596 bps

Tabelle 3: Liste der verwendeten BACs in Fall 2, welche auf Chromosom 4 hybridisieren

BAC-Nummer	Lokalisation	Position / Größe
RP11-216M21	9p11.2 / 9q12	42.204.266-42.368.151 / 163.886 bps
RP11-399F4	9p11.2 / 9p11.1	42.938.056-43.025.195 / 87.140 bps
Alpha-Satelliten (VYSIS)	9cen	

Tabelle 4: Liste der verwendeten BACs in Fall 2, welche auf Chromosom 9 hybridisieren

3.5 Reagenzien

Es wurden die laborüblichen Reagenzien verwendet, Angaben über Inhalt und Zusammensetzung finden sich auf dem Institutsserver der Humangenetik der Universitätsmedizin Mainz:

3.6 Methoden

3.6.1 Allgemeines zur FISH-Diagnostik

Gelang mit der Entdeckung der Darstellbarkeit der Chromosomen und der Chromosomenbänderung ein großer Schritt in der genetischen Diagnostik, so war die Einführung der „In-situ-Hybridisierung“ Ende der 60er Jahre ein weiterer Quantensprung für die Zytogenetik. Hierbei machte man sich die Eigenschaften der De- und Renaturierung komplementärer DNS- oder RNS-Einzelstränge zunutze (John et al. 1969, Pardue und Gall 1969). Ein weiterer wichtiger Schritt war die Einführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, die die Anwendung deutlich vereinfachte und es ermöglichte, dass die FISH heute in großem Rahmen als Routinediagnostik in der Zytogenetik angewandt wird (Langer et al. 1981).

Eine umfassende, genomweite Bibliothek von BACs (Bacterial Artificial Chromosome) ermöglicht eine zielgerichtete Hybridisierung auf Chromosomenabschnitte, um die Anzahl der Kopien oder auch die Lokalisation in der Metaphase zu identifizieren (O'Connor et al. 1989, Asakawa et al. 1997, Haaf 2000).

3.6.2 Herstellung der Metaphasepräparate

Die Chromosomenpräparate wurden nach den üblichen Methoden zur Herstellung von Metaphasepräparaten angefertigt. Das Patientenmaterial bestand aus heparinisiertem Vollblut. Aus PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen wurde nach der gängigen Methode mittels Kolchizinbehandlung, hypotoner KCl-Behandlung und Methanol-Eisessig-Fixierung eine Zellsuspension in Methanol-Eisessig zur Konservierung und Anfertigung der Präparate hergestellt.

Die Zellsuspension wurde auf Objektträger aufgebracht und für die weiteren Analysen entsprechend vorbereitet.

3.6.3 Herstellung der DNS-Sonden

DNS

Die DNS-Abschnitte zur Herstellung der Sonden wurden aus BACs der Ensembl-Bibliothek für humane Genome gewonnen:

- Ausstreichen der Bakterien auf einen Nähragar mit - je nach BAC - entsprechendem Antibiotikum mittels 3-Strich-Technik zur Vereinzellung
- Kultivierung der Platten für 16h bei 37°C
- Überführung einer Kolonie des Bakterienstammes in 50ml Flüssignährmedium
- Kultivierung unter ständigem Durchmischen für 16h bei 37°C
- Kryokonservierung der Bakteriensuspension (800µl in 500µl 50% Glycerol) bei -80°C
- Isolierung der Bakterien-DNS mittels PhasePrep™ BAC DNA Kit von Sigma laut Anweisung der Mini Scale Preparation
- Bestimmung der DNS-Konzentration mittels Photometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260nm

Nick-Translation

Die Nick-Translation ist ein Verfahren, um mittels DNS-Polymerase I aus spezifischen DNS-Abschnitten geeignete Sonden für die In situ-Hybridisierung herzustellen (Rigby et al. 1977). Hierbei können Antikörper- oder Fluoreszenz-gelabelte dNTPs verwendet werden.

Die ersten DNS-Sonden wurden mittels Nick-Translation mit indirekter Markierung der Sonden und anschließender Detektion mittels Fluoreszenz-Antikörpern hergestellt. Für die nachfolgenden Sonden wurden direkt markierte dNTPs eingesetzt, wodurch die Antikörperdetektion entfiel.

Ansatz mit indirekt markierten Sonden (50µl Ansatz):

- 30 - x µl H₂O
- 5 µl 10xNT-Puffer
- 5 µl dNTP-Mix

- 5 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol
- 1 µl Bio-16-dUTP oder DIG-16-dUTP
- x µl DNS(1µg)
- 3 µl DNase I, 1:3000 in H₂O bidest verdünnt
- 1 µl DNA-Polymerase I

Ansatz mit direkt markierten dNTPs (25µl)

- 15 – x µl H₂O
- 2,5 µl 10xNT-Puffer
- 2,5 µl dNTP-Mix
- 2,5 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol
- 0,5 µl direkt gelabeltes dUTP (rot oder grün)
- x µl DNS (0,5µg)
- 1,5 µl DNase I, 1:3000 in H₂O bidest verdünnt
- 0,75 µl DNA-Polymerase I

Ansatz auf Eis pipettieren, 45-60 min bei 15°C inkubieren,

Fragmentlängenanalyse (kann ausgespart werden),

7µl Ansatz auf 1,5% Agarosegel mittels Gelelektrophorese analysieren (gewünschte Fragmentlänge 200-500 bp, falls zu lang, eventuell Nachverdau).

Bei ausreichendem Verdau, Zugabe von 1 Volumen Stopp-Mix.

Aufreinigung und Fertigstellung der DNS-Sonden

Zum Entfernen nicht eingebauter Nukleotide und zu kurzer DNS-Abschnitte wurde eine chromatographische Aufreinigung der DNS-Sonden über eine Sephadex-Säule durchgeführt:

- Spitze einer 1ml-Einmalspritze mit etwas Watte ausstopfen
- mit Sephadex G50 in TE + 0,1% SDS auffüllen
- bei 2000 rpm 2 min zentrifugieren
- Nick-Translationsansatz auftragen
- bei 2000 rpm 5 min zentrifugieren, Eluat auffangen

Einzelne Nukleotide und zu kurze DNS-Abschnitte verbleiben in der Säule

Zur Unterdrückung von Kreuzhybridisierungen repetitiver DNS-Sequenzen wurden die gereinigten Sonden mit cot-DNS und salm sperm DNS vermischt und durch Zugabe von Natriumacetat und Äthanol über Nacht bei -20°C gefällt:

Fällungsansatz:

- 25 µl Eluat
- 5 µl cot-DNS
- 5 µl salm sperm DNS
- 5 µl 3M NaAcetat pH 5,2
- 250 µl 100% Ethanol

Zur weiteren Aufreinigung der DNS-Abschnitte wurden die gefällten Sonden bei 13000 rpm 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200µl 70% Ethanol resuspendiert.

Danach wurden die Sonden erneut 15 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abermals verworfen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge für ca. 10 min getrocknet.

Die fertigen Sonden wurden in 5-10µl Hybmix aufgenommen.

3.6.4 Hybridisierung der DNS-Sonden auf Chromosomenpräparate

Um eine Hybridisierung zu ermöglichen, müssen sowohl das Präparat als auch die DNS-Sonde denaturiert werden, um Einzelstrang-DNS zu erhalten.

Vorbehandlung und Denaturierung der Objektträger:

- 1-5 min in 2xSSC einstellen (RT)
- aufsteigende Alkoholreihe (70% → 85% → 100% Ethanol, je 1min)
- Objektträger trocknen lassen

- 150-200 µl 70% deionisiertes Formamid / 30% 2xSSC auf Präparat aufbringen, mit Deckglas abdecken
- 3-5 min bei 73°C auf Wärmeplatte denaturieren
- aufsteigende Alkoholreihe
- Objektträger trocknen lassen, vor Sondenzugabe anwärmen (37°C)

Denaturierung und Hybridisierung der Sonde

- Sonde im Hybmix 30 min bei 45°C im Rüttler lösen
- vorsichtig resuspendieren
- 5-8 min bei 80°C denaturieren
- 30 min bei 37°C preanneelen
- auf vorgewärmten Objektträger aufbringen
- eindecken, mit Fixogum abdichten
- in feuchter Kammer bei 37°C 1-3 Tage inkubieren

3.6.5 Hybridisierungsanalyse

Je nach Verwendung von direktmarkierten dNTPs oder Biotin- bzw. Dig-gelabelten dUTPs erfolgte eine Direktanalyse oder eine Antikörperdetektion.

Direktanalyse

Die Objektträger wurden nach der Hybridisierung entdeckelt und 2min bei 65°C in 0,4xSSC ausgewaschen. Anschließend wurden sie 1 Minute in 2xSSC bei Raumtemperatur eingestellt, antrocknen gelassen, mit 15µl Vectashield incl. DAPI eingedeckelt und unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Antikörperdetektion

Waschen der Objektträger:

- 9 min in 2xSSC (45°C)
- 9 min in 0,2xSSC (55°C)
- kurz in 4xSSC/ 0,1% Tween (45°C) equilibrieren

Blocking:

- Objektträger mit 150 µl 3% Blocking eindecken
- 30 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren

Nachweisreaktion:

- Objektträger für 1min in 4xSSC/ 0,1% Tween (45°C) einstellen
- mit 150 µl Avidin/FITC-Antikörperverdünnungslösung eindecken
- 30 min in feuchter Kammer bei 37°C inkubieren
- 9 min in 4xSSC/0,1% Tween bei 45°C waschen
- mit 150 µl anti-Avidin/mouse-anti-GIG Verdünnungslösung eindecken
- 45 min in feuchter Kammer bei 37°C inkubieren
- 9 min in 4xSSC/0,1% Tween bei 45°C waschen
- mit 150 µl Avidin-FITC / sheep-anti-Mouse Verdünnungslösung eindecken
- 30 min in feuchter Kammer bei 37°C inkubieren

Gegenfärbung mit DAPI

- Objektträger abtropfen lassen
- mit 1 ml DAPI-Färbelösung abgedunkelt 10 min bei RT färben
- DAPI abkippen, Objektträger mit destilliertem Wasser abspülen
- im Dunkeln trocknen lassen
- mit 20 µl Antifadelösung eindecken, unter dem Mikroskop analysieren

3.6.6 Mikroskop

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 23 der Firma Zeiss). Die verwendeten Filter:

Grün: Filterset 10 (bp 450-490, ft 510, bp515-565)

Blau: Filterset 01 (bp365, ft395, lp397)

Rot: Filterset 15 (bp546/12, ft580, lp590)

Die fotografische Dokumentation erfolgte mit dem Bildanalyse-System Power Gene der Firma Applied Imaging mac probe 4.3.

4 Ergebnisse

4.1 Fall 1

Die ursprüngliche Karyotypformel von Patient 1 war mit 46,XYq,inv(7)(q35;q36.2) angegeben. Anhand der zytogenetisch erhobenen Karyotypformel wurden in Ensembl.org BACs ausgewählt, die im Bereich der Bruchpunkte hybridisieren sollten.

Name	Bande	Position	Hybridisierungsort
RP11-307I2	7q34	143.493.388-143.493.813	7q, invertiert
RP11-374N8	7q35	144.512.467-144.602.584	7q, invertiert [Abb.5]
RP11-697B15	7q35	145.051.154-145.187.440	1q [Abb. 4]
RP11-519M4	7q36.1	147.911.966-148.058.341	7q, nicht invertiert
RP11-422E4	7q36.2	154.119.437-154.270.634	7q, nicht invertiert

Tabelle 5: Erstes Sonden-Panel Fall 1

Rasch zeigte sich, dass bei dem Patienten komplexere Strukturveränderungen vorliegen, als zunächst vermutet wurde. Die DNS-Sonde RP11-697B15 (Grün) für den Bruchpunkt auf 7q35 hybridisierte auch auf einem der Chromosomen 1. [Abb. 4]

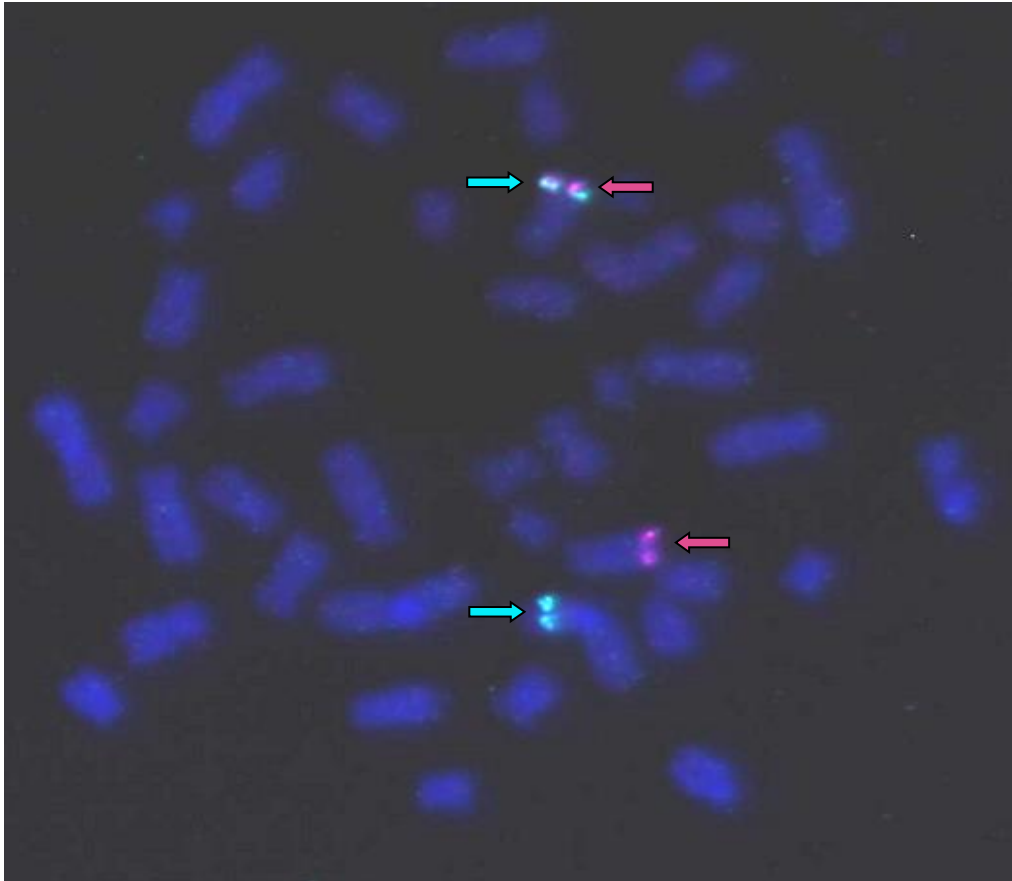


Abbildung 4: Fall 1, RP11-697B15 (grün) auf 7q und 1q; RP11-519M4 (rot) auf 7q (Pfeile)

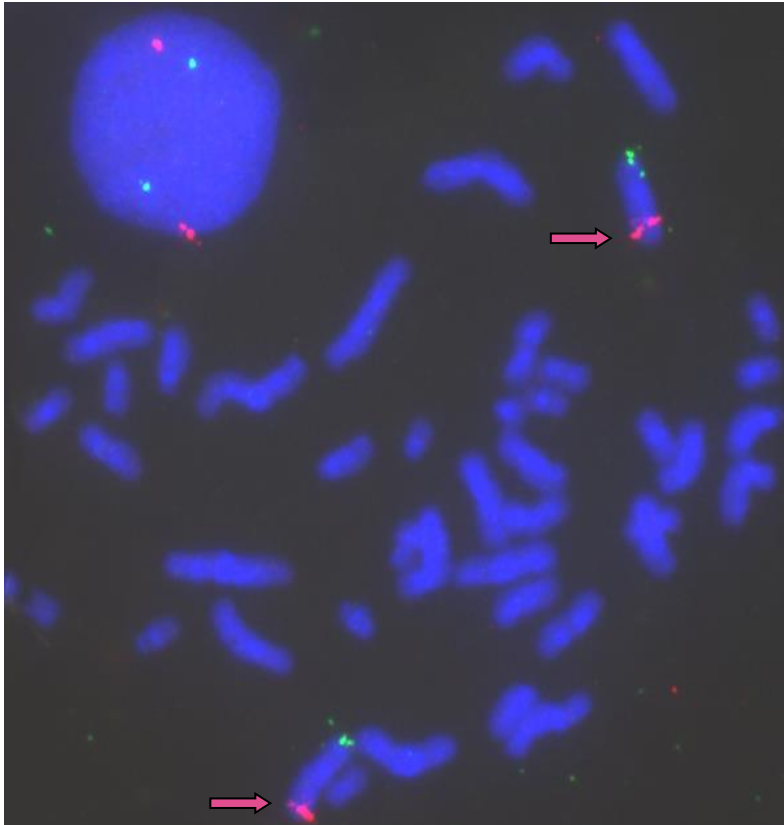


Abbildung 5: Fall 1, 7pter (grün); RP11-374N8 (rot) auf 7q (invertiert und normal) (Pfeile)

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der ursprüngliche Karyotyp revidiert. Die Bruchpunkte für die Inversion wurden anhand der Karyogramme neu ermittelt und auf die Banden 7q32.1 und 7q35 gelegt.

Name	Bande	Position	Hybridisierungsort
RP11-313M4	7q31.33	124.188.666-124.336.892	7q, nicht invertiert
RP11-274B21	7q32.1	128.251.308-128.355.597	7q, invertiert [Abb. 6]
RP11-409M7	7q35	144.728.070-144.768.002	1q
RP11-643A21	7q35	146.553.728-146.706.411	1q [Abb. 8]
RP11-654P5	7q35	147.407.480-147.453.336	7q, nicht invertiert[Abb. 7]
RP11-1150H5	7q35	147.628.248-147.686.862	7q, nicht invertiert
RP11-312C1	7q36.1	152.458.767-152.598.716	7q, nicht invertiert

Tabelle 6: Zweites Sonden-Panel Fall 1

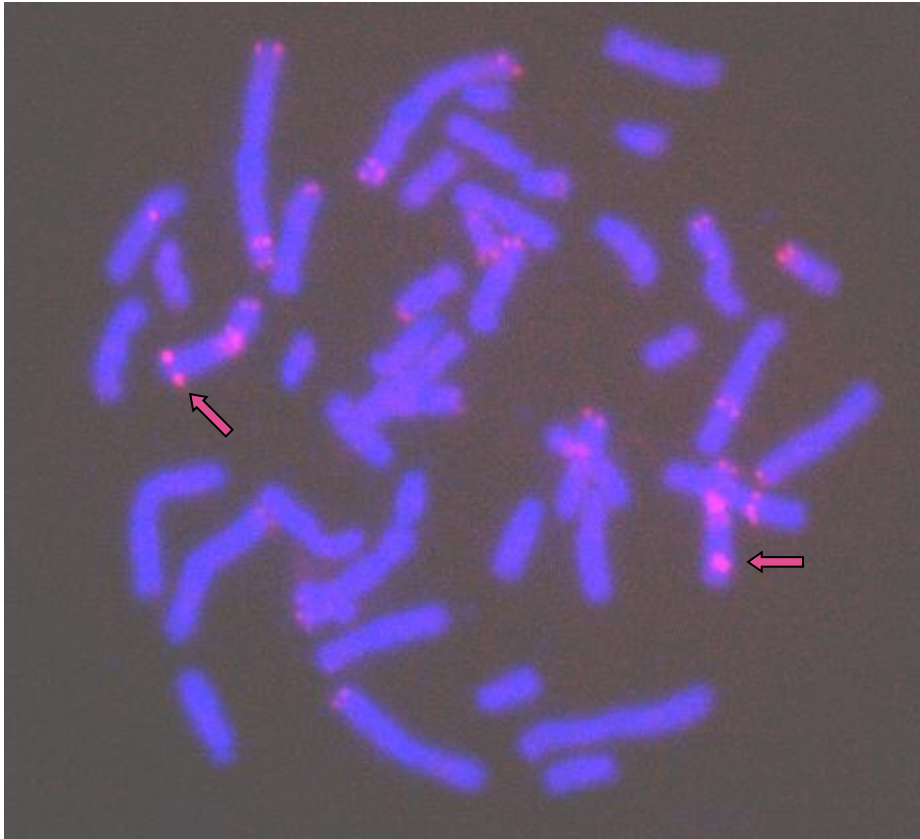


Abbildung 6: Fall 1, RP11-274B21 (rot) invertiert und nicht invertiert (Pfeile) auf 7q, mit Kreuzhybridisierungen

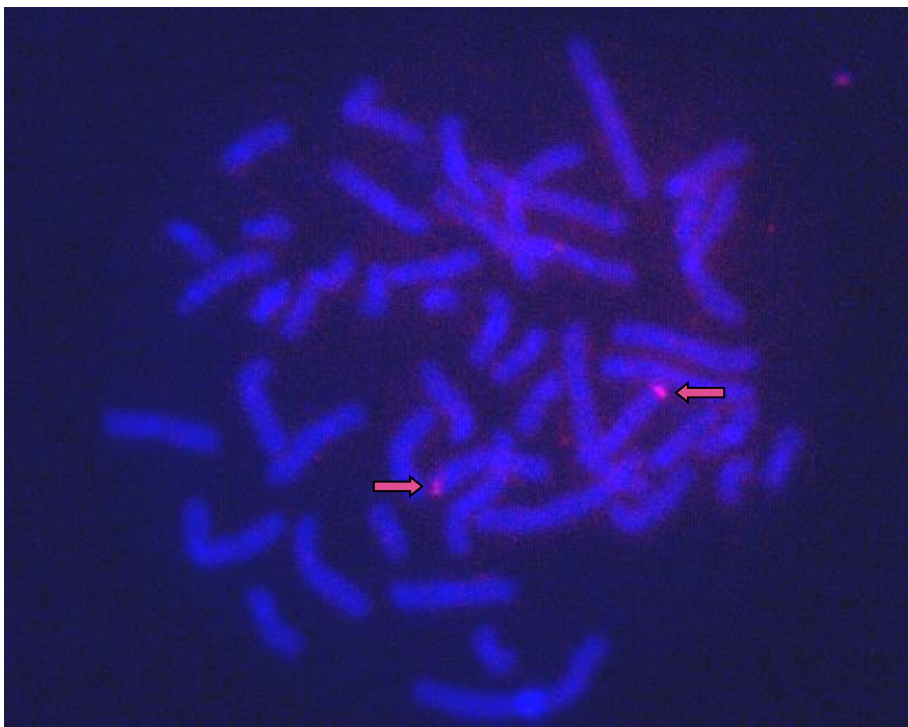


Abbildung 7: Fall 1, RP11-654P5 (rot) nicht invertiert auf 7q (Pfeile)

Um den Insertionsort auf Chromosom 1q näher einzugrenzen, wurden weitere Sonden auf Chromosom 1 hybridisiert und in Bezug zu RP11-643A21 gestellt.

Name	Bande	Position	Hybridisierungsort
RP11-382D12	1q25.3	184.251.406-184.365.657	1q, oberhalb
RP11-420P16	1q31.1	188.815.279-188.974.191	1q, oberhalb
RP11-463J7	1q31.1-31.2	188.892.717-189.058.635	1q, oberhalb
RP11-184F4	1q31.2	189.162.971-189.327.857	1q, oberhalb
RP11-189O8	1q31.2	189.468.242-189.624.029	1q, oberhalb
RP11-191J5	1q31.2	189.624.272-189.797.018	1q, oberhalb
RP11-6E3	1q31.2	189.843.455-190.027.923	1q, oberhalb [Abb. 8]
RP11-92K2	1q31.2	190.888.976-191.038.120	1q, oberhalb
RP11-379L12	1q31.3	193.875.766-194.047.789	1q, unterhalb
RP11-135A15	1q31.3	198.176.004-198.339.212	1q, unterhalb [Abb. 9]

Tabelle 7: Drittes Sonden-Panel Fall 1

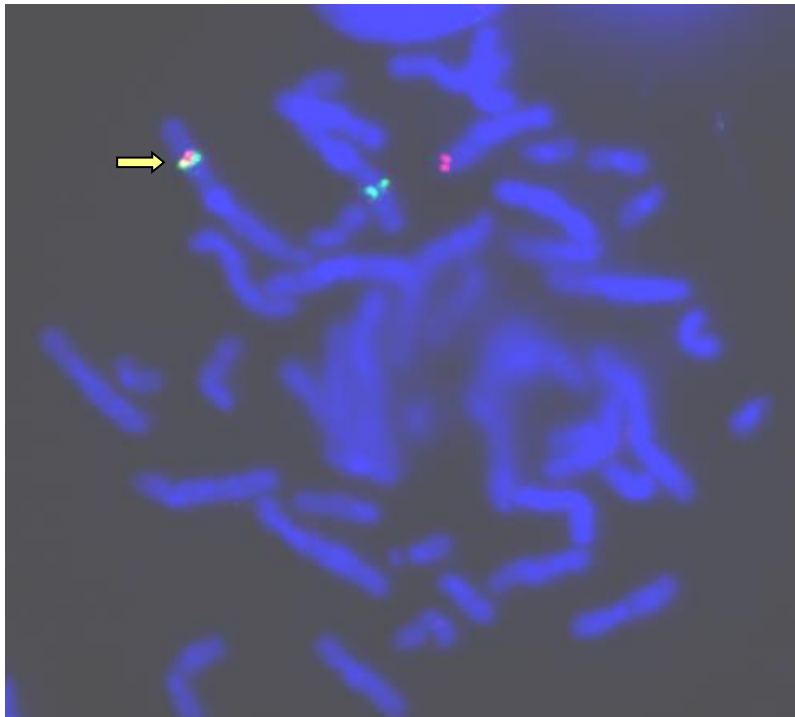


Abbildung 8: Fall1, RP11-6E3 (grün) zentromerseitig von RP11-643A21 (rot) (Pfeil)

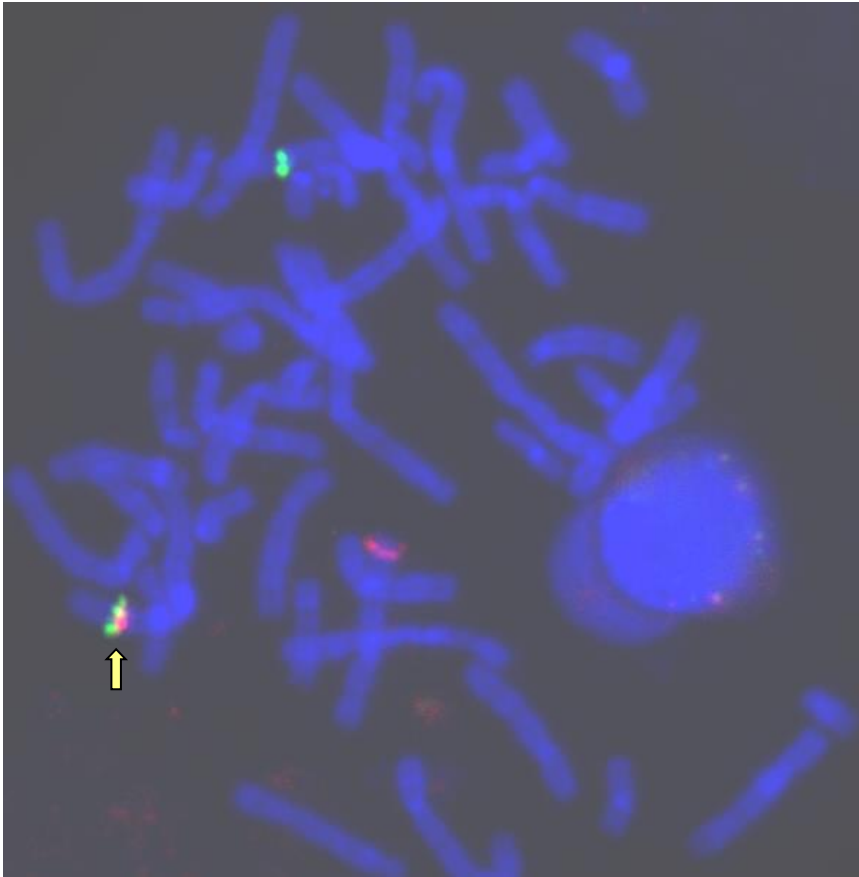


Abbildung 9: Fall 1, RP11-135A15 (grün) telomerseitig von RP11-643A21 (rot) auf 1q (Pfeil)

Die Bestimmung der Bruchpunkte des auf Chromosom 1 inserierten Stückes erfolgte durch folgende Sonden:

Name	Bande	Position	Hybridisierungsort
RP11-49G5	7q35	144.602.585-144.728.069	1q und 7q, invertiert [Abb. 10]
RP11-291N9	7q35	147.075.479-147.156.567	1q
RP4-811H12	7q35	147.156.568-147.318.582	1q
RP4-777G9	7q35	147.318.583-147.407.479	1q und 7q, nicht invertiert [Abb. 11]

Tabelle 8: Viertes Sonden-Panel Fall 1

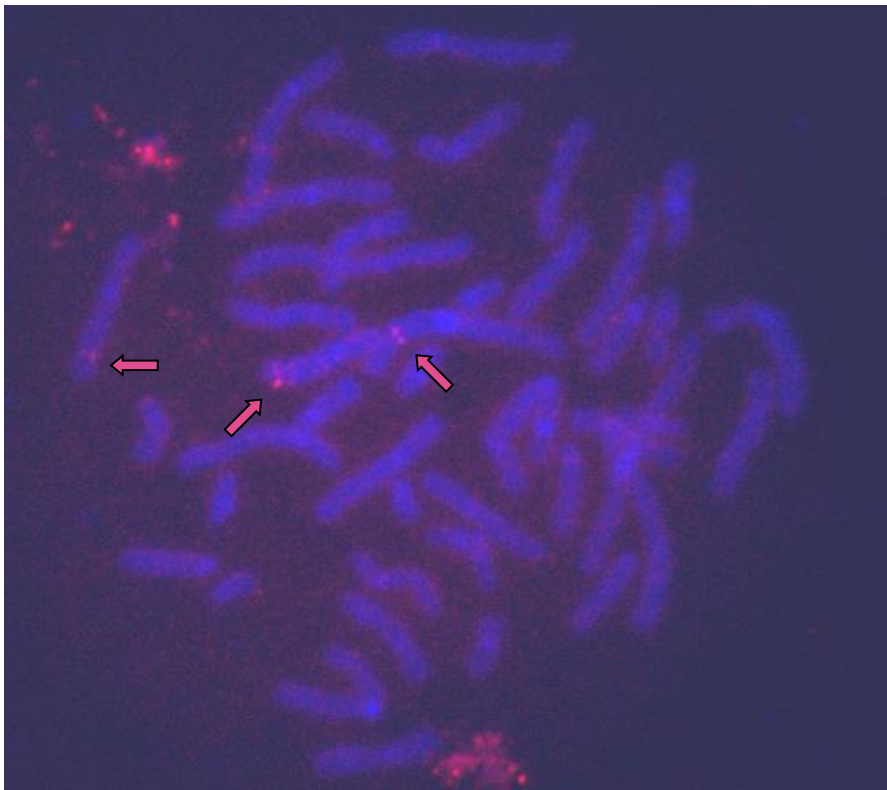


Abbildung 10: Fall 1, RP11-49G5 (rot) auf Derivat 1, Chromosom 7 und Derivat 7 (Pfeile)

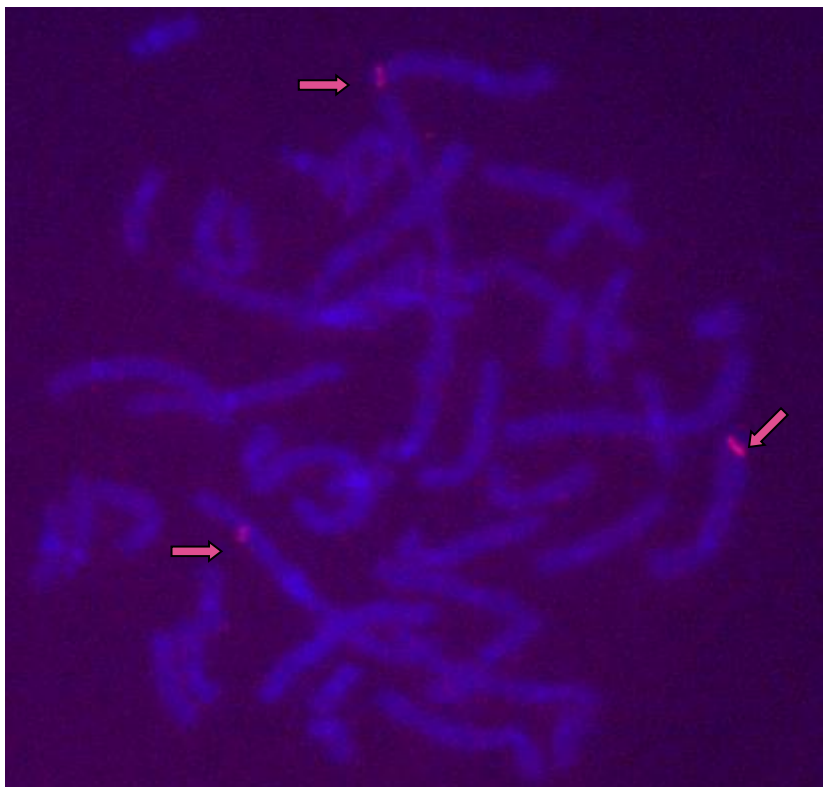


Abbildung 11: Fall 1, RP4-777G9 (rot) auf Derivat 1, Chromosom 7 und Derivat 7 (Pfeile)

Der - wie zunächst angenommen - letzte Bruchpunkt auf Chromosom 7 wurde wieder mittels BAC-Sonden ermittelt.

Name	Bande	Position	Hybridisierungsort der(7)
RP11-791P08	7q31.33	125.756.175 - 125.904.691	gespaltenes Signal [Abb. 14]
RP11-475H14	7q31.33	126.344.278 – 126.524.170	invertiert [Abb. 12]
RP11-309K22	7q31.33	126.524.201 – 126.677.598	invertiert [Abb. 13]

Tabelle 9: Fünftes Sonden-Panel Fall 1



Abbildung 12: Fall1, RP11-475H14 (rot) auf Chromosom 7 und Derivat 7 (invertiert) (Pfeile)

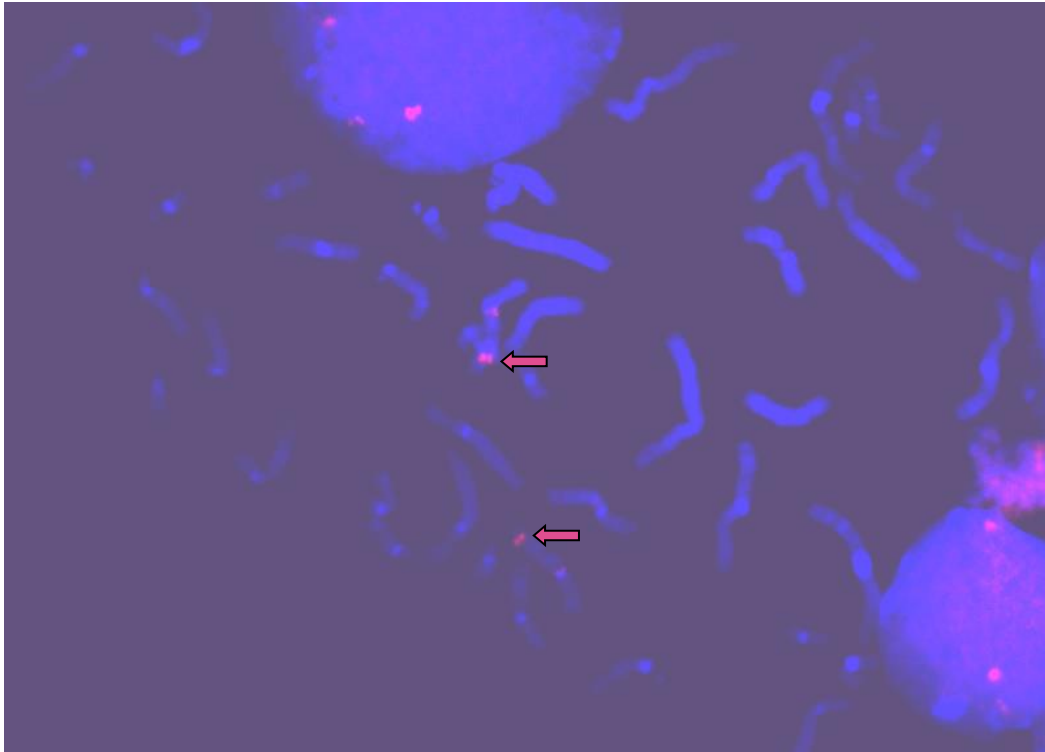


Abbildung 13: Fall 1, RP11-309K22 (rot) auf Chromosom 7 und Derivat 7 (invertiert) (Pfeile)

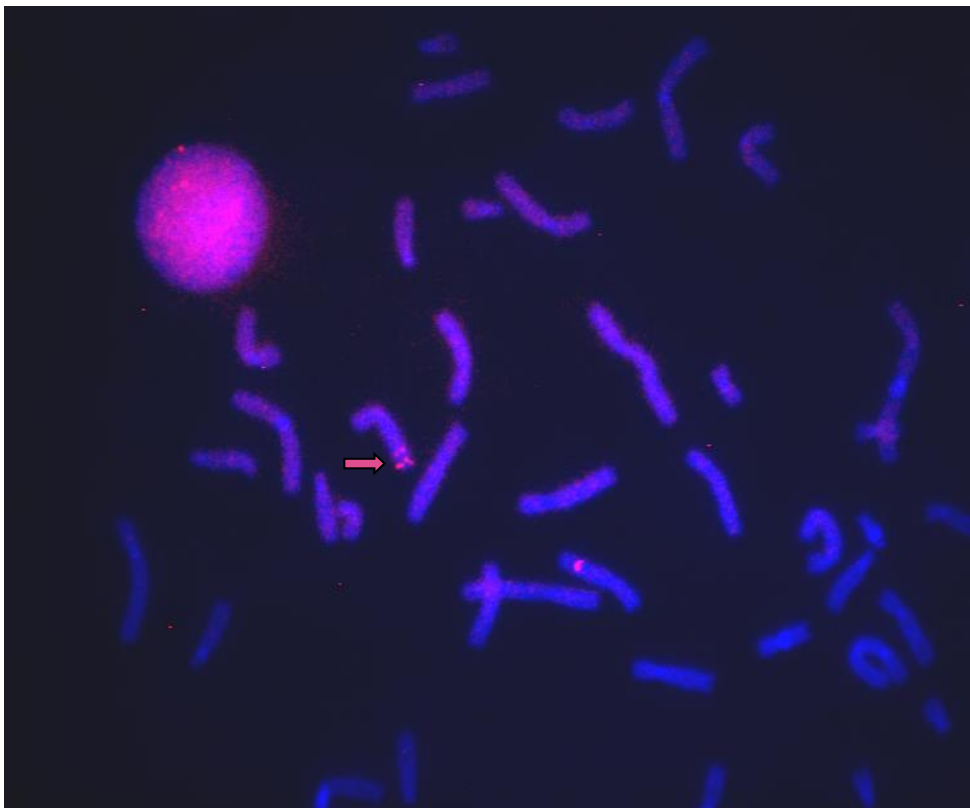


Abbildung 14: Fall 1, RP11-791P08 (rot) gesplittet auf Derivat 7 (Pfeil)

Da die Bestimmung des verbleibenden Bruchpunkts auf Chromosom 1 aufgrund zu geringer Auflösung nicht mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung möglich war, wurden „Illumina Infinium HumanHap370 genotyping beadchip SNP arrays“ des Patienten und seiner Eltern bei Herrn Dr. Martin Poot an der Universität Utrecht durchgeführt, um Deletionen im Bereich der Bruchpunkte ausschließen zu können.

Die Analyse zeigte im proximalen, auf Derivat 7 verbliebenen Anteil, von *CNTNAP2* einen Verlust im paternalen Allel von mindestens 402 kb und maximal 435 kb.

Die Deletion reichte von SNP rs10275851(nt:145.717.255) bis SNP rs12674168(nt: 146.120.055) und wurde durch SNP rs17170068(nt: 145.696.390) und SNP rs11972861(nt: 146.131.465) flankiert.

Auf Chromosomen 1 wurden mehrere Auffälligkeiten beobachtet. Im Bereich 1p32.3 lag eine von der Mutter unverändert vererbte Duplikation von SNP rs2270003(nt: 55.021.290 bis SNP rs17111584(nt: 55.319.284), Flankierung durch SNP rs12740946 (nt: 55.016.785) und SNP rs497159 (nt: 55.326.142).

Im Bereich 1q41.1 bestand eine *de novo* 5,65 Mb-Deletion des paternalen Allels. Deletion von SNP rs2841616 (nt: 213,240,461) bis SNP rs2889895 (nt: 218,894,753), Flankierung durch SNP rs1452623 (nt: 213,231,930) und SNP rs366414 (nt:218,915,724). Eine Auffälligkeit im Bereich der Insertion lag nicht vor.

Die in der Array-Diagnostik diagnostizierte Deletion im Bereich 1q41.1 wurde mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit folgenden BAC-Sonden bestätigt:

Name	Bande	Position	Hybridisierungsort der(1)
RP11-172L10	1q41	213.142.008-213.293.491	1q41
RP11-5F19	1q41	213.843.688-214.005.803	deletiert
RP11-332J14	1q41	218.698.681-218.866.026	deletiert
RP11-322F10	1q41	218.805.714-218.985.621	1q41

Tabelle 10: Sechstes Sonden-Panel Fall 1

Die Deletion auf Chromosom 7q wurde mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nachvollzogen. Dabei stellte sich heraus, dass das in Chromosom 1 inserierte Chromosomenmaterial nicht aus einem kontinuierlichem Abschnitt besteht, sondern

dass Teilstücke auf Chromosom 7 verblieben sind. Die Deletion konnte bestätigt werden.

Name	Bande	Position	Hybridisierungsort
RP4-630F1	7q35	146.023.202 - 146.150.527	7q [Abb. 15]
RP11-766K8	7q35	146.150.528 - 146.168.300	7q, deletiert [Abb. 16]
RP5-969D4	7q35	146.471.608 — 146.547.216	7q [Abb. 17]

Tabelle 11: Siebtes Sonden-Panel Fall 1

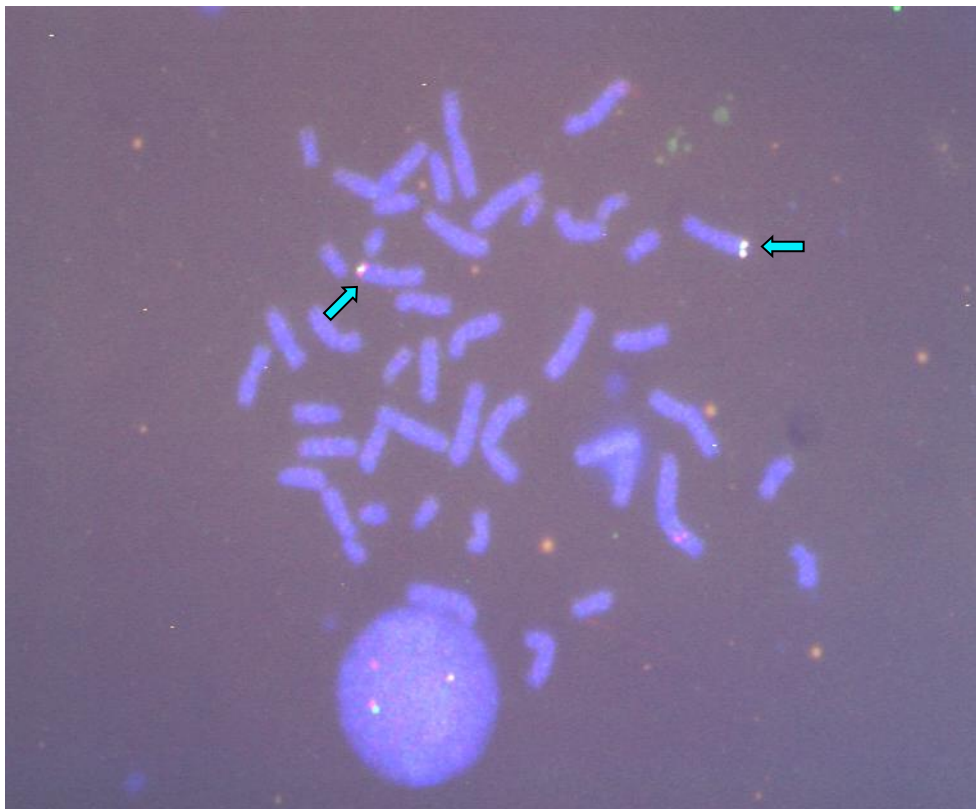


Abbildung 15: Fall 1, RP4-630F1(grün) auf den Chromosomen 7 (Pfeile)

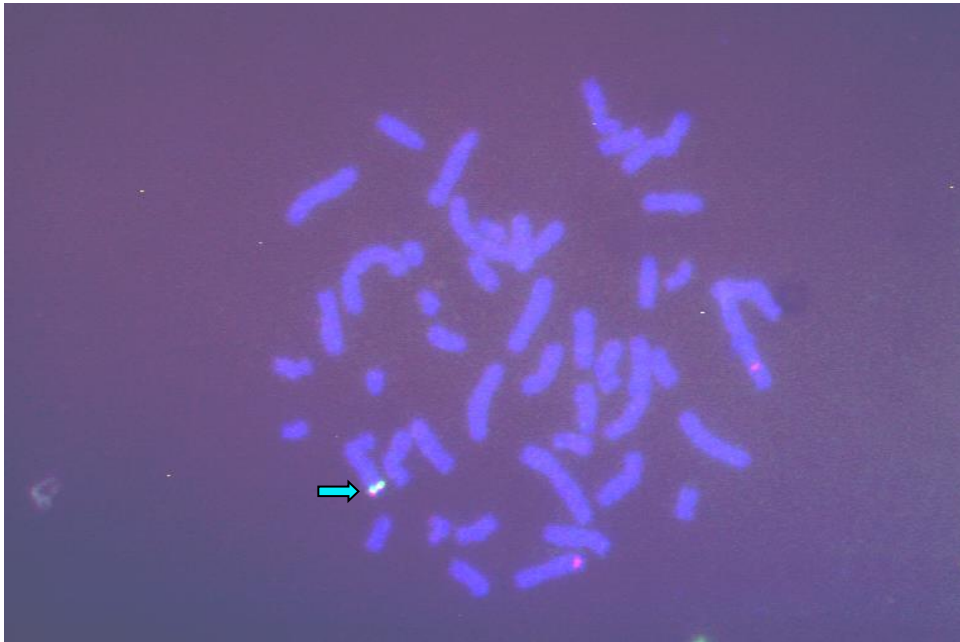


Abbildung 16: Fall 1, RP11-766K8(grün) nur auf einem Chromosom 7(Pfeil)

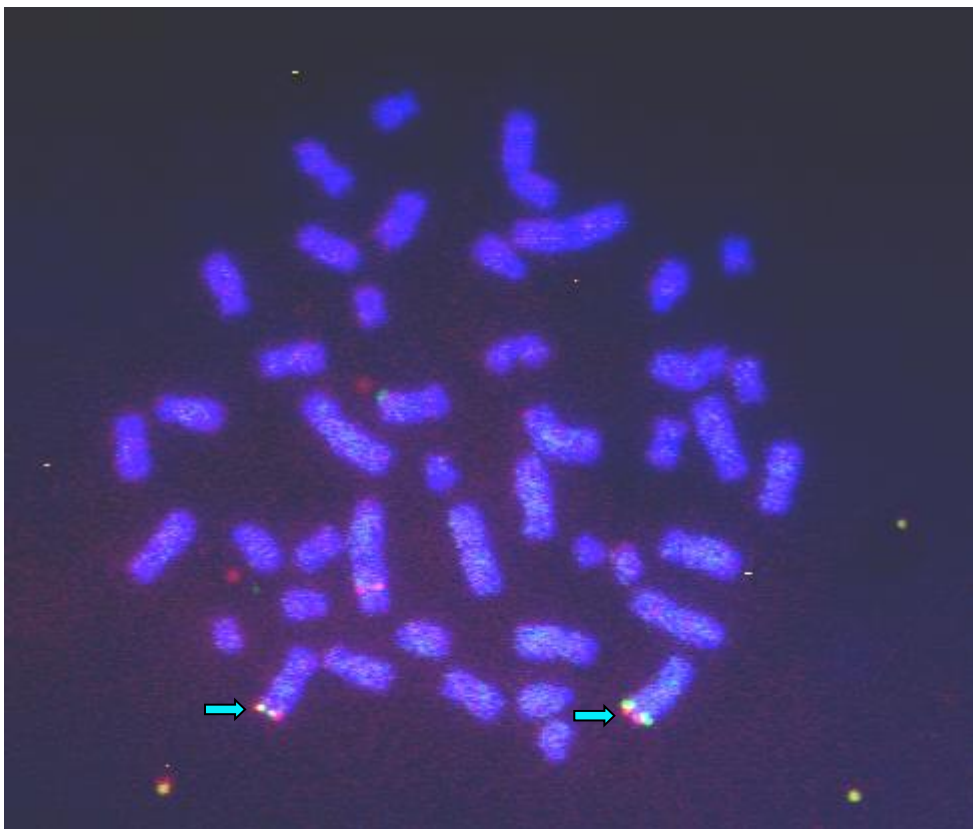


Abbildung 17: Fall 1, RP4-969D4(grün) auf beiden Chromosomen 7 (Pfeile)

Anhand der Ergebnisse aus den Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen und aus der SNP-Analyse ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Chromosomenrearrangement bei Patient 1 um komplexe Bruchereignisse handelt, welche mit größter Wahrscheinlichkeit während der väterlichen Keimzellreifung stattgefunden haben. Anstatt der am Anfang vermuteten zwei Brüche auf Chromosom 7 konnten im Laufe der Untersuchungen 10 Chromosomenbrüche beobachtet werden.

Drei dieser Brüche fanden in Chromosom 1 statt: In 1q31.2 als Insertionsstelle und zwei Brüche in 1q41.1 mit konsekutiver Deletion. Die übrigen sieben Brüche fanden alle im Bereich zwischen 7q32.1 und 7q35 statt. Das erste Fragment war auf Chromosom 7 verblieben und invertiert, das zweite nach Chromosom 1q31.2 inseriert. Das dritte und das fünfte Fragment waren auf Chromosom 7 verblieben, die genaue Anordnung ließ sich aufgrund der methodenspezifischen Auflösung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nicht bestimmen. Das vierte Fragment war deletiert, das sechste wiederum in 1q31.2 inseriert.

Eine genauere Analyse der Anordnung der Bruchstücke konnte aufgrund der Auflösungsmöglichkeiten der Methode nicht erfolgen. Abschließend wurde folgende Karyotypformel bei Patient 1 erhoben:

46,XYqs

pat,dup(1)(pter→p32.3::p32.3→p32.3::p32.3→qter)mat,der(1)ins(1;7)(1pter→1q31.2:
:7q35→7q35::7q35→7q35::1q31.2→1q41.1::1q41.1→1qter),

der(7)(7pter→7q32.1::7q35→7q32.1::7q35-->7q35::7q35-->7q35::7q35→7qter)de
novo(pat)

Das Idiogramm der veränderten Chromosomen1 stellt sich wie folgt dar:

Das väterliche Chromosom 1:

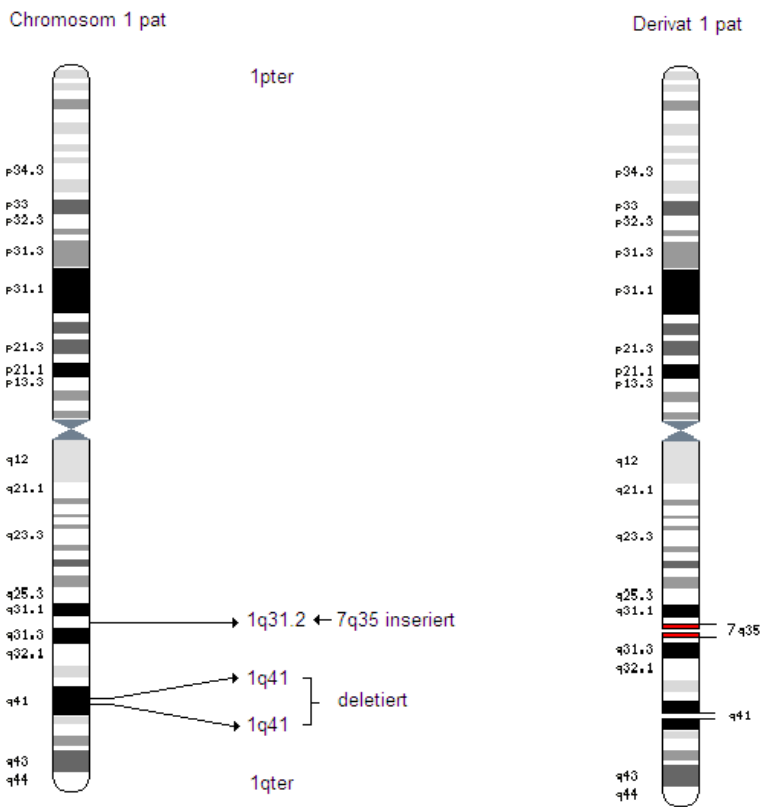


Abbildung 18: Fall 1, Idiogramm des paternalen Derivat 1

Das mütterliche Chromosom 1:

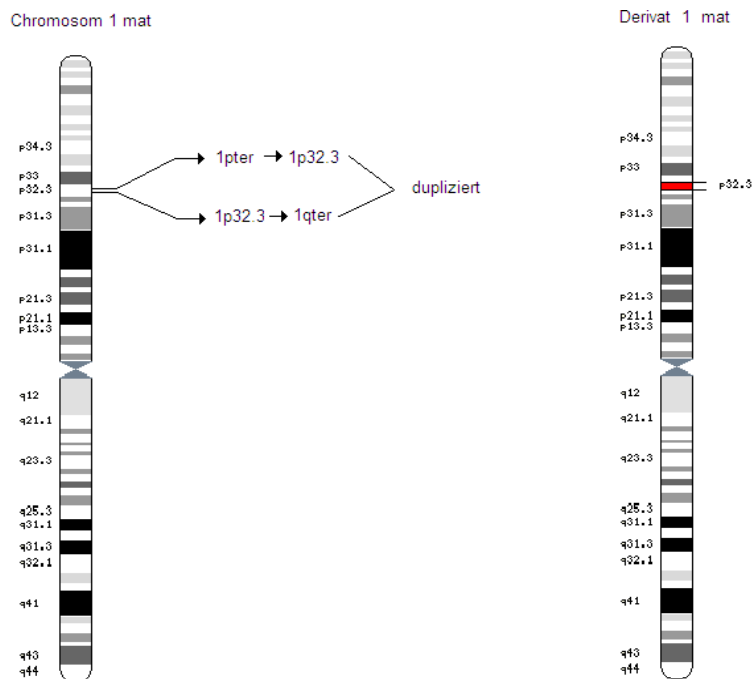


Abbildung 19: Fall 1, Idiogramm des maternalen Derivat 1

Das väterliche Chromosom 7:

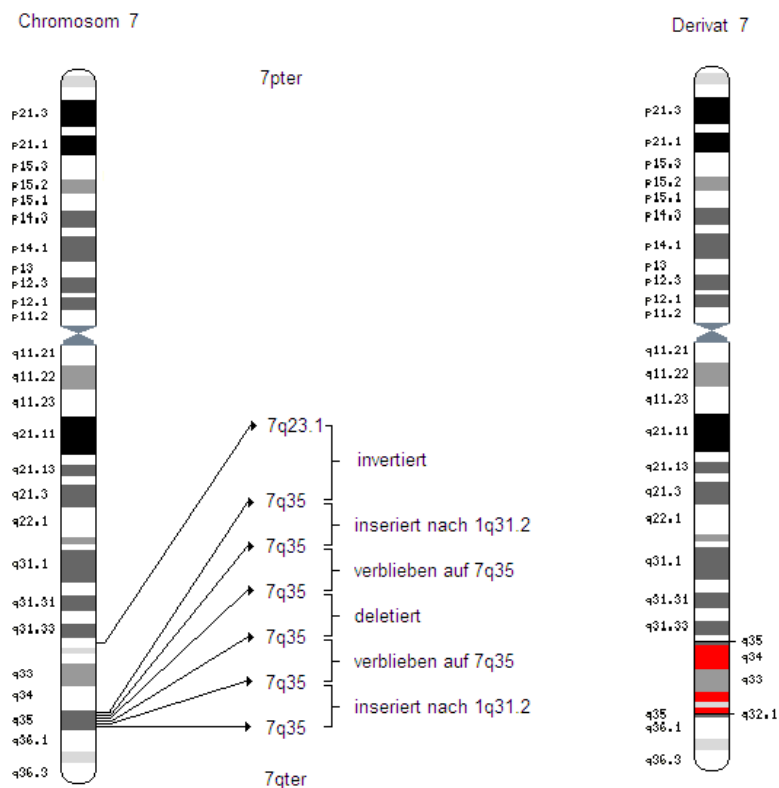


Abbildung 20: Fall, Idiogramm des paternalen Derivat 7

Auf die Bestimmung sämtlicher Bruchpunkte wurde teils wegen fehlender technischer Möglichkeiten, teils wegen mangelnder Aussagekraft verzichtet.

4.2 Fall 2

Die anhand des Karyogramms erhobene Karyotypformel von Patient 2 lautet 46,XY,t(4;9)(p16.3;q11). In Ensembl.org wurden BACs zur Bestätigung und zur genauen Charakterisierung der Bruchpunkte ausgewählt.

Liste der zunächst verwendeten Sonden:

Name	Bande	Position	Hybridisierungsort
RP11-478C6	4p16.3	210.623-364.887	der(9)
RP11-478C1	4p16.3	2.175.397-2.349.734	der(4)
RP11-324I10	4p16.3	4.124.473-4.316.068	der(4)
RP11-216M21	9p11.2/9q12	42.216.270-42.378.155 ?	der(4) + der(9) [Abb. 21]

Tabelle 12: Erstes Sonden-Panel Fall 2

Es zeigte sich schnell, dass sich die Bruchpunktbestimmung auf Chromosom 9 aufgrund der repetitiven Sequenzen im Zentromerbereich schwierig gestalten würde. Alle Sonden im zentromernahen Bereich binden sowohl auf dem kurzen als auch auf dem langen Arm des Chromosoms 9 [Abb. 21].

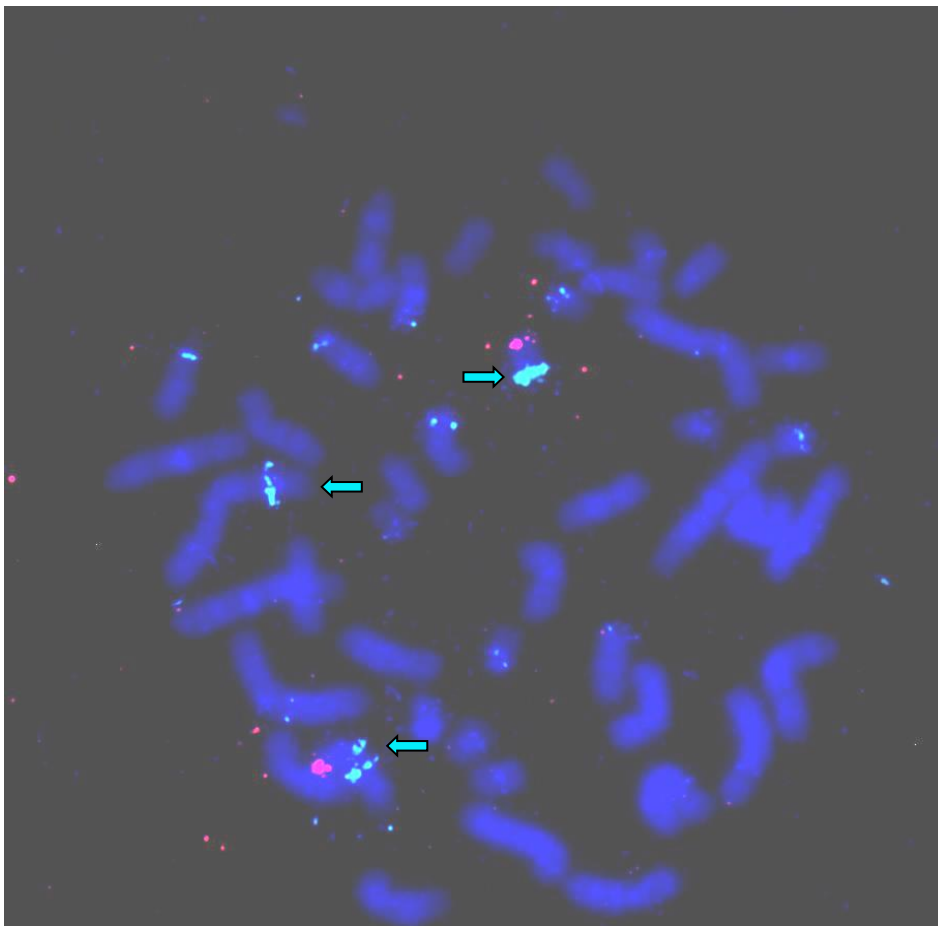


Abbildung 21: Fall 2, RP11-216M21 (grün) doppelt auf Chromosom 9, einfach auf Derivat 9 und einfach auf Derivat 4 (Pfeile)

Mit weiteren Sonden wurden die Bruchpunkte weiter eingegrenzt:

Name	Bande	Position	Hybridisierungsort
RP11-1191J2	4p16.3	602.222-732.011	der(4) + der(9)
RP11-440L14	4p16.3	732.012-916.785	der(4)
RP11-460I19	4p16.3	916.786-1.093.016	der(4)
RP11-386I15	4p16.3	1.283.479-1.366.459	der(4)
RP11-1398P2	4p16.3	1.575.789-1.581.980	der(4)
RP11-1197E19	4p16.3	1.812.776-1.880.225	der(4)
RP11-399F4	9p11.2/9q11	45.848.789 – 45.935.928 auf 9p, 9q?	der(4) + der(9) [Abb. 22]

Tabelle 13: Zweites Sonden-Panel Fall 2

Der bruchpunktüberspannende Klon wurde identifiziert. Die besondere Problematik der Bruchpunktlokalisation auf Chromosom 9 wurde wieder deutlich, da die BAC-Sonden sowohl auf 9p als auch auf 9q hybridisierten.

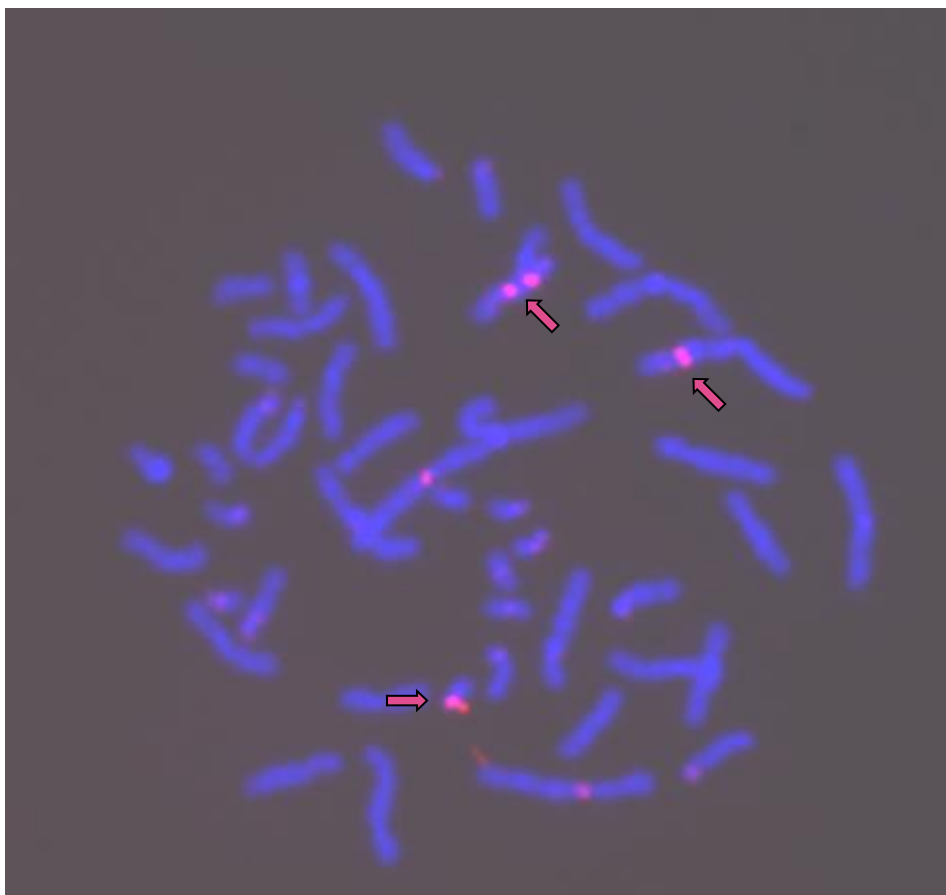


Abbildung 22: Fall 2, RP11-399F4 (rot) zweifach auf Chromosom 9, einfach auf Derivat 9 und Derivat 4 (Pfeile)

Um den Bruchpunkt dennoch näher zu charakterisieren, wurden Alphasatelliten-Sonden von Chromosom 4 und Chromosom 9 hybridisiert.

Die Alphasatelliten-Sonden für Chromosom 9 hybridisierten nicht auf Derivat 9 sondern auf Derivat 4, was bedeutet, dass der Bruchpunkt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 liegt und es sich bei dem Translokationschromosom 4 um ein dizentrisches Chromosom handelt. [Abb. 23]

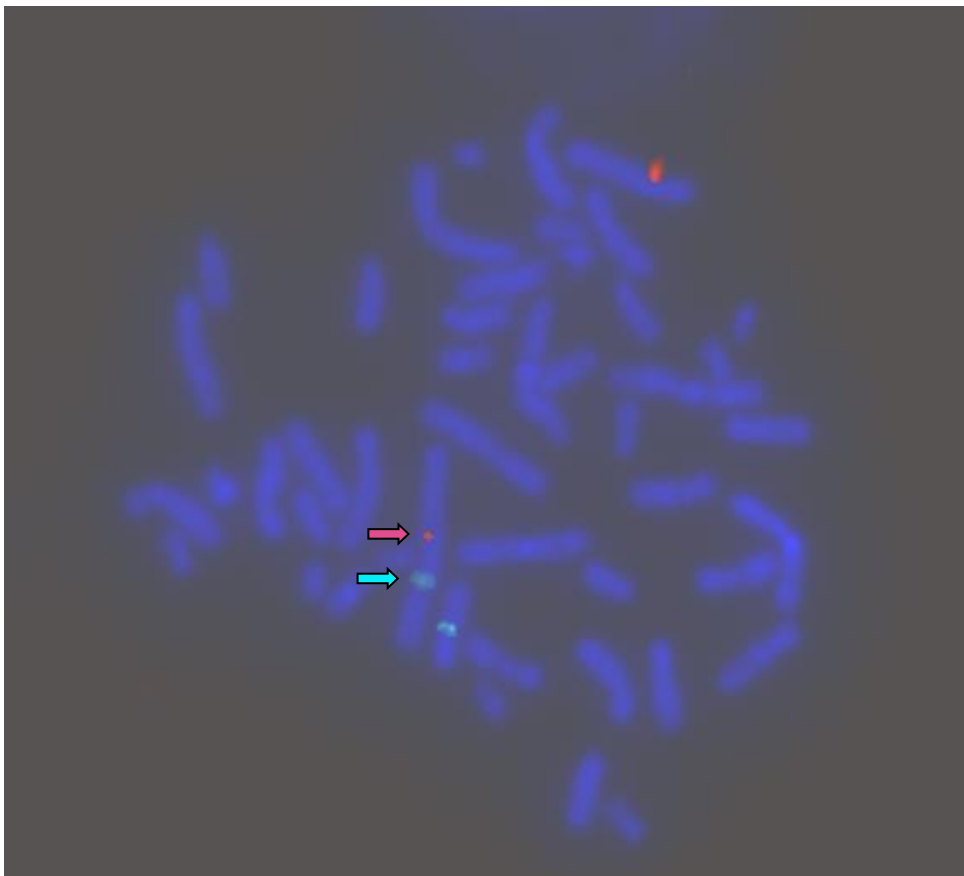


Abbildung 23: Fall 2, Alphasatelliten von Chromosom 4 (rot) und Chromosom 9 (grün) beide auf dem Derivat 4 (Pfeile)

Welche Region auf dem derivativen Chromosom 9 als Zentromer fungiert, ist unklar. Es handelt sich nicht um ein azentrisches Fragment, da in keiner Mitose ein Verlust verzeichnet wurde. Die abschließend erhobene Karyotypformel bei Patient 2 lautet:

46,XY,dic(4)t(4;9)(p16.3;p?10),der(9)t(4;9)(p16.3;p?10)

oder

46,XYdic(4)(9qter-->9p10?:4p16.3-->4qter),der(9)(9pter-->9p10?:4p16.3-->4pter)

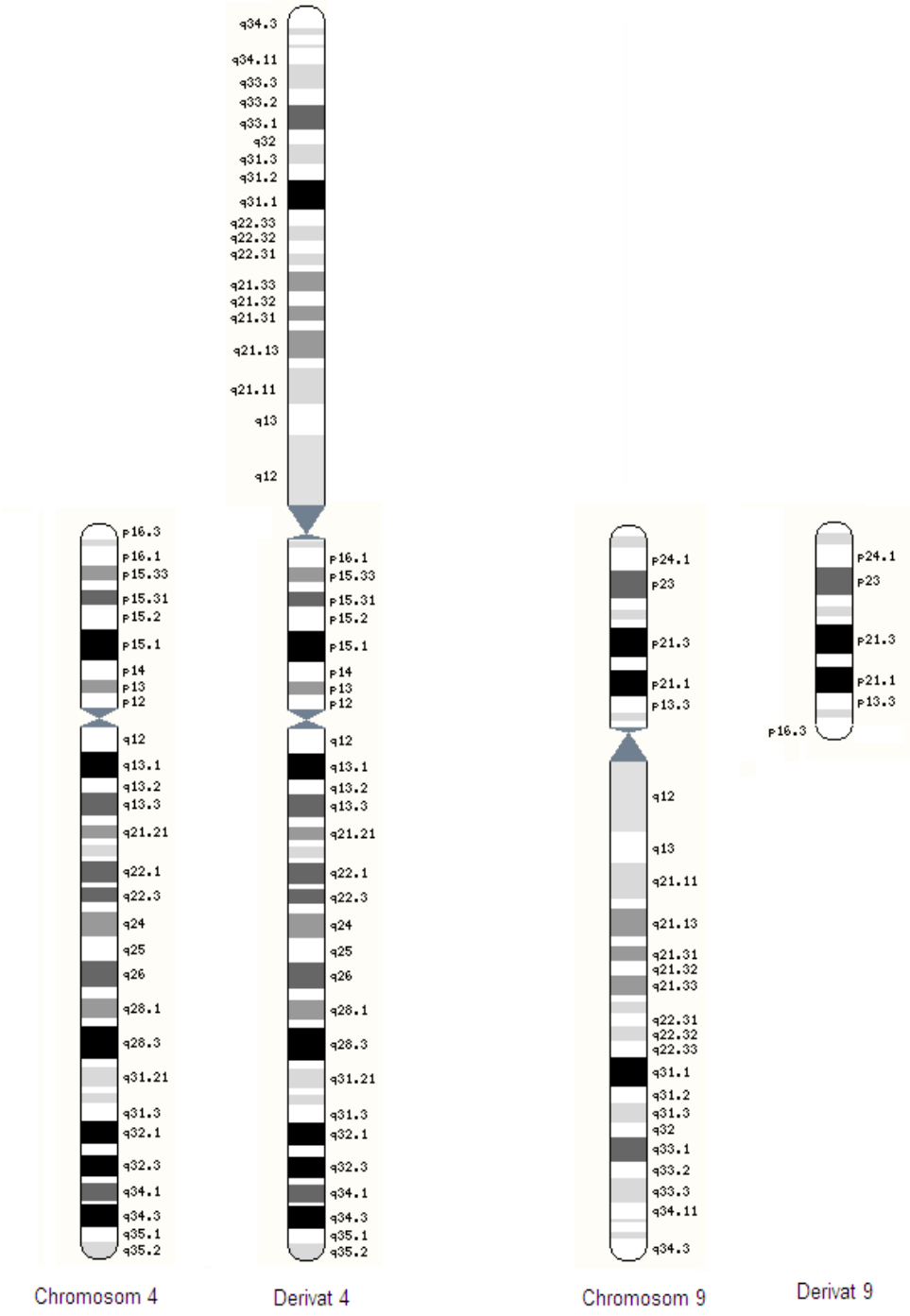


Abbildung 24: Fall 2, Idiogramm der Translokationschromosomen 4 und 9

5 Diskussion

5.1 Fall 1

Die Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen und der Array-CGH zeigten, dass bei Patient 1 entgegen der Annahme einer einfachen Inversion mehrere Chromosomenloci von Veränderungen betroffen sind. Teilergebnisse wurden bereits publiziert:

Poot M, Beyer V, Schwaab I, Damatova N, van't Slot R, Prothero J, Holder S, Haaf T. Disruption of CNTNAP2 and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder. *Neurogenetics*. 2009;11(1):81-89.

5.1.1 Duplikation 1p32.3

Auf Chromosomen 1 trägt Patient 1 eine von der Mutter unverändert vererbte Duplikation im Bereich 1p32.3. In diesem Bereich befinden sich sechs bekannte Gene. Aufgrund des gleichen Befundes und des unauffälligen Phänotyps der Mutter wurde eine mögliche Bedeutung der Duplikation nicht weiter verfolgt. Zwar wäre es denkbar, dass durch Imprinting-Effekte Auswirkungen auf die Entwicklung bei Patient 1 vorliegen, welche bei seiner Mutter nicht bestehen – dies wurde schon in früheren Fällen vermutet (Mignon-Ravix et al. 2001, Robin et al. 1997) - es sind jedoch bis jetzt in diesem Bereich keine Gene bekannt, welche durch Imprinting modifiziert werden (Morison und Reeve 1998, www.geneimprint.com). Bei anhaltendem Verdacht auf Störungen des Imprintings könnte eine weiterführende Abklärung durch Familienuntersuchungen und methylierungsspezifische PCRs der betroffenen Gene im Vergleich zu anderen Familienmitgliedern erfolgen (Derks et al. 2004).

5.1.2 Insertion in 1q32

Im Bereich zwischen 1q32.2 und 1q32.3 ist ein Abschnitt von 7q35 inseriert. Die Bruchpunkt angrenzenden BAC-Klone (RP11-92K2, RP11-379L12) legen den Bereich zwischen 1:191.038.120 und 1:193.875.766 fest. Eine weitere Eingrenzung der Insertionsstelle war aufgrund der technisch bedingten Auflösung der FISH an

Metaphasechromosomen von etwa 3-10 Mb (Haaf 2000) nicht möglich. In der Array-CGH zeigten sich in der Region keine Auffälligkeiten. Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation der Insertionsstelle wäre eine hochauflösende Fiber-FISH an gedehnten Chromatinfäden. Mittels Fiber-FISH kann eine Auflösung von etwa 5-500kb erreicht werden (Haaf 2000). Die Gene der verbleibenden Region könnten durch eine MLPA auf Verluste oder Bruchereignisse untersucht werden (Sellner und Taylor 2004). Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung der Insertionsstelle würde die Durchführung einer Shotgun-Sequenzierung darstellen, bei der es möglich ist, die Insertionsstelle auf eine Base genau zu identifizieren (Weber und Myers 1997, Venter et al. 1998). Allerdings ist es fraglich, ob eine so aufwendige und kostenintensive Untersuchung gerechtfertigt wäre. Betrachtet man die Region der Insertionsstelle im Detail, so stellt man fest, dass eine überschaubare Anzahl an Genen involviert sein können [www.Ensembl.org].

Der Bereich 1q32 enthält 19 Gene, Pseudogene und andere bekannte Sequenzen. Zu allen Protein-codierenden Genen wurde die OMIM-G-Nummer und, sofern vorhanden, die OMIM-P-Nummer und der Erbgang aufgelistet [Ensembl]:

Symbol	Name	Lokalisation	Funktion	OMIM-G / OMIM-P(Erbgang)
<i>LOC100421399</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene	191.115.153-191.116.091	Pseudogen	
<i>LOC100652834</i>	uncharakterisiert	191.827.837-191.836.095	miscRNS	
RGS18	regulator of G-protein signaling 18	192.127.592-192.154.945	Protein-coding	607192 / -
<i>LOC647150</i>	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1 pseudogene	192.215.839-192.216.625	Pseudogen	
RGS21	regulator of G-protein signaling 21	192.286.122-192.336.415	Protein-coding	612407 / -
RGS1	regulator of G-protein signaling 1	192.544.857-192.549.159	Protein-coding	600323 / -
RGS13	regulator of G-protein signaling 13	192.605.268-192.629.441	Protein-coding	607190 / -

<i>RPS27AP5</i>	ribosomal protein S27a pseudogene 5	192.685.267-192.685.813	Pseudogen	
<i>MIR4426</i>	microRNS 4426	192.685.458-192.685.520	miscRNS	
<i>LOC100130137</i>	integrin beta 1 binding protein 1 pseudogene	192.769.702-192.770.303	Pseudogen	
<i>RGS2</i>	regulator of G-protein signaling 2	192.778.169-192.781.407	Protein-coding	600861 / -
<i>LOC730190</i>	zinc finger protein 101 pseudogene	192.962.553-192.963.915	Pseudogen	
<i>UCHL5</i>	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5	192.981.496-193.029.237	Protein-coding	610667 / -
<i>TROVE2</i>	TROVE domain family, member 2	193.028.552-193.060.907	Protein-coding	600063 / -
<i>GLRX2</i>	glutaredoxin 2	193.065.600-193.075.244	Protein-coding	606820 / -
<i>MIR1278</i>	microRNS 1278	193.105.633-193.105.713	miscRNS	
<i>B3GALT2</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2	193.147.860-193.155.743	Protein-coding	603018 / -
<i>CDC73</i>	cell division cycle 73, Paf1/RNS polymerase II complex component, homolog	193.091.088-193.223.945	Protein-coding	607393 / 145001(AD) Hyperparathyroidismus
<i>RPL23AP2</i> 2	ribosomal protein L23a pseudogene 22	193.725.943-193.726.397	Pseudogen	

Tabelle 14: Fall 1, DNS-Strukturen im Bereich 1q32

Einen Hinweis auf die Kontinuitätsstörung eines der in Frage kommenden Gene, bzw. auf eine phänotypische Auswirkung einer Unterbrechung gibt es anhand der bisher bekannten Genfunktionen nicht [Ensembl][pubmed].

5.1.3 Deletion 1q41.1

Als letzte Chromosomenaberration auf Chromosom 1 ist die Deletion des paternalen

Allels im Bereich 1q41.1 zu vermerken. Diese Deletion umfasst 5,65 Mb (von 213.231.930 bis 218.915.724) und 24 Gene, Pseudogene und andere bekannte Sequenzen. Es folgt eine Auflistung aller Gene, einschließlich OMIM-G-Nummer und, sofern vorhanden, OMIM-P-Nummer und Erbgang[Ensembl]:

Symbol	Name	Lokalisation	Funktion	OMIM-G / OMIM-P(Erbgang)
RPS6KC1	ribosomal protein S6 kinase, 52kDa, polypeptide 1	213.224.588-213.446.808	Protein-Coding	617517 / -
<i>RPL31P13</i>	ribosomal protein L31 pseudogene 13	213.602.060-213.602.407	Pseudogen	
<i>LOC100505832</i>	uncharakterisiert	213.991.095-214.139.608	miscRNS	
PROX1	prospero homeobox 1	214.161.860-214.209.766	Protein-Coding	601546 / -
SMYD2	ET and MYND domain containing 2	214.454.565-214.510.477	Protein-Coding	610663 / -
PTPN14	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14	214.522.039-214.725.024	Protein-Coding	603155 / 613611(AR) Choanalatresie, Lymphödem
<i>LOC643454</i>	adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit pseudogene	214.655.562-214.656.832	Pseudogen	
<i>KRT18P12</i>	keratin 18 pseudogene 12	214.705.488-214.706.867	Pseudogen	
<i>FAM108A4P</i>	family with sequence similarity 108, member A4, pseudogene	214.778.795-214.782.589	Pseudogen	
<i>LOC100505982</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 pseudogene	214.786.301-214.786.740	Pseudogen	
CENPF	centromere protein F, 350/400kDa (mitosin)	214.776.532-214.837.914	Protein-Coding	600236 / 243605(AR) Stromme Syndrom

<i>GAPDHP2</i> 4	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase pseudogene 24	215.043.995- 215.045.264	Pseudogen	
<i>KCNK2</i>	potassium channel, subfamily K, member 2	215.178.885- 215.410.436	Protein-Coding	603219 / -
<i>VDAC1P1</i> 0	voltage-dependent anion channel 1 pseudogene 10	215.549.754- 215.551.581	Pseudogen	
<i>KCTD3</i>	potassium channel tetramerisation domain containing 3	215.740.735- 215.795.149	Protein-Coding	613272 / -
<i>USH2A</i>	Usherin	215.796.236- 216.596.738	Protein-Coding	608400 / 276901(AR) Usher-Syndrom Typ 2A; 613809 Retinitis pigmentosa 39
<i>MRPS18B</i> <i>P1</i>	mitochondrial ribosomal protein S18B pseudogene 1	216.374.400- 216.375.168	Pseudogen	
<i>ESRRG</i>	estrogen-related receptor gamma	216.676.588- 217.311.097	Protein-Coding	602969 / -
<i>GPATCH2</i>	G patch domain containing 2	217.603.834- 217.804.409	Protein-Coding	616836 / -
<i>SPATA17</i>	spermatogenesis associated 17	217.804.695- 218.040.484	Protein-Coding	611032 / -
<i>UBBP2</i>	ubiquitin B pseudogene 2	218.023.601- 218.024.025	Pseudogen	
<i>RRP15</i>	ribosomal RNS processing 15 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	218.458.629- 218.511.325	Protein-Coding	611193 / -
<i>RPS26P1</i> 7	ribosomal protein S26 pseudogene 17	218.511.888- 218.512.173	Pseudogen	
<i>TGFB2</i>	transforming growth factor, beta 2	218.518.676- 218.617.961	Protein-Coding	190220 / 614816(AD) Loeys-Dietz- Syndrom 4

Tabelle 15: Fall 1, DNS-Strukturen im deletierten Bereich 1q41

Über die Funktionen der Gene ist bisher Folgendes bekannt:

***RPS6KC1* - ribosomal protein S6 kinase**

Position Ensembl Chromosom 1: 213.224.589-213.448.116 [Ensembl May 2012]

OMIM-Nummer: 617517

Alternative Symbole: *humS6PKh1*

Das *RPS6KC1*-Gen ist 223.527 bp lang und in 15 Exons unterteilt. Es gibt sieben Transkripte, wovon 4 proteincodierend sind [Ensembl][Entrez].

Das Protein ist ein ribosomales Protein. Es wurde bisher nicht in Zusammenhang mit Entwicklungsauffälligkeiten beschrieben (Teasdale und Collins 2012).

***PROX1* - prospero homeobox 1**

Position Ensembl Chromosom 1: 214.156.524-214.214.853 [Ensembl May 2012]

OMIM: 601546

Das *PROX1*-Gen ist 58.329 bp lang und in 5 Exons unterteilt. Es gibt 6 Transskripte, wovon alle proteincodierend sind [Ensembl][Entrez].

Das *PROX1*-Gen gehört zur Gruppe der Prospero-Homeobox. Es könnte eine wichtige Rolle in der frühen ZNS-Entwicklung spielen und die Genexpression und die Entwicklung von postmitotischen undifferenzierten jungen Neuronen regulieren [uniprot].

Bei Mäusen scheint es im Zusammenhang mit der Entwicklung von Linsenfasern und Lymphgefäßen (Wigle et al. 1999a, Wigle et al. 1999b), der Einwanderung von Hepatozyten (Sosa-Pineda et al. 2000), Retina-Zelldifferenzierung (Dyer et al. 2003) und Entwicklung des Pankreas (Wang et al. 2005) zu stehen.

Darüber hinaus scheint es eine Rolle bei der Entdifferenzierung von Karzinomen zu

spielen und wird als Kandidat für ein Tumorsuppressorgen diskutiert (Takahashi et al. 2006).

Das analoge Gen *PROSPERO* bei *Drosophila* wurde im Zusammenhang mit asymmetrischer Zellteilung, vor allem bei der Entwicklung des Nervensystems beobachtet (Ceron et al. 2001, Yu et al. 2006).

***SMYD2* - SET and MYND domain containing 2**

Position Ensembl Chromosom 1: 214.454.445-214.510.474 [Ensembl May 2012]

OMIM: 610663

Alternative Symbole: *KMT3C*; *HSKM-B*; *ZMYND14*

Das *SMYD2*-Gen ist 56.029 bp lang und in 12 Exons unterteilt. Es gibt 7 Transkripte, von denen 3 proteincodierend sind [Ensembl][Entrez].

Das *SMYD2*-Gen katalysiert als ein SET-Domänen-haltiges Protein die Methylierung von Lysin in Histonen und hat somit Einfluss auf die Aktivierung bzw. Unterdrückung der Transkription der entsprechenden Region (Zhang und Reinberg 2001, Lachner et al. 2003, Schotta et al. 2004). Da es bereits in der Embryonalphase in Herz und Hypothalamus exprimiert wird, könnte es eine Rolle bei der Entwicklung spielen. Eine Überexpression von *SMYD2* unterdrückt die Zellproliferation in T-Zellen (Brown et al. 2006).

SMYD2 wurde in Zusammenhang mit der Methylierung und somit der Inaktivierung der Tumorsuppressoren *RB1* (Saddic et al. 2010) und *TP53* (Huang et al. 2006) gebracht. Eine Methylierung von *RB1* führt zur ausbleibenden Hemmung von E2F-Transkriptionsfaktoren, welche die Zelle in die S-Phase eintreten lassen.

Eine Untersuchung der Rolle von *SMYD2* auf die Herzentwicklung bei Mäusen ergab, dass ein Verlust von *SMYD2* in Kardiomyozyten nicht zu einer Beeinträchtigung der Entwicklung des Herzens oder seiner Funktion führt. Des Weiteren konnte keine Abweichung der Methylierung der kardiomyelozytären Histone festgestellt werden. Als mögliche Erklärung käme eine kompensatorische Überexpression von *SMYD1* infrage (Diehl et al. 2010).

***PTPN14* - protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14**

Position Ensembl Chromosom 1:214.530.851-214.725.792 [Ensembl May 2012]

OMIM: 603155

Alternative Symbole: *PEZ*, *PTP36*

Das *PTPN14*-Gen ist 194.941 bp lang und in 19 Exons unterteilt. Es gibt 5 Transkripte, von denen 2 proteincodierend sind [Ensembl, Entrez].

Das vom *PTPN14*-Gen codierte Protein gehört zur Gruppe der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP). PTPs fungieren als Signaltransmitter und regeln eine Vielzahl von zellulären Prozessen, darunter Zellwachstum, Differenzierung, Zellzyklus und Krebsentstehung (Neel und Tonks 1997). Aufgrund des Proteinaufbaus mit N-terminaler Zytoskelett-ähnlicher FERM-Domäne wird eine Lokalisation an der Membran oder im Zytoskelett vermutet (Tsukita et al. 1997). Es scheint die lymphatische Entwicklung bei Säugern zu regulieren. Eine „Loss of Funktion“-Mutation wurde bei einer Familie mit lymphoider Choanal-Atresie (OMIM #613611, AR) beobachtet (Au et al. 2010) [provided by RefSeq, Sep 2010].

***CENPF* - centromere protein F, 350/400kDa (mitosin)**

Position Ensembl Chromosom 1:214.776.538-214.837.931 [Ensembl July 2012]

OMIM: 600236

Alternative Symbole: *CENF*; *hcp-1*; *PRO1779*

Das *CENPF*-Gen ist 61.393 bp lang und in 20 Exons unterteilt. Es gibt 5 Transkripte, von denen nur 1 proteincodierend ist [Ensembl][Entrez].

Das Gen codiert ein Protein, welches mit dem Zentromer-Kinetochor-Komplex in Zusammenhang steht. Das Protein ist eine Komponente der nuklearen Matrix während der G2-Phase der Zelle. In der späten G2-Phase verbindet sich das Protein mit dem Kinetochor und hält diese Verbindung während der frühen Anaphase. Es lagert sich in der Mitte des Spindelapparates und der intrazellulären Brücke in der späten Anaphase und Telophase an und wird dort vermutlich sukzessive abgebaut. Aufgrund der Lokalisation wird angenommen, dass das Protein eine Rolle in der

Chromosomen-Segregation während der Mitose spielen könnte. Vermutlich besteht der Aufbau aus einem Homo- oder Heterodimer. Homozygote pathogene Veränderungen im *CENPF*-Gen sind mit dem Stromme-Syndrom (OMIM #243605, AR) assoziiert (Filges et al. 2016). Autoantikörper gegen das CENPF-Protein konnten bei Patienten mit Krebserkrankungen oder Graft-versus-Host-Erkrankungen nachgewiesen werden (Casiano et al. 1995) [provided by RefSeq, Jul 2008].

***KCNK2* - potassium channel, subfamily K, member 2**

Position Ensembl Chromosom 1:215.179.118-215.410.436 [Ensembl July 2012]

OMIM: 603219

Alternative Symbole: *TREK*; *TPKC1*; *TREK1*; *K2p2.1*; *TREK-1*; *hTREK-1c*; *hTREK-1e*

Das *KCNK2*-Gen ist 231.318bp lang und in 7 Exons unterteilt. Es gibt 9 Transkripte, von denen 5 proteincodierend sind [Ensembl][Entrez].

Dieses Gen codiert ein Protein aus der Familie der „Two-pore-domain background“ Kalium-Kanäle. Diese Form der Kaliumkanäle ist aus zwei Homodimeren aufgebaut, welche einen Kanal bilden, der Kalium aus der Zelle strömen lässt, um das Ruhemembranpotential aufrecht zu erhalten. Der Kanal kann durch verschiedene Anästhetika, Membrandehnung, intrazelluläre Azidose und Hitze geöffnet werden. Drei Transkriptvarianten für unterschiedliche Isoformen des Proteins konnten bislang identifiziert werden [provided by RefSeq, Jul 2008].

Es wird vermutet, dass das Gen eine Rolle bei der Entstehung von Depressionen spielt und sich auf das Therapieansprechen in Zusammenhang mit weiteren vorliegenden Polymorphismen auswirkt (Liou et al. 2009).

***KCTD3* - potassium channel tetramerisation domain containing 3**

Position Ensembl Chromosom 1: 215.740.735-215.795.073 [Ensembl May 2012]

OMIM: 613272

Alternative Symbole: NY-REN-45

Das *KCTD3*-Gen ist 54.338bp lang und in 18 Exons unterteilt. Es gibt sieben

Transkripte, von denen 5 proteincodierend sind. Das Protein hat Eigenschaften eines Kaliumkanals, die genaue Funktion von *KCTD3* ist bisher nicht bekannt [Ensembl][Entrez][OMIM].

KCTD3 wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung der Kiemenbogenentwicklung bei Mäuseembryonen erwähnt (Bennetts et al. 2006), eine Untersuchung in Zusammenhang mit Nierenzellkarzinomen zeigte eine Lokalisation in der Zellkernmembran (Scanlan et al 1999).

Eine CNV („copy-number-variation“) von *KCTD3* wurde in Verbindung mit mentaler Retardierung gebracht (Poot et al. 2010). Ob ein Verlust oder Zugewinn des Gens eine Auswirkung auf die Gesundheit des Trägers hat, ist bisher nicht bekannt.

***USH2A* - Usher syndrome 2A**

Position Ensembl Chromosom 1: 215.796.236-216.596.738 [Ensembl May 2012]

OMIM: 608400

Alternative Symbole: *RP39*, *USH2*

Das *USH2A*-Gen ist 800.502 bp lang und hat 72 Exons. Es gibt 5 Transkripte, von denen 3 proteincodierend sind [Ensembl, OMIM].

Dieses Gen codiert das Protein Usherin. Aufgrund des Aufbaus, welcher ein laminin-epidermal-growth-factor-Motiv, eine Pentaxin-Domäne und viele Fibronectin Typ III-Einheiten enthält, wird von einem Vorkommen in der Basalmembran und der extrazellulären Matrix sowie von einem Zusammenhang mit Zelladhäsion ausgegangen. Usherin wird in der Cochlea, dem Auge, dem Gehirn und der Niere exprimiert. Ihm wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Regulation des Innenohrs und der Retina zugeschrieben. Pathogene Veränderungen in beiden Allelen des *USH2A*-Gens führt zum Usher-Syndrom Typ IIa (OMIM #276901, AR). Bei einem Teil der Patienten mit autosomal rezessiver Retinopathia pigmentosa ohne Hörverlust (OMIM #613809) werden ebenfalls Veränderungen im *USH2A*-Gen gefunden.

Das Usher-Syndrom ist durch eine angeborene Schwerhörigkeit, bzw. Taubheit und eine später einsetzende Erblindung aufgrund einer Retinopathia pigmentosa mit

Absterben der Photorezeptoren charakterisiert. Es ist die häufigste genetische Ursache einer kombinierten Taub- und Blindheit unter Erwachsenen und betrifft 3-6% der Kinder mit angeborener Hörstörung. Das Usher-Syndrom Typ IIa geht mit einer moderaten bis schweren Höreinschränkung einher [Entrez, Omim, provided by RefSeq, Dec 2008].

Ein Verlust des paternalen Allels mit den Genen *KCTD3* und *USH2A* wurde zuvor bei einem Patienten mit Autismus beschrieben (Wassink et al. 2005).

***ESRRG* - estrogen-related receptor gamma**

Position Ensembl Chromosom 1:216.676.588-217.311.097 [Ensembl July 2012]

OMIM: 602969

Alternative Symbole: *ERR3*; *NR3B3*; *ERRgamma*

Das *ESRRG*-Gen ist 634.509bp lang und in 26 Exons unterteilt. Es gibt 23 Transkripte, von denen 17 proteincodierend sind [Ensembl].

Das Gen codiert für ein Mitglied der Familie der Östrogen-Rezeptor-verwandten Rezeptoren (ESRR), welche zur Überfamilie der nukleären Hormonrezeptoren gehören. Alle Mitglieder der ESRR-Familie haben eine fast identische DNS-Bindungsdomäne, welche aus zwei C4-Typ Zink-Finger-Motiven zusammengesetzt ist. Die Mitglieder der ESRR-Familie sind seltene nukleäre Rezeptoren. Sie binden an Östrogen-Response-Elementen und den steroidogenen Faktor-1-Response-Elementen und aktivieren Gene, welche von beiden Response-Elementen kontrolliert werden, sofern kein Ligationspartner vorliegt. Die ESRR-Familie ist eng mit der Östrogen Rezeptor (ER)-Familie verwandt. Sie teilen sich Zielgene, Ko-Regulatoren und Promotoren. Aufgrund der gemeinsamen Zielgene scheinen die ESRRs mit den ER-vermittelnden Östrogen-Response-Elementen auf verschiedenen Wegen in Wechselwirkung zu stehen.

Die Mitglieder der ESRR-Genfamilie fungieren als Transkriptionsaktivatoren der DNS-Cytosin-5-Methyltransferase 1 (DNMT1)- Expression durch direktes Binden an ihrem Responseelement im DNMT1-Promoter. Es beeinflusst die Zell-Proliferation und den Östrogen-Signalweg bei Brustkrebs und unterdrückt die *morphogenetic-*

protein-2 induzierte Osteoblasten-Differenzierung und das Knochenwachstum. Es wurden viele alternative Splice-Varianten beobachtet, welche sich hauptsächlich am 5'-Ende unterscheiden. Einige Protein-Isoformen unterscheiden sich in der N-terminalen Region [ENTREZ].

***GPATCH2* - G patch domain containing 2**

Position Ensembl Chromosom 1:217.600.334-217.804.424 [Ensembl July 2012]

OMIM: 616836

Alternative Symbole: *CT110; GPATC2; PPP1R30; RP11-361K17.1*

Das *GPATCH2*-Gen ist 204.090bp lang und in 10 Exons unterteilt. Es gibt 5 Transkripte, von denen 2 proteincodierend sind [Ensembl].

Die genaue Funktion von *GPATCH2* ist bisher nicht bekannt, es wurde jedoch in Zusammenhang mit Brustkrebserkrankungen gebracht (Lin et al. 2009). Das Genprodukt hat darüber hinaus wohl eine Nukleinsäure bindende Funktion [ENTREZ].

***SPATA17* - spermatogenesis associated 17**

Position Ensembl Chromosom 1:217.804.666-218.045.038 [Ensembl January 2013]

OMIM: 611032

Alternative Symbole: *IQCH; MSRG11; MSRG-11; RP11-144C20.1*

Das *SPATA17*-Gen ist 240.372bp lang und in 11 Exons unterteilt. Es gibt 5 Transkripte, von denen nur eines proteincodierend ist [Ensembl].

Es wurde in Zusammenhang mit Zellapoptose und Spermatogenese beobachtet (Deng et al. 2006).

***RRP15* - ribosomal RNS processing 15 homolog (*S. cerevisiae*)**

Position Ensembl Chromosom 1:218.458.629-218.511.325 [Ensembl January 13]

OMIM: 611032

Alternative Symbole: *CGI-115; KIAA0507*

Das *RRP15*-Gen ist 52.696bp lang und in 5 Exons unterteilt. Es gibt 2 Transskripte, von denen eines proteincodierend ist [Ensembl].

Es spielt eine Rolle im Aufbau der großen Untereinheit der ribosomalen RNS (De Marchis et al. 2005).

***TGFB2* - transforming growth factor, beta 2**

Position Ensembl Chromosom 1: 218.519.577-218.617.961 [Ensembl January 13]

OMIM: 190220

Alternative Symbole: *LDS4*; *TGF-beta2*

Das *TGFB2*-Gen ist 98.384bp lang und in 7 Exons unterteilt. Es gibt 4 Transskripte, von denen 2 proteincodierend sind [Ensembl].

Das Gen codiert für ein Protein aus der Gruppe der transformin growth factor beta-Familie der Zytokine. Diese multifunktionellen Peptide regulieren die Proliferation, die Differenzierung, die Adhäsion, die Migration und andere Funktionen in vielen Zelltypen, indem sie ihr Signal durch Kombinationen von Transmembranrezeptoren Type I und Typ II (TGFBR1 und TGFBR2) und den nachgeschalteten Effektoren, den SMAD-Proteinen leiten. Verluste eines Genallels oder pathogene Mutationen wurden in Zusammenhang mit dem Loeys-Dietz-Syndrom 4 (OMIM-P: 614816, AD) beschrieben (Lindsay et al. 2012). Eine Unterbrechung des TGFB/SMAD-Signalwegs wurde bei einer Reihe von Krebserkrankungen des Menschen beobachtet. Das gebildete Protein hat unterdrückende Wirkung auf das Interleukin-2-abhängige T-Zell-Wachstum. Eine Translokation t(1;7)(q41;p21) mit resultierender Fusion von *TGFB2* mit dem *HDAC9*-Gen ist mit Fehlbildungen der vorderen Augenkammer (Peters-Anomalie) assoziiert (David et al. 2003). Ein Ausschalten des Gens im Maus-Modell führt zu schweren Entwicklungsstörungen und perinataler Mortalität [ENTREZ].

Mikrodeletionssyndrom 1q

Einige der bei Patient 1 deletierten Gene spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Verlust eines der Gene und den beobachteten Auffälligkeiten kann jedoch nicht hergestellt werden. Es ist jedoch

anzunehmen, dass eine Deletion eines über 5Mb großen Abschnittes für die klinischen Auffälligkeiten verantwortlich sein kann.

In der Literatur wurden bereits einige Patienten mit Deletionen im Bereich 1q beschrieben und die Deletion 1q als Syndrom definiert. Dabei wurde eine Einteilung in drei verschiedene 1q-Syndrome vorgenommen (Taysi et al.1982).

Proximale Deletion 1q im Bereich 1q21-22-1q25

Bei den bisher beschriebenen Fällen wurde eine prä- und postnatale Wachstumsretardierung, eine schwere psychomotorische Entwicklungsstörung, eine Mikrobrachyzephalie, Auffälligkeiten der Ohren, eine Bindegewebsschwäche, Auffälligkeiten des äußeren Genitals, kleine Hände und Füße mit dysplastischen Nägeln und Klinodaktylie des 5. Fingers beobachtet. Ausserdem lagen bei dem überwiegenden Teil der Patienten, genau wie bei der distalen Deletion, spärliche feine Haare und Augenbrauen, eine muskuläre Hypotonie sowie Spaltbildungen im Bereich der Lippen, des Kiefers oder des Gaumens vor (Taysi et al.1982).

Interstitielle Deletion 1q im Bereich 1q24-25 → q32

Bei Patienten mit Deletionen in diesem Bereich kamen Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, Lippen- und Gaumenspalte, Epikanthus, Ohrauffälligkeiten und Klinodaktylie vor. Des Weiteren wurden psychomotorische Entwicklungsretardierung, Hypertelorismus und Auffälligkeiten des Genitals beschrieben (Taysi et al. 1982).

Distales oder terminales 1q-Syndrom im Bereich 1q42-43-->qter

Kinder mit einer Deletion in diesem Bereich wiesen eine psychomotorische Entwicklungsretardierung auf, fast alle waren kleinwüchsig und mikrobrachyzephal. Hinzu kamen spärliches dünnes Haar, Auffälligkeiten der Augenlider, der Ohren und des Gaumens, eine flache Nasenwurzel, Mikrognathie und Auffälligkeiten des äußeren Genitals (Taysi et al. 1982).

Poot (2018) untersuchte Kinder mit neurologischen Entwicklungsstörungen und

Deletionen im Bereich 1q44 mit Array-CGH oder Whole-Genome-Sequenzierung zur Bestimmung eines Kandidatengens für das terminale 1q-Syndrom. Neben den im Focus stehenden Genen *AKT3* als Kandidatengen für Mikrozephalie und *ZBTB18* für Korpus Callosum-Anomalien wurde das Gen *HNRNPU* in Verbindung mit Epilepsie und Intelligenzminderung gebracht.

1q41-q42 Deletionssyndrom (OMIM #612530)

Shaffer et al. (2007) beschrieben in einer Übersichtsarbeit sieben Kinder mit mentaler Retardierung und Deletionen im Bereich 1q41 bis 1q42. In fünf der Fälle überspannten die Deletionen den Bereich der auch bei unserem Patienten Nr 1 deletiert ist. Bei den betroffenen Kindern wurden Mikrozephalie, Gesichtsauffälligkeiten sowie verschiedene Auffälligkeiten im Bereich des Stammes und der Extremitäten beschrieben. Bei drei der fünf Kinder lagen Klumpfüße vor, die auch bei Patient 1 beobachtet wurden. Fast alle Kinder hatten zudem ein Anfallsleiden und eine Wachstumsretardierung. Shaffer et al (2007) und Slavotinek et al (2008) vermuteten das Gen *DISP1* als Kandidatengen für die klinischen Auffälligkeiten.

Meinecke und Vögtel (1987) verglichen zwei Kinder mit Deletionen in 1q mit 21 früheren Fällen aus der Literatur.

Neben den schon oben genannten Auffälligkeiten wurde ein verringertes Geburtsgewicht vermerkt, bei den beschriebenen Jungen lagen darüberhinaus Auffälligkeiten des äußeren Genitals vor, u. a. auch eine Hypospadie, wie sie bei Patient 1 beschrieben wurde.

Durch weitere Vergleiche von Patienten mit Deletionen im Bereich 1q41 bis 1q42 und Patienten mit ähnlichem Phänotyp und Varianten in den Genen *WDR26* und *FBXO28* wurden beide Gene als möglicherweise für das 1q41-q42 Deletionssyndrom verantwortlichen Kandidatengene detektiert (Au et al. 2014, Balak et al. 2018, Skraban et al. 2017, Schneider et al. 2021, Cassina et al. 2014).

Leider liegen bei Patient 1 keine detaillierteren Beschreibungen des Phänotyps vor.

Es gibt keine Angaben zur Größe oder zum Kopfumfang und keine Beschreibung der Extremitäten und des Gesichts.

Die vorhandenen Angaben würden jedoch alle zum Bild eines 1q41q42-Deletionssyndroms passen. Die bisher beschriebenen Kandidatengen für die klinischen Auffälligkeiten (*DISP1*, *WDR26* und *FBXO28*) sind jedoch bei Patient 1 nicht von der Deletion betroffen.

Welche Mechanismen beim Ausfall ganzer Chromosomenabschnitte für Entwicklungsauffälligkeiten verantwortlich sind, ist bisher nicht ausreichend geklärt. Die Entschlüsselung des menschlichen Erbguts ist in den letzten Jahren zwar mit Riesenschritten vorangekommen (z.B. das Humangenomprojekt), allerdings ist die Regelung vieler Abläufe der Zell- und Embryonalentwicklung weiterhin unklar. In den letzten Jahren ist deutlich geworden, dass nicht nur die proteincodierenden Gene und deren Expression für die Entwicklung mitverantwortlich sind, sondern dass weitaus komplexere epigenetische Regulationsmechanismen eine wesentliche Rolle spielen (Amaral und Mattick 2008).

Neben den o. g. Genen sind bei Patient 1 auch nicht-codierende Elemente deletiert. Die Funktion der einzelnen Elemente ist bisher in den meisten Fällen noch unklar, es wäre jedoch denkbar, dass durch den Verlust regulatorischer miRNS oder lincRNS Prozesse in der Embryonalentwicklung gestört wurden.

5.1.4 Bruchpunkte auf Chromosom 7q32.1 und 7q35

Auf Chromosom 1 wurden insgesamt 3 Chromosomenbrüche festgestellt. Die verbleibenden 7 Brüche fanden im Bereich 7q32.1 und 7q35 statt.

Betrachtet man die einzelnen Bruchpunkte stellt man fest, dass im Bereich des zentromernächsten Bruchpunktes in 7q31.33 (1:125.756.175 – 125.904.691) keine Gene bekannt sind [Ensembl]

Die übrigen 6 Bruchpunkte liegen alle im Bereich 1:144.602.585-147.407.479.

In diesem Abschnitt sind folgende Elemente zu finden [Ensembl]:

Symbol	Name	Lokalisation	Funktion
LOC402715	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1) pseudogene	144.707.146-144.708.295	Pseudogen
LOC100420072	etoposide induced 2.4 mRNS pseudogene	144.702.155-144.703.238	Pseudogen
LOC643308	ribosomal protein L7 pseudogene	144.737.444-144.738.056	Pseudogen
LOC100420073	dpy-19-like 4 (C. elegans) pseudogene	145.280.294-145.281.915	Pseudogen
LOC100420074	transmembrane protein 183A pseudogene	146.289.110-146.289.752	Pseudogen
CNTNAP2	contactin associated protein-like 2	145.813.453-148.118.090	Protein-Coding
MIR548F4	microRNS 548f-4	147.075.109-147.075.213	miscRNS
LOC100507538	uncharacterized LOC100507538	147.368.791-147.370.236	miscRNS

Tabelle 16: Fall1, DNS-Strukturen im Bereich 7q35

Bis auf CNTNAP2 ist im gesamten Abschnitt keine weitere proteincodierende Sequenz bekannt.

Folgende BAC-Klone im Bereich von CNTNAP2 wurden hybridisiert [Abb.25]:

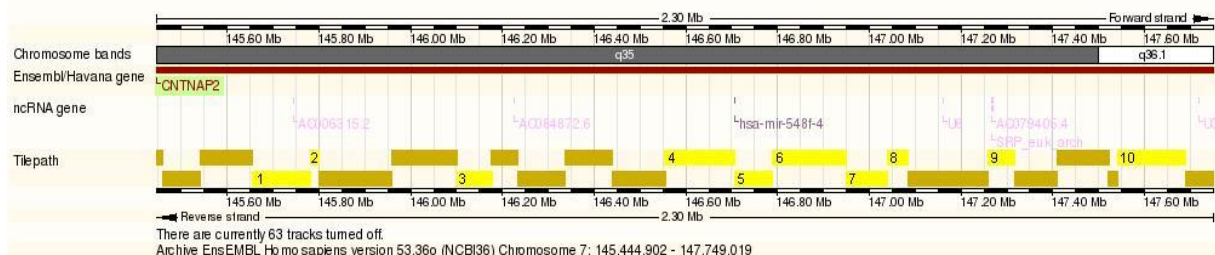


Abbildung 25: Fall 1, BAC-Klone im Bereich des CNTNAP2-Gens

	BAC-Name	Bereich	Hybridisierungsort
1	RP4-630F1	145.654.135-145.781.460	7q
2	RP11-766K8	145.781.461-145.799.233	deletiert
3	RP5-969D4	146.102.541-146.178.149	7q

4	RP11-643A21	146.553.728-146.706.612	1q
5	RP11-291N9	146.706.412-146.787.701	1q
6	RP4-811H12	146.787.501-146.949.716	1q
7	RP4.777G9	146.949.516-147.038.613	1q und 7q, nicht invertiert
8	RP11-654P5	147.038.413-147.084.470	7q, nicht invertiert
9	RP11-1150H5	147.259.181-147.317.996	7q, nicht invertiert
10	RP11-519M4	147.542.899-147.689.274	7q, nicht invertiert

Tabelle 17: Fall 1, Hybridisierte BACs im Bereich des *CNTNAP2*-Gens

Auf eine weitere Eingrenzung der verbleibenden Bruchpunkte wurde verzichtet. In der Array-Analyse wurde ebenfalls die Deletion im Bereich 7:145.696.390-146.131.465 beobachtet. Im Bereich der Deletion sind Teile der Exons 1 und 2, das Intron 1 und mehrere FOXP2-Protein-Bindungsstellen enthalten (Vernes et al. 2008). Nebenbefundlich ergab sich das homozygote Vorliegen des SNP rs2710102 (nt: 147,205,323) im *CNTNAP2*-Gen, welches als Risikoallel für das Auftreten einer autistischen Erkrankung gilt (Alarcón et al. 2008).

Für *CNTNAP2* ergibt sich durch diese Ergebnisse folgende Gliederung [Abb. 26]:

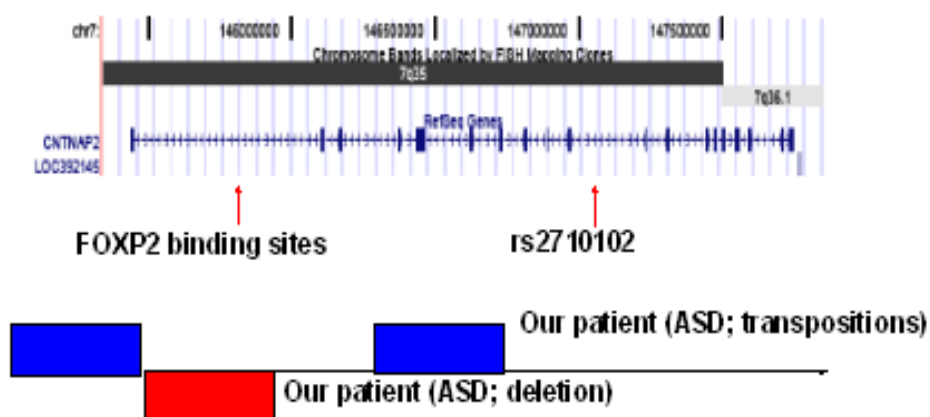


Abbildung 26: Fall 1, Veränderung des *CNTNAP2*-Gens durch die Chromosomenveränderungen

Es ist anzunehmen, dass es durch die Bruchereignisse und die Deletion zu einem Funktionsverlust von *CNTNAP2* gekommen ist.

Zu *CNTNAP2* ist bisher folgendes bekannt:

***CNTNAP2* - contactin associated protein-like 2**

Position Ensembl Chromosom 7: 145.444.902-147.749.019 [Ensembl May 2009]

OMIM: 604569

Alternative Symbole: *CDFE*; *NRXN4*; *AUTS15*; *CASPR2*; *PTHSL1*, *DKFZp781D1846*

Das *CNTNAP2* Gen ist mit 2.304.117bp eines der größten menschlichen Gene und nimmt 1,5% von Chromosom 7 ein (Nakabayashi und Scherer 2001). Es enthält 24 Exons und hat vier Transkripte [provided by RefSeq, Mar 2010].

Das Genprodukt von *CNTNAP2* (*CASPR2*) gehört zur Gruppe der Neurexine. Diese Transmembranproteine nehmen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems ein, insbesondere in der Entwicklung und Funktion der Synapsen. *CASPR2* vermittelt die Interaktion zwischen Neuronen und Glia und ist an der Positionierung der Kaliumkanäle der sich differenzierenden Axone beteiligt (Poliak et al. 2003). Mit *CASPR2*-Antikörpern exponierte Mäuseembryonen zeigten Auffälligkeiten in der Hirnentwicklung und im Verhalten (Coutinho et al. 2017).

Sein Aufbau beinhaltet, wie auch die anderen Proteine aus der Gruppe der Neurexine, Bereiche mit EGF-like und Laminin-G-like Domänen, sowie eine transmembranöse Domäne, und je ein intrazelluläres 4.1B- und PDZ- binding Motiv. Im Gegensatz zu Neurexin 1 α enthält *CASPR2* zwei zusätzliche extrazelluläre Domänen: eine Discoidin-like Domäne (F58C) und eine Fibrinogen-like Domäne (Poliak et al. 1999, Saint-Martin et al. 2018).

Die Regulation, vor allem die Down-Regulierung von *CNTNAP2*, erfolgt durch das „forkhead box protein P2“ (*FOXP2*) über eine *FOXP2* Bindungsstelle im vorderen Genabschnitt (Intron 1) (Alarcón et al. 2008). *FOXP2* scheint als Transkriptionsfaktor eine große Rolle bei der embryonalen Hirnentwicklung zu spielen, v. A. in Bezug auf die Sprachentwicklung (Lai et al. 2003). Es wird vermutet, dass ein Gendosiseffekt eine wesentliche Rolle spielt, da Patienten bereits mit Veränderungen nur eines *FOXP2*-Allels schwere Sprachverständnis- und Sprechstörungen aufweisen (Lai et al. 2001, MacDermot et al. 2005).

CNTNAP2 wird in Verbindung mit vielen neurologischen Erkrankungen gebracht, darunter das Gilles-de la Tourette-Syndrom, Schizophrenie, Epilepsie, Autismus, ADHS und mentale Retardierung.

Der homozygote Ausfall von *CNTNAP2*, bzw. des zugehörigen Proteins CASPR2 führt im Mausmodell zu Verteilungsveränderungen der Kaliumkanäle in den myelinisierten Axonen. Auffälligkeiten im Verhalten der Mäuse können, im Gegensatz zum Ausfall des *CASPR*-Gens, jedoch nicht beobachtet werden (Poliak et al. 2003). Beim Menschen wurde ein homozygoter Ausfall in Zusammenhang mit einem Erkrankungsbild mit schwerer, therapieresistenter fokaler Epilepsie (OMIM-P: 610042, AR), teilweise mit nachweisbaren Veränderungen des Cortex, relativer Makrozephalie und abgeschwächten Sehnenreflexen beobachtet. Nach Eintritt der Krämpfe in früher Kindheit entwickelte sich in allen Fällen eine Sprachentwicklungsstörung, Hyperaktivität, aggressives Verhalten und eine mentale Retardierung (Strauss et al. 2006). Auch bei weiteren Studien zur mentalen Retardierung wurde ein Zusammenhang mit homozygoten *CNTNAP2*-Mutationen beobachtet. Der heterozygote Ausfall schien in einigen Fällen keinen Einfluss auf die Gesundheit des Trägers zu nehmen. Neben der mentalen Retardierung der Patienten mit homozygoten Veränderungen war auch die Sprachentwicklung hochgradig verzögert, zudem lag ein Krampfleiden vor (Zweier et al. 2009, Zweier 2012).

Ein heterozygoter Ausfall von *CNTNAP2* wurde in einer Familie mit Zwangsneurosen und Gilles-de la Tourette-Syndrom beobachtet (Verkerk et al. 2003).

Polymorphismen im *CNTNAP2*-Gen scheinen in Verbindung mit dem Auftreten von Sprachentwicklungsstörungen und Autismus zu stehen (Vernes et al. 2008, Alarcón et al. 2008, Arking et al. 2008), wobei vor allem die Vererbung durch die Mutter bei der Entwicklung einer autistischen Störung eine große Rolle spielt (Arking et al. 2008).

Bei einem Patienten mit milden Dysmorphiezeichen, der aufgrund einer ausgeprägten Hypotonie im Neugeborenenalter auffiel und im Verlauf eine globale Entwicklungsverzögerung mit mentaler Retardierung und Sprachentwicklungsstörung

entwickelte, wurde eine Inversion eines Chromosoms 7 mit Beteiligung der Gene *CNTNAP2* und *AUTS2* diagnostiziert. Ein Bruchpunkt liegt zwischen den Exons 10 und 13 des *CNTNAP2*-Gens, der Bruchpunkt im *AUTS2*-Gen wurde in Intron 5 lokalisiert (Bakkaloglu et al. 2008). Ein Zusammenhang zwischen einem Funktionsverlust von *AUTS2* und muskulärer Hypotonie, mentaler Retardierung sowie Autismus wurde bereits in anderen Fällen mit balancierten Chromosomenrearrangements beobachtet (Kalscheuer et al. 2007, Sultana et al. 2002). Ob bei Fällen mit Transposition von Teilen des Genes eventuell entstandene Genfusionen Einfluss auf den Phänotyp des Patienten nehmen, kann vermutlich nicht geklärt werden (Kalscheuer et al. 2007).

Nicht bei jedem Patienten führt der Ausfall eines *CNTNAP2*-Gens zu einem auffälligen Phänotyp. So wurden in einer Familie bei drei Mitgliedern mit einer balancierten Translokation und einem Bruchpunkt in 7q35 mit Bruch des *CNTNAP2*-Gens keine Auffälligkeiten in der Entwicklung oder der Sprache beobachtet (Belloso et al. 2007).

Mit großer Wahrscheinlichkeit stehen der heterozygote Ausfall von *CNTNAP2* und auch der Verlust der *FOXP2*-Bindungsstelle bei Patient 1 in Zusammenhang mit der schweren Sprachentwicklungsstörung und den autistischen Zügen. Hinzu kommt, dass im verbleibendem *CNTNAP2*-Gen der SNP rs2710102 (nt: 147,205,323) als Risikoallel für das Auftreten einer autistischen Erkrankung (OMIM #612100) nachgewiesen wurde (Alarcón et al. 2008). Der Ausfall eines *CNTNAP2*-Allels scheint jedoch bei Patient 1 nicht die alleinige Ursache für die phänotypischen Auffälligkeiten zu sein.

Betrachtet man alle Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und der Array-CGH, können die festgestellten Veränderungen als ausreichende Ursache für die bei Patient 1 festgestellten Entwicklungsstörungen angenommen werden. Bei der Komplexität der Veränderungen ist es jedoch nicht möglich, einer einzelnen Genveränderung eine eindeutige Wirkung zuzuordnen. Es ist daher anzunehmen, dass bei Patient 1 ein contiguous-gene-Syndrom vorliegt.

5.2 Fall 2

Bei Patient 2 konnte durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung das Vorliegen der balancierten Translokation zwischen dem kurzen Arm eines Chromosoms 4 und dem Zentromerbereich eines Chromosoms 9 bestätigt werden. Mikroskopisch war zuvor nicht zu erkennen, dass es sich bei dem entstandenen Derivat 4 um ein dizentrisches Chromosom handelt.

Die Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigen keine Deletionen oder Zugewinne in den Bruchregionen. Eine Array-CGH könnte hierüber weitere Informationen geben (Shaw-Smith et al. 2004).

5.2.1 Bereich 9p10-9p11.2

Die Bruchpunktlokalisierung auf Chromosom 9 ist schwer einzugrenzen, da in der Zentromerregion von Chromosom 9 viele repetitive Sequenzen liegen und es daher zu einer Doppelhybridisierung der BAC-Sonden kommt. Da die Alpha-Satelliten-Sonde für das Zentromer von Chromosom 9 auf dem derivativen Chromosom 4 hybridisierte und der dem Zentromer am nächsten gelegene BAC-Klon im Bereich 9p11.2 lokalisiert war, kann angenommen werden, dass sich der Bruch zwischen den Banden 9p10 und 9p11.2 ereignet hat. In diesem Bereich sind keine proteincodierenden Gene bekannt [Ensembl][ENTREZ].

5.2.2 Bereich 4p16.3

Der Bereich auf Chromosom 4, in dem der Bruch stattgefunden hat, konnte auf 128789 bps festgelegt werden (Position des BAC-Klons RP11-1191J2: 602.222-732.011) [Ensembl].

In diesem Bereich sind 5 proteincodierende Gene bekannt [Ensembl]:

Symbol	Name	Position	Funktion	OMIM-G / OMIM-P(Erbgang)
PDE6B	phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta	619.373-664.571	Protein-Coding	180072 / 163500(AD) Autosomal dominante

				kongenitale stationäre Nachtblindheit 2 613801(AR) Retinitis pigmentosa 40
ATP5I	ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit E	666.225-668.127	Protein-Coding	601519 / -
MYL5	Myosin, light chain 5, regulatory	667.369-675.822	Protein-Coding	160782 / -
MFSD7	major facilitator superfamily domain containing 7	675.618-683.230	Protein-Coding	- / -
PCGF3	polycomb group ring finger 3	699.537-764.428	Protein-Coding	617543 / -

Tabelle 18: Fall 2, Proteincodierende Gene im Bruchpunktbereich 4p16.3

PDE6B - Phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta

Position Ensembl Chromosom 4: 619.373-664.571 [Ensembl Sep 2013]

OMIM: 180072

Alternative Symbole: *CSNB3, PDEB, rd1, RP40*

Das *PDE6B*-Gen ist 45.198bp lang und in 22 Exons unterteilt. Es gibt 12 Transkripte, von denen 8 proteincodierend sind [Ensembl][Entrez].

Das Gen codiert die Beta-Untereinheit der Phosphodiesterase (PDE). PDE ist ein randständiges heterotrimeres Membranenzym in der Retina, welches durch Lichteinfall in den Stäbchen aktiviert wird. Es führt über die Hydrolyse von cGMP zur Hyperpolarisation der Zelle und somit zur Signaltransduktion [provided by RefSeq, Feb 2009].

Ein homozygoter Ausfall des Gens führt zu einer autosomal rezessiv erblichen Form der Retinopathia pigmentosa (OMIM-P: 613802, AR) (McLaughlin et al. 1993).

Ein heterozygoter Ausfall dieses Gens wurde in Zusammenhang mit der autosomal

dominanten kongenitalen stationären Nachtblindheit (CSNB) (OMIM-P: 163500, AD) beobachtet (Gal et al. 1994).

***ATP5I* - ATP Synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit E**

Position Ensembl Chromosom 4: 666.225-668.127 [Ensembl Sep 2013]

OMIM: 601519

Alternative Symbole: *ATP5K*

Das *ATP5I*-Gen ist 1902 bp lang und in 4 Exons unterteilt. Es gibt 5 Transkripte, von denen eines proteincodierend ist [Ensembl][Entrez].

Die mitochondriale ATP-Synthase katalysiert die ATP-Synthese, indem sie sich den elektrochemischen Protonengradienten entlang der inneren Membran während der oxidativen Phosphorylierung zunutze macht. Das Enzym besteht aus zwei miteinander verbundenen Komplexen: einem löslichen katalytischen Kern (F1) und einer membranspannenden Komponente (F0), welche den Protonenkanal beinhaltet. Der F1-Komplex besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten (alpha, beta, gamma, delta und epsilon), wovon die Alpha- und Beta-Einheiten 3-fach vorhanden sind. Der F0-Komplex scheint aus 9 verschiedenen Untereinheiten zu bestehen (a, b, c, d, e, f, g, F6 und F8). Das *ATP5I*-Gen codiert für die e-Untereinheit des F0-Komplexes [provided by RefSeq, Jun 2010].

Das *ATP5I*-Gen wurde bei Untersuchungen auf CNVs eines Abschnittes auf 4p16.3 in Zusammenhang mit der Entstehung eines early-onset Typ 2 Diabetes als Kandidatengen beschrieben (Kudo et al. 2011).

***MYL5* - myosin, light chain 5, regulatory**

Position Ensembl Chromosom 4: 667.369-675.822 [Ensembl Sep 2013]

OMIM: 160782

Alternative Symbole: -

Das *MYL5*-Gen ist 8453 bp lang und in 8 Exons unterteilt. Es gibt 9 Transkripte, von denen fünf proteincodierend sind [Ensembl][Entrez].

Das Gen codiert eine der Myosin-Leichtketten, einer Komponente der hexameren ATPase des zellulären Motorproteins Myosin. Myosin besteht aus zwei schweren Ketten, zwei nicht-phosphorylierbaren basischen Leichtketten und zwei phosphorylierbaren regulatorischen Leichtketten. Genprodukte des *MYL5*-Gens, z. B. eine der regulatorischen Leichtketten des Myosins, werden im Muskel in der Fetalzeit und beim Erwachsenen in der Retina, dem Gehirn und den Basalganglien exprimiert [provided by RefSeq, Jul 2008].

Das Gen wurde bisher nicht in Zusammenhang mit Entwicklungsauffälligkeiten beschrieben.

***MFSD7* - major facilitator superfamily domain containing 7**

Position Ensembl Chromosom 4: 675.618-683.230 [Ensembl Sep 2013]

OMIM: -

Alternative Symbole: *FLJ22269*, *LP2561*

Das *MFSD7*-Gen ist 7612 bp lang und in 10 Exons unterteilt. Es gibt 9 Transkripte, von denen sieben proteincodierend sind. [Ensembl, Entrez]

Über die Funktion des Gens ist bisher nur wenig bekannt. Expressionsänderungen und SNPs des Gens wurden in Zusammenhang mit Tumorentstehung und Tumorentwicklung gebracht (Wen et al. 2012, De Giorgi et al. 2009, Peedicayil et al. 2010).

***PCGF3* - polycomb group ring finger 3**

Position Ensembl Chromosom 4: 699.537-764.428 [Ensembl Sep 2013]

OMIM: 617543

Alternative Symbole: *DONG1*, *FLJ36550*, *MGC40413*, *RNF3*, *RNF3A*

Das *PCGF3*-Gen ist 64891 bp lang und in 13 Exons unterteilt. Es gibt 14 Transkripte, von denen acht proteincodierend sind [Ensembl, Entrez].

Die codierten Proteine enthalten eine C3HC4-Ringfingerstruktur, welche dafür bekannt ist, an der Protein-Protein-Interaktion beteiligt zu sein. Die spezielle Funktion

der PCGF3-Proteine ist bisher noch nicht bekannt [provided by RefSeq, Jul 2008].

Keines der obengenannten Gene wurde bisher in Zusammenhang mit einer Entwicklungsauffälligkeit beschrieben. Um den Bruchpunkt exakter zu charakterisieren, könnte eine FISH-Diagnostik mit DNS-Sonden aus Long-Range-PCR-Abschnitten im Bereich der bruchpunktüberspannenden Genom-Sequenz, eventuell in Verbindung mit FIBER-FISH durchgeführt werden (Florijn et al. 1996). Des Weiteren käme eine Shotgun-Sequenzierung in Betracht (Weber und Myers 1997, Venter et al. 1998). Sollte durch die ergänzenden Befunde die Beteiligung eines der o. g. Gen am Bruchereignis nachgewiesen werden, ist dennoch eine Relevanz für die bei Patient 2 vorliegenden Entwicklungsauffälligkeiten noch nicht bewiesen. Geklärt werden müsste auch, ob eine Fusion zweier Gene mit resultierender Änderung der Genaktivität stattgefunden haben könnte. Allerdings ist dies wenig wahrscheinlich, da im Bruchpunktbereich auf Chromosom 9 wenige bis keine codierenden Genstrukturen bekannt sind. Darüber hinaus könnte eine Neupositionierung entwicklungsrelevanter Gene im Genom zu einer Expressionsänderung geführt haben (Kleinjan und van Heyningen 1998), eine Untersuchung hierauf gestaltet sich zurzeit jedoch eher schwierig.

Durch die Alpha-Satellitenanalyse wurde festgestellt, dass der Zentromerbereich von Chromosom 9 auf das Derivat 4 transloziert ist. Es handelt sich demnach beim Translokationschromosom 4 um ein dizentrisches Chromosom. Da wir annehmen, dass sich auch auf dem derivativen Chromosom 9 ein Zentromer befindet, stellt sich die Frage, welcher Bereich die Aufgabe des Zentromers übernommen und sich zu einem Neozentromer formiert hat.

Die Formation eines Neozentromers wurde das erste Mal 1993 beobachtet. Im überwiegenden Teil der Fälle entsteht es durch Chromosomenbrüche mit konsekutivem Markerchromosom (Marshall et al. 2008).

Der Fall eines Neozentromers in Verbindung mit einer balancierten Translokation mit Entstehung eines dizentrischen Chromosoms wurde bisher nicht beschrieben.

Ein Neozentromer beinhaltet im Gegensatz zu einem ursprünglichen Zentromer

keine Alpha-Satelliten, übernimmt jedoch in Mitose und Meiose die komplexe Aufgabe eines vollständigen Zentromers. Die Organisation eines Neozentromers und der Ablauf der Aktivierung sind bisher nicht geklärt. Es wird angenommen, dass vor allem eine CENPA-bindende Domäne an der Formierung eines Neozentromers beteiligt ist (Marshall et al. 2008).

Bisher ist nicht bekannt, ob im menschlichen Genom feste Loci für die Formation eines Neozentromers vorhanden sind. Eine strikte Übereinstimmung in der Genstruktur der bisher beobachteten Neozentromere konnte nicht gefunden werden. Neozentromere formieren sich sowohl in Gen-reichen als auch Gen-armen Regionen (Marshall et al. 2008). Die Genaktivität eines im Neozentromer liegenden Gens scheint dabei nicht beeinflusst zu werden (Saffery et al. 2003).

Fälle mit Formierung eines Neozentromers auf Chromosom 9 wurden bereits beschrieben (Depinet et al. 1997, Satinover et al. 2001, Vance et al. 1997). In diesen Fällen lag ein unbalancierter Karyotyp mit Markerchromosom aus einem Teil von 9p, welches sich dupliziert hatte vor. (47,XY,+der(9)(pter->p21.2::p21.2->pter) und 47,XY,del(9)(p12),+der(9)(pter->p12::p12->pter) und 47,XX,del(9)(p13)+der(9)(pter-Yp13::p13->pter)) (Depinet et al. 1997). Eine Untersuchung des Neozentromers mittels FISH und Immunfluoreszenz der im Neozentromers enthaltenen CENP-C und CENP-E ergab eine Lokalisation des Neozentromers in 9p23-24 (Satinover et al. 2001).

Die Kombination aus Immunfluoreszenz zur Markierung des Zentromers und BAC-Sonden könnte zur Lokalisation des Neozentromers auf dem Derivat 9 von Patient 2 herangezogen werden. Fraglich ist jedoch, ob die Entstehung eines Neozentromers in Verbindung mit einer Entwicklungsauffälligkeit stehen könnte. In der Literatur gibt es dazu keine Hinweise.

Das derivative Chromosom 4 bei Patient 2 zeigte sich in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als dizentrisch. Vermutete man früher, dass dizentrische Chromosomen stets zu Problemen mit unbalancierten Tochterzellen in Mitose und Meiose führen (Haber et al. 1984), so zeigte sich bei Untersuchungen an dizentrischen Chromosomen, dass eines der Zentromere meist inaktiviert wird, so

dass die Stabilität bei der Zellteilung gewährleistet wird (Han et al. 2006).

Die Inaktivierung des Zentromers von Chromosom 9 auf dem Derivat 4 von Patient 2 würde erklären, warum nur eine Konstriktion des Derivats 4 im Bereich des Zentromers von Chromosom 4 beobachtet werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bislang erhobenen Ergebnisse bei Patient 2 seinen auffälligen Phänotyp und die Entwicklungsstörung nicht hinreichend erklären. Um weiteren Aufschluss über mögliche genetische Ursachen für die Auffälligkeiten zu erhalten, könnten ergänzende Untersuchungen durchgeführt werden (Array-CGH, NGS, weitere FISH-Analysen, s.o.).

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die bei Patient 2 beobachteten Auffälligkeiten nicht mit der entstandenen Translokation in Verbindung stehen. Neben genetischen Ursachen wie Mikrodeletionen, rezessiven oder dominanten Erbkrankheiten, kämen z. B. auch pränatale Infektionen oder physikalische Noxen als Auslöser in Betracht. Hierzu wären weitere Informationen über den Schwangerschaftsverlauf, Ergebnisse der Infektionsserologie und anamnestische Angaben bezüglich Medikamenteneinnahme und Alkoholkonsum der Mutter während der Schwangerschaft notwendig.

Unter der Annahme, dass das Risiko einer angeborenen Gesundheitsstörung bei Kindern mit neu entstandenen balancierten Chromosomenrearrangements doppelt so hoch ist wie bei Kindern ohne Chromosomenauffälligkeiten (Warburton et al. 1991), kann man ebenso annehmen, dass bei etwa 50% der auffälligen Kinder mit balancierter Chromosomenveränderung eine von dem Rearrangement unabhängige Ursache für die Entwicklungsstörung vorliegt.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei Kinder untersucht, bei denen der Verdacht auf ein „Disease associated balanced chromosome Rearrangement“ (DBCR oder krankheitsassoziierte balancierte Chromosomenveränderung) bestand. In beiden

Fällen war in der klassischen Bänderungsanalyse eine vermeintlich balancierte Strukturveränderung diagnostiziert worden. Das Ziel war, mittels FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) eine genauere Charakterisierung der Bruchpunkte zu erreichen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Chromosomenveränderungen und dem auffälligen Phänotyp herstellen zu können. Die DNS-Sonden hierfür wurden aus BACs (bacterial artificial chromosoms) mittels Anreicherung und Nick-Translation mit Antikörper- und Fluoreszenz-markierten Nukleotiden gewonnen.

Patient 1, ein acht Jahre alter Junge, war wegen einer Sprachentwicklungsstörung, leichter globaler Entwicklungsretardierung, autistischen Zügen und milden Dysmorphiezeichen auffällig geworden und eine Chromosomenanalyse hatte eine Inversion 7 [46,XYqs,inv(7)(q35q36.2)] ergeben. Mehrere Untersuchungen mittels FISH zeigten, dass bei ihm anstelle einer Inversion ein komplexes Chromosomenrearrangement mit Insertion von Chromosom 7q35 nach Chromosom 1q31.2 vorlag. Durch diese Insertion kam es zu einer Unterbrechung und somit zum Ausfall des auf Chromosom 7q befindlichen *CNTNAP2*-Gens, das in Zusammenhang mit Sprachentwicklungsstörungen und Autismus gebracht wird. Eine auswärtig durchgeführte SNP-Array-CGH (Dr. Poot, Utrecht) zeigte zudem eine maternal vererbte etwa 0,3 Mb große Duplikation von Chromosom 1p32.3, eine 5,65 Mb große Deletion des paternalen Allels von Chromosom 1q41 und eine 402-435 kb große Deletion des paternalen Allels von Chromosom 7q35. Die Deletionen konnten mittels FISH bestätigt werden. Anstatt eines Zweibruch-Ereignisses mit Inversion muss es während der väterlichen Keimzellreifung zu mindestens 10 Chromosomenbrüchen gekommen sein. Die vereinfachte Karyotypformel nach FISH lautete:

46,XYqs pat, dup(1)(pter→p32.3::p32.3→p32.3::p32.3→qter)mat,der(1) ins(1;7)
 (1pter→1q31.2::7q35→7q35::7q35→7q35::1q31.2→1q41.1::1q41.1→1qter),
 der(7)(7pter→7q32.1::7q35→7q32.1::7q35-->7q35::7q35-->7q35::7q35→7qter)
 de novo(pat)

Weiter zeigte sich, dass bei Patient 1 im verbleibenden maternalen *CNTNAP2*-Gen ein mit Autismus assoziierter SNP(rs2710102) vorlag.

Somit kann angenommen werden, dass die Entwicklungsauffälligkeiten von Patient 1 (globale Entwicklungsverzögerung, autistische Züge, Hypospadie, Klumpfüsse) durch die Chromosomenanomalien verursacht wurden, am ehesten durch die fast 5,6 Mb große Deletion von 1q41. Die Sprachentwicklungsstörung und die autistischen Züge könnten als multifaktorielle Auffälligkeiten durch die Veränderungen der *CNTNAP2*-Gene begünstigt sein, die anderen Auffälligkeiten reihen sich in das Bild des 1q-Syndroms (Chromosome 1q41-q42 Deletion Syndrom #612530) ein (Shaffer et al. 2007).

Patient 2, ein acht Jahre alter Junge, war ebenfalls durch eine Sprachentwicklungsstörung sowie durch motorische Dyspraxie, aggressives Verhalten, Infektanfälligkeit, Blutungsneigung und milden körperlichen Dysplasien, wie weichem Ohrknorpel und kurzern Fingern, aufgefallen. Die Chromosomenanalyse hatte eine Translokation zwischen dem kurzen Arm eines Chromosoms 4 und dem langen Arm eines Chromosoms 9 ergeben [46,XY,t(4;9)(p16.3;q11)]. Bei Patient 2 konnte die Translokation mit FISH bestätigt werden, außerdem konnte ich den Bruchpunkt auf Chromosom 9 genauer lokalisieren (nicht im Bereich 9q11, sondern in der Region zwischen 9p11.2 und 9q10). Somit handelt es sich bei dem Translokationschromosom 4 um ein dizentrisches Chromosom mit Inaktivierung eines Zentromers, während sich auf dem derivativen Chromosom 9 ein Neozentromer gebildet haben muss.

Eine Erklärung für den auffälligen Phänotyp von Patient 2 wurde durch die Untersuchung nicht gefunden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen den Chromosomenveränderungen und den Entwicklungsauffälligkeiten könnte durch eine Neupositionierung entwicklungsrelevanter, dosissensitiver Gene im Genom bedingt sein. Im Rahmen dieser Arbeit war keine weiterführende Untersuchung möglich.

Ergänzend könnte z.B. durch eine Mikroarrayanalyse oder eine NGS-Sequenzierung versucht werden, weiter Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp zu erhalten.

7 Literaturverzeichnis

Alarcón M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, Sebat J, Wigler M, Martin CL, Ledbetter DH, Nelson SF, Cantor RM, Geschwind DH (2008) Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet.* 82(1):150-9. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.09.005.

Amaral PP, Mattick JS (2008) Noncoding RNA in development. *Mamm Genome.* 19(7-8):454-92. doi: 10.1007/s00335-008-9136-7.

Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, Teslovich TM, West K, Ikeda M, Rea A, Guy M, Lin S, Cook EH, Chakravarti A (2008) A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet.* 82(1):160-4. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.09.015.

Asakawa S, Abe I, Kudoh Y, Kishi N, Wang Y, Kubota R, Kudoh J, Kawasaki K, Minoshima S, Shimizu N (1997) Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene.* 191(1):69-79. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00044-9.

Au AC, Hernandez PA, Lieber E, Nadroo AM, Shen YM, Kelley KA, Gelb BD, Diaz GA (2010) Protein tyrosine phosphatase PTPN14 is a regulator of lymphatic function and choanal development in humans. *Am J Hum Genet.* 87(3):436-44. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.08.008.

Au PY, Argiropoulos B, Parboosingh JS, Micheil Innes A (2014) Refinement of the critical region of 1q41q42 microdeletion syndrome identifies FBXO28 as a candidate causative gene for intellectual disability and seizures. *Am J Med Genet A.* 164A(2):441-8. doi: 10.1002/ajmg.a.36320.

Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Tanriover G, Abrahams BS, Duvall JA, Robbins EM, Geschwind DH, Biederer T, Gunel M, Lifton RP, State MW (2008) Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet.* 82(1):165-73. doi:

Balak C, Belnap N, Ramsey K, Joss S, Devriendt K, Naymik M, Jepsen W, Siniard AL, Szelinger S, Parker ME, Richholt R, Izatt T, LaFleur M, Terraf P, Llaci L, De Both M, Piras IS, Rangasamy S, Schrauwen I, Craig DW, Huentelman M, Narayanan V (2018) A novel FBXO28 frameshift mutation in a child with developmental delay, dysmorphic features, and intractable epilepsy: A second gene that may contribute to the 1q41-q42 deletion phenotype. *Am J Med Genet A.* 176(7):1549-1558. doi: 10.1002/ajmg.a.38712.

Bartsch O, Wagner A, Hinkel GK, Krebs P, Stumm M, Schmalenberger B, Böhm S, Balci S, Majewski F (1999) FISH studies in 45 patients with Rubinstein-Taybi syndrome: deletions associated with polysplenia, hypoplastic left heart and death in infancy. *Eur J Hum Genet.* 7(7):748-56. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200378.

- Belloso JM, Bache I, Guitart M, Caballin MR, Halgren C, Kirchhoff M, Ropers HH, Tommerup N, Tümer Z (2007) Disruption of the CNTNAP2 gene in a t(7;15) translocation family without symptoms of Gilles de la Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet.* 15(6):711-3. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201824.
- Bennetts JS, Fowles LF, Butterfield NC, Berkman JL, Teasdale RD, Simpson F, Wicking C (2006) Identification and analysis of novel genes expressed in the mouse embryonic facial primordia. *Front Biosci.* 11:2631-46. doi: 10.2741/1997.
- Brown MA, Sims RJ 3rd, Gottlieb PD, Tucker PW (2006) Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol Cancer.* 5:26. doi: 10.1186/1476-4598-5-26.
- Budarf ML, Collins J, Gong W, Roe B, Wang Z, Bailey LC, Sellinger B, Michaud D, Driscoll DA, Emanuel BS (1995) Cloning a balanced translocation associated with DiGeorge syndrome and identification of a disrupted candidate gene. *Nat Genet.* 10(3):269-78. doi: 10.1038/ng0795-269.
- Bugge M, Bruun-Petersen G, Brøndum-Nielsen K, Friedrich U, Hansen J, Jensen G, Jensen PK, Kristoffersson U, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen KR, Rasmussen K, Tommerup N (2000) Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man. *J Med Genet.* 37(11):858-65. doi: 10.1136/jmg.37.11.858.
- Casiano CA, Humbel RL, Peebles C, Covini G, Tan EM (1995) Autoimmunity to the cell cycle-dependent centromere protein p330d/CENP-F in disorders associated with cell proliferation. *J Autoimmun.* 8(4):575-86. doi: 10.1016/0896-8411(95)90009-8.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C (1970) Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res.* 60(3):315-9. doi: 10.1016/0014-4827(70)90523-9.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C (1970) Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp Cell Res.* 62(2):490-2. doi: 10.1016/0014-4827(70)90586-0.
- Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L (1968) Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res.* 49(1):219-22. doi: 10.1016/0014-4827(68)90538-7.
- Cassina M, Rigon C, Casarin A, Vicenzi V, Salviati L, Clementi M (2015) FBXO28 is a critical gene of the 1q41q42 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 67(6):1418-20. doi: 10.1002/ajmg.a.37033.
- Ceron J, González C, Tejedor FJ (2001) Patterns of cell division and expression of asymmetric cell fate determinants in postembryonic neuroblast lineages of *Drosophila*. *Dev Biol.* 230(2):125-38. doi: 10.1006/dbio.2000.0110.
- Cheng SSW, Chan KYK, Leung KKP, Au PKC, Tam WK, Li SKM, Luk HM, Kan ASY, Chung BHY, Lo IFM, Tang MHY (2019) Experience of chromosomal microarray applied in prenatal and postnatal settings in Hong Kong. *Am J Med Genet C Semin*

Med Genet. 181(2):196-207. doi: 10.1002/ajmg.c.31697.

Comings DE (1978) Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Annu Rev Genet.* 12:25-46. doi: 10.1146/annurev.ge.12.120178.000325

Coutinho E, Menassa DA, Jacobson L, West SJ, Domingos J, Moloney TC, Lang B, Harrison PJ, Bennett DLH, Bannerman D, Vincent A (2017) Persistent microglial activation and synaptic loss with behavioral abnormalities in mouse offspring exposed to CASPR2-antibodies in utero. *Acta Neuropathol.* 134(4):567-583. doi: 10.1007/s00401-017-1751-5.

Curran ME, Atkinson DL, Ewart AK, Morris CA, Leppert MF, Keating MT (1993) The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis. *Cell.* 73(1):159-68. doi: 10.1016/0092-8674(93)90168-p.

David D, Cardoso J, Marques B, Marques R, Silva ED, Santos H, Boavida MG (2003) Molecular characterization of a familial translocation implicates disruption of HDAC9 and possible position effect on TGFbeta2 in the pathogenesis of Peters' anomaly. *Genomics.* 81(5):489-503. doi: 10.1016/s0888-7543(03)00046-6.

De Giorgi V, Monaco A, Worchech A, Tornesello M, Izzo F, Buonaguro L, Marincola FM, Wang E, Buonaguro FM (2009) Gene profiling, biomarkers and pathways characterizing HCV-related hepatocellular carcinoma. *J Transl Med.* 7:85. doi: 10.1186/1479-5876-7-85.

De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previderé C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O (2007) Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet.* 44(12):750-62. doi: 10.1136/jmg.2007.052787.

De Marchis ML, Giorgi A, Schininà ME, Bozzoni I, Fatica A (2005) Rrp15p, a novel component of pre-ribosomal particles required for 60S ribosome subunit maturation. *RNA.* 11(4):495-502. doi: 10.1261/rna.7200205.

Deng Y, Hu LS, Lu GX (2006) Expression and identification of a novel apoptosis gene Spata17 (MSRG-11) in mouse spermatogenic cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 38(1):37-45. doi: 10.1111/j.1745-7270.2006.00125.x.

Depinet TW, Zackowski JL, Earnshaw WC, Kaffe S, Sekhon GS, Stallard R, Sullivan BA, Vance GH, Van Dyke DL, Willard HF, Zinn AB, Schwartz S (1997) Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet.* 6(8):1195-204. doi: 10.1093/hmg/6.8.1195.

Derks S, Lentjes MH, Hellebrekers DM, de Bruïne AP, Herman JG, van Engeland M (2004) Methylation-specific PCR unraveled. *Cell Oncol.* 26(5-6):291-9. doi: 10.1155/2004/370301.

- Diehl F, Brown MA, van Amerongen MJ, Novoyatleva T, Wietelmann A, Harriss J, Ferrazzi F, Böttger T, Harvey RP, Tucker PW, Engel FB (2010) Cardiac deletion of *Smyd2* is dispensable for mouse heart development. *PLoS One*. 5(3):e9748. doi: 10.1371/journal.pone.0009748.
- Dolk H, Loane M, Garne E (2010) The prevalence of congenital anomalies in Europe. *Adv Exp Med Biol*. 686:349-64. doi: 10.1007/978-90-481-9485-8_20.
- Dyer MA, Livesey FJ, Cepko CL, Oliver G (2003) *Prox1* function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat Genet*. 34(1):53-8. doi: 10.1038/ng1144.
- Feldkamp ML, Carey JC, Byrne JLB, Krikov S, Botto LD (2017) Etiology and clinical presentation of birth defects: population based study. *BMJ*. 357:j2249. doi: 10.1136/bmj.j2249.
- Filges I, Bruder E, Brandal K, Meier S, Undlien DE, Waage TR, Hoesli I, Schubach M, de Beer T, Sheng Y, Hoeller S, Schulzke S, Røsby O, Miny P, Tercanli S, Oppedal T, Meyer P, Selmer KK, Strømme P (2016) Strømme Syndrome Is a Ciliary Disorder Caused by Mutations in *CENPF*. *Hum Mutat*. 37(4):359-63. doi: 10.1002/humu.22960. Erratum in: *Hum Mutat*. 2016 Jul;37(7):711.
- Florijn RJ, van de Rijke FM, Vrolijk H, Blonden LA, Hofker MH, den Dunnen JT, Tanke HJ, van Ommen GJ, Raap AK (1996) Exon mapping by fiber-FISH or LR-PCR. *Genomics*. 38(3):277-82. doi: 10.1006/geno.1996.0629.
- Gal A, Orth U, Baehr W, Schwinger E, Rosenberg T (1994) Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat Genet*. 7(1):64-8. doi: 10.1038/ng0594-64. Erratum in: *Nat Genet*. 1994 Aug;7(4):551.
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP (2005) The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet*. 42(1):8-16. doi: 10.1136/jmg.2004.024141.
- Haaf T. Fluorescence in-situ hybridization (2000) In: Meyers RA, Hrsg. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 4984–5006.
- Haber JE (2000) Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet*. 16(6):259-64. doi: 10.1016/s0168-9525(00)02022-9.
- Haber JE, Thorburn PC, Rogers D (1984) Meiotic and mitotic behavior of dicentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 106(2):185-205.
- Han F, Lamb JC, Birchler JA (2006) High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(9):3238-43. doi: 10.1073/pnas.0509650103.
- Harris BS, Bishop KC, Kemeny HR, Walker JS, Rhee E, Kuller JA (2017) Risk Factors for Birth Defects. *Obstet Gynecol Surv*. 72(2):123-135. doi:

10.1097/OGX.0000000000000405.

Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, Berger SL (2006) Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature*. 444(7119):629-32. doi: 10.1038/nature05287.

John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*. 223(5206):582-7. doi: 10.1038/223582a0.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 258(5083):818-21. doi: 10.1126/science.1359641.

Kalscheuer VM, FitzPatrick D, Tommerup N, Bugge M, Niebuhr E, Neumann LM, Tzschach A, Shoichet SA, Menzel C, Erdogan F, Arkesteijn G, Ropers HH, Ullmann R (2007) Mutations in autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) in patients with mental retardation. *Hum Genet*. 121(3-4):501-9. doi: 10.1007/s00439-006-0284-0.

Kleinjan DJ, van Heyningen V (1998) Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet*. 7(10):1611-8. doi: 10.1093/hmg/7.10.1611.

Kudo H, Emi M, Ishigaki Y, Tsunoda U, Hinokio Y, Ishii M, Sato H, Yamada T, Katagiri H, Oka Y (2011) Frequent loss of genome gap region in 4p16.3 subtelomere in early-onset type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res*. 2011:498460. doi: 10.1155/2011/498460.

Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*. 116(Pt 11):2117-24. doi: 10.1242/jcs.00493.

Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F, Monaco AP (2001) A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*. 413(6855):519-23. doi: 10.1038/35097076.

Lai CS, Gerrelli D, Monaco AP, Fisher SE, Copp AJ (2003) FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. *Brain*. 126(Pt 11):2455-62. doi: 10.1093/brain/awg247.

Langer PR, Waldrop AA, Ward DC (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78(11):6633-7. doi: 10.1073/pnas.78.11.6633.

Lentze MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J (2003) *Pädiatrie. Grundlagen und Praxis*. Berlin: Springer

Lin ML, Fukukawa C, Park JH, Naito K, Kijima K, Shimo A, Ajiro M, Nishidate T, Nakamura Y, Katagiri T (2009) Involvement of G-patch domain containing 2 overexpression in breast carcinogenesis. *Cancer Sci*. 100(8):1443-50. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01185.x.

Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, Doyle JJ, Gallo E, Fert-Bober J, Kempers MJ, Fishman EK, Chen Y, Myers L, Bjeda D, Oswald G, Elias AF, Levy HP, Anderlid BM, Yang MH, Bongers EM, Timmermans J, Braverman AC, Canham N, Mortier GR,

Brunner HG, Byers PH, Van Eyk J, Van Laer L, Dietz HC, Loeys BL (2012) Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet.* 44(8):922-7. doi: 10.1038/ng.2349.

Liou YJ, Chen TJ, Tsai SJ, Yu YW, Cheng CY, Hong CJ (2009) Support for the involvement of the KCNK2 gene in major depressive disorder and response to antidepressant treatment. *Pharmacogenet Genomics.* 19(10):735-41. doi: 10.1097/FPC.0b013e32832cbe61.

Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fodor SP (1995) Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques.* 19(3):442-7.

Lord J, McMullan DJ, Eberhardt RY, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, Prigmore E, Keelagher R, Best SK, Carey GK, Mellis R, Robart S, Berry IR, Chandler KE, Cilliers D, Cresswell L, Edwards SL, Gardiner C, Henderson A, Holden ST, Homfray T, Lester T, Lewis RA, Newbury-Ecob R, Prescott K, Quarrell OW, Ramsden SC, Roberts E, Tapon D, Tooley MJ, Vasudevan PC, Weber AP, Wellesley DG, Westwood P, White H, Parker M, Williams D, Jenkins L, Scott RH, Kilby MD, Chitty LS, Hurler ME, Maher ER (2019) Prenatal Assessment of Genomes and Exomes Consortium. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet.* 393(10173):747-757. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31940-8.

MacDermot KD, Bonora E, Sykes N, Coupe AM, Lai CS, Vernes SC, Vargha-Khadem F, McKenzie F, Smith RL, Monaco AP, Fisher SE (2005) Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. *Am J Hum Genet.* 76(6):1074-80. doi: 10.1086/430841.

Mahler EA, Johannsen J, Tsiakas K, Kloth K, Lüttgen S, Mühlhausen C, Alhaddad B, Haack TB, Strom TM, Kortüm F, Meitinger T, Muntau AC, Santer R, Kubisch C, Lessel D, Denecke J, Hempel M (2019) Exome Sequencing in Children. *Dtsch Arztebl Int.* 116(12):197-204. doi: 10.3238/arztebl.2019.0197.

Malinowski J, Miller DT, Demmer L, Gannon J, Pereira EM, Schroeder MC, Scheuner MT, Tsai AC, Hickey SE, Shen J; ACMG Professional Practice and Guidelines Committee (2020) Systematic evidence-based review: outcomes from exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability. *Genet Med.* 22(6):986-1004. doi: 10.1038/s41436-020-0771-z.

Manning M, Hudgins L; Professional Practice and Guidelines Committee (2010) Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med.* 12(11):742-5. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181f8baad.

Marshall OJ, Chueh AC, Wong LH, Choo KH (2008) Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *Am J Hum Genet.* 82(2):261-82. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.11.009.

McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP (1993) Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis

pigmentosa. *Nat Genet.* 4(2):130-4. doi: 10.1038/ng0693-130.

Meinecke P, Vögtel D (1987) A specific syndrome due to deletion of the distal long arm of chromosome 1. *Am J Med Genet.* 28(2):371-6. doi: 10.1002/ajmg.1320280215.

Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L, Janssens S, De Paepe A, De Moor B, Moreau Y, Marynen P, Fryns JP, Mortier G, Devriendt K, Speleman F, Vermeesch JR (2006) Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet.* 43(8):625-33. doi: 10.1136/jmg.2005.039453.

Mignon-Ravix C, Mugneret F, Stavropoulou C, Depetris D, Khau Van Kien P, Mattei MG (2001) Maternally inherited duplication of the possible imprinted 14q31 region. *J Med Genet.* 38(5):343-7. doi: 10.1136/jmg.38.5.343.

Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ (2000) Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 9(9):1415-23. doi: 10.1093/hmg/9.9.1415.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH (2010) Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 86(5):749-64. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006.

Morison IM, Reeve AE (1998) A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. *Hum Mol Genet.* 7(10):1599-609. doi: 10.1093/hmg/7.10.1599.

Nakabayashi K, Scherer SW (2001) The human contactin-associated protein-like 2 gene (CNTNAP2) spans over 2 Mb of DNA at chromosome 7q35. *Genomics.* 73(1):108-12. doi: 10.1006/geno.2001.6517.

Neel BG, Tonks NK (1997) Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 9(2):193-204. doi: 10.1016/s0955-0674(97)80063-4.

Ng PC, Kirkness EF (2010) Whole genome sequencing. *Methods Mol Biol.* 628:215-26. doi: 10.1007/978-1-60327-367-1_12.

Nielsen J, Wohler M (1991) Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.* 87(1):81-3. doi: 10.1007/BF01213097.

Nuytemans K, Vance JM (2010) Whole exome sequencing. *Rinsho Shinkeigaku.* 50(11):952-5. Japanese. doi: 10.5692/clinicalneuro.50.952.

- O'Connor M, Peifer M, Bender W (1989) Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science*. 244(4910):1307-12. doi: 10.1126/science.2660262.
- Pantzar JT, Allanson JE, Kalousek DK, Poland BJ (1984) Cytogenetic findings in 318 couples with repeated spontaneous abortion: a review of experience in British Columbia. *Am J Med Genet*. 17(3):615-20. doi: 10.1002/ajmg.1320170310.
- Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 64(2):600-4. doi: 10.1073/pnas.64.2.600.
- Patricia JA (1977) Structural rearrangements of the chromosomes in man. In: Hook EB, Hrsg. Porter IH, Hrsg. *Population Cytogenetics Studies in Humans*. New York: Academic Press, 81-87
- Patsalis PC, Evangelidou P, Charalambous S, Sismani C (2004) Fluorescence in-situ hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. *Eur J Hum Genet*. 12(8):647-53. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201211.
- Peedicayil A, Vierkant RA, Hartmann LC, Fridley BL, Fredericksen ZS, White KL, Elliott EA, Phelan CM, Tsai YY, Berchuck A, Iversen ES Jr, Couch FJ, Peethamabaran P, Larson MC, Kalli KR, Kosel ML, Shridhar V, Rider DN, Liebow M, Cunningham JM, Schildkraut JM, Sellers TA, Goode EL (2010) Risk of ovarian cancer and inherited variants in relapse-associated genes. *PLoS One*. 5(1):e8884. doi: 10.1371/journal.pone.0008884.
- Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, Trimmer JS, Shrager P, Peles E (1999) Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron*. 24(4):1037-47. doi: 10.1016/s0896-6273(00)81049-1.
- Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, Stewart CL, Xu X, Chiu SY, Shrager P, Furley AJ, Peles E (2003) Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol*. 162(6):1149-60. doi: 10.1083/jcb.200305018.
- Poot M, Eleveld MJ, van 't Slot R, Ploos van Amstel HK, Hochstenbach R (2010) Recurrent copy number changes in mentally retarded children harbour genes involved in cellular localization and the glutamate receptor complex. *Eur J Hum Genet*. 18(1):39-46. doi: 10.1038/ejhg.2009.120.
- Poot M (2019) *HNRNPU*: Key to Neurodevelopmental Disorders such as Intellectual Delay, Epilepsy, and Autism. *Mol Syndromol*. 9(6):275-278. doi: 10.1159/000495204.
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol*. 113(1):237-51. doi: 10.1016/0022-2836(77)90052-3.
- Robin NH, Harari-Shacham A, Schwartz S, Wolff DJ (1997) Duplication 14(q24.3q31) in a father and daughter: delineation of a possible imprinted region. *Am J Med Genet*. 71(3):361-5. doi: 10.1002/(sici)1096-8628(19970822)71:3<361::aid-

ajmg20>3.0.co;2-h.

Saddic LA, West LE, Aslanian A, Yates JR 3rd, Rubin SM, Gozani O, Sage J (2010) Methylation of the retinoblastoma tumor suppressor by SMYD2. *J Biol Chem.* 285(48):37733-40. doi: 10.1074/jbc.M110.137612.

Saffery R, Sumer H, Hassan S, Wong LH, Craig JM, Todokoro K, Anderson M, Stafford A, Choo KH (2003) Transcription within a functional human centromere. *Mol Cell.* 12(2):509-16. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00279-x.

Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H (2009) Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med.* 11(3):139-46. doi: 10.1097/GIM.0b013e318194ee8f.

Saint-Martin M, Joubert B, Pellier-Monnin V, Pascual O, Noraz N, Honnorat J (2018) Contactin-associated protein-like 2, a protein of the neurexin family involved in several human diseases. *Eur J Neurosci.* 48(3):1906-1923. doi: 10.1111/ejn.14081.

Satinover DL, Vance GH, Van Dyke DL, Schwartz S (2001) Cytogenetic analysis and construction of a BAC contig across a common neocentromeric region from 9p. *Chromosoma.* 110(4):275-83. doi: 10.1007/s004120100143.

Scanlan MJ, Gordan JD, Williamson B, Stockert E, Bander NH, Jongeneel V, Gure AO, Jäger D, Jäger E, Knuth A, Chen YT, Old LJ (1999) Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 83(4):456-64. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19991112)83:4<456::aid-ijc4>3.0.co;2-5.

Schneider AL, Myers CT, Muir AM, Calvert S, Basinger A, Perry MS, Rodan L, Helbig KL, Chambers C, Gorman KM, King MD, Donkervoort S, Soldatos A, Bönnemann CG, Spataro N, Gabau E, Arellano M, Cappuccio G, Brunetti-Pierri N, Rossignol E, Hamdan FF, Michaud JL, Balak C, Mefford HC, Scheffer IE (2021) FBXO28 causes developmental and epileptic encephalopathy with profound intellectual disability. *Epilepsia.* 62(1):e13-e21. doi: 10.1111/epi.16784.

Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18(11):1251-62. doi: 10.1101/gad.300704.

Schröder K, Schuffenhauer S, Seidel H, Bartsch O, Blin N, Hinkel GK, Schmitt H (1998) Deletion mapping by FISH with BACs in patients with partial monosomy 22q13. *Hum Genet.* 102(5):557-61. doi: 10.1007/s004390050739.

Sellner LN, Taylor GR (2004) MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat.* 23(5):413-9. doi: 10.1002/humu.20035.

Shaffer LG, Theisen A, Bejjani BA, Ballif BC, Aylsworth AS, Lim C, McDonald M, Ellison JW, Kostiner D, Saitta S, Shaikh T (2007) The discovery of microdeletion syndromes in the post-genomic era: review of the methodology and characterization of a new 1q41q42 microdeletion syndrome. *Genet Med.* 9(9):607-16. doi: 10.1097/gim.0b013e3181484b49.

Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP (2004) Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet.* 41(4):241-8. doi: 10.1136/jmg.2003.017731.

Skraban CM, Wells CF, Markose P, Cho MT, Nesbitt AI, Au PYB, Begtrup A, Bernat JA, Bird LM, Cao K, de Brouwer APM, Denenberg EH, Douglas G, Gibson KM, Grand K, Goldenberg A, Innes AM, Juusola J, Kempers M, Kinning E, Markie DM, Owens MM, Payne K, Person R, Pfundt R, Stocco A, Turner CLS, Verbeek NE, Walsh LE, Warner TC, Wheeler PG, Wiczorek D, Wilkens AB, Zonneveld-Huijssoon E; Deciphering Developmental Disorders Study, Kleefstra T, Robertson SP, Santani A, van Gassen KLI, Deardorff MA (2017) WDR26 Haploinsufficiency Causes a Recognizable Syndrome of Intellectual Disability, Seizures, Abnormal Gait, and Distinctive Facial Features. *Am J Hum Genet.* 101(1):139-148. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.06.002.

Slavotinek AM (2008) Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet.* 124(1):1-17. doi: 10.1007/s00439-008-0513-9.

Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G (2000) Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat Genet.* 25(3):254-5. doi: 10.1038/76996.

Spielmann M, Marx S, Barbi G, Flöttmann R, Kehrer-Sawatzki H, König R, Horn D, Mundlos S, Nader S, Borck G. Femoral facial syndrome associated with a de novo complex chromosome 2q37 rearrangement (2016) *Am J Med Genet A.* 170A(5):1202-7. doi: 10.1002/ajmg.a.37560.

Stark Z, Tan TY, Chong B, Brett GR, Yap P, Walsh M, Yeung A, Peters H, Mordaunt D, Cowie S, Amor DJ, Savarirayan R, McGillivray G, Downie L, Ekert PG, Theda C, James PA, Yapliito-Lee J, Ryan MM, Leventer RJ, Creed E, Macciocca I, Bell KM, Oshlack A, Sadedin S, Georgeson P, Anderson C, Thorne N, Melbourne Genomics Health Alliance, Gaff C, White SM (2016) A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders. *Genet Med.* 18(11):1090-1096. doi: 10.1038/gim.2016.1.

Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, Stephan DA, Morton DH (2006) Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N Engl J Med.* 354(13):1370-7. doi: 10.1056/NEJMoa052773.

Sultana R, Yu CE, Yu J, Munson J, Chen D, Hua W, Estes A, Cortes F, de la Barra F, Yu D, Haider ST, Trask BJ, Green ED, Raskind WH, Distèche CM, Wijsman E, Dawson G, Storm DR, Schellenberg GD, Villacres EC (2002) Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics.* 80(2):129-34. doi: 10.1006/geno.2002.6810.

Takahashi M, Yoshimoto T, Shimoda M, Kono T, Koizumi M, Yazumi S, Shimada Y, Doi R, Chiba T, Kubo H (2006) Loss of function of the candidate tumor suppressor prox1 by RNA mutation in human cancer cells. *Neoplasia.* 8(12):1003-10. doi: 10.1593/neo.06595.

Taysi K, Sekhon GS, Hillman RE (1982) A new syndrome of proximal deletion of the long arm of chromosome 1: 1q21-23 leads to 1q25. *Am J Med Genet.* 13(4):423-30. doi: 10.1002/ajmg.1320130411.

Teasdale RD, Collins BM (2012) Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *Biochem J.* 441(1):39-59. doi: 10.1042/BJ20111226.

Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S (1997) ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem Sci.* 22(2):53-8. doi: 10.1016/s0968-0004(96)10071-2.

Vance GH, Curtis CA, Heerema NA, Schwartz S, Palmer CG (1997) An apparently acentric marker chromosome originating from 9p with a functional centromere without detectable alpha and beta satellite sequences. *Am J Med Genet.* 71(4):436-42. doi: 10.1002/(sici)1096-8628(19970905)71:4<436::aid-ajmg13>3.0.co;2-h.

Venter JC, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M (1998) Shotgun sequencing of the human genome. *Science.* 280(5369):1540-2. doi: 10.1126/science.280.5369.1540.

Verkerk AJ, Mathews CA, Joosse M, Eussen BH, Heutink P, Oostra BA; Tourette Syndrome Association International Consortium for Genetics (2003) CNTNAP2 is disrupted in a family with Gilles de la Tourette syndrome and obsessive compulsive disorder. *Genomics.* 82(1):1-9. doi: 10.1016/s0888-7543(03)00097-1.

Vernes SC, Newbury DF, Abrahams BS, Winchester L, Nicod J, Groszer M, Alarcón M, Oliver PL, Davies KE, Geschwind DH, Monaco AP, Fisher SE (2008) A functional genetic link between distinct developmental language disorders. *N Engl J Med.* 359(22):2337-45. doi: 10.1056/NEJMoa0802828.

Waggoner D, Wain KE, Dubuc AM, Conlin L, Hickey SE, Lamb AN, Martin CL, Morton CC, Rasmussen K, Schuette JL, Schwartz S, Miller DT; ACMG Professional Practice and Guidelines Committee (2018) Yield of additional genetic testing after chromosomal microarray for diagnosis of neurodevelopmental disability and congenital anomalies: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 20(10):1105-1113. doi: 10.1038/s41436-018-0040-6.

Walter S, Sandig K, Hinkel GK, Mitulla B, Ounap K, Sims G, Sitska M, Utermann B, Viertel P, Kalscheuer V, Bartsch O (2004) Subtelomere FISH in 50 children with mental retardation and minor anomalies, identified by a checklist, detects 10 rearrangements including a de novo balanced translocation of chromosomes 17p13.3 and 20q13.33. *Am J Med Genet A.* 128A(4):364-73. doi: 10.1002/ajmg.a.30160.

Wang J, Kilic G, Aydin M, Burke Z, Oliver G, Sosa-Pineda B (2005) Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of "secondary transition" pancreatic endocrine cells. *Dev Biol.* 286(1):182-94. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.021.

Warburton D (1991) De novo balanced chromosome rearrangements and extra

marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 49(5):995-1013.

Wassink TH, Losh M, Frantz RS, Vieland VJ, Goedken R, Piven J, Sheffield VC (2005) A case of autism and uniparental disomy of chromosome 1. *Hum Genet.* 117(2-3):200-6. doi: 10.1007/s00439-005-1257-4.

Weber JL, Myers EW (1997) Human whole-genome shotgun sequencing. *Genome Res.* 7(5):401-9. doi: 10.1101/gr.7.5.401.

Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ (1999) Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol.* 52(5):243-51. doi: 10.1136/mp.52.5.243.

Wen H, Li Y, Malek SN, Kim YC, Xu J, Chen P, Xiao F, Huang X, Zhou X, Xuan Z, Mankala S, Hou G, Rowley JD, Zhang MQ, Wang SM (2012) New fusion transcripts identified in normal karyotype acute myeloid leukemia. *PLoS One.* 7(12):e51203. doi: 10.1371/journal.pone.0051203.

Wigle JT, Oliver G (1999) Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell.* 98(6):769-78. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81511-1.

Wigle JT, Chowdhury K, Gruss P, Oliver G (1999) Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet.* 21(3):318-22. doi: 10.1038/6844.

Yu F, Kuo CT, Jan YN (2006) Drosophila neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. *Neuron.* 51(1):13-20. doi: 10.1016/j.neuron.2006.06.016.

Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15(18):2343-60. doi: 10.1101/gad.927301.

Zhu G, Gillessen-Kaesbach G, Wirth J, Passarge E, Bartsch O (2001) Girl with phenotypic abnormalities and a de novo, apparently balanced translocation 46,XX,t(5;10)(q35.2q11.2). *Am J Med Genet.* 98(4):317-9. doi: 10.1002/1096-8628(20010201)98:4<317::aid-ajmg1129>3.0.co;2-e.

Zweier C, de Jong EK, Zweier M, Orrico A, Ousager LB, Collins AL, Bijlsma EK, Oortveld MA, Ekici AB, Reis A, Schenck A, Rauch A (2009) CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in Drosophila. *Am J Hum Genet.* 85(5):655-66. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.10.004.

Zweier C (2012) Severe Intellectual Disability Associated with Recessive Defects in CNTNAP2 and NRXN1. *Mol Syndromol.* 2(3-5):181-185. doi: 10.1159/000331270.

8 Danksagung

Ich möchte mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Doktorarbeit niemals zustande gekommen wäre:

Mein ganz besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit sowie für die umfassende Unterstützung und die vielen hilfreichen Tipps zur Erstellung des schriftlichen Teils. Zudem möchte ich mich für die enorme Geduld, die bis zur Fertigstellung der Promotionsschrift aufgebracht werden musste, bedanken.

Meinem Chef danke ich herzlichst für seine Ermutigung und Hilfestellung zur Beendigung der Arbeit. Durch das inspirierende Arbeitsumfeld, das freundliche Miteinander und die beständige Motivation war es mir zu guter Letzt doch noch möglich, die Dissertation zum Abschluss zu bringen.

Auch danke ich meinem ersten Betreuer für die Möglichkeit einer Doktorarbeit im Institut für Humangenetik der Uniklinik Mainz. Die Integration in das Team hat mir neben einem kollegialen Arbeitsumfeld einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht, was für den praktischen und schriftlichen Teil dieser Arbeit essentiell war.

Ebenso gilt mein Dank den engen Mitarbeitern für die technische Unterstützung des praktischen Teils sowie die Hilfestellung bei der Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, Kolleginnen und Kollegen am Institut für Humangenetik in Mainz möchte ich für die wissenschaftliche Zusammenarbeit danken. Diese war stets geprägt von einer angenehmen Atmosphäre, wertvollen Diskussionen und gegenseitiger Unterstützung und Wertschätzung.

Mein großer Dank gilt zudem meiner lieben Kollegin und meiner treuen Freundin für die Durchsicht dieser Arbeit und die große Mühe bei den Korrekturen.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders herzlich für alles danken, was sie mir entgegengebracht haben. Ohne eure stete Motivation, eure Unterstützung in jeder

Hinsicht, euer Vertrauen und euren Glauben an mein Potential wäre es mir nicht möglich gewesen, meine Lebensträume so zu verwirklichen, wie es mir durch euch ermöglicht wurde. Danke!

Meinem Ehemann danke ich von ganzem Herzen für seine uneingeschränkte Unterstützung, Motivation, seine Liebe und sein Vertrauen in mich. Ich bin sehr glücklich, dass ich dich getroffen habe und genieße jeden gemeinsamen Tag.

Meinen Kindern danke ich für all die Freude, die sie in mein Leben gebracht haben. Ihr macht mich jeden Tag glücklich und unglaublich stolz. Meinem Exmann danke ich für das liebevolle Umsorgen unserer Kinder und die umfassende Unterstützung während meines gesamten Studiums und dem praktischen Teil dieser Arbeit

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Verwandten, Freunden und Studienkollegen, die mich während meines Werdegangs unterstützt und auch in schwierigen Zeiten immer wieder aufgeheitert haben. Dies war stets ein großer Rückhalt für mich.