

**Etablierung und Anwendung von  
molekular-zytogenetischen Methoden an  
reproduktionsgenetischen und  
klinisch-genetischen Fragestellungen**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Christina Landwehr**

aus

Lohne i.O.

Bonn, im August 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn.

1. Referentin: Prof. Dr. med. R. G. Weber

2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. K. H. Scheidtmann

Tag der Promotion: 21.01.2010

Erscheinungsjahr: 2010

Für meine Eltern und Geschwister

**I Inhaltsverzeichnis**

<b>I Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>II Abbildungen und Tabellen .....</b>	<b>7</b>
<b>III Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
1 Einleitung	10
1.1 Theoretische Grundlagen der klinischen Genetik.....	10
1.1.1 Nachweis von Veränderungen in der DNA-Kopienzahl .....	10
1.1.1.1 Zytogenetik.....	10
1.1.1.2 Molekulare Zytogenetik .....	11
1.1.1.3 Chromosomale Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) .....	12
1.1.1.4 Array-CGH.....	13
1.1.1.5 Humanes Genomprojekt (HGP).....	13
1.2 Einleitung Reproduktionsgenetik .....	14
1.3 Klinische Genetik .....	14
1.3.1 Patienten mit mentaler Retardierung unklarer Ätiologie.....	14
1.3.1.1 Schwere mentale Retardierung mit Atmungsanomalien (Pitt-Hopkins Syndrom) .....	15
1.3.2 Nierenfehlbildungen .....	16
1.3.2.1 Ungeklärte syndromale Nephropathien .....	16
1.3.2.2 Kongenitale Anomalien der Nieren und der ableitenden Harnwege (CAKUT) .....	17
1.4 Überblick und Ziele dieser Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Reagenzien, Material, Software .....	20
2.1.1 Chemikalien.....	20
2.1.2 Reagenzien .....	22
2.1.3 Kits .....	26
2.1.4 Material .....	26
2.1.5 Geräte.....	26
2.1.6 Software .....	27
2.1.7 Onlinequellen .....	27
2.2 Reproduktionsgenetik .....	28
2.2.1 Material zur Entwicklung eines Schnell-CGH-Protokolls.....	28
2.2.2 Patientinnen und Polkörper .....	29
2.3 Patienten mit mentaler Retardierung (MR).....	29
2.3.1 Kollektiv von Patienten mit ungeklärter MR.....	29
2.3.2 Kollektiv von Patienten mit schwerer MR ohne Sprachentwicklung einschließlich der Patientin mit Pitt-Hopkins Syndrom .....	30
2.4 Patienten mit Nierenfehlbildungen .....	31
2.4.1 Patienten mit ungeklärten syndromalen Nephropathien.....	31
2.4.2 Patienten mit CAKUT.....	34
2.5 Isolation der Einzelzellen und der Polkörper für die Schnell-CGH.....	35

2.6 DNA-Isolation aus peripherem Blut, Polkörpern und Einzelzellen .....	36
2.7 Universelle DNA-Amplifikation .....	36
2.8 Chromosomendarstellung aus Lymphozyten .....	37
2.8.1 Lymphozytenkultivierung.....	37
2.8.2 Metaphasepräparation für CGH und FISH .....	38
2.8.3 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate .....	39
2.9 Chromosomale CGH .....	39
2.9.1 <i>Nick-Translation</i> .....	39
2.9.2 Fällung und Reinigung der DNA .....	40
2.9.3 Prinzip und Durchführung der Hybridisierung .....	41
2.9.4 Stringenzwaschschritte und Antikörpernachweis .....	42
2.9.5 Mikroskopische Auswertung und Dokumentation .....	44
2.10 Präparation der FISH-Sonden.....	45
2.10.1 Ausstreichen der Klone auf Agarplatten .....	45
2.10.2 Midipräparation .....	45
2.11 X-Inaktivierungsuntersuchung .....	46
2.12 Array-basierte CGH.....	46
2.12.1 Konstruktion und Herstellung der DNA-Chips .....	47
2.12.2 Probenmarkierung mittels <i>Random Priming</i> .....	48
2.12.3 Array-CGH Probenherstellung.....	50
2.12.4 Array-CGH Hybridisierung .....	50
2.12.5 Vorbereitung der DNA-Chips zum Scannen .....	51
2.12.6 Scannen der DNA-Chips .....	51
2.12.7 Datenverarbeitung mit Genepix 6.1 .....	51
2.12.8 Generierung der primären log-Ratio Daten .....	52
2.12.9 Datenanalyse.....	52
2.12.10 Dateninterpretation .....	53
2.13 MLPA-Analysen zur Kopienzahlbestimmung .....	53
2.14 Statistische Analysen.....	54
2.15 Molekulargenetische Untersuchungen.....	54
3 Ergebnisse .....	55
3.1 Reproduktionsgenetik .....	55
3.1.1 Etablierung eines Schnell-CGH Protokolls.....	55
3.1.2 Validierung des Schnell-CGH Protokolls.....	57
3.1.3 Anwendung des Schnell-CGH-Protokolls zum Aneuploidiescreening an Polkörpern .....	62
3.2 Klinische Genetik .....	65
3.2.1 Array-CGH als zuverlässige Methode zur hochauflösenden genetischen Untersuchung auf Mikroimbalance .....	65
3.2.2 Mentale Retardierung (MR) .....	65
3.2.2.1 Identifizierte genomische Imbalance bei Patienten mit ungeklärter MR.....	65
3.2.2.2 Klinische Konsequenzen.....	69
3.2.3 Schwere mentale Retardierung mit Atmungsanomalien (Pitt-Hopkins Syndrom, PHS).....	71
3.2.4 Nierenfehlbildungen .....	75
3.2.4.1 Detektierte Mikroaberrationen in Patienten mit ungeklärten	

syndromalen Nephropathien .....	75
3.2.4.1.1 Genetischer Befund bei Patientin MA/3 .....	77
3.2.4.1.2 Renaler und zerebraler Phänotyp der Patientin MA/3 .....	80
3.2.4.2 Detektierte Mikroaberrationen bei CAKUT-Patienten.....	83
3.2.4.2.1 Patient HD01 .....	83
3.2.4.2.2 Patient HD16 .....	87
3.2.4.2.3 Patient HD24 .....	90
4    Diskussion .....	92
4.1 Reproduktionsgenetik .....	92
4.2 Klinische Genetik .....	95
4.2.1 Detektierte Mikroaberrationen in Patienten mit mentaler Retardierung.....	95
4.2.1.1 Schwere mentale Retardierung mit Atmungsanomalien (Pitt-Hopkins Syndrom, PHS).....	98
4.2.2 Nierenfehlbildungen .....	99
4.2.2.1 Detektierte Mikroaberrationen in Patienten mit ungeklärten syndromalen Nephropathien .....	99
4.2.2.2 Detektierte Mikroaberrationen in CAKUT-Patienten.....	103
4.3 Kopienzahlvarianten.....	106
5    Zusammenfassung .....	107
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>122</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>123</b>
<b>Publikationsliste Christina Landwehr .....</b>	<b>124</b>

## II Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1. Spektrophotometer-Messung	49
Abbildung 2. Etablierung und Validierung des Schnell-CGH-Protokolls.	58
Abbildung 3. Detektierte Trisomie 18 und detektierte Trisomie 21	59
Abbildung 4. Analyse eines Lymphozytenkerns mit Trisomie 21	60
Abbildung 5. Identifizierung des zusätzlichen Materials eines derivativen Chromosoms 13	61
Abbildung 6. Anwendung des Schnell-CGH-Protokolls zum Aneuploidiescreening von ersten Polkörpern.	62
Abbildung 7. CGH-Profile nach Anwendung der Schnell-CGH-Analyse an Polkörpern	63
Abbildung 8. Faziale Merkmale der Patienten	65
Abbildung 9. Array-CGH-Profil der aberranten Chromosomen.	66
Abbildung 10. MRT-Aufnahmen der Patientin 54/00	69
Abbildung 11. Übersicht ausgewählter FISH-Bilder	70
Abbildung 12. Indexpatientin und Ergebnisse der molekularzytogenetischen Analysen.	72
Abbildung 13. Graphische Übersicht der deletierten Regionen in Chromosom 18q21.2	74
Abbildung 14. Genetische Befunde der 16-jährigen Patientin.	77
Abbildung 15. Übersicht der deletierten Region in Chromosom Xq22.3-q23.	78
Abbildung 16. Detektion der DCX Deletion mittels MLPA.	79
Abbildung 17. Faziale Merkmale und ultrastrukturelle Evaluation der Nierenbiopsie der 16-jährigen Patientin mit Mikrodeletion in Xq22.3-q23.	80
Abbildung 18. Transaxiales T1 gewichtetes kranielles MRT	81
Abbildung 19. 3D-Rekonstruktionen der Bahnen der weißen Substanz	82
Abbildung 20. Faziale Merkmale der Patienten HD01 und HD01-2	83
Abbildung 21. Genetische Befunde des Patienten HD01 und seines Bruders HD01-2	87
Abbildung 22. Genetische Befunde des Patienten HD16	90
Abbildung 23. Genetische Befunde des Patienten HD24	91
Tabelle 1: Protokoll der Array-CGH	51
Tabelle 2. Inhalte der gpr-Datei	52
Tabelle 3. Vergleich der Dauer einzelner Schritte des Standard- und des Schnell-CGH Protokolls.	57
Tabelle 4. Klinische Daten, FISH- und Schnell-CGH-Ergebnisse von 32 ersten Polkörpern	64
Tabelle 5. Klinische Daten der zehn Patienten mit unklaren syndromalen Nephropathien.	76
Tabelle 6. Phänotyp der Patienten HD01 und seines Bruders HD01-2	85
Tabelle 7. Genotyp und Phänotyp des Patienten HD16 und seines Vaters HD16-P	88

## III Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
AMA	Fortgeschrittenes mütterliches Alter ( <i>advanced maternal age</i> )
Array-CGH	Array-comparative genomische Hybridisierung
AT1	Angiotensinrezeptor 1
Aqua dest.	Aqua destillata
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
CAKUT	Kongenitale Anomalien der Nieren und der ableitenden Harnwege
CCD-Kamera	<i>Charged Coupled Device</i> -Kamera
cDNA	Komplementäre DNA
CGH	Comparative genomische Hybridisierung
CK	Cytokeratin
CNV	Kopienzahlvariante ( <i>copy number variant</i> )
CTA/B/C/D	California Institute of Technology library A/B/C/D
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole· Dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOP-PCR	<i>Degenerate oligonucleotide primed</i> PCR
DTI	<i>Diffusion tensor imaging</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E-Box	Ephrussi-Box
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalographie
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
gal	<i>Genepix array list</i>
gps	<i>Genepix setting</i>
gpr	<i>Genepix result</i>
GTG	Giemsa-Bänderung (G-Bänder nach Trypsinbehandlung und Giemsafärbung)
h	Stunde
HGP	Humanes Genomprojekt ( <i>Human Genome Project</i> )
HLH	Helix-loop-Helix
IVF	<i>In vitro</i> Fertilisation
IQ	Intelligenzquotient
kb	Kilobase



---

I	Liter
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
M	Mol
m	Meter
m	Milli
M	Mega
Mb	Megabasenpaar
MR	Mentale Retardierung
μ	Mikro
min	Minute
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
OT	Objektträger
p-Arm	Kurzer Arm des Chromosoms
PAC	<i>P1-derived artificial chromosome</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGD	Präimplantationsgenetische Diagnostik
PHA	Phytohämagglutinin
PHS	Pitt-Hopkins-Syndrom
q-Arm	Langer Arm des Chromosoms
RIF	Wiederholtes Implantationsversagen ( <i>Repeated implantation failure</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RPCI	<i>Roswell Park Cancer Institute</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SSC	<i>Standard saline citrate</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
SPM	<i>Raven's Standard Progressive Matrices</i>
Tab.	Tabelle
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
UTR	<i>Untranslated region</i>
V	Volt
VCFS	DiGeorge/Velokardiofaziales Syndrom
ZNS	Zentralnervensystem

## 1 Einleitung

### 1.1 Theoretische Grundlagen der klinischen Genetik

Die klinische Genetik befasst sich mit Erbkrankheiten und deren genetischen Ursachen. Heute besteht die Möglichkeit, auch kleinste Veränderungen im menschlichen Genom zu erkennen, so dass die genetische Diagnostik eine neue Dimension erreicht hat. Man unterscheidet drei Arten von genetischen Veränderungen: Genommutationen, Chromosomenmutationen und Genmutationen.

Bei einem numerisch veränderten Chromosomensatz handelt es sich um eine Genommutation. Sofern die Anzahl des vollständigen Chromosomensatzes betroffen ist und in mehr als zwei Kopien vorliegt, wird dies als Polyploidie bezeichnet. Polyploidien sind meist nicht mit dem Leben vereinbar. Eine Veränderung der Anzahl einzelner Chromosomen, z.B. ein Verlust (Monosomie) oder ein Gewinn (Trisomie), wird Aneuploidie genannt.

Unter einer Chromosomenmutation versteht man eine strukturelle Veränderung von Chromosomen wie z.B. Translokationen, Inversionen, Deletionen oder Duplikationen. Wenn es durch einen Umbau zu keinem Verlust oder Gewinn von genetischem Material kommt, handelt es sich um eine balancierte Veränderung, die im Regelfall keinen Einfluss auf den Phänotyp des Trägers hat. Deletionen und Duplikationen sind Beispiele für unbalancierte Aberrationen.

Die dritte Klasse der genetischen Veränderungen umfasst die Genmutationen. Diese werden entweder durch Austausch (Basensubstitution), Deletion oder Insertion einer oder mehrerer Nukleotide in die DNA-Sequenz verursacht. Dabei unterscheidet man zwischen *silent* (stillen), *missense* (Fehlsinn-) und *nonsense* (Unsinn-) Mutationen. Während stille Mutationen ohne Folge für die Aminosäuresequenz bleiben, führen *missense* Mutationen zu einem Aminosäureaustausch und *nonsense* Mutationen zur Konstitution eines Stoppcodons, so dass die Translation vorzeitig abgebrochen wird.

#### 1.1.1 Nachweis von Veränderungen in der DNA-Kopienzahl

##### 1.1.1.1 Zytogenetik

Mitosen bzw. Metaphasechromosomen gewinnt man durch Kultivierung vitaler Zellen. Nachdem Tijo und Levan im Jahre 1956 den normalen diploiden Chromosomensatz des Menschen mit  $2n=46$  korrekt bestimmt hatten, wurden ab 1959 zunächst numerische, etwas später auch strukturelle Veränderungen nachgewiesen, welche mit definierten klinischen

Syndromen oder neoplastischen Erkrankungen assoziiert waren. Erst nach der Entwicklung von Techniken zur Bänderung der Chromosomen Anfang der siebziger Jahre konnten die einzelnen Chromosomen sicher identifiziert und strukturelle Anomalien analysiert werden (Haas 1999).

Heute ist die Chromosomenanalyse eine der häufigsten Laboruntersuchungen in humangenetischen Einrichtungen. Als Standardfärbung hat sich die G-Bänderung mit Giemsa nach Trypsin-Verdau durchgesetzt, die international gültige Zytogenetik-Nomenklatur (ISCN 2009) orientiert sich an diesem Bandenmuster. In Abhängigkeit von der Präparationstechnik und dem untersuchten Gewebe lassen sich 300 bis 850 Banden pro haploidem Genom unterscheiden. Bei der strukturellen Analyse von Karyogrammen können Aberrationen mit einer Mindestgröße von 5 Mb erkannt werden (Schuffenhauer 1999).

Die Aussagekraft konventioneller Bänderungstechniken ist jedoch begrenzt. Strukturanomalien, die nur zu einer diskreten Veränderung des Bandenmusters führen oder deren Größe unter 5 Mb liegt, werden nicht erfasst. Darüber hinaus können einige der mit G-Bänderung identifizierten Strukturauffälligkeiten, z.B. Markerchromosomen und unbalancierte *de novo* entstandene Translokationen, mit konventionellen Bänderungstechniken nicht vollständig charakterisiert werden.

#### **1.1.1.2 Molekulare Zytogenetik**

Ende der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts verschmolzen molekulare und zytogenetische Methoden in Form der ISH (*In situ* Hybridisierung). Anfang der achtziger Jahre begann die Entwicklung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Seitdem können Chromosomen und Chromosomenbereiche durch mit Fluorochromen markierte DNA-Sonden spezifisch identifiziert werden. Der Begriff der Hybridisierung wird benutzt, da ein Hybrid aus der eingesetzten DNA-Sonde und der komplementären DNA-Sequenz der Chromosomen gebildet wird. Eine Hybridisierung ist sowohl in der Metaphase als auch in der Interphase möglich. Neben repetitiven Sonden zum Nachweis der Zentromere und heterochromatischen Bereiche, sowie den „*whole chromosome paints*“ zum Nachweis ganzer Chromosomen (Cremer *et al.* 1988; Pinkel *et al.* 1988), gewann vor allem die Darstellung einzelner Sequenzen durch lokusspezifische Sonden zunehmend an Bedeutung.

Die FISH-Analyse hat sich als Ergänzung zur konventionellen Chromosomenanalyse etabliert. Zu den klinisch relevanten Einsatzmöglichkeiten gehören die Analyse von

balancierten und unbalancierten strukturellen Chromosomenaberrationen und von kryptischen, d.h. nicht durch konventionelle Chromosomenanalyse erkennbare Störungen vor allem Translokationen im Bereich der Subtelomere und interstitielle Mikrodeletionen (z.B. für das Williams Beuren Syndrom: 7q11.23, für das Prader Willi Syndrom/ Angelman Syndrom: 15q11-q13 und für das DiGeorge Syndrom: 22q11.2).

### **1.1.1.3 Chromosomale Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)**

Kallioniemi *et al.* (1992) und du Manoir *et al.* (1993) stellten die Methode der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) als neue molekular-zytogenetische Methode vor. Die CGH ermöglicht eine umfassende Analyse des gesamten Genoms auf vollständige oder partielle Aneuploidien jedes Chromosoms.

Die Methode basiert auf gleichzeitiger Hybridisierung von zu testender, markierter DNA mit der gleichen Menge unterschiedlich markierter Referenz-DNA auf Metaphasepräparate eines gesunden Individuums. Die markierten Fragmente der Test- bzw. Referenz-DNA konkurrieren um die Hybridisierungsstellen entlang jedes Chromosoms. DNA-Segmente, die in der Test-DNA über- oder unterrepräsentiert sind, erscheinen bei der Analyse als stärkere bzw. schwächere Signale des für die Markierung verwandten Fluorochroms. Diese werden gemeinsam mit den Signalintensitäten der gleichzeitig hybridisierten Referenz-DNA gemessen und damit verglichen (Kallioniemi *et al.* 1992; du Manoir *et al.* 1993).

Ein deutlicher Vorteil der CGH ist, dass im Gegensatz zu Bänderungstechniken keine Metaphasechromosomen der Patienten benötigt werden und daher eine vorhergehende Kultivierung der Zellen, die analysiert werden sollen, entfällt. Darüberhinaus ist die CGH anwendbar, wenn nur kleinste DNA-Mengen oder sogar eine einzelne Zelle als Ausgangsmaterial zur Verfügung stehen. Diese geringe Menge an DNA muss dann vor der CGH mittels PCR universell amplifiziert werden.

Zu den Nachteilen der CGH gehört, dass alle komplett balancierten Strukturveränderungen (z.B. reziproke Translokationen, Inversionen), also Veränderungen ohne Verlust oder Zugewinn von genomischem Material, nicht erkannt werden. Auch bei dem Nachweis von Mosaiken hat diese Methode ihre Grenzen. Da das Auflösungsvermögen der chromosomalen CGH auf ca. 5 Mb begrenzt ist, können auch kleinere Deletionen und Duplikationen mit dieser Methode nicht erkannt werden. Außerdem ist eine Detektion von Polyploidien nicht möglich, da die Technik auf der Normalisierung der Intensitätsverhältnisse

beruht. Erhöhte Intensitätswerte eines Fluorochroms, z.B. aufgrund einer triploiden Test-DNA, werden während der Analyse normalisiert und können daher nicht erkannt werden.

Um die CGH auch für die Analyse von Polkörpern nutzen zu können, für die diese Methode normalerweise zu viel Zeit in Anspruch nimmt, ist eine Verringerung der Analysedauer von Vorteil. Im Regelfall dauert eine Analyse ca. 120 Stunden.

#### **1.1.1.4 Array-CGH**

Die Array-CGH, die 1997 entwickelt wurde (Solinas-Toldo *et al.* 1997; Pinkel *et al.* 1998), stellt eine Weiterentwicklung der chromosomalen CGH dar. Sie basiert auf der Kombination des CGH-Prinzips und einer Hybridisierung auf DNA-Chips, auf denen DNA-Fragmente bekannter genomischer Lokalisierung immobilisiert sind. Diese ersetzen die Mitosen auf den Objektträgern. Im Vergleich zur chromosomalen CGH, ist hier die Detektion kryptischer, submikroskopischer Veränderungen durch ein Screening mit um eine Zehnerpotenz erhöhter Auflösung möglich. Mit der Array-CGH kann die Sensitivität für unbalancierte Chromosomenstörungen jeden chromosomalen Bereichs erhöht werden. Es können jedoch wie bei der chromosomalen CGH keine balancierten Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. Ebenfalls kann keine Detektion von Polyploidien erreicht werden.

#### **1.1.1.5 Humanes Genomprojekt (HGP)**

Im Februar 2001 wurden die ersten Ergebnisse der systematischen und koordinierten Entschlüsselung des humanen Genoms durch das Humane Genomprojekt (HGP) bekannt gegeben. Das HGP hatte die Absicht, alle menschlichen Gene zu katalogisieren, zu kartieren und zu sequenzieren. Während die geschätzte Zahl der vom humanem Genom kodierten Gene zu Beginn des Genomprojekts auf etwa 100.000 geschätzt wurde, sank diese Zahl zunächst auf 30.000-40.000 (Venter *et al.* 2001) und wurde im Jahre 2004 auf 22.287 Genloci korrigiert. Die kodierenden Bereiche, die Exons, stellen nur 1,1 % des Genoms dar.

Aufgrund der neugewonnenen Erkenntnisse aus dem HGP werden Krankheitsursachen nicht mehr nur in Veränderungen der Sequenz einzelner Gene vermutet, sondern es werden zusätzlich Veränderungen der gesamten Genomarchitektur als kausativ für Phänotypen in Betracht gezogen. Fehlerhafte Rekombinationsprozesse können z.B. zu Deletionen oder Duplikationen unterschiedlich großer Fragmente führen und mit Verlust oder Gewinn von

chromosomalem Material, Brüchen innerhalb von Genen oder Strukturveränderungen in Kontrollelementen einhergehen (Lupski 1998; Lupski *et al.* 2003; Inoue *et al.* 2002).

Obwohl nahezu die gesamte Genomsequenz des Menschen identifiziert wurde, ist die Charakterisierung der krankheitsverursachenden Gene nach wie vor sehr umfangreich, da nach Identifizierung zelluläre und organische Funktionen aufgeklärt werden müssen. Klinisch besonders relevant ist, einen Bezug zwischen pathologischen Phänotypen und identifizierten Genen herzustellen.

## **1.2 Einleitung Reproduktionsgenetik**

Die CGH wäre eine ideale Technik, um in der präimplantationsgenetischen Diagnostik (PGD) Aneuploidien auszuschließen und somit die Schwangerschaftsrate und die „*baby take home rate*“ zu verbessern, indem Oozyten oder Embryonen ohne numerische Aberrationen ausgewählt würden. Für eine Anwendung in der PGD ist erforderlich, dass die DNA-Menge einer einzelnen Zelle nach Amplifikation ausreicht, um die Analyse durchführen zu können. Es wurden Protokolle für universelle Amplifikation der Ziel-DNA durch einen einzelnen Primer entwickelt, die z.B. bei Einzelzellen wie Blastomeren oder Amniozyten einsetzbar sind, so dass eine CGH-Analyse anschließend durchgeführt werden konnte (Klein *et al.* 1999; Wells *et al.* 1999). Diese Technik wurde daraufhin in der PGD angewandt, um biopsierte Blastomere aus 5- bis 12-Zell-Embryonen von Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen (RIF) zu untersuchen (Wilton *et al.* 2001; Voullaire *et al.* 2002; Wilton *et al.* 2003). Diese Analyse dauerte vier bis fünf Tage und war möglich, da der Embryo während dieses Untersuchungszeitraums kryokonserviert war. Die erste klinische Anwendung der CGH an zehn Polkörpern von einer Patientin im fortgeschrittenen mütterlichen Alter (AMA) dauerte etwa zwei Tage (Wells *et al.* 2002).

## **1.3 Klinische Genetik**

### **1.3.1 Patienten mit mentaler Retardierung unklarer Ätiologie**

Mentale Retardierung oder Entwicklungsverzögerungen betreffen 2-3 % der Bevölkerung (Roeleveld *et al.* 1997). Zu möglichen Ursachen gehören Umweltfaktoren wie z.B. Schädigung durch Teratogene, perinatale Hypoxie, Infektionen oder Mangelernährung. Die genetischen Veränderungen, die zu einer MR oder Entwicklungsverzögerung führen können,

sind numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen einschließlich Subtelomerumbauten und Mutationen von bestimmten Genen, die einen MR-Phänotyp verursachen können. Üblicherweise wird bei einem Patienten mit ungeklärter MR zunächst eine konventionelle Chromosomenanalyse durchgeführt, die numerische Chromosomenaberrationen und große Strukturveränderungen, die mindestens 10 Mb groß sind und das Bänderungsmuster verändern, detektiert. Nach einer Chromosomenanalyse ohne pathologischen Befund werden die Subtelomere mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) auf Umbauten untersucht und bekannte Mikrodeletionssyndrome ausgeschlossen. Außerdem werden Gene, die häufige MR-Syndrome verursachen wie z.B. das *FMR1*-Gen, dessen Veränderung dem Fragilen X-Syndrom zugrunde liegt, molekulargenetisch analysiert. Mit diesen Untersuchungen werden die ursächlichen Veränderungen in etwa der Hälfte aller Patienten mit MR oder Entwicklungsverzögerung nachgewiesen (Yeargin-Allsopp *et al.* 1997).

Aufgrund von Mikrodeletionssyndromen wie dem DiGeorge-Syndrom oder dem Williams-Beuren-Syndrom, die durch Deletionen bestimmter Bereiche des Genoms hervorgerufen werden und nicht durch konventionelles Karyotypieren detektiert werden können, kam man zu der Ansicht, dass solche Bereiche genomweit als Ursache für MR und Entwicklungsverzögerung existieren müssen.

Um diese Hypothese zu testen, wurde die Array-basierte CGH mit DNA-Chips verschiedener Auflösung und unterschiedlichen Methoden zur Datenverifizierung an MR-Patienten mit unbekannter Ätiologie eingesetzt (Vissers *et al.* 2003; Shaw-Smith *et al.* 2004; Schoumans *et al.* 2005; Tyson *et al.* 2005; de Vries *et al.* 2005; Miyake *et al.* 2006; Menten *et al.* 2006; Rosenberg *et al.* 2006). Unter anderem zeigten diese Studien die Schwierigkeit der Dateninterpretation, die sich dadurch ergibt, dass kausale Veränderungen von Kopienzahlvarianten ohne Krankheitswert unterschieden werden müssen.

### **1.3.1.1 Schwere mentale Retardierung mit Atmungsanomalien (Pitt-Hopkins Syndrom)**

Das Pitt-Hopkins Syndrom (PHS) (MIM 610954) ist ein syndromales Krankheitsbild mit motorischer und mentaler Retardierung unbekannter molekularer Ursache, das im Jahre 1978 von Pitt und Hopkins erstmals beschrieben wurde. PHS-Patienten zeigen eine charakteristische Kombination von Symptomen wie eine schwere mentale Retardierung ohne Sprachentwicklung, eine charakteristische Fazies (grobes Gesicht mit breitem und

gebogenem Nasenrücken, großem Mund mit bogenförmiger Oberlippe und evertierter Unterlippe und kelchförmigen, fleischigen Ohren) und typischen Atmungsanomalien mit Hyperventilations- und Apnoëepisodes. Zusätzlich können die Patienten Krampfanfälle, subtile strukturelle Hirnanomalien, postnatale Mikrozephalie und Wachstumsstörungen, eine Muskelhypotonie und motorische Störungen, intestinale Probleme und ein fröhliches Wesen aufweisen (Singh *et al.* 1993; Van Balkom *et al.* 1998; Orrico *et al.* 2001; Peippo *et al.* 2006). Obwohl die Patienten im Prinzip ein wiedererkennbares klinisches Bild zeigen, scheint das PHS-Syndrom unterdiagnostiziert zu sein, da bisher nur wenige Fälle beschrieben wurden. Das PHS weist klinisch Ähnlichkeiten zu häufigen MR-Syndromen wie dem Angelman Syndrom (MIM 105830), dem Rett Syndrom (MIM 312750) oder dem Mowat-Wilson Syndrom (MIM 235730) auf. Daher ist die Identifizierung der ursächlichen molekularen Veränderung des PHS für die sichere Abgrenzung von anderen schweren syndromalen MR-Fällen wichtig. Darüber hinaus könnte die Identifizierung des ursächlichen Gens helfen einen molekularen (Patho)mechanismus der schweren MR, der Sprachentwicklung und der Atmungsregulation zu verstehen.

### **1.3.2 Nierenfehlbildungen**

#### **1.3.2.1 Ungeklärte syndromale Nephropathien**

Zurzeit sind mehr als 500 erbliche Syndrome mit Entwicklungsverzögerung verschiedener Organsysteme bekannt, die unter anderem mit Veränderungen der Niere und der ableitenden Harnwege einhergehen. Beispiele für solche Syndrome sind das Alport Syndrom, das CHARGE Syndrom, das DiGeorge Syndrom, das Denys-Drash Syndrom und die VACTERL Assoziation (Limwongse und Cassidy 2003). Einige dieser Syndrome sind monogene Erkrankungen, die durch Veränderungen in einem einzelnen, bereits identifizierten Gen hervorgerufen werden. Bei anderen Syndromen handelt es sich um *contiguous gene* Syndrome, die durch Deletionen oder Duplikationen einer spezifischen Region des Genoms, die mehrere Gene enthält, entstehen. Bei weiteren Syndromen ist die Ätiologie ungeklärt.

Für alle Patienten mit komplexen Phänotypen ist eine genetische Diagnosestellung hilfreich. Wenn das Gen bzw. die chromosomale Region eines vorliegenden Syndroms bekannt ist, besteht die Möglichkeit, einen spezifischen, genetischen Test durchzuführen. Ist die genetische Ursache eines Syndroms jedoch unklar oder der vorliegende Phänotyp kann keinem bekannten Syndrom zugeordnet werden, kann ein genomweites Screening auf



Mikroaberrationen durchgeführt werden, um ggf. die genetische Ursache der Erkrankung zu klären.

### 1.3.2.2 Kongenitale Anomalien der Nieren und der ableitenden Harnwege (CAKUT)

Kongenitale Anomalien der Nieren und der ableitenden Harnwege (CAKUT = *Congenital Anomalies of the Kidneys and Urinary Tract*) werden in etwa einer von 500 durchgeführten fetalen Ultraschalluntersuchungen diagnostiziert. Unter diesem Begriff werden folgende Veränderungen zusammengefasst: Nierenhypoplasien und –agenesien, zystische und/oder dysplastische Nieren, multizystisch-dysplastische Nieren, Anomalien des Ureters und Verdoppelungsfehlbildungen, Anomalien der Blase oder des Urogenitaltrakts.

CAKUT ist die häufigste Ursache chronischer Niereninsuffizienz bei Säuglingen und Kleinkindern. Zusätzliche Fehlbildungen anderer Organsysteme treten bei 10-15 % der Betroffenen auf.

Die molekulare Pathogenese dieser Anomalien ist bisher kaum entschlüsselt. Einige Gene, die an der Nierenentwicklung beteiligt sind und im Falle einer Mutation spezifische Phänotypen verursachen, sind bekannt, wie z.B. *PAX2*, *EYA1*, *TCF2*, *SIX1*, *SIX2*, *SIX5*, *BMP4* (Sanyanusin *et al.* 1995; Abdelhak *et al.* 1997; Woolf 2000; Bingham *et al.* 2001; Ruf *et al.* 2004; Weber *et al.* 2008). Andere monogene Ursachen für Nierenfehlbildungen sind homozygote oder *compound* heterozygote Mutationen in Genen des Renin-Angiotensin Systems, die für Renin, Angiotensinogen, Angiotensin *Converting* Enzym oder Angiotensin II Rezeptor Typ 1 kodieren (Gribouval *et al.* 2005; Niimura *et al.* 2006). Ferner wurde polygene Vererbung bei CAKUT-Anomalien beschrieben. Die Ätiologie der Organfehlbildungen bleibt jedoch im größten Teil der Fälle ungeklärt.

Es gibt verschiedene Strategien, um neue Kandidatenregionen oder -gene für einen Krankheitsphänotyp zu identifizieren. Diese können sowohl mittels Array-CGH als auch durch Linkage-Analysen lokalisiert werden. Der Vorteil der Array-CGH besteht darin, dass bei einzelnen Patienten kritische chromosomale Regionen identifiziert werden können, die nur 500 kb umfassen und ein einzelnes Gen enthalten (Brockschmidt *et al.* 2007).

#### 1.4 Überblick und Ziele dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung und Anwendung aktueller molekular-zytogenetischer Methoden. Zunächst sollte die Analyse eines Genoms auf Einzelzellniveau mit einer verkürzten chromosomalen CGH ermöglicht und an verschiedenen Zellsystemen implementiert werden. Außerdem wurden gesamtgenomische Untersuchungen von Patientenkollektiven mit angeborenen Erkrankungen mittels Array-CGH durchgeführt, um kausative Mikroimbalancen und enthaltene Kandidatengene zu identifizieren.

Die Hauptziele dieser Arbeit sind im Folgenden aufgeführt.

1. Um die Anwendbarkeit der chromosomalen CGH im klinischen Feld der Pränatal- und Präimplantationsdiagnostik zu verbessern, war es ein Ziel dieser Studie, die Analysezeit zu reduzieren. Es wurde angestrebt, ein Schnell-CGH-Protokoll zu entwickeln, das ein Aneuploidiescreening in einem für die Pränataldiagnostik und Präimplantationsdiagnostik geeigneten Zeitraum ermöglicht und in der Einzelzellanalyse anwendbar ist. Das Protokoll wurde durch die erfolgreiche Anwendung an kleinen DNA-Mengen und Einzelzellen mit bekannten unbalancierten Veränderungen validiert. Die Schnell-CGH wurde daraufhin an 32 ersten Polkörpern von 16 Patientinnen im Alter von 33 bis 44 Jahren angewandt, die aufgrund des fortgeschrittenen mütterlichen Alters (AMA) oder wiederholtem Implantationsversagen (RIF) in Behandlung waren.

2. Ein weiteres Ziel dieser Studie bestand darin, kausative Mikroimbalancen bei Patienten mit ungeklärter MR oder Entwicklungsverzögerungen zu identifizieren, darin enthaltene deletierte oder duplizierte MR-Kandidatengene, zu detektieren und die genetischen Daten mit den klinischen zu korrelieren, um Kriterien zur Vorauswahl von solchen Patienten zu definieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine kausative Mikroimbalancen tragen. Daher wurden 60 klinisch umfassend charakterisierte Patienten mit MR oder Entwicklungsverzögerung unbekannter Ätiologie mit einem Mikrochip analysiert, der das Genom mit einer Auflösung von annähernd 0,5 Mb abdeckte. Vor dieser Analyse wurden Untersuchungen zum Ausschluss der verschiedenen bekannten MR-Ursachen durchgeführt. Jeder in der array-basierten CGH potentiell auffällige Klon wurde mittels FISH-Analyse verifiziert und bei Bestätigung an elterlichen Chromosomen untersucht, um zu bestimmen, ob die detektierte Veränderung ererbt oder *de novo* und somit höchstwahrscheinlich kausal für den Phänotyp des Patienten war. Bei kausativen Imbalancen wurden die genauen

Bruchpunkte der Veränderung bestimmt, um präzise Aussagen zu den Genen, die in dieser Region lokalisiert sind, machen zu können.

3. In einem weiteren Teil der klinisch-genetischen Fragestellungen wurde eine Patientin mit Pitt-Hopkins-Syndrom, einer syndromalen Erkrankung mit mentaler Retardierung, analysiert, mit dem Ziel, das krankheitsverursachende Gen zu identifizieren.

4. Außerdem untersuchten wir zehn klinisch gut charakterisierte Patienten mit syndromalen Nephropathien unklarer Ätiologie mittels Array-CGH. Wir nutzten einen DNA-Mikroarray, der das gesamte Genom mit einer Auflösung von 0,5 Mb abdeckt. Ziel war es herauszufinden, ob und wie häufig submikroskopische chromosomale Deletionen und Duplikationen als Ursache der syndromalen Nephropathie vorkommen.

5. Schließlich wurde die Array-CGH an DNA-Proben von 30 Kindern durchgeführt, die in unterschiedlichen Schweregraden von CAKUT und mindestens einem zusätzlichen, extrarenalen Symptom betroffen waren. Hier war das Ziel, eine Eingrenzung der kritischen chromosomalen Regionen und darin lokalisierten krankheitsverursachender Kandidatengene zu erreichen zu erreichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien, Material, Software

#### 2.1.1 Chemikalien

Name	Bestellnummer	Hersteller/ Lieferant
100 bp Massenstandard		Invitrogen Corporation
4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	18860.01	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)	B-5002	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Agarose	A9539	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Ammoniumacetat (CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> )	1.01116.0500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid (ClNH <sub>4</sub> )	1.01145.1000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Antifade Vectashield <i>mounting medium</i>	H-1000	LINARIS GmbH, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Anti-Maus IgG TRITC Konjugat	T-2402	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Bacto-Trypton	211705	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto-Yeast Extrakt	212750	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Betain wasserfrei	B2629	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-Triphosphat	1093070	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
Biotinyliertes anti-Avidin D	BA-0300	LINARIS GmbH, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Blue Dextran 2000	17-0360-01	GE Healthcare BIO-SCIENCES, Uppsala, Schweden
Chloramphenicol	C3175	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Cy3-dCTP	PA 53021 oder NEL576	GE Healthcare BIO-SCIENCES, Uppsala, Schweden oder PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Beaconsfield, UK
Cy5-dCTP	PA 55021 oder NEL577	GE Healthcare BIO-SCIENCES AB, Uppsala, Schweden oder PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Beaconsfield, UK
D(+)-Biotin	B-1595	MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland
dATP	1051440	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
dCTP	1051458	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
Dextransulfat	17-0340-1	GE Healthcare BIO-SCIENCES, Uppsala, Schweden

dGTP	1051466	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
Digoxigenin-11-2'-deoxyuridin-5'-triphosphat	11558706910	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	4984.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Polymerase I	10104485001	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
DNase	104159	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
dTTP	1051482	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
Dye Saver II	Q500600	Implen GmbH, München, Deutschland
Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	1.00063.2511	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	1.00983.5000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	1.00944.1000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fixogum Rubber Cement	290117000	Marabuwerke GmbH&Co., Tamm
Fluorescein-Avidin	DCS A-2011	LINARIS GmbH, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	1.04001.1000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formamid	1.09684.2500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	G-2025	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Hoechst 33258	B-2883	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Humane Cot1-DNA	1581074, 15270-001	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz oder Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
Isopropanol	1.09634.2511	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Kaliumacetat ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )	1.04820.1000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	1.04936.0500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	3904.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )	1.04854.0500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	K-4378	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Laurylsulfat/ Natriumdodecylsulfat (SDS)	L-4509	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	8.14733.0500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	1.06009.2511	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Monoklonaler Maus anti-Digoxin Antikörper	D-8156	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat-Trihydrat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	677.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	1.06404.5000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	1.06495.0250	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiocyanat ( $\text{NaSCN}$ )	3478-500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

RDHA1		
Pepsin	P-7012	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20)	P2287	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Proteinase K	03 115 879 001	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	121 961	ProDiaMed GmbH, Mauer, Deutschland
RNase A	109169	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
Salmon Sperm DNA	D1626	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Salzsäure (HCl)	K 025.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	1.08382.1000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trinatriumcitratdihydrat(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O)	4984.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ULTRAhyb Ultrasensitiver Hybridisierungspuffer	8670	Ambion Inc., Austin, TX, USA
Xylen	1.08685.2500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol (Stocklösung)	4227.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## 1.2 Reagenzien

Name	Ansatz
Antikörperlösung I	1 ml Detektionslösung 5 µl Avidin-FITC
Antikörperlösung II	1 ml Detektionslösung 5 µl Anti-Avidin Antikörper 2 µl Maus Anti-Dig Antikörper
Antikörperlösung III	1 ml Detektionslösung 5 µl Avidin-FITC 10 µl TRITC Anti-Maus Antikörper
Ammoniumacetat 4 M	30,83 g Ammoniumacetat Mit <i>Aqua dest.</i> auf 100 ml auffüllen
Betain 5 M	29,2875 g Betain (wasserfrei) Mit <i>Aqua dest.</i> auf 50 ml auffüllen
Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat	1 mM
Blockinglösung	90 mg BSA 3 ml 4x SSC/Tween 20
β-Mercaptoethanol (Stammlösung) 14,4 M	β-Mercaptoethanol (Gebrauchslösung) 0,1 M: 69 µl 14,4 M β-Mercaptoethanol Mit <i>Aqua dest.</i> auf 10 ml auffüllen

Chloramphenicol Stammlösung	12,5 µg/µl in ddH <sub>2</sub> O
Cy3-dCTP	1 mM
Cy5-dCTP	1 mM
10x dNTP-Mix	20 µl 100 mM dATP 20 µl 100 mM dGTP 20 µl 100 mM dTTP 11 µl 100 mM dCTP 929 µl Aqua injectabile
Deionisiertes Formamid	400 ml Formamid 20 g AG 501-X8 Resin 2 h rühren bis pH 7 erreicht wurde und Resin ausfiltern
Denaturierungsmix	100 µl 20x SSC 200 µl <i>Aqua dest.</i> 7 µl 1 M HCl 700 µl Formamid
Detektionslösung	1 ml Blockinglösung 2 ml 4x SSC/Tween 20
4',6-Diamidin-2-phenylindol'2HCl'H <sub>2</sub> O (DAPI) (Stammlösung: 0,2 mg/ml)	DAPI-Gebrauchslösung: 15 µl DAPI Stammlösung 100 ml <i>Aqua dest.</i>
Digoxigenin-11-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat DNA-Ladepuffer	1 mM 5 ml 10x TAE-Puffer 20 ml Ficoll (20%) 5 ml Bromphenolblau 5 ml Xylencyanol Mit <i>Aqua dest.</i> auf 50 ml auffüllen
DNase Stammlösung (1 mg/ml) 5 mg DNase 2,5 mg 0,3 M NaCl 2,5 mg Glycerol Mit <i>Aqua dest.</i> auf 5 ml auffüllen	DNase Gebrauchslösung (10 µg/ml) 1 µl DNase Stammlösung 99 µl <i>Aqua dest.</i>
dNTP Mix	25 µl 2 mM dATP 25 µl 2 mM dCTP 25 µl 2 mM dGTP 5 µl 2 mM dTTP Mit <i>Aqua dest.</i> auf 100 µl auffüllen
Erythrozyten-Lysepuffer	77,5 ml 1 M CINH <sub>4</sub> 5 ml 1 M KHCO <sub>3</sub> 100 µl 0,5 M EDTA Mit <i>Aqua dest.</i> auf 500 ml auffüllen
Essigsäure 45 %	31,5 ml Essigsäure 36,5 ml <i>Aqua dest.</i>
Fixativ	6 ml Methanol 2 ml Essigsäure
Kanamycin Stammlösung Kernlysepuffer	20 µg/µl in ddH <sub>2</sub> O 0,61 g Tris 11,69 g NaCl 0,372 g Na-EDTA

Klenow Fragment ( <i>Bio Prime Labeling Kit</i> )	Mit <i>Aqua dest.</i> auf 500 ml auffüllen und pH 8,2 einstellen 40 U/μl großes Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) 50 mM Kaliumphosphat (pH 7) 100 mM KCl 1 mM DTT 50% Glycerol
LB-Agarplatten	15 g Agarose 1 l LB-Medium Autoklavieren der Lösung, auf < 65°C abkühlen lassen, Antibiotikum zugeben (1 μl Antibiotikum Stammlösung pro ml Medium). Je 25 ml in jede 10 mm Petrischale gießen.
LB-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Yeast 10 g NaCl Mit <i>Aqua dest.</i> auf 1l auffüllen und autoklavieren. Zugabe des entsprechenden Antibiotikums kurz vor Gebrauch.
Lösung 1	5 ml 20% Glucose 2,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8) 2 ml 0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (pH 8) Mit <i>Aqua dest.</i> auf 100 ml auffüllen und autoklavieren
Lösung 2	2 ml 10 M NaOH 5 ml 20 % SDS
Lösung 3	Mit <i>Aqua dest.</i> auf 100 ml auffüllen 29,4 g Kaliumacetat 11,5 ml Eisessig
Mastermix	Mit <i>Aqua dest.</i> auf 100 ml auffüllen 4 g Dextransulfat 20 ml 2x SSC
Natriumacetat 3 M	23,12 g Natriumacetat Mit <i>Aqua dest.</i> auf 100 ml auffüllen und pH 5,2 einstellen
Natriumacetat 4 M	30,83 g Natriumacetat Mit <i>Aqua dest.</i> auf 100 ml auffüllen
10x NT-Puffer	0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 50 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 mg/ml BSA
10x PBS	82 g NaCl 2 g KCl 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O Mit <i>Aqua dest.</i> auf 1 l auffüllen und pH



1x PBS	7,4 einstellen 30 ml 10x PBS 270 ml <i>Aqua dest.</i>
PBS-MgCl <sub>2</sub>	50 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> 950 ml 1x PBS
Pepsin Stammlösung	10%
Pepsin Gebrauchslösung (37°C)	700 µl 1 M HCl 70 ml <i>Aqua dest.</i> Vor Gebrauch 50 µl Pepsin Stammlösung zugeben
Postfixierungslösung	2 ml Formaldehyd (37%) 68 ml PBS-MgCl <sub>2</sub>
Proteinase K	10 mg/ml
2,5x Random Primer ( <i>Bio Prime Labeling Kit</i> )	125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 12,5 mM MgCl <sub>2</sub> 25 mM β-Mercaptoethanol 750 µg/ml Oligodeoxyribonukleotid-Primer (Random Oktamere)
RNase A	10 mg/ml
SDS 10 %	10 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 100 ml <i>Aqua dest.</i>
20x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O Mit <i>Aqua dest.</i> auf 1 l auffüllen und pH 7,0 einstellen
2x SSC (37°C)	7 ml 20x SSC 63 ml <i>Aqua dest.</i>
0,2x SSC (53°C)	1 ml 20x SSC 99 ml <i>Aqua dest.</i>
0,1x SSC	250 µl 20x SSC 9750 µl <i>Aqua dest.</i>
4x SSC/Tween 20 (45°C)	200 ml 20x SSC 800 ml <i>Aqua dest.</i> 2 ml Tween 20
Stop-Mix	200 mg Dextranblau 2000 (in 39,8 ml ddH <sub>2</sub> O lösen) 13,7 µl 5 M NaCl 160 µl 0,5 M EDTA 80 µl 1 M Tris-HCl pH 7,5
50x TAE-Puffer	484 g Tris 37,2 g EDTA 114,2 ml 100% Essigsäure Mit <i>Aqua dest.</i> auf 2 l auffüllen
1x TAE-Puffer	20 ml 50x TAE-Puffer 980 ml <i>Aqua dest.</i>
1x TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA)	1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 200 µl 0,5 M EDTA pH 7,4 einstellen
0,1x TE-Puffer	1 ml 1x TE-Puffer

Tris-HCl	9 ml Aqua dest. pH 7,4 einstellen. 121,1 g Tris Mit <i>Aqua dest.</i> auf 1 l auffüllen und pH 7,5 einstellen
Waschpuffer A	250 ml Formamid 225 ml <i>Aqua dest.</i> 25 ml 20x SSC 500 µl Tween 20 Mit HCl auf pH 7 einstellen
Waschpuffer B	450 ml <i>Aqua dest.</i> 50 ml 20x SSC 250 µl Tween20 Mit HCl auf pH 7 einstellen
Waschpuffer C	450 ml <i>Aqua dest.</i> 50 ml 10x PBS 250 µl Tween 20 Mit HCl auf pH 7 einstellen

### 2.1.3 Kits

Name	Bestellnummer	Hersteller/ Lieferant
BioPrime DNA Labeling Kit	18094-011	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
DiGeorge/VCFS-Sonde (TUPLE1)	32-191028	Vysis Inc., Downer's Grove, UK

### 2.1.4 Material

Name	Bestellnummer	Hersteller/ Lieferant
MicroCon YM30 Aufreinigungsröhrchen	42411	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
AG 501-X8 resin	143-6424	Bio-Rad Hercules, CA, USA

### 2.1.5 Geräte

Name	Hersteller/ Lieferant
Array-Scanner Genepix 4000B	Molecular Devices Corporation, Ontario, Canada
Brutschrank B6060	Heraeus, Hanau, Deutschland
DNA-Hybridisierungssystem HybArray 12TM	Perkin Elmer, Life and Analytical Sciences, Beaconsfield, UK
Elektrophoresekammer (Modelle B1 und A2)	OWI Separation Systems, Portsmouth,

Elektrophorese-Netzteil EPS200	USA Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Feinwaage CP423S-OCE	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem	INTAS, Göttingen, Deutschland
Leica DM RXA2 Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle 8020L	Privileg, Fürth, Deutschland
Omnigrid Microarray Spotter	GeneMachines Inc., San Carlos, CA, USA
Photometer Gene Quant pro RNA/DNA Calculator	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
pH-Meter InoLab pH level1	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Stratalinker	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler PTC 200	MJ Research Inc. (Bio-Rad Hercules, CA, USA)
UV Spektrophotometer GENESYS 10	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vortex	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5417R (mit Rotor F-45-30-11)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R (mit Rotor A-4-81)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

### 2.1.6 Software

Name	Hersteller/ Lieferant
GenePix 4000B	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA
GenePix Pro 6.0	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA
Leica CW 4000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
VISIONlite™ Software	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

### 2.1.7 Onlinequellen

Name	Adresse	Herausgeber
ChipYard Framework für Arraydatenanalyse	<a href="http://www.dkfz.de/genetics/ChipYard/">http://www.dkfz.de/genetics/ChipYard/</a>	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland
Clone Registry	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone/</a>	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, USA

Database of Genomic Variants	<a href="http://projects.tcag.ca/variation/">http://projects.tcag.ca/variation/</a>	Centre of Applied Genomics, Toronto, Canada
ENSEMBL Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>	Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK
Human BAC Resource	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/cyto/hbrc.shtml">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/cyto/hbrc.shtml</a>	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, USA
Human Genome Structural Variation Project	<a href="http://paralogy.gs.washington.edu/structuralvariation/">http://paralogy.gs.washington.edu/structuralvariation/</a>	University of Washington, Seattle, USA
Online Mendelian Inheritance in Man	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM</a>	The John Hopkins University, Baltimore, USA
UCSC Genome Browser Mapping Resource	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>	University of California, Santa Cruz, USA
Deutsches Ressourcen-zentrum	<a href="http://www.rzpd.de">http://www.rzpd.de</a>	RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin, Deutschland

## 2.2 Reproduktionsgenetik

### 2.2.1 Material zur Entwicklung eines Schnell-CGH-Protokolls

Um ein Schnell-CGH-Protokoll zu entwickeln, verwendeten wir DNA der Zelllinie COLO 704, die aus einem Ovar-Adenokarzinom stammt (German Collection of Microorganisms and Cell Culture (DSMZ), Braunschweig, Deutschland). Diese Zelllinie zeigt sowohl Imbalancen ganzer Chromosomen verschiedener Größen, als auch einen Gewinn eines Chromosomenarms. Mittels einer CGH-Analyse nach einem Standardprotokoll (Weber *et al.* 1996) wurde der Karyotyp bestimmt: rev ish enh(1)(q),enh(7),enh(8),enh(19),enh(20).

Um zu untersuchen, ob strukturelle Aberrationen mittels Schnell-CGH detektiert werden können, wurde die Analyse an DNA aus Lymphozyten des peripheren Bluts einer Patientin durchgeführt, die Trägerin einer strukturellen Chromosomenaberration war. Die Patientin hatte den Karyotyp 46,XX,add(13)(p12). Eine Einverständniserklärung der Eltern lag vor.

Zur Validierung der Schnell-CGH für die Analyse an Einzelzellen wurden Zellen mit bekannten chromosomalen Aberrationen aus dem Zytogenetiklabor des Instituts für Humangenetik der Universitätsklinik Bonn analysiert. Die Untersuchung wurde an einem Lymphozyten aus einer

Zellsuspension aus peripherem Blut eines Patienten mit Trisomie 21 und einem Fibroblasten einer Achillessehnenbiopsie eines abortierten Feten mit Trisomie 18 durchgeführt. Diese Zellen wurden zu diagnostischen Zwecken kultiviert und mittels GTG-Bänderung analysiert. Beide Chromosomenaberrationen wurden in allen untersuchten Zellen detektiert.

### **2.2.2 Patientinnen und Polkörper**

32 erste Polkörper von 16 Patientinnen wurden mittels Schnell-CGH untersucht. Die Altersspanne der Patientinnen lag zwischen 33 und 44 Jahren, das durchschnittliche Alter betrug 38 Jahre. Die Patientinnen durchliefen IVF (*in vitro* Fertilisation)-Behandlungen am Institut für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin der Universitätsklinik Bonn. Sie wurden aufgrund folgender Indikationen behandelt: Wiederholtes Implantationsversagen (RIF) (n=7), fortgeschrittenes mütterliches Alter (AMA) (n=5), RIF und/oder AMA (n=3), reziproke Translokation (n=1). Die Polkörperbiopsie wurde für diagnostische Zwecke nach Einverständniserklärung der Patientinnen wie beschrieben vorgenommen (Montag *et al.* 1998). Allerdings wurde für das *Zona Drilling* (künstliche Öffnung der *Zona pellucida*) ein Octax Laser (MTG, Deutschland) benutzt und zur Ansaugung der Polkörper wurden spezialangefertigte Kapillaren verwendet (Custom-Tip 02/240, Eppendorf, Deutschland) (Montag *et al.* 2004a). Der Transfer der Polkörper auf die Objektträger und die Fixierung wurde wie beschrieben durchgeführt (Montag *et al.* 2004b). Nach der Aneuploidieanalyse mittels 6-Farben-FISH wurden die Polkörper für die Forschung freigegeben. Die zugehörigen Oozyten konnten nicht untersucht werden, da der größte Teil fertilisiert und transferiert wurde. Einige Oozyten, deren zugehörige Polkörper nach 6-Farben-FISH-Untersuchung Aneuploidien aufwiesen, wurden verworfen bevor diese Studie begann.

## **2.3 Patienten mit mentaler Retardierung (MR)**

### **2.3.1 Kollektiv von Patienten mit ungeklärter MR**

Diese Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn genehmigt. Schriftliche Einverständniserklärungen für die durchgeführten Analysen lagen von den Eltern aller Patienten vor. An 60 Patienten (25 weibliche, 35 männliche) mit MR oder Entwicklungsverzögerung unbekannter Ätiologie wurden Array-CGH-Analysen durchgeführt. Bei 38 der Patienten wurde der Intelligenzquotient (IQ) durch entsprechende Tests bestimmt bzw. die Meilensteine der Entwicklung erfasst. Bei 47 der

Patienten wurden kranielle MRT und/oder CT-Scans durchgeführt. Fehlbildungen anderer Organe wurden bei entsprechendem Verdacht ausgeschlossen. Zwölf Patienten zeigten eine moderate/schwere MR/Entwicklungsverzögerung; 24 Patienten zeigten eine milde MR/Entwicklungsverzögerung, zwei Patienten wiesen eine Lernbehinderung auf. Bei 22 Patienten wurde der Grad der MR/Entwicklungsverzögerung nicht bestimmt. Die meisten Patienten waren von multiplen kongenitalen Anomalien betroffen: 29 hatten faziale und/oder somatische Dysmorphien ohne Fehlbildungen, ein Patient hatte Fehlbildungen ohne Dysmorphien, und 26 zeigten sowohl Fehlbildungen als auch Dysmorphien. Zwölf Patienten wiesen im MRT und/oder CT-Scan Hirnfehlbildungen oder Anomalien auf. 15 Patienten litten an einem Anfallsleiden und bei sieben weiteren wurden EEG Anomalien ohne Anfälle diagnostiziert. 31 Patienten wiesen andere neurologische Auffälligkeiten auf, wie eine muskuläre Dystonie, Ataxie oder herabgesetztes Schmerzempfinden.

Die Patienten hatten de Vries-Werte (de Vries *et al.* 2005; Details in der Legende zu Tabelle 1) von 0 bis 8 Punkten (Median: 3 Punkte): 0 Punkte (3 Patienten), 1 Punkt (2 Patienten), 2 Punkte (12 Patienten), 3 Punkte (14 Patienten), 4 Punkte (13 Patienten), 5 Punkte (7 Patienten), 6 Punkte (4 Patienten), 7 Punkte (3 Patienten), 8 Punkte (2 Patienten).

Alle 60 Patienten wiesen einen normalen Karyotyp mit einer Bandenauflösung von 400-550 Banden pro haploidem Genom auf. Subtelomerische Chromosomenaberrationen wurden mittels FISH-Analyse ausgeschlossen. Andere bekannte Ursachen für MR/Entwicklungsverzögerung wie das Fragile X-Syndrom, Rett-Syndrom, Stoffwechselerkrankungen oder bekannte Mikrodeletionssyndrome wurden bei klinischem Verdacht ausgeschlossen.

### **2.3.2 Kollektiv von Patienten mit schwerer MR ohne Sprachentwicklung einschließlich der Patientin mit Pitt-Hopkins Syndrom**

Die Indexpatientin wurde spontan nach normaler Schwangerschaft in der 41. Schwangerschaftswoche mit einem Geburtsgewicht von 4330 g (97. Perzentile), einer Körpergröße von 58 cm (90. Perzentile) und einem KU von 36,5 cm geboren. Die Untersuchung im Alter von sieben Jahren zeigte eine schwere mentale Retardierung ohne Sprachentwicklung. Im Alter von fünf Jahren wurde eine schwere motorische Entwicklungsverzögerung ohne Krabbeln und assistiertem Laufen diagnostiziert. Die Patientin war zur Zeit der Vorstellung nicht in der Lage, ohne Hilfe zu laufen. Sie leidet an Muskelhypotonie und einer Ataxie des Rumpfes. Die fazialen Merkmale der Patientin umfassen ein grobes Gesicht und eine leicht tiefliegende Nasenwurzel, einen großen Mund mit bogenförmiger Oberlippe und einem kurzen Philtrum (Abbildung 12

oben). Die Ohren sind leicht dysplastisch mit antevertierten Ohrläppchen. Sie hat einen kurzen Hals und tiefe Stirn- und Nackenhaaransätze. Sie hat Plattfüße mit überlagerten Zehen und eine moderate Syndaktylie der Zehen II/III. Die Patientin hat lange, leicht spitz zulaufende Finger mit Vierfingerfurchen bds. und proximal inserierte Daumen an beiden Händen. Der Mamillenabstand war vergrößert. Ihr Gewicht lag bei 26 kg (75.-90. Perzentile), ihre Größe bei 116 cm (10. Perzentile) und ihr KU bei 52 cm (75. Perzentile). Sie hatte ein glückliches und freundliches Wesen. Im MRT fanden sich keine ZNS-Anomalien. Eine initial vermutete Epilepsie wurde ausgeschlossen und die EEG-Befunde waren normal. Weiter wurde bei der Patientin eine ausgeprägte Myopie (-6.5/-7 Dioptrien) diagnostiziert. Bis zum Zeitpunkt als die Patientin für die Studie rekrutiert wurde, war keine Hyperventilation beobachtet worden. Im Alter von siebeneinhalb Jahren traten erste Hyperventilationsattacken auf, so dass ihre klinischen Symptome seit dem mit dem PHS kompatibel sind. Konventionelle zytogenetische Analysen und das Subtelomerscreening mittels FISH zeigten normale Ergebnisse. Rett- und Angelman-Syndrom wurden ausgeschlossen und umfassende Stoffwechseluntersuchungen zeigten keine pathologischen Auffälligkeiten.

Außer der Indexpatientin wurden in dieser Studie 46 weitere Patienten mit idiopathischer mentaler Retardierung (29 männliche, 17 weibliche) auf Mutationen im *TCF4*-Gen hin untersucht. Der Großteil der Patienten wies neben schwerer mentaler Retardierung ohne Sprachentwicklung eine muskuläre Hypotonie oder Ataxie auf, jedoch wurde bei keinem das PHS klinisch eindeutig diagnostiziert. Von allen Familien der in der Studie involvierten Patienten lagen schriftliche Einverständniserklärungen vor. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Bonn genehmigt.

## **2.4 Patienten mit Nierenfehlbildungen**

### **2.4.1 Patienten mit ungeklärten syndromalen Nephropathien**

Diese Studie wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Rostock bewilligt, da Rostocker Patienten untersucht wurden. Schriftliche Einverständniserklärungen für die durchgeführten Analysen lagen von den Eltern aller Patienten vor. Die Array-CGH-Analyse wurde bei fünf weiblichen Patientinnen und fünf männlichen Patienten mit syndromalen Nephropathien unbekannter Ätiologie durchgeführt.

Patient 1: Ein 9-jähriger männlicher Patient zeigte folgende neonatale renale Auffälligkeiten: Eine multizystische Nierendysplasie (rechts) und eine Nierenhypoplasie (links). Im Alter von 21 Monaten wurde eine Nierentransplantation nach Lebendspende durchgeführt. Der Patient wies eine moderate psychomotorische Retardierung (selbstständiges Sitzen: 21 Monate,

Sprachentwicklung im Alter von zwei Jahren auf dem Stand eines 1-jährigen), eine milde mentale Retardierung (MR) (9 Jahre: IQ 69; Raven's *Standard Progressive Matrices* (SPM) (Raven *et al.* 2006)) und eine aggressive Verhaltensweise auf. In den ersten Lebensmonaten wurde mittels kranielem MRT eine globale Hirnatrophie und eine Hypoplasie des Corpus callosum diagnostiziert. Außerdem zeigte der Patient eine progressive Wachstumsstörung; im Alter von einem Jahr lag die Körpergröße unter der dritten Perzentile. Es wurden eine subvalvuläre Aortenstenose, schlaffe Haut, ein tiefer Nackenhaaransatz und tiefsitzende Ohren diagnostiziert.

Patient 2: Dieser 9-jährige Patient zeigte eine chronische Nierenerkrankung Stadium 4 bedingt durch eine bilaterale zystische Nierendysplasie mit vesico-ureteralem Reflux III° (links). Er zeigte eine moderate psychomotorische Retardierung (selbstständiges Sitzen: 15 Monate, selbstständiges Laufen: 21 Monate, Sprachentwicklung mit 28 Monaten auf dem Stand eines 18-Monate alten Kindes), Mikrozephalie (im Alter von 3 Jahren: KU < 3. Perzentile), chronische Obstipation, Testishypoplasie, persistierende Wachstumsstörung (im Alter von 3 Jahren: Körpergröße < 3. Perzentile). Die Durchführung einer MRT-Untersuchung wurde von den Eltern abgelehnt.

Patient 3: Bei dieser Patientin wurde mit elf Jahren eine therapie-resistente fokale Epilepsie diagnostiziert. Im Alter von fünf Jahren entwickelte sie eine Mikrohämaturie und mit sechs Jahren eine glomeruläre Proteinurie (0.5 g/Tag). Sie wies eine schwere mentale und eine moderate motorische Retardierung (selbstständiges Sitzen: 9 Monate, selbstständiges Laufen: 18 Monate, Sprachentwicklung mit vier Jahren auf dem Stand einer 2-jährigen, mit 16 Jahren: IQ < 70, Raven's SPM (Raven *et al.* 2006)), sowie eine Innenohrschwerhörigkeit auf. Das kraniale MRT im Alter von 13 Jahren zeigte eine subkortikale Heterotopie. Bei der Patientin wurden außerdem Dysmorphien wie eine Mittelgesichtshypoplasie, eine tiefliegende Nasenwurzel, eine tiefe Nackenhaargrenze, kleine Hände und Finger, spitz zulaufende Finger, Plattfüße, Sandalenlücken beidseits und gluteale Depigmentierung diagnostiziert. Die Patientin wurde im Alter von 14 Jahren in die Kinder- und Jugendklinik der Universität Rostock überwiesen, um die unklare, syndromale Nephropathie abzuklären.

Patient 4: Dieser 19-jährige Patient wies eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung auf (erste Worte im Alter von zwei Jahren, selbstständiges Laufen: 4,5 Jahre), eine milde mentale Retardierung (mit 16 Jahren: IQ < 64, Raven's SPM (Raven *et al.* 2006)), milde Stenose der Aorta descendes, Mikrophthalmie, kongenitale Katarakte, Hypertonie und Progenie. Im Alter von 13 Jahren wurde eine Proteinurie (von 0,3 bis 3,3 g/d) diagnostiziert. Durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Nierenbiopsie im Alter von 16 Jahren wurde eine



*Minimal Change* Glomerulonephritis nachgewiesen. Ein Screening auf Mutationen in den Genen *PODOCIN/NPHS2* und *WT1* war negativ.

Patient 5: Diese Patientin zeigte eine multizystische Dysplasie der rechten Niere und eine kompensatorische Hypertrophie der linken Niere. Außerdem wies sie eine moderate psychomotorische Retardierung (selbstständiges Sitzen mit 1,5 Jahren, selbstständiges Laufen mit drei Jahren, Sprachentwicklung mit drei Jahren auf dem Stand einer 2-jährigen), einen bilateralen Nystagmus und eine Hypoplasie des Genitalbereichs auf. Mittels MRT wurde eine Dandy-Walker Variante nachgewiesen.

Patient 6: Diese 7-jährige Patientin zeigte eine unilaterale multizystische Nierendysplasie (rechts), eine Obstruktion des ureteropelvinen Übergangs (links), Atrium- und Ventrikelseptumdefekte, einen Strabismus und kraniofaziale Dysmorphien (dysplastische Ohren, Blepharophimose und schmale Lippen).

Patient 7: Dieser 12-jährige Junge mit moderater motorischer Entwicklungsverzögerung (selbstständiges Laufen: 14 Monate, Beeinträchtigung der Feinmotorik und Lernbehinderung (11 Jahre: IQ 81, Raven's SPM (Raven *et al.* 2006)), Wachstumsretardierung (Körpergröße: bei Geburt normal, ab dem Alter von 4 Jahren < 3. Perzentile), Innenohrschwerhörigkeit, niedriger Stirn- und Nackenhaaransatz, partieller Haaralbinismus am Hinterkopf, Hypertrichose der Stirn, des Halses, der Arme und Beine und beeinträchtigte Gelenkbeweglichkeit. Das kraniale MRT zeigte milde kortikale und subkortikale Atrophien, sowie eine Hyperdensität des *Globus pallidus*. Im Alter von zehn Jahren entwickelte er ein steroid-resistentes nephrotisches Syndrom (Proteinurie 1,5-5,8 g/Tag). Die Nierenbiopsie zeigte im Lichtmikroskop eine fokale segmentale Glomerulosklerose und den Verlust der Podozyten-Fußfortsätze. Die Proteinurie sprach teilweise auf eine hochdosierte Cyclosporin A-Therapie an. Ein Screening auf Mutationen in den Genen *PODOCIN/NPHS2* und *WT1* war negativ.

Patient 8: Diese 4-jährige Patientin zeigte eine Duplexniere mit vesico-ureteralem Reflux IV° (obere rechte Niere) und eine Obstruktion des ureteropelvinen Übergangs (links). Als Neugeborene wies sie eine muskuläre Hypotonie und eine generalisierte Epilepsie auf. Außerdem wurden ein Ventrikelseptumdefekt, ein konvergenter Strabismus und bilateral rudimentäre 6. Finger diagnostiziert. Sie zeigte eine moderate psychomotorische Retardierung (im Alter von 22 Monaten selbstständiges Umdrehen möglich, Sprachentwicklung belief sich auf einzelne Laute). Das kraniale MRT zeigte eine Hypoplasie des Kleinhirnwurms.

Patient 9: Dieser Patient wies neonatales Nierenversagen auf, das auf bilaterale Nierendysplasien zurückzuführen war und im Alter von vier Jahren in einer chronischen

Nierenerkrankung Stadium 4 resultierte. Er zeigte schwere motorische- und Sprachentwicklungsverzögerungen (im Alter von vier Jahren: Selbstständiges Sitzen und Laufen nicht möglich, Sprechen einzelner Wörter), eine Mikrozephalie (KU: bei Geburt auf der 3. Perzentile, mit 0,5 Jahren < 3. Perzentile), eine milde muskuläre Hypotonie im Alter von vier Jahren und Schwerhörigkeit. Im kraniellen MRT fand sich eine milde kortikale Atrophie, eine Arachnoidalzyste ventral der Pons und eine Asymmetrie der Hirnhemisphären. Außerdem wurden eine Aortenisthmusstenose, eine Aortenklappenstenose, ein Vorhofseptumdefekt und ein pulmonaler Sequester diagnostiziert. Der Patient zeigte verschiedene Dysmorphien wie tiefsitzende Ohren, eine eingesunkene Nasenwurzel, Mikro-/Retrognathie, einen hohen Gaumen, einen kurzen Hals, einen tiefen Nackenhaaransatz, eine Hypertrichose, einen Pes calcaneus und schlaffe Haut.

Patient 10: Diese Patientin wies eine kongenitale bilaterale Nierenhypoplasie und bilateralen vesico-ureteralen Reflux (III° links, II° rechts) auf, die im Alter von zehn Jahren zu einer chronischen Nierenerkrankung Stadium 3 führten. Es wurde eine Aortenisthmusstenose und ein persistierender Ductus arteriosus diagnostiziert. Außerdem hatte die Patientin eine vorgewölbte Stirn, einen Epikanthus, eine schmale Oberlippe, einen kleinen Mund und eine breite Nasenwurzel. Sie hatte eine moderate motorische Entwicklungsverzögerung (selbstständiges Sitzen mit zwölf Monaten, selbstständiges Laufen mit 18 Monaten) und grenzwertige intellektuelle Fähigkeiten (IQ-Wert 76 mit 13 Jahren, Raven's SPM (Raven *et al.* 2006). Mittels kranialem MRT wurde eine verkleinerte Sella turcica und eine Hypophysenhypoplasie detektiert. Außerdem wies die Patientin eine Wachstumsstörung (Geburt: Körpergröße auf der 25. Perzentile, Gewicht auf der 50. Perzentile, KU < 50. Perzentile; im Alter von neun Monaten: Körpergröße < 3. Perzentile, Gewicht < 3. Perzentile) und im Alter von zehn Monaten einen Wachstumshormonmangel auf. Eine Wachstumshormonsubstitution ab dem Alter von einem Jahr resultierte in einer mäßigen Wachstumsnormalisierung (im Alter von 13 Jahren: Körpergröße auf der 3. Perzentile). Im Alter von zwölf Jahren wurde ein nicht-insulin-abhängiger Diabetes mellitus (Typ II) diagnostiziert.

#### **2.4.2 Patienten mit CAKUT**

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg genehmigt, da Heidelberger Patienten untersucht wurden. Einverständniserklärungen für genetisches Screening der Patienten und/oder der Eltern lagen vor.

30 Patienten mit einem CAKUT-Phänotyp und mindestens einem schweren extrarenalen Symptom wurden in das Kollektiv für die genetische Analyse mittels Array-CGH aufgenommen. Die

Geschlechterverteilung der Studienkohorte war balanciert. 20 Patienten waren Deutsche, drei waren Türken, zwei Italiener, zwei Osteuropäer, ein Patient war Philippino, einer Libanese und einer Vietnamesen. Die Eltern eines türkischen Patienten und des Libanesen waren konsanguin.

Die Patienten wurden von qualifizierten pädiatrischen Nephrologen und pädiatrischen Radiologen aus der Universitätskinderklinik Heidelberg klinisch und ultrasonographisch untersucht. Sie waren von einem oder mehreren der folgenden CAKUT Symptome betroffen: Nierenagenesie (sechs Patienten), Nierenhypoplasie (sechs Patienten), dysplastische Nieren (14 Patienten), medulläre zystische Nierenerkrankung (vier Patienten) oder Hufeisennieren (zwei Patienten). 13 Patienten zeigten Anomalien des Ureters: Proximale Ureterstenose (drei Patienten), Megaureter/Hydronephrose (neun Patienten) oder Ureterocele (zwei Patienten). Urethralklappen wurden bei zwei Patienten diagnostiziert, bei einem Patienten eine Harnröhrenatresie. Zwei Patienten wiesen eine Hypospadie auf und ein Patient eine Penisagenesie. Bei fünf Patienten wurde ein Kryptorchismus, bei einem eine Hydrozele testis, bei zwei Patienten ein Uterus/Vagina duplex und bei drei Patienten persistierende Kloaken identifiziert.

Weitere Untersuchungen (wie z.B. CT/MRT-Untersuchungen) wurden, wenn notwendig, durchgeführt. Die folgenden extrarenalen Anomalien wurden detektiert: Mentale Retardierung (zwölf Patienten), Sprachstörungen (zwei Patienten), Mikrozephalie (acht Patienten), Makrozephalie (ein Patient) und strukturelle Anomalien des Gehirns, die durch CT- oder MRT-Untersuchungen nachgewiesen wurden (vier Patienten). Innenohrtaubheit wurde bei drei Patienten beobachtet, ein Patient zeigte eine unilaterale Atresie des Gehörgangs, ein weiterer eine Mikrotie und ein Patient wies ein Ohranhängsel auf. Bei acht Patienten wurden Augenfehlbildungen, bei vier Patienten faziale Dysmorphien diagnostiziert. Ein Patient hatte eine Choanalatresie, ein anderer eine Trachealstenose. Herzanomalien wurden bei sechs Patienten identifiziert, Anomalien des Gastrointestinaltrakts bei zehn Patienten. Auffälligkeiten der Extremitäten, Gelenke und des Skelettsystems wurden bei 13 Patienten beobachtet. Anomalien des endokrinen Systems wurden bei vier Patienten erfasst, Hautpigmentierungsstörungen bei zwei Patienten.

## **2.5 Isolation der Einzelzellen und der Polkörper für die Schnell-CGH**

Die Lymphozyten eines Patienten mit Trisomie 21 wurden auf zwei verschiedene Arten isoliert. Einerseits wurde ein Tropfen sehr stark verdünnter Suspension mit Trisomie 21 auf einen OT gegeben und ein einzelner Lymphozyt mit einer Glasnadel unter einem Invertmikroskop isoliert. Andererseits wurde ein einzelner Lymphozytenkern, der auf einem OT fixiert war, mit einer

Glasnadel mikrodiseziert. Der Fibroblast aus Abortmaterial mit der Trisomie 18 wurde mit einer Glasnadel unter dem Invertmikroskop aus einem Tropfen sehr stark verdünnter Zellsuspension isoliert, die wir durch das Trypsinieren einer aus Achillessehne angelegten Zellkultur erhielten. Die Polkörper, die auf einem OT fixiert und die mittels Mehrfarben-FISH analysiert worden waren, wurden mit einer Glasnadel unter dem Invertmikroskop mikrodiseziert. Jede Zelle bzw. jeder Polkörper wurde in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß, das 5 µl PCR Puffer enthielt, überführt.

## **2.6 DNA-Isolation aus peripherem Blut, Polkörpern und Einzelzellen**

Für die Array-CGH-Analysen zu klinisch-genetischen Fragestellungen wurde die Test-DNA aus peripherem Blut der Patienten isoliert. Nach demselben, im folgenden beschriebenen Protokoll wurde die Referenz-DNA aus peripherem Blut normaler Individuen extrahiert. Zur Lyse der Erythrozyten wurden 40 ml Erythrozyten-Lysispuffer mit 5 ml EDTA-Blut gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 1500 Upm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 15 ml Erythrozyten-Lysispuffer gewaschen und ein weiteres Mal 10 min bei 1500 Upm (4 °C) zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 5 ml Kernlysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml 10 % SDS und 200 µl Proteinase K wurde die Suspension über Nacht bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf RT heruntergekühlt und 1 ml 5M NaCl hinzugefügt, gut gevortext und 15 min bei 4000 Upm (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Ein weiteres Mal wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 5 ml Ethanol hinzugefügt und gut gemischt. Danach fiel die DNA aus und konnte in ein neues Reaktionsgefäß transferiert werden. Zum Schluss wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 300-500 µl 1x TE-Puffer gelöst.

Für reproduktionsgenetische Fragestellungen wurde DNA aus Einzelzellen und Polkörpern verwandt und folgendermaßen präpariert: Die Lyse einer isolierten Einzelzelle oder eines Polkörpers erfolgte durch Zugabe von 5 µl Proteinase K (125 µg/ml) zu 5 µl PCR Puffer, der die Einzelzelle oder einen Polkörper enthielt, und einer anschließenden 30-minütigen Inkubation bei 37° C. Das Enzym wurde danach durch eine fünf-minütige Inkubation bei 95° C inaktiviert.

## **2.7 Universelle DNA-Amplifikation**

Um das Rapid-CGH-Protokoll zu etablieren wurden zwei Protokolle zur DNA-Amplifikation getestet. Fünf pg DNA (dies entspricht ungefähr dem DNA-Gehalt einer einzelnen diploiden Zelle),

Einzelzellen und Polkörpern sowie männliche Kontroll-DNA wurden mit diesen Protokollen amplifiziert. Diese Methoden waren modifizierte DOP-PCR Protokolle (Weber *et al.* 1998) nach Telenius *et al.* (1992) und nach Klein *et al.* (1999). Je PCR-Reaktion wurden sowohl eine Negativ- als auch eine Positivkontrolle mitgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die PCR-Reagenzien unter der Sterilbank pipettiert. Die Amplifikation wurde im Thermocycler PTC-200 (MJ Research, Waltham, USA) durchgeführt.

## 2.8 Chromosomendarstellung aus Lymphozyten

### 2.8.1 Lymphozytenkultivierung

Lymphozyten sind ausdifferenzierte Zellen, die sich im peripheren Blut nicht mehr teilen. Durch eine Kultivierung unter Stimulation durch das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) verlassen insbesondere die T-Lymphozyten die  $G_0$ -Phase und treten wieder in den Zellzyklus ein, so dass es zur klonalen Proliferation kommt. Die Kultivierung erfolgte über 72 h bei 37 °C in einem Brutschrank. Nach etwa 24 h treten die Zellen asynchron in den Zellzyklus ein. Bis zum Abbruch der Kultur durchläuft der Großteil der T-Lymphozyten noch zwei weitere Zellzyklen.

Durch Zugabe des Spindelgiftes Colcemid, einem Derivat des Colchicins, wird beim Zellteilungsprozess der Übergang von der Metaphase zur Anaphase verhindert. Die Mikrotubuli-abhängigen Vorgänge werden blockiert, indem das Colcemid die Polymerisation der Tubulin-Untereinheiten verhindert und so die Ausbildung der Mitosespindel ausbleibt. Die Anzahl der Zellen, die sich in Metaphase befinden, wird somit künstlich erhöht und die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle unterbleibt (C-Metaphasen).

Durchführung:

Die Chromosomenpräparation wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 45 ml Zellkulturmedium und 5 ml Heparinblut in eine 250 ml Kulturflasche geben
- Kulturflasche schwenken, 1-2 h mit aufgeschraubtem Deckel im 37° C Brutschrank stehen lassen, danach den Deckel schließen
- Nach 72 h Zugabe von 500 µl Colcemid (1 µg/100 µl) pro 50 ml und durchmischen
- 15-30 min bei 37° C inkubieren
- Inhalt der Kulturflasche auf zwei 50 ml Falconröhrchen aufteilen
- 10 min bei 1200 Upm zentrifugieren
- Überstand abpipettieren, Zellen resuspendieren

- Zuerst 10 ml 0,0375 M KCl langsam und tropfenweise zugeben, danach bis auf 40 ml auffüllen
- 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren
- 10 min bei 1200 Upm zentrifugieren
- Überstand abpipettieren, Zellen resuspendieren
- Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1), eisgekühlt, zuerst 10 ml tropfenweise zugeben, danach schneller bis 20 ml auffüllen
- 10 min bei 1200 Upm und 4 °C zentrifugieren
- Fixierung mehrmals wiederholen
- Lagerung bei -20 °C

### **2.8.2 Metaphasepräparation für CGH und FISH**

Metaphasepräparate von sehr guter Qualität waren sowohl für die CGH als auch für die FISH-Analyse erforderlich. Dies bedeutet, dass eine ausreichende Anzahl an Metaphasen auf dem Präparat vorhanden sein muss, die zudem weit gespreitet sind. Die Chromosomen der einzelnen Metaphasen dürfen wegen der geringeren Auflösung entlang der Chromosomenachse nicht zu kurz, jedoch aufgrund der Überlagerungstendenz auch nicht zu lang sein. Nach dem Auftropfen wurden die Präparate bonitiert, um die Qualität zu überprüfen.

Durchführung:

- Objektträger (OT) mit 50 % Aceton und 50 % Ethanol entfetten, mit fusselfreiem Tuch abwischen
- Zellsuspension mit Fixativ bis zur gewünschten Zelldichte verdünnen
- Zellsuspension mischen, 15-20 µl von der Oberfläche mit einer Pipette abnehmen
- Beschriftete OT in Fixativ tauchen
- Aus ca. 20 cm Höhe Suspension auftropfen
- OT im Wasserdampf trocknen lassen (50 °C Wasserbad)
- OT in 70 % Essigsäure tauchen
- Trocknen lassen
- Kennzeichnung der Region mit den meisten Metaphasen
- Aufbewahrung in 70 % Ethanol

### 2.8.3 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Um ein gutes Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund (*signal-to-noise-ratio*) bei der CGH zu erhalten, wurden die Metaphasepräparate vorbehandelt. Durch die Behandlung mit dem proteolytischen Enzym Pepsin wurde die Hybridisierungseffizienz der DNA-Sonde auf die Chromosomenpräparate gesteigert, indem Zytoplasmaresten, die die Chromosomen umschließen, abgebaut wurden. Die darauf folgende Fixierung der Präparate durch die vernetzende Wirkung von Formaldehyd erhielt die Chromosomenmorphologie. Danach wurden die Präparate einer Denaturierung und einer Dehydrierung unterzogen.

Durchführung:

- Präparate kurz in 2x SSC äquilibrieren
- Pepsinverdau: 10 min bei 37 °C
- 2x 5 min waschen mit 1x PBS
- 5 min waschen in 1x PBS-Magnesiumchlorid
- Nachfixierung: Präparate für 10 min bei Raumtemperatur in einer Küvette mit 2 ml Formaldehyd (37 %) in 70 ml PBS-Magnesiumchlorid inkubieren
- 5 min waschen in 1x PBS
- Je 3 min in 70 %, 90 % und 100 % Ethanol dehydrieren
- Präparate lufttrocknen
- Die vorbehandelten Objektträger mit 100 µl Denaturierungsmix 1 min 45 sec bei 73 °C in einer Metallbox inkubieren
- Je 3 min in eisgekühltem 70 %, 90 % und 100 % Ethanol dehydrieren, lufttrocknen

## 2.9 Chromosomale CGH

### 2.9.1 Nick-Translation

Bei der *Nick-Translation* wurde die doppelsträngige DNA gleichmäßig markiert und auf eine geeignete Fragmentlänge gebracht. Mittels der Enzyme Desoxyribonuklease I (DNase I) und DNA-Polymerase wurden modifizierte Nukleotide in die DNA eingebaut.

Durch Zugabe von DNase, die als Exonuklease fungiert, wurden zufallsgemäß Einzelstrangbrüche, sog. Nicks in den DNA-Doppelstrang durch Spaltung der Phosphodiesterbrücke eingefügt. Dadurch entstanden ein 5'-Phosphat und ein 3'-OH-Ende. Die DNA wurde fragmentiert, wenn zwei Nicks auf den komplementären Strängen aufeinander trafen. Je länger die Einwirkung des Enzyms auf die DNA war, desto kleinere Fragmente entstanden. Durch die Wahl der DNase-

Konzentration erreichte man, dass weder zu große, noch zu kleine Fragmente entstanden, deren Hybridisierungseigenschaften nicht optimal gewesen wären.

Die indirekte Markierung erfolgte, indem zu dem Ansatz für die *Nick-Translation* die modifizierten Nukleotidtriphosphate wie Biotin-16-dUTP und Digoxigenin-11-dUTP gegeben wurden, die dann anstatt des dTTPs in die DNA eingebaut wurden. Die Biotin- bzw. Digoxigenin-Moleküle waren kovalent an das jeweilige Nukleotid gebunden, so dass sie herausragten und somit für Antikörper zugänglich waren. Die angekoppelten Fluorochrome Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) bzw. Rhodamin wurden zum Schluss im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen.

Ansatz:

1 µg DNA

5 µl 10x NT-Puffer

5 µl 0,1M β-Mercaptoethanol

5 µl dNTPs

1 µl dig- bzw. bio-dUTPs

1–5 µl DNase (je nach DNA-Typ, frisch verdünnt)

1 µl DNA-Polymerase I

Mit *Aqua bidest.* auf 50 µl auffüllen

Vortexen, kurz zentrifugieren

2 h bei 15° C im Wasserbad inkubieren

Auf Eis stellen, um die Enzymreaktion abzustoppen.

Eine Gelelektrophorese wurde zum Überprüfen der Fragmentlänge nach dem DNA-Verdau durchgeführt. Die besten Hybridisierungsergebnisse wurden erreicht, wenn die DNA eine Fragmentlänge von 100-500 bp aufwies. Wenn notwendig wurde die Inkubation im Wasserbad verlängert. Wenn die Reaktion gestoppt werden sollte, wurde die gleiche Menge Stopp-Mix hinzugefügt.

### 2.9.2 Fällung und Reinigung der DNA

Die DNA wurde mit humaner Cot-1-DNA gemischt, die unmarkiert und hochrepetitiv war. Sie blockierte die hochrepetitiven Sequenzen der Chromosomen, bei denen es ohne Blockierung zu Kreuzhybridisierungen kommen konnte (Strachan und Read, 1996). Die Fällung erfolgte durch Zugabe von Alkohol (100 % Ethanol) und Natriumacetat, die zu einer Aggregation der



Nukleinsäuremoleküle und anschließender Präzipitation der Aggregate führte. Niedermolekulare Oligonukleotide und freie Nukleotide blieben in Lösung (Ibelgaufts 1993).

Durchführung:

- Ansatz
  - 80 µl Biotin-markierte Test-DNA (= 800 ng)
  - 80 µl Digoxigenin-markierte Kontroll-DNA (= 800 ng)
  - 80 µl Human-Cot-1-DNA
  - 1 µl *Salmon-Sperm*-DNA
  - 24 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,2 (1/4 Gesamtvolumen)
  - 600 µl 100 % Ethanol (-20 °C) (2,5-faches Gesamtvolumen)
- Gut mischen
- Über Nacht bei -20 °C inkubieren (oder mindestens 30 min bei -80 °C)
- 30 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 3x mit 70 % Ethanol waschen
- Pellet bei 37 °C trocknen.

### 2.9.3 Prinzip und Durchführung der Hybridisierung

Um eine Hybridisierung durchführen zu können, ist eine Trennung der Doppelstränge, eine sog. Denaturierung der markierten DNA-Sonde und der Chromosomen, die als Hybridisierungsziel dienen, durch Hitzeeinwirkung notwendig. Wenn die einzelsträngige Sonden-DNA mit den unmarkierten einzelsträngigen Chromosomen zusammengebracht wird, lagern sich aufgrund der Reassoziationskinetik einzelsträngiger Nukleinsäuren die komplementären Sequenzen durch die Basenpaarungen von Adenin und Thymin (A-T) bzw. Cytosin und Guanin (C-G) zusammen. Diese Hybridisierung erfolgt bei definierten Salzkonzentrationen und Temperaturen.

In diesem Zusammenhang spielt die Schmelztemperatur der DNA  $T_m$  eine besondere Rolle. Sie ist als die Temperatur definiert, bei der die Hälfte einer doppelsträngigen DNA in Einzelstränge dissoziiert vorliegt. Durch sie wird die Stabilität eines Doppelstranges bestimmt. Je stabiler der Zustand der DNA, desto höher ist  $T_m$  und desto mehr Energie muss folglich aufgewendet werden, um die Doppelhelix zu trennen.

$T_m$  wird von verschiedenen Faktoren bestimmt:

1. Stranglänge:

Je länger ein DNA-Fragment ist, desto mehr Wasserstoffbrückenbindungen sind zwischen den Basen beider Stränge vorhanden und desto stabiler ist das Fragment.  $T_m$  steigt demnach mit steigender Stranglänge.

#### 2. Basenzusammensetzung:

Die Schmelztemperatur  $T_m$  nimmt mit steigendem GC-Gehalt zu, da zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, während zwischen Adenin und Thymin nur zwei vorhanden sind.

#### 3. Chemisches Umgebungsmilieu:

Formamid destabilisiert die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Nukleotiden und setzt dadurch die Schmelztemperatur herab. Monovalente Kationen hingegen erhöhen die Schmelztemperatur durch Stabilisierung der DNA-Doppelstränge.

Damit besteht die Möglichkeit, die Bedingungen für die Hybridisierung optimal einzustellen. Durch die Zugabe von 5  $\mu$ l deionisiertem Formamid wird die Schmelztemperatur gesenkt, so dass die Denaturierung bei 72-75 °C durchgeführt werden kann. Die Stringenz steigt demnach mit zunehmender Formamidkonzentration und abnehmender Salzkonzentration.

Durch das Hinzufügen von 5  $\mu$ l eines Mastermixes, der Dextransulfat enthält, werden sowohl die Hybridisierungsraten als auch die Hybridisierungsempfindlichkeit erhöht (Ibelgaufts 1993). Das Dextransulfat als ein inertes Polyanion fungiert als Matrix und bewirkt durch die lokale Erhöhung der Sondenkonzentration eine höhere Hybridisierungsgeschwindigkeit, ohne dass die Genauigkeit der Basenpaarungen, die Stringenz, beeinträchtigt wird.

Das Standardprotokoll sah ein Preannealing für 30-45 min bei 37°C vor. Nach Ablauf der Preannealing-Zeit wurde der Hybridisierungsmix auf die eingezeichnete Region der vorbehandelten Chromosomenpräparate gegeben, mit einem Deckglas (DG) eingedeckt und mit Fixogum abgedichtet.

#### 2.9.4 Stringenzwaschschritte und Antikörpernachweis

Während der auf die Hybridisierung folgenden Stringenzwaschschritte werden eventuell fehlgepaarte sowie unspezifisch auf der Glasoberfläche des OT gebundene Sonden entfernt und damit eine kontrastreichere Chromosomendarstellung erreicht. Die unspezifischen Proteinbindungsstellen wurden durch das Blocken mit Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) abgesättigt. Die Darstellung der markierten DNA erfolgte über die Reaktion mit Antikörpern und Reportern. Diese variierte je nachdem, ob eine indirekte oder direkte Markierung vorangegangen war.

Beim Nachweis nach indirekter Markierung detektierte ein primärer Reporter, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppeltes Avidin, die biotinylierte Test-DNA. Das Avidin wies vier Bindungsstellen für Biotin auf, so dass nach der Bindung vernetzte Komplexe entstanden. Einen signalverstärkenden Effekt hatte der Antikörper, der gegen das Avidin gerichtet war und außerdem die Reportergruppe Biotin trug. Durch die im dritten Schritt erneute Zugabe von Avidin-FITC wurde eine weitere Signalverstärkung erreicht. Die in der *Nick-Translation* mit Digoxigenin markierte Kontroll-DNA wurde zunächst mit einem Maus-Anti-Dig-Antikörper gekoppelt, der wiederum von Anti-Maus-TRITC gebunden wurde. Eine verkürzte Version dieses Nachweises beschränkte sich auf Inkubation mit einer Nachweislösung, die FITC-gekoppeltes Avidin und Anti-Dig-Rhodamin enthielt.

Nach direkter Markierung während der *Nick-Translation* folgten nach der Hybridisierung Waschschritte und die Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI.

Protokoll:

- Objektträger aus der Hybridisierungskammer nehmen
- Fixogum und Deckglas entfernen
- Objektträger in 2x SSC (37 °C) 10 min auf dem Schüttler waschen
- 2x 7 min in 0,2x SSC (53 °C) waschen
- Kurz in 4x SSC / Tween 20 äquilibrieren
- 30 min Inkubation mit 150 µl Blockinglösung in einer feuchten Kammer bei 37 °C
- Kurz in 4x SSC / Tween 20 äquilibrieren
- 30 min Inkubation mit 150 µl Lösung I in einer feuchten Kammer bei 37 °C
- 3x 5 min mit 4x SSC / Tween 20 (45 °C) auf dem Schüttler waschen
- 45 min Inkubation mit 150 µl Lösung II in einer feuchten Kammer bei 37 °C
- 3x 5 min mit 4x SSC / Tween 20 (45 °C) auf dem Schüttler waschen
- 30 min Inkubation mit 150 µl Lösung III in einer feuchten Kammer bei 37 °C
- 3x 5 min mit 4x SSC / Tween 20 (45 °C) auf dem Schüttler waschen
- 10 min Inkubation mit 150 µl Biotinlösung in einer feuchten Kammer bei 37 °C
- 5 min mit 4x SSC / Tween 20 (45 °C) auf dem Schüttler waschen
- Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI

Verkürztes Protokoll:

- Objektträger aus der Hybridisierungskammer nehmen

- Fixogum und Deckglas entfernen
- Objektträger in 2x SSC (37 °C) 10 min auf dem Schüttler waschen
- 2x 7 min in 0,2x SSC (53 °C) waschen
- kurz in 4x SSC / Tween 20 äquilibrieren
- 30 min Inkubation mit 150 µl Blockinglösung in einer feuchten Kammer bei 37 °C
- kurz in 4x SSC / Tween 20 äquilibrieren
- 30 min Inkubation mit 150 µl Lösung I in einer feuchten Kammer bei 37 °C
- 3x 5 min mit 4x SSC / Tween 20 (45 °C) auf dem Schüttler waschen
- Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI

### 2.9.5 Mikroskopische Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung der chromosomalen CGH- und FISH-Analysen erfolgte an einem DM LB Mikroskop der Firma Leica mit der Software Leica CW 4000. Im Fluoreszenzmikroskop wurde der für jedes Fluorochrom benötigte Anregungs- und Emissionsfilterblock automatisch vorgewählt und mit Hilfe eines Photometrics Sensys 1400-Kamerasystems, einer digitalisierenden CCD-Kamera (*charged coupled device*) je ein monochromatisches Fluoreszenzbild für die FITC-, TRITC- und DAPI-Färbung aufgenommen. Diese Daten wurden durch die Leica CW 4000 Software automatisch ausgewertet. Für die chromosomale CGH wurde das durchschnittliche Verhältnis der roten und grünen Fluoreszenz für jedes Chromosom bestimmt und normalisiert. Falsche Ergebnisse, die durch eventuelle Intensitätsunterschiede zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen entstehen könnten, wurden dadurch vermieden (Piper *et al.* 1995). Für die Auswertung der chromosomalen CGH wurden mindestens 15 Mitosen pro getesteter DNA-Probe aufgenommen und karyotypisiert. Die Identifizierung der einzelnen Chromosomen wurde durch die Bänderung im DAPI-Bild ermöglicht.

Sowohl die Chromosomenachsen, als auch die Lage des Zentromers wurden definiert. Das von der Software erstellte Durchschnittsprofil für ein Experiment setzte sich aus den Einzelprofilen zusammen. Die Einzelprofile für jedes Chromosom in jeder Mitose zeigten keinen identischen Verlauf entlang der Chromosomenachse, so dass Mittelwerte für jedes Chromosom aus den Profilen der karyotypisierten Mitosen erstellt wurden. Einzelprofile, die einen extremen Ausschlag aufgrund von Ungenauigkeiten in der Hybridisierung zeigten, wurden nicht berücksichtigt. Das Konfidenzintervall gab den Bereich um den errechneten Mittelwert an, in dem sich 95 % aller Intensitätswerte der Einzelprofile befanden.

War eine DNA-Sequenz der Test-DNA amplifiziert, hybridisierte diese häufiger an dem entsprechenden Chromosom. Im Fluoreszenzmikroskop überwog dann das FITC-Fluorochrom. Das

erstellte Profil zeigte einen Ausschlag nach rechts und wies auf einen Zugewinn hin. Je stärker ein Chromosom bzw. ein Chromosomenbereich amplifiziert war, desto weiter wich das Einzelprofil von der Mittelwertachse ab. Ein Verlust in der Test-DNA erschien, wenn das TRITC-Fluorochrom vorherrschte. In diesem Fall wies das Profil einen Ausschlag nach links auf.

## 2.10 Präparation der FISH-Sonden

### 2.10.1 Ausstreichen der Klone auf Agarplatten

Die Klone wurden unter sterilen Bedingungen ausgestrichen. Die bakteriellen Klone aus Libraries, die in *bacterial artificial chromosomes* (BACs) kloniert wurden (RPCI-11, -13 (*Roswell Park Cancer Institute*, Buffalo, USA), und CTA, CTB, CTC, CTD (*California Institute of Technology*, Pasadena, USA)), wurden auf Medium ausgestrichen, dem das Antibiotikum Chloramphenicol zugesetzt wurde. Die Klone aus Libraries, die in *P1-derived artificial chromosomes* (PACs) kloniert wurden (Libraries RPCI-1, -3, -4, -5, -6), wurden auf Medium mit Kanamycin ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### 2.10.2 Midipräparation

Einzelkolonien wurden von den Agarplatten gepickt, in 50 ml flüssiges Kulturmedium (LB-Medium) übertragen und über Nacht bei 37 °C im Inkubator bis zur Sättigung wachsen gelassen. Die Bakterienkulturen wurden in Zentrifugationsröhrchen überführt und 20 min bei 4 °C und 4000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 1,2 ml der Lösung 1 resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 3,6 ml Lösung 2, es wurde vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 30 min bei 4000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand in ein neues Röhrchen überführt worden war, wurde erneut zentrifugiert (15 min, 4000 Upm, 4 °C). Wiederum wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und 5 ml Isopropanol hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Nach der folgenden Zentrifugation (30 min, 4000 Upm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Pellets 5 min luftgetrocknet. Die Pellets wurden in 600 µl TE-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Dieses wurde 3 min bei 65 °C inkubiert und nach Zugabe von 600 µl 4M Ammoniumacetat für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 13000 Upm, RT). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und 720 µl hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (10 min, 13000 Upm, 4 °C), wurde der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets bei RT wurde es in 40 µl

TE-Puffer aufgenommen. Um die RNA zu verdauen, wurde 1 µl RNase (10 mg/ml) zugefügt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die DNA Qualität und Quantität wurde mittels einer Agarose-Gel-Elektrophorese kontrolliert.

### 2.11 X-Inaktivierungsuntersuchung

In der vorliegenden Arbeit wurden in zwei Fällen X-Inaktivierungsuntersuchungen an Lymphozyten aus peripherem Blut durchgeführt. Zum einen an den Chromosomen der Mutter des Patienten 18/02 (Projekt: Patienten mit ungeklärter mentaler Retardierung) und zum anderen an den Chromosomen der Patientin MA (Projekt: Patienten mit ungeklärten syndromalen Nephropathien).

Für die Untersuchung wurde zunächst BrdU (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, U.S.A.) in die Chromosomen eingebaut, danach erfolgte die Färbung mit Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich Corp.) nach Standardprotokollen, um das aktive und das inaktive X-Chromosom unterscheiden zu können. Es folgte eine FISH, die das derivative X-Chromosom mit der Deletion identifizierte. 100 Mitosen wurden jeweils ausgewertet.

### 2.12 Array-basierte CGH

Die Entwicklung der Array-CGH (Solinas-Toldo *et al.* 1997; Pinkel *et al.* 1998) stellte einen wichtigen Entwicklungsschritt dar, da die Array-CGH verglichen mit der chromosomalen CGH genomische Imbalancen mit einer höheren Auflösung detektieren kann. Die Metaphasepräparate der konventionellen CGH werden hier durch DNA-Klone als Ziel-DNA ersetzt. Diese DNA-Fragmente bekannter Lokalisation werden auf einen Objektträger gespottet und auf diesem immobilisiert. Diese Technik kombiniert den Vorteil der CGH, d.h. den Vergleich von zwei Genomen hinsichtlich ihrer Kopienzahlunterschiede in einem Experiment und die Präzision, die zuvor nur mit der FISH-Analyse mit *Single Copy*-Sonden erreichbar war.

Sowohl die Test- als auch die Kontroll-DNA werden vor der Hybridisierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zusammen mit unmarkierter humaner Cot-1-DNA auf den DNA-Chip hybridisiert. Nach der Detektion wird die Fluoreszenzintensität beider Fluorochrome jedes einzelnen Klons errechnet. Dadurch können mögliche Gewinne und Verluste des Testgenoms mit einer hohen Auflösung detektiert werden. Die Größe und die genomische Verteilung der Klone stellen die limitierenden Faktoren da.

Der erste DNA-Chip mit einer genomweiten Auflösung wurde 2001 beschrieben (Snijders *et al.* 2001). Dieser DNA-Chip enthielt 2300 *large insert* Klone (hauptsächlich BACs) und bot eine durchschnittliche Auflösung von 1,4 Mb. Ein nächster Array enthielt 3000 *large insert* Klone („1 Mb clone set“), die das humane Genom mit einer durchschnittlichen Auflösung von 1 Mb abdecken (Fiegler *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die Array-CGH mit DNA-Chips durchgeführt, die 6000 (6k-Array), 8000 (8k-Array) oder 10600 (10,6k-Array) *large insert* Klone enthielten. Diese DNA-Chips werden im Folgenden erläutert.

### 2.12.1 Konstruktion und Herstellung der DNA-Chips

Die DNA-Chipherstellung erfolgte in der Abteilung von Peter Lichter am Deutschen Krebsforschungszentrum (Heidelberg, Deutschland). Diese Gruppe beschrieb im Jahre 1997 als Erste diese Technik und benannte sie Matrix-CGH (Solinas-Toldo *et al.* 1997). BACs machen den größten Teil der *large insert* Klone dieser genomischen DNA-Chips aus. Für diese Studien wurden drei Generationen von DNA-Chips verwendet, die 6 k-, die 8 k- und die 10,6 k-Arrays. Die Namen lassen auf die annähernde Anzahl der Klone des jeweiligen DNA-Chips schließen.

Der 6 k-Array enthielt 6437 *large insert* Klone.

- 3,428 Klone des 1 Mb Klonsset von Dr. N.P. Carter, Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK (Fiegler *et al.* 2003)
- Annähernd 2000 regionspezifische Klone (spezifisch für chromosomale Regionen, die mit der Tumorgenese in Zusammenhang stehen).
- Annähernd 1000 genspezifische Klone (spezifisch für Gene, die mit der Tumorgenese in Zusammenhang stehen, insbesondere Onkogene und Tumorsuppressorgene).

Der 8 k-Array enthielt 8049 *large insert* Klone.

- 3428 Klone des 1 Mb Klonsset von Dr. N.P. Carter, Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK (Fiegler *et al.* 2003)
- Annähernd 2000 regionspezifische Klone (spezifisch für chromosomale Regionen, die mit der Tumorgenese in Zusammenhang stehen).
- Annähernd 2000 genspezifische Klone (spezifisch für Gene, die mit der Tumorgenese in Zusammenhang stehen, insbesondere Onkogene und Tumorsuppressorgene).
- 2000 Klone, die auf den Chromosomen 1p und 1q, 19 und 22q lokalisiert sind und eine *tiling-path* Abdeckung dieser großen GC-reichen und genreichen Regionen gewährleisteten.

Die Auflösung der DNA-Chips variiert abhängig von der jeweiligen Klonabdeckung in den verschiedenen chromosomalen Regionen. Das 1 Mb-Klonset liefert eine gesamtgenomische Auflösung von ca. 1 Mb, während für die chromosomalen Loci um viele Tumorsuppressorgene und Onkogene herum und für große Teile der Chromosomen 1 und 19 Klone ausgewählt wurden, die eine *tiling-path*-Abdeckung ermöglichten und somit eine durchschnittliche Auflösung von besser als 0,5 Mb erreicht werden konnte.

Der 10,6 k-Array wurde um weitere 2200 Klone erweitert, die die Auflösung der zentromernahen Bereiche und die Subtelomerbereiche erhöhen sollten. Außerdem wurden Regionen, die für Mikrodeletions- und Mikroduplikationssyndrome bekannt sind, mit höherer Auflösung abgedeckt.

Zum größten Teil basiert die DNA-Chipherstellung auf dem *Sanger Institute* Protokoll (Fiegler *et al.* 2003; Fiegler *et al.* 2007). Alle *large insert* Klone wurden als Stocks in 50 % Glycerol gelagert, Midipräparationen wurden durchgeführt und die DNA wurde mittels DOP-PCR (mit den Primern DOP1, DOP2 und DOP3 (Fiegler *et al.* 2003)) amplifiziert. Die Amplifikation der Ziel-DNA folgte mit einer zweiten PCR (*amino-linking PCR*). Nach der PCR-Amplifikation wurde die DNA in Spottingpuffer verdünnt und alle Produkte in 384-well-Platten bis zum Spotten der DNA-Chips mit einem Omnigridd Spotting Roboter (GeneMachines Inc., San Carlos, CA, USA) gelagert. Jeder Klon wurde in drei Triplikaten auf Nexterion Slide E Microarray Chips gespottet (Schwaenen *et al.* 2004). Nach dem Spotten wurden die DNA-Chips luftgetrocknet, durch UV-Licht mit dem Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA, USA) auf der Objektträgeroberfläche fixiert und für eine Stunde bei 60 °C gebacken. Danach können die DNA-Chips für die Array-CGH verwendet und bei Dunkelheit und Trockenheit mindestens sechs Monate gelagert werden.

### **2.12.2 Probenmarkierung mittels *Random Priming***

Diese Methode zur Markierung von DNA (und RNA) basiert auf dem Gebrauch einer Mischung aus Oligonukleotidprimern mit einer Länge von 6 bis 12 Basenpaaren. Diese Basen liegen in allen möglichen Kombinationen vor (Feinberg und Vogelstein 1983, 1984). Nach der Denaturierung der Test-DNA werden das Klenow-Fragment, das große Fragment der DNA-Polymerase, die *Random Primer* und markierte sowie unmarkierte Nukleotide (dNTPs) zugefügt. Die Nukleotide können entweder biotinyliert oder mit Cy-Farbstoffen markiert sein. Die Random Primer annealen an ihre zugehörigen komplementären Sequenzen der einzelsträngig vorliegenden Test-DNA, so dass das Klenow-Fragment einen komplementären DNA-Strang in 5'→3'-Richtung synthetisiert. Durch den Einbau der markierten Nukleotide wird eine effektive Markierung erreicht. Neben der Markierung



wird eine 10- bis 40-fache Amplifikation erreicht. Um sowohl die Test- als auch die Kontroll-DNA zu markieren, wurden je 500-1000 ng in den Random Priming-Ansatz eingesetzt.

Die Kontroll-DNA Pools wurden aus DNA von normalen Individuen generiert (10 gesunde Frauen, bzw. 10 gesunde Männer). Die Hybridisierung erfolgte geschlechts-matched. Die Test-DNA wurde Cy3 gelabelt, die Kontroll-DNA mit Cy5. Das Random-Priming erfolgte nach folgendem Protokoll:

500-1,000 ng DNA

36  $\mu$ l 2,5x Random primer-Lösung

32  $\mu$ l 5 M Betain

Auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 77,4  $\mu$ l.

Der Ansatz wurde für 10 min auf 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Folgende Reagenzien wurden auf Eis hinzugefügt:

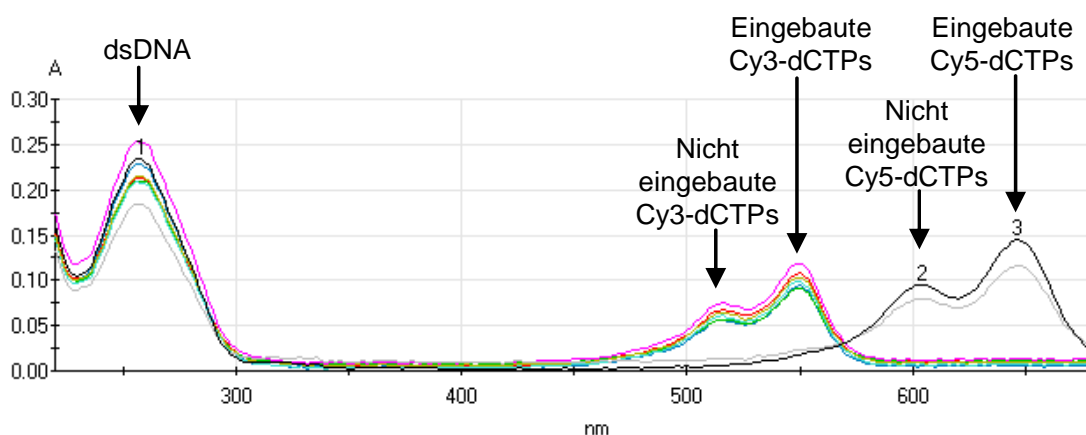
9  $\mu$ l dNTP-mix

1,8  $\mu$ l Cy3-dCTP bzw. 1,8  $\mu$ l Cy5-dCTP

1,8  $\mu$ l Klenow-Fragment

Dieser Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 16 h bei 37 °C inkubiert.

Die Proben wurden mit MicroCon YM30 Säulen (Microcon, Millipore 42411) aufgereinigt und Nukleotide, die nicht eingebaut wurden, entfernt. Die MicroCon Säulen wurden gemäß der Anleitung verwendet. Die markierte DNA wurde in 100  $\mu$ l 0,1x SSC eluiert und sowohl die DNA-Menge als auch der Farbstoffeinbau durch die Spektrophotometermessung bestimmt. Die Absorptionsraten bei 260 nm (DNA), 550 nm (Cy3) und 650 nm (Cy5) wurden für jede Probe berechnet.



**Abbildung 1.** Spektrophotometer-Messung zur Bestimmung des DNA-Gehalts und der Einbauraten der markierten Nukleotide

Die DNA-Menge wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{A^{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g}}{1000 \mu\text{l}}$$

Die Einbaurate für Cy3-dCTP konnte gemäß folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Cy3-dCTP-Einbaurate} \left[ \frac{\text{dye}}{\text{bp}} \right] = \frac{A^{260}}{A^{550}} \times 23.15$$

Der optimale Wert für die Cy3-dCTP Inkorporation lag bei einem markierten Nukleotid pro 40 Basenpaare, aber das Experiment gelang auch bei einem Einbau eines markierten Nukleotids pro 60 bis 80 Basenpaare.

Die Einbaurate für Cy5-dCTP konnte gemäß folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Cy5-dCTP-Einbaurate} \left[ \frac{\text{dye}}{\text{bp}} \right] = \frac{A^{260}}{A^{650}} \times 38.58$$

Der optimale Wert für die Cy5-dCTP Inkorporation lag bei einem markierten Nukleotid pro 60 Basenpaare, aber das Experiment gelang auch bei einem Einbau eines markierten Nukleotids pro 80 bis 100 Basenpaare.

### 2.12.3 Array-CGH Probenherstellung

Gleiche Mengen Test- und Kontroll-DNA (je ~10-15 µg) wurden mit annähernd 120 µg humaner Cot-1-DNA, 1/10 des Volumens Natriumacetat und 2,5-faches Volumen 100 % Ethanol für mindestens 30 min bei -70 °C präzipitiert und anschließend 30 min bei 4 °C und 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 125 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und für mindestens 1 h bei 40 °C oder über Nacht bei 37 °C gelöst.

### 2.12.4 Array-CGH Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurde die DNA für 10 min bei 75 °C denaturiert und für 40-60 min bei 37 °C preannealt. Die DNA wurde auf die DNA-Chips gegeben, die zuvor in die vorgesehenen Module der Hybridisierungskammer HybArray12 (Perkin Elmer, PerkinElmer, Beaconsfield, UK) eingelegt worden waren. Diese Anordnung ermöglichte eine simultane Hybridisierung von bis zu zwölf DNA-Chips. Das Protokoll der Hybridisierung und der stringenten Waschung durchlief folgende Schritte:

Zweck	Temperatur	Dauer
Denaturierung der DNA Chips	75° C	5 min
Zugabe der Proben	42° C	
Verteilen der Proben auf den DNA-Chips	42° C	30 min
Hybridisierung	37° C	62 h
Waschen der DNA-Chips (2x SSC/ 0,05 % Tween20)	37° C	30 s Spülen, 5 s Halten
Waschen der DNA-Chips (2x SSC/ 0,05 % Tween20)	44° C	15 s Spülen, 5 s Halten
Waschen der DNA-Chips (50 % Formamid/ 2x SSC / 0,1%Tween20)	44° C	20 s Spülen, 3 min Halten
Waschen der DNA-Chips (2x SSC/ 0,05 % Tween20)	44° C	20 s Spülen, 5 s Halten
Waschen der DNA-Chips (1x PBS)	25° C	2 min Spülen, 5 s Halten

**Tabelle 1:** Protokoll der Array-CGH

### 2.12.5 Vorbereitung der DNA-Chips zum Scannen

Nachdem die Stringenzwaschschritte beendet waren, wurden die DNA-Chips aus der Hybridisierungskammer entnommen und direkt für wenige Sekunden in den Waschpuffer C getaucht. Zum Trocknen wurden die DNA-Chips in einem 50 ml Falconröhrchen bei 1500 upm für zwei Minuten abzentrifugiert, um sie danach mit einer Antifadinglösung (DyeSaverII) zu benetzen.

### 2.12.6 Scannen der DNA-Chips

Die DNA-Chips wurden mit dem Dual Laser Scanner GenePix 4000B (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) gescannt. Dieser scannt simultan sowohl in der Wellenlänge 532 nm, welche die Cy3-Markierung detektiert und für die Cy5-Markierung in der Wellenlänge 635 nm. Der Scanner nutzt die Software Genepix 6.0.

Zunächst wird ein sog. *Prescan* mit einer Auflösung von 50 µm durchgeführt, um die hybridisierte Region auf dem DNA-Chip zu bestimmen. Diese Region wird danach mit einer höheren Auflösung von 10 µm gescannt. Dieses Bild wird als *multi-image* tiff-Datei gespeichert.

### 2.12.7 Datenverarbeitung mit Genepix 6.1

Die tiff-Datei wurde mit der Software Genepix 6.1 analysiert. Im ersten Schritt wurde eine *gal (genepix array list)*-Datei hochgeladen, die die Information zum DNA-Chip-Design enthält, wie z.B. die Anzahl der gespotteten Blöcke, die Anzahl und Lage der Spots, den Spotdurchmesser und den Namen des Klons jedes Spots. Nachdem die Softwareschablone hochgeladen wurde, die jeden individuellen Spot des DNA-Chips erkennen sollte, wurde dieses überprüft und manuell korrigiert.

Diese für jeden DNA-Chip individuellen Settings werden als *gps (genepix settings)*-Datei gespeichert.

### 2.12.8 Generierung der primären log-Ratio Daten

Nachdem die tiff-Datei hochgeladen und die *gps*-Datei generiert wurde, kann durch die Analyse der in der *gps*-Datei enthaltenen Informationen zu jedem definierten Spot eine *gpr (genepix result)*-Datei erstellt werden. Folgende Informationen sind aus der *gpr*-Datei für jeden Spot abzulesen: Lage des Spots (Block, Spalte, Reihe), chromosomale Lokalisation, Spotname und Spotdurchmesser.

<b>635 nm:</b>	<b>532 nm:</b>
F635 Median	F532 Median
F635 Mittelwert	F532 Mittelwert
F635 SD	F532 SD
F635 CV	F532 CV
B635 Median	B532 Median
B635 Mittelwert	B532 Mittelwert
B635 SD	B532 SD
B635 CV	B532 CV

**Tabelle 2.** Inhalte der *gpr*-Datei

F, Vordergrund; B, Hintergrund; SD, Standardabweichung; CV, Reproduzierbarkeit

### 2.12.9 Datenanalyse

Für die weitere Datenanalyse stand das ChipYard-Programm zur Verfügung. Dieses ist ein über das Internet verfügbares Programm für die Datenanalyse von DNA-Chips (<http://www.dkfz.de/genetics/ChipYard/>). Die Daten der hybridisierten DNA-Proben und die Patienteninformationen wurden in diese Datenbank eingefügt und die DNA-Chipdaten wurden als *gpr*-Dateien hochgeladen. Es folgten Qualitätskontrollen der DNA-Chipdaten, Herausfiltern der Spots mit zu geringer Qualität, Berechnung des Test/Kontroll-Verhältnisses jedes Spots, Berechnung der Spotintensität/Hintergrundintensitätsverhältnisses und die Datennormalisierung. Die Datenausgabe unserer Analyse erfolgte als *txt*-Datei, die die Information für jeden Klon auf dem DNA-Chip einschließlich der Klonposition (Startpunkt, Endpunkt und Mittelpunktbasenpaarung des Klons), des Gengehalts und das normalisierte  $\log_2$  Test/Kontroll-Verhältnis für jeden Klon (Durchschnittswert für jedes Triplikat) enthielt.

### 2.12.10 Dateninterpretation

Um die generierten Daten in vollem Umfang auswerten zu können, wurden Informationen über die Klone aus vorhandenen Datenbanken abgerufen und in einer Klonliste zusammengefasst, die es ermöglichte, abweichende Klone eines Array-CGH-Experiments zu bewerten. Diese erstellte Klonliste enthielt die Ergebnisse aus FISH-Experimenten, die in unserem Institut durchgeführt worden sind. Einige der untersuchten Klone zeigten Kreuzhybridisierungen (mehrfaches Binden der Sonde auf verschiedenen Chromosomen) oder waren auf dem falschen Chromosom lokalisiert. Außerdem wurden die Informationen aus anderen Zentren weltweit in die Klonliste integriert. Dazu diente die Homepage des *National Center for Biotechnology, U.S. National Library of Medicine*, Bethesda, USA (Cheung *et al.* 2001) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/cyto/hbrc.shtml>), die regelmäßig aktualisiert wird. In diese Datenbank fließen die Daten aller diesbezüglich informativen Publikationen ein. So werden polymorphe Klone beschrieben, die bei gesunden Kontrollpersonen Abweichungen zeigen oder Klone, die mit solchen Regionen überlappen. Eine Übersicht dieser varianten Loci gibt die „*Database of genomic variants*“ (<http://projects.tcag.ca/variation/>). Der Betreiber dieser Datenbank ist das *Centre of Applied Genomics*, Toronto, Canada und basiert auf der Publikation von Iafrate *et al.* (Iafrate *et al.* 2004). Mittlerweile enthält diese Datenbank Informationen aus 31 Publikationen, über 21178 Kopienzahlvarianten, von denen 6558 Loci das humane Genom betreffen.

### 2.13 MLPA-Analysen zur Kopienzahlbestimmung

Um die *DCX* Kopienzahl der Patientin MA und ihrer Eltern zu bestimmen, wurde eine *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) (SALSA MLPA kit P061 Lissencephaly; MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) durchgeführt. Das Probenset bestand aus *DCX* Zielproben aus verschiedenen Exons dieses Gens. 37 weitere Proben für andere Sequenzen auf anderen Chromosomen dienten als Kontrollen. Eine dieser Proben war Y-Chromosom-spezifisch. Die MLPA-Analyse wurde nach dem Protokoll der Hersteller durchgeführt. 75 ng genomischer DNA werden in 5 µl TE-Puffer 5 min bei 98 °C denaturiert und über Nacht bei 60 °C mit den MLPA-Proben hybridisiert. Die hybridisierten Produkte wurden bei 54 °C für 15 min ligiert, mittels PCR (30 Zyklen) amplifiziert und die PCR-Fragmente auf einem ABI 3100 Kapillarsequenzierer aufgetragen. Die Daten werden mit GeneMapper, Version 4.0 Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) ausgewertet und die Gendosis wird mit Coffalyser V4 Programm (MRC-Holland) bestimmt. Wurde der „*population normalization*“ Modus genutzt, werden die Peakhöhen auf der

Basis der Medianhöhen aller Peaks (Test und Kontrollen) normalisiert. Die normalisierten Peakhöhen werden mit den Peaks der (mindestens vier) normalen Proben verglichen. Es wurden Standardanalyseparameter genutzt, die eine Peakhöhe von unter 0,75 als Deletion identifizierten.

### 2.14 Statistische Analysen

Die Vergleiche zwischen Gruppen wurden je nach Eignung mittels Fisher's Exact Test, t-Test oder Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

### 2.15 Molekulargenetische Untersuchungen

Die genomische Struktur von *TCF4* wurde mit Hilfe der humanen cDNA-Sequenz aus der GenBank (NM\_003199.1) erstellt. Alle kodierenden Exons und Splice Stellen wurden mittels Standard-PCR an genomischer DNA amplifiziert und anschließend bei Patientin AC mit Pitt-Hopkins-Syndrom, ihren Eltern und weiteren 46 Patienten mit idiopathischer MR sequenziert. Die Sequenzen wurden mit dem Eintrag der Genbankeintrag NM\_003199 und zusätzlichen genomischen Daten verglichen. Aus den Lymphozyten der Patientin AC und ihrer Eltern wurde mittels „*PAXgene blood RNA Kit*“ gemäß der Anleitung RNA isoliert und mit dem „*OneStep RT-PCR Kit*“ (beide: Qiagen, Hilden, Deutschland) cDNA synthetisiert. Mit den Primern (Vorwärtsprimer: 5'-tgcaagacacgaaatcttcgg-3', Rückwärtsprimer: 5'-atacagctgtaaggaagtgg-3'), die in den Exons 17 und 20 lokalisiert waren, wurde aus der RNA der Patientin ein 497 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert, welches den SNP rs8766 (lokalisiert in Exon 19) enthielt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Reproduktionsgenetik

#### 3.1.1 Etablierung eines Schnell-CGH Protokolls

Die Durchführung des Standardprotokolls für chromosomale CGH unseres Labors nimmt 76 h in Anspruch (Weber *et al.* 1996). Mit dem Ziel ein Schnell-CGH-Protokoll für die Pränataldiagnostik und PGD zu etablieren, versuchten wir die Zeitdauer jedes Schrittes, der für die Analyse benötigt wird, zu reduzieren. Für diese Experimente nutzten wir DNA der Tumorzelllinie COLO 704 als Test-DNA, die sowohl Gewinne großer als auch kleiner Chromosomen enthält um zu untersuchen, ob diese Imbalancen nach verschiedenen Protokollveränderungen detektierbar sind. Zunächst reduzierten wir die Hybridisierungszeit, die längste Zeitspanne (64 h) des CGH-Standardprotokolls. Die Dauer der Hybridisierung wurde kontinuierlich verringert bis die geringste Zeitspanne erreicht war, die verlässliche Ergebnisse lieferte. Diese belief sich auf 6 h. Die beste Qualität der CGH-Profile wurde nach einer Hybridisierung in einem Thermomixer für Objektträger (OTs) (Eppendorf), der bei 300 Upm rotierte, erzielt. Die Ergebnisse waren besser als nach einer Hybridisierung im Wasserbad. Als nächsten Schritt testeten wir, ob wir zuverlässige Ergebnisse bei einer auf 6 h reduzierten Hybridisierungsdauer erhalten können, wenn die Markierung der DNA mit Nukleotiden erfolgt, die direkt mit Fluorochromen gekoppelt waren. Diese Nukleotide zu nutzen, hat den Vorteil, dass die Antikörper-Detektionsschritte nach der Hybridisierung entfallen und somit Zeit eingespart werden kann. Jedoch konnten durch diese direkte Markierung keine verlässlichen Ergebnisse erzielt werden. Daher wurden Nukleotide, die an einen Reporter (z.B. Biotin oder Digoxigenin) gekoppelt sind, in die DNA eingebaut. Somit waren eine *Nick-Translation* und ein Nachweis mit fluoreszenzgekoppeltem Avidin und anti-Digoxigenin-Antikörpern notwendig. Die Zeitspanne, die für diese Schritte notwendig war, konnte reduziert werden. Wir stellten fest, dass die *Nick-Translation* nach einer Inkubation von 30 min anstelle von zwei Stunden eine ausreichende DNA-Markierung lieferte. Außerdem wurde die Detektion nach einer Inkubation mit den Fluorochrom-konjugierten Molekülen ohne einen signalverstärkenden Schritt durchgeführt und führte zu CGH-Profilen hinreichender Qualität. Dadurch konnten die Stringenzwaschschritte und die Detektionsschritte von vier Stunden auf zwei Stunden verkürzt werden.

Die Resuspension der präzipitierten DNA nach der *Nick-Translation* konnte von einer Stunde auf 30 min verringert werden, wenn diese im Thermomixer (Eppendorf) bei 1300 Upm ablief. Die

minimale Zeit, die für das Preannealing der repetitiven Sequenzen nach der DNA-Denaturierung angesetzt werden musste, belief sich auf 30 min und konnte um 1,5 h reduziert werden. Die digitale Bildaufnahme und Auswertung von 15 Mitosen konnte in 1 h erfolgen. Insgesamt konnte das CGH-Protokoll von 76 h auf 12 h für die Fälle, in denen ausreichend DNA zur Verfügung stand, reduziert werden.

Für die Analyse von Einzelzellen wurden zwei zusätzliche Schritte benötigt. Zunächst war ein Proteinase K-Verdau von 40 min erforderlich, um die DNA aus der Zelle zu extrahieren. Danach musste eine universelle DNA-Amplifikation erfolgen, um eine ausreichende DNA-Menge für die CGH-Analyse zu generieren. Wir testeten verschiedene DNA-Amplifikationsprotokolle und evaluierten ihre Eignung. Das *single cell* PCR Protokoll nach Klein *et al.* (1999) beschrieb eine Methode, mit der die DNA einer Zelle amplifiziert und mit einem Fluorochrom-konjugierten Nukleotid mittels PCR markiert werden kann. Mit einer verkürzten Version dieser Methode konnten wir keine zuverlässigen Ergebnisse erzielen. Das *degenerate oligonucleotide primed* (DOP)-PCR Protokoll nach Telenius *et al.* (1992) ermöglicht eine DNA-Amplifizierung. Danach folgt eine Markierung mittels Nick-Translation. Mit diesem Protokoll und der reduzierten Hybridisierungszeit von 6 h konnten beständige und verlässliche CGH-Profile guter Qualität generiert werden. Um die Dauer der DNA-Amplifikationsschritte zu verkürzen, wurde die Anzahl der Zyklen reduziert bis das kürzeste DOP-PCR-Protokoll, das zu aussagekräftigen Ergebnissen führte, identifiziert wurde. Dieses Protokoll nahm eine Zeit von drei Stunden in Anspruch und bestand aus folgenden Schritten: 96 °C (5 min); 94 °C (1 min), 30 °C (1 min, 30 sec), 72 °C (3 min) (ramp 0,2) für 10 Zyklen; 94 °C (1 min), 62 °C (1 min), 72 °C (2 min, 30 sec) für 20 Zyklen gefolgt von einem finalen Schritt bei 72 °C für 7 min. Das Protokoll wurde für eine schnelle Einzelzellanalyse etabliert und wurde Schnell-CGH-Protokoll genannt. Es benötigte eine Zeitspanne von 16 h und wurde in Tabelle 3 in seinen einzelnen Schritten mit dem konventionellen CGH-Protokoll verglichen (Landwehr *et al.* 2007).

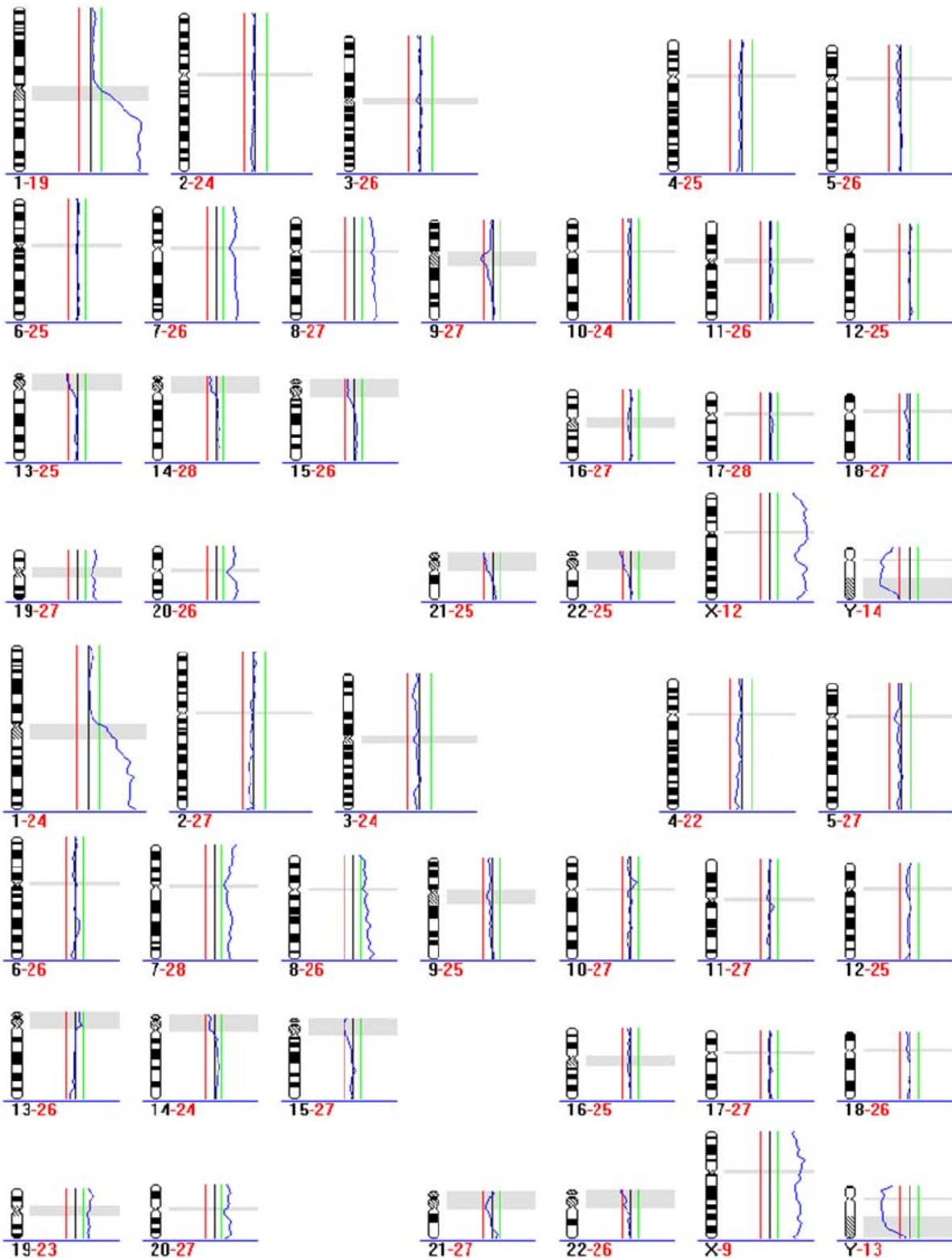


Protokoll	Standard CGH	Schnell-CGH
1. Proteinase K Verdau zur DNA-Extraktion	40 min	40 min
2. Universelle DNA Amplifikation mittels DOP-PCR	6 h	3 h
3. Photometermessung	5 min	5 min
4. DNA-Labeling mittels Nick-Translation	2 h	1 h
5. DNA Fällung	1 h	1 h
6. Lösen der DNA Vorbehandlung der Chromosomenpräparate	1 h	30 min
7. Denaturierung und Preannealing	2 h, 5 min	35 min
8. Hybridisierung	64 h	6 h
9. Stringenzwaschschritte und Antikörperdetektion	4 h	2 h
10. Aufnahme der Metaphasen und digitale Bildanalyse	2 h	1 h
Gesamtdauer (ohne Schritte 1 und 2)	~76 h	~12 h
Gesamtdauer für die Einzelzellanalyse (einschließlich der Schritte 1 und 2)	~83 h	~16 h

**Tabelle 3.** Vergleich der Dauer einzelner Schritte des Standard- und des Schnell-CGH Protokolls

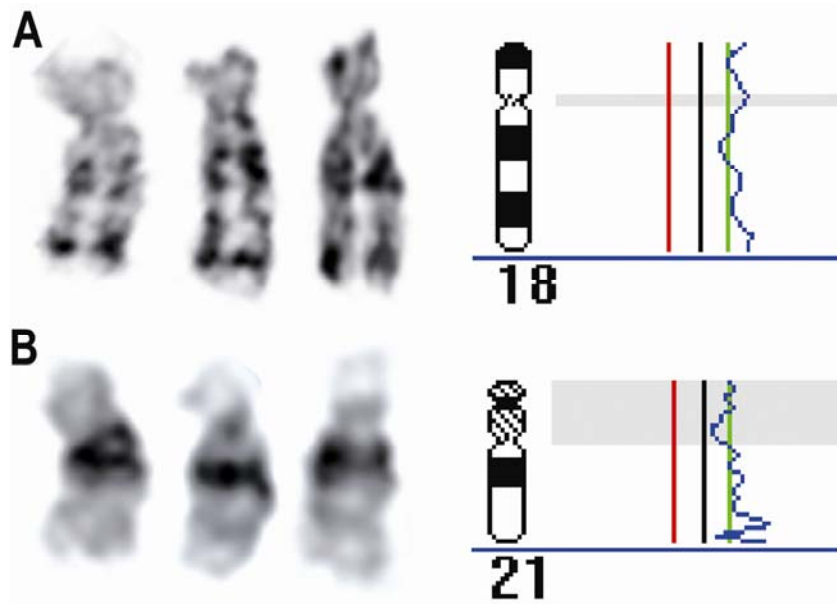
### 3.1.2 Validierung des Schnell-CGH Protokolls

Eine DNA-Probe der Zelllinie COLO 704, die annähernd äquivalent zu dem DNA-Gehalt einer Einzelzelle (5 pg) ist, wurde erfolgreich mittels Schnell-CGH analysiert. Alle uns durch die Analyse mit konventioneller CGH bekannten Zugewinne stimmten mit den Ergebnissen der Schnell-CGH überein (Abbildung 2).



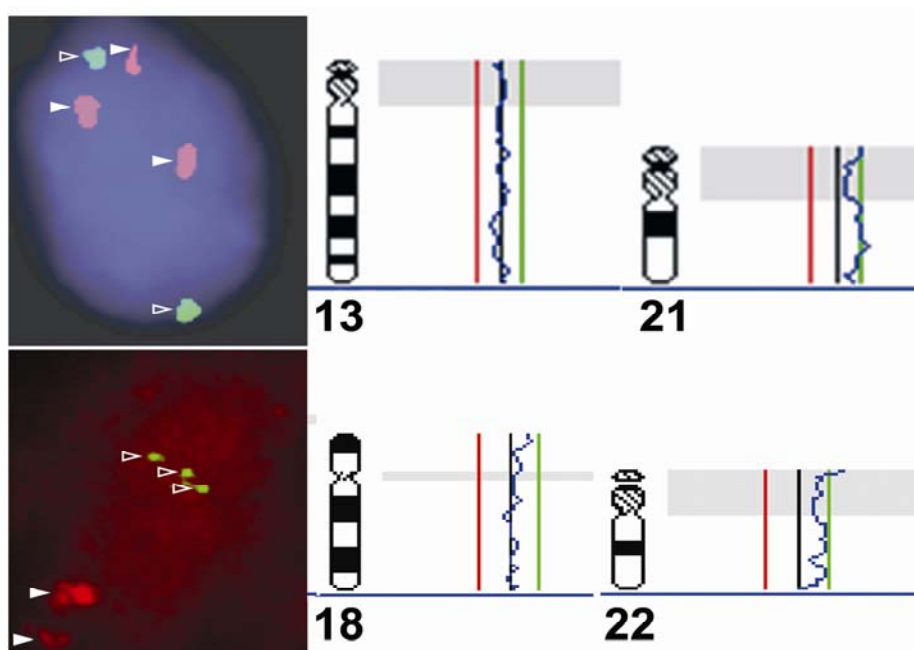
**Abbildung 2.** Etablierung und Validierung des Schnell-CGH-Protokolls. Chromosomale CGH-Profile nach Durchführung des Standard-CGH-Protokolls (oben) und des Schnell-CGH-Protokolls (unten) an DNA des Testsystems, der Ovarialadenokarzinom Zelllinie COLO 704, die Gewinne großer und kleiner Chromosomen sowie Gewinne von Chromosomenarmen aufweist. Gewinne der Chromosomen/Chromosomenarme 1q, 7, 8, 19, 20 wurden nach Durchführung des Schnell-CGH-Protokolls (unten) ebenso aussagekräftig detektiert wie nach Durchführung des Standard-Protokolls (oben).

Außerdem ermöglichte die Schnell-CGH einerseits die Detektion eines Gewinns von Chromosom 18 bei der Analyse von DNA aus einer einzelnen Fibroblastenzelle aus Abortmaterial mit bekannter Trisomie 18 und andererseits die Detektion eines Gewinns eines Chromosoms 21 bei der Analyse von DNA aus einer einzelnen Lymphozytenzelle von einem Patienten mit bekannter Trisomie 21 (Abbildung 3).



**Abbildung 3.** A: Mittels GTG-Bänderung detektierte Trisomie 18 in einer Fibroblastenkultur einer Achillessehnenbiopsie von einem abortierten Feten (links) und ein Gewinn von Chromosom 18 nach Analyse eines einzelnen Fibroblasten derselben Achillessehnenbiopsie mittels Schnell-CGH (rechts). B: Mittels GTG-Bänderung detektierte Trisomie 21 in einer Lymphozytenkultur von einem Patienten mit Down-Syndrom (links) und ein Gewinn von Chromosom 21 nach Analyse eines einzelnen Lymphozyten derselben Lymphozytenkultur mittels Schnell-CGH (rechts).

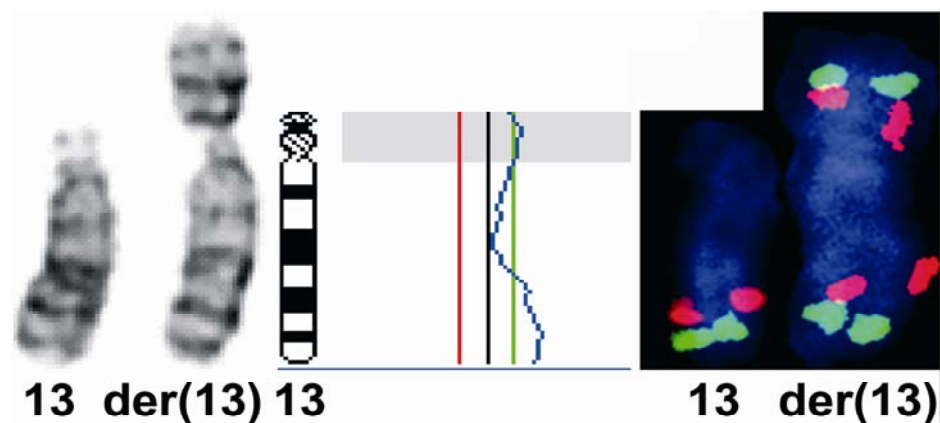
Der Gewinn eines Chromosoms 21 konnte ebenfalls mit der Schnell-CGH detektiert werden, nachdem ein Lymphozytenkern eines Patienten mit bekannter Trisomie 21, der auf einem OT fixiert war, mikrodiseziert worden war (Abbildung 4 oben). Ein Polkörper, der mittels FISH untersucht worden war und einen Zugewinn einer Chromatide von Chromosom 22 zeigte, wurde mikrodiseziert und ebenfalls mit der Schnell-CGH untersucht. Das Profil wies einen Zugewinn von Chromosom 22 auf (Abbildung 4 unten).



**Abbildung 4.** Oben: Analyse eines Lymphozytenkerns mit Trisomie 21 von einem Patienten mit Down-Syndrom mittels Interphase-FISH und Schnell-CGH. Links: FISH-Analyse eines Lymphozytenkerns, die drei Signale für Chromosom 21 (rot, ausgefüllte Pfeilspitzen) und zwei reguläre Signale für Chromosom 13 (grün, unausgefüllte Pfeilspitzen) zeigte. Rechts: Ein weiterer Lymphozytenkern von demselben Objektträger, an dem nach Mikrodisektion eine Schnell-CGH-Analyse durchgeführt wurde. Das Profil zeigte eine Verschiebung des Chromosom 21-Profiles nach rechts entsprechend einem Gewinn von Chromosom 21, während das Profil für Chromosom 13 balanciert war.

Unten: Konsekutive Analyse desselben Polkörperchens mit einer zusätzlichen Chromatide von Chromosom 22 mittels Interphase-FISH und Schnell-CGH. Links: Mittels FISH analysierter Polkörper zeigte drei Signale für Chromosom 22 (grün, unausgefüllte Pfeilspitzen) entsprechend einer zusätzlichen Chromatide und zwei reguläre Signale für Chromosom 18 (rot, ausgefüllte Pfeilspitzen). Rechts: Nach Mikrodisektion des Polkörperchens wurde eine Schnell-CGH-Analyse durchgeführt, die einen Gewinn von Chromosom 22 anzeigte, während das Chromosom 18-Profil balanciert war.

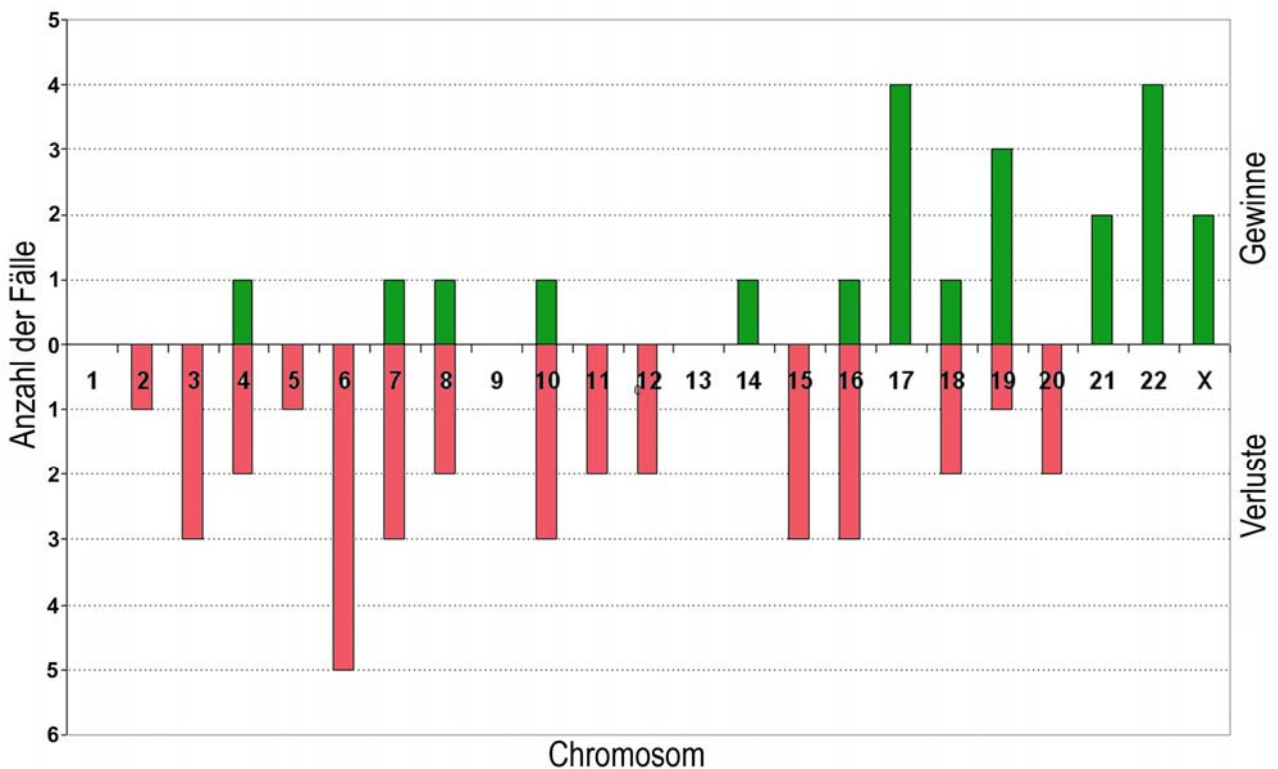
Weiterhin wurden 5 pg DNA aus peripherem Blut einer Patientin mit einer strukturellen Chromosomenaberration erfolgreich mittels Schnell-CGH analysiert. Eines der Chromosomen 13 zeigte zusätzliches Material im Bereich des kurzen Arms nach GTG-Bänderung (Abbildung 5). Mit Schnell-CGH konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem zusätzlichen Material um dupliziertes Material des distalen Chromosoms 13 handelt. Das Schnell-CGH Ergebnis wurde mittels FISH-Analyse mit zwei lokusspezifischen Proben aus der trisomen chromosomalen Region verifiziert.



**Abbildung 5.** Identifizierung des zusätzlichen Materials eines derivativen Chromosoms 13 einer Patientin mit MR mittels Schnell-CGH und Verifizierung mittels FISH. Links: GTG-Bänderung zeigte ein normales Chromosom 13 und ein derivatives Chromosom 13 mit zusätzlichem Material am kurzen Arm. Mitte: Schnell-CGH-Profil von Chromosom 13 zeigte einen partiellen Gewinn des distalen Chromosoms 13q. Das zusätzliche Material am kurzen Arm des derivativen Chromosoms 13 wurde daher als Material vom distalen, langen Arm des Chromosoms 13 identifiziert. Rechts: Das Schnell-CGH Ergebnis wurde mittels FISH-Analyse mit den Klonen RP11-120L14 (rot, 13q31.1) und RP11-430M15 (grün 13q33.1) verifiziert. Es waren Signale auf dem kurzen Arm des derivativen Chromosoms 13 und Signale in den erwarteten Banden auf dem langen Arm des Chromosoms 13 zu sehen. Im dargestellten CGH-Profil wurde der kurze Arm des akrozentrischen Chromosoms 13 schraffiert, um die repetitiven DNA-Sequenzen zu markieren, die von der Bewertung ausgenommen wurden.

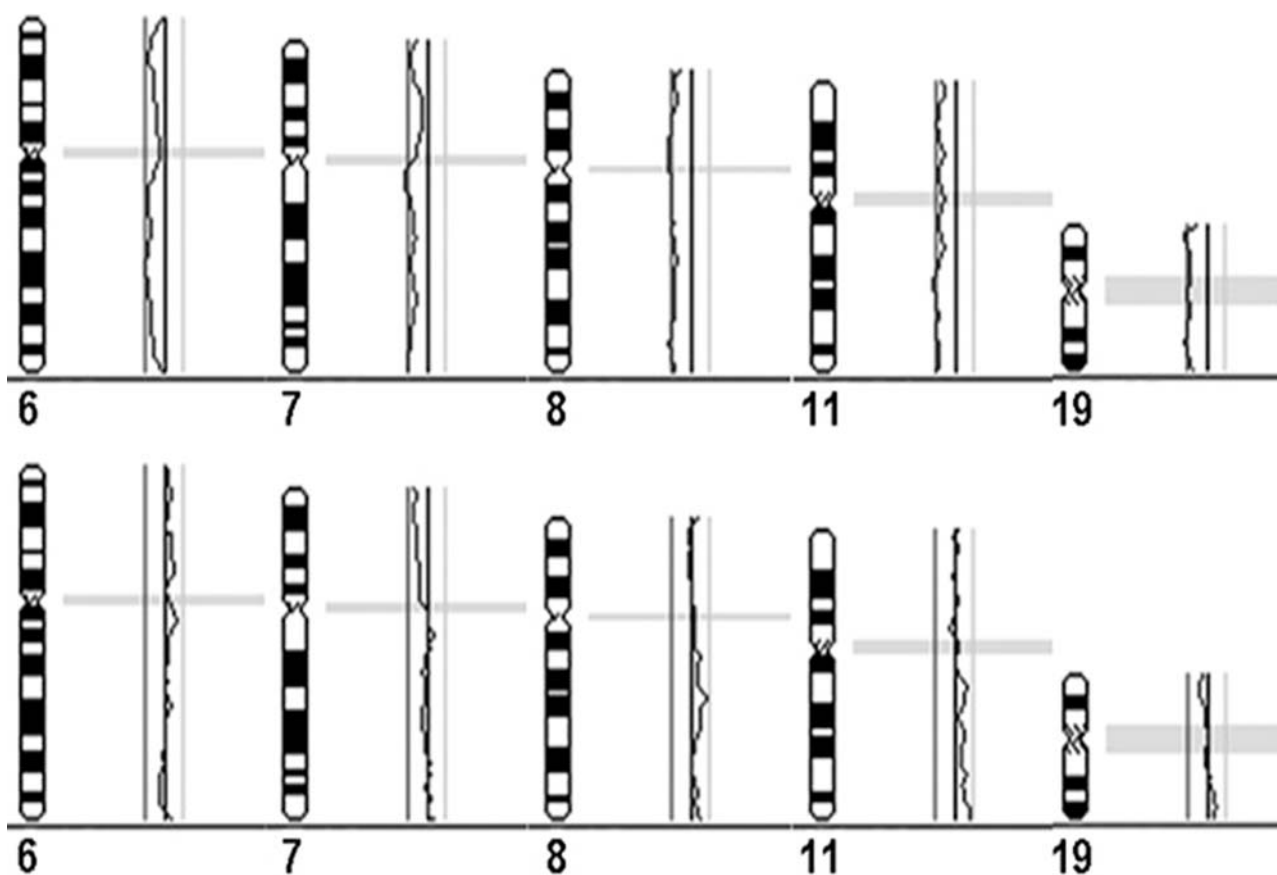
### 3.1.3 Anwendung des Schnell-CGH-Protokolls zum Aneuploidiescreening an Polkörpern

Die 32 untersuchten Polkörper der 16 Patientinnen im Alter von 33 bis 44 Jahren, mit einem Durchschnittsalter von 38 Jahren, wiesen durchschnittlich 1,8 chromosomale Aberrationen (Schwankungsbereich: 0-5 Aberrationen) auf. Rekurrente Gewinne traten bei den Chromosomen 17 und 22 (4/32 Fällen), 19 (3/32 Fällen), 21 und X (2/32 Fällen) auf. Die Chromosomen 6 (5/32 Fällen), 3, 7, 10, 15, und 16 (3/32 Fällen), 4, 8, 11, 12, 18, und 20 (2/32 Fälle) wiesen rekurrente Verluste auf. Die Häufigkeit der Gewinne und Verluste sowie alle betroffenen Chromosomen sind in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6.** Anwendung des Schnell-CGH-Protokolls zum Aneuploidiescreening von ersten Polkörpern. Häufigkeit von chromosomalen Imbalancen in 32 ersten Polkörpern von 16 Patienten im Alter zwischen 33 und 44 Jahren (durchschnittliches Alter: 38 Jahre), die aufgrund von fortgeschrittenem mütterlichen Alter und wiederholtem Implantationsversagen in Behandlung waren. Gewinne (grüne Balken) und Verluste (rote Balken) wurden in 75 % der Polkörper detektiert. Nahezu alle Chromosomen lagen mindestens einmal unbalanciert vor. 40 % der detektierten Aberrationen in den Polkörpern waren Gewinne, die mit Monosomien in den fertilisierten Oozyten einhergehen.

Die CGH-Ergebnisse stimmten mit den Ergebnissen der 6-Farben-FISH-Analyse durch die Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsklinik Bonn überein (Tabelle 4). Die Profile von zwei ausgewählten Polkörpern, die nach Schnell-CGH-Analyse entstanden, sind in Abbildung 7 dargestellt. Der Polkörper einer 39-jährigen Patientin, die wegen fortgeschrittenem mütterlichen Alter behandelt wurde, wies fünf chromosomale Aberrationen auf (Verluste der Chromosomen 6, 7, 8, 11, 19, Abbildung 7 oben). Die Analyse eines Polkörpers einer 41-jährigen Patientin mit gleicher Indikation zeigte keine Aneuploidie (Abbildung 7, unten). Die zugehörige Oozyte wurde fertilisiert, der Embryo wurde transferiert und es resultierte eine Schwangerschaft.



**Abbildung 7.** CGH-Profile der Chromosomen 6, 7, 8, 11 und 19 nach Anwendung der Schnell-CGH-Analyse an Polkörpern von zwei ausgewählten Fällen. Oben: CGH-Analyse von Polkörper PB8A einer 39-jährigen Patientin, die aufgrund ihres fortgeschrittenen mütterlichen Alters in Behandlung war, zeigte multiple Aneuploidien (Verluste der Chromosomen 6, 7, 8, 11 und 19). Unten: CGH-Analyse von Polkörper PB15B einer 41-jährigen Patientin, die ebenfalls aufgrund ihres fortgeschrittenen mütterlichen Alters in Behandlung war. Es wurden keine Imbalancen detektiert. Die Profile der gleichen Chromosomen sind zum Vergleich abgebildet. Nach Implantation der zugehörigen fertilisierten Oozyte dieser Patientin resultierte eine Schwangerschaft. In den abgebildeten CGH-Profilen wurden die Zentromerbereiche aller Chromosomen schraffiert, um die repetitiven DNA-Sequenzen zu kennzeichnen, die von der Bewertung ausgeschlossen wurden.

Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl der Aberrationen pro Polkörper und dem Alter der Patientin ( $p=0,3$ ). Außerdem konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Aberrationen pro Polkörper in den zwei Patientengruppen, die wegen AMA oder RIF behandelt wurden, festgestellt werden ( $p=0,5$ ).

Fall-Nr.	Patientin Nr.	Polkörper Nr.	Alter (Jahre)	Indikation für IVF	FISH Ergebnisse		Schnell-CGH Ergebnisse		Anzahl der Aberrationen pro Polkörper
					Verluste	Gewinne	Verluste	Gewinne	
1	1	PB1A	34	RIF	-	-	-	-	0
2	2	PB2A	44	AMA	-	-	-	-	0
3	2	PB2B	44	AMA	-	-	6	-	1
4	3	PB3A	33	RIF	n.d.	n.d.	-	4, X	2
5	3	PB3B	33	RIF	n.d.	n.d.	-	22	1
6	4	PB4A	33	RIF	n.d.	n.d.	6, 7, 10, 12, 18	-	5
7	4	PB4B	33	RIF	-	-	20	-	1
8	4	PB4C	33	RIF	n.d.	n.d.	4, 8	-	2
9	4	PB4D	33	RIF	-	-	2, 3, 10, 12	7	5
10	4	PB4E	33	RIF	n.d.	n.d.	6, 7, 20	-	3
11	4	PB4F	33	RIF	16	-	16	-	1
12	5	PB5A	44	AMA	n.d.	n.d.	15	10, 18, 21, X	5
13	5	PB5B	44	AMA	-	-	15	14	2
14	6	PB6A	40	AMA	n.d.	n.d.	18	-	1
15	7	PB7A	37	RIF	n.d.	n.d.	15	17	2
16	8	PB8A	39	AMA	-	-	6, 7, 8, 11, 19	-	5
17	9	PB9A	39	RIF	n.d.	n.d.	4, 5	17, 22	4
18	9	PB9B	39	RIF	n.d.	n.d.	-	17	1
19	9	PB9C	39	RIF	-	-	-	-	0
20	9	PB9D	39	RIF	-	16	-	16, 19	2
21	9	PB9E	39	RIF	-	22	-	19, 22	2
22	9	PB9F	39	RIF	-	21	-	21	1
23	10	PB10A	n.d.	RIF/AMA	n.d.	n.d.	3, 16	-	2
24	11	PB11A	n.d.	RIF/AMA	n.d.	n.d.	10, 16	-	2
25	12	PB12A	n.d.	RIF/AMA	n.d.	n.d.	-	-	0
26	13	PB13A	39	RIF	-	-	3, 6, 11	17, 19	5
27	13	PB13B	39	RIF	-	-	-	-	0
28	14	PB14A	37	t	-	-	-	8	1
29	15	PB15A	41	AMA	-	-	-	-	0
30	15	PB15B	41	AMA	-	-	-	-	0
31	16	PB16A	34	RIF	n.d.	n.d.	-	22	1
32	16	PB16B	34	RIF	-	-	-	-	0

**Tabelle 4.** Klinische Daten, FISH- und Schnell-CGH-Ergebnisse von 32 ersten Polkörpern von 16 Patientinnen: RIF, *repeated implantation failure* (wiederholtes Implantationsversagen); AMA, *advanced maternal age* (erhöhtes mütterliches Alter)



### 3.2 Klinische Genetik

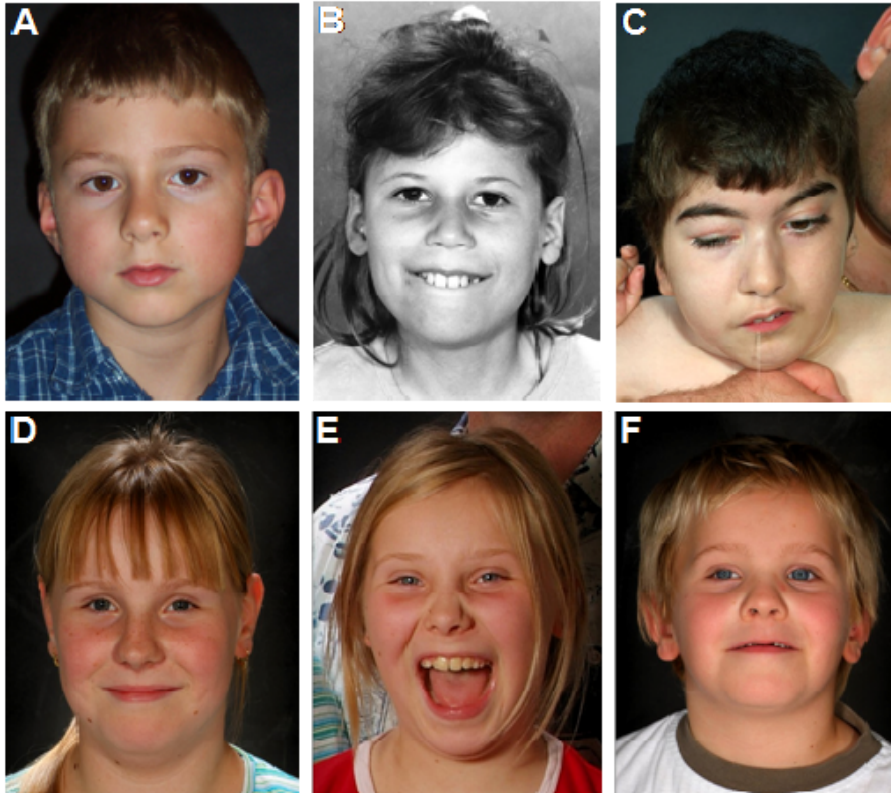
#### 3.2.1 Array-CGH als zuverlässige Methode zur hochauflösenden genetischen Untersuchung auf Mikroimbalancen

Die Array-CGH-Experimente wurden auf DNA Mikrochips durchgeführt, die zunächst mit 8000 und später mit 10600 *large insert* Klonen mit einer durchschnittlichen Auflösung von besser als 0,5 Mb und *tiling-path* Abdeckung einiger chromosomaler Bereiche ausgestattet waren.

Die Verlässlichkeit der Arrays wurde getestet, indem sowohl normale weibliche bzw. männliche DNA gegen einen Pool verschiedener DNAs von zehn weiblichen bzw. männlichen, gesunden Individuen hybridisiert wurde. Die resultierenden Profile waren weitgehend balanciert. Darüber hinaus zeigten diese Experimente Klone auf, die nicht balanciert waren, was entweder auf Hybridisierungsartefakte oder auf Unterschiede in der Kopienzahl ohne Krankheitswert (*copy number variants* (CNVs)) zwischen den zwei analysierten DNA-Proben zurückzuführen war.

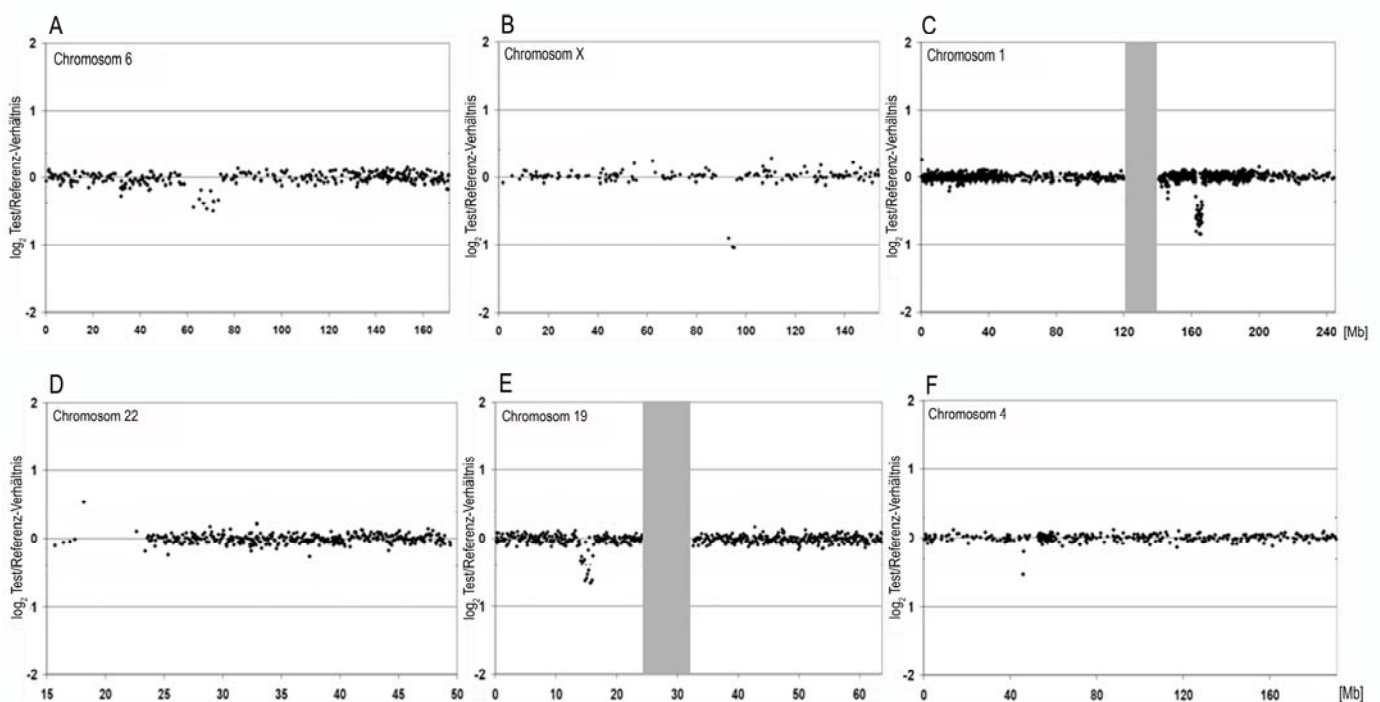
#### 3.2.2 Mentale Retardierung (MR)

##### 3.2.2.1 Identifizierte genomische Imbalancen bei Patienten mit ungeklärter MR



**Abbildung 8.** Faziale Merkmale der Patienten 18/02 (A), 91/00 (B), 54/00 (C), 128/00b (D) und ihrer Geschwister 128/00c (E) und 128/00a (F). Einverständniserklärungen der Eltern zur nicht-anonymisierten Abbildung der Patienten lagen vor.

Von 60 Patienten mit idiopathischer mentaler Retardierung/Entwicklungsverzögerung wurden 16 mit dem 6 k-Array und 44 mit dem 8 k-Array untersucht. Jeder auffällig erscheinende Klon, einschließlich abweichender Einzelklone, wurde mit einer Datenbank für genomische Varianten verglichen (<http://projects.tcag.ca/variation/>). Abweichende Klone, die nicht in der Datenbank aufgeführt waren, wurden als mögliche Imbalancen in Betracht gezogen. Jede mögliche Imbalance wurde mit FISH-Experimenten an Metaphasechromosomen des Patienten entweder bestätigt oder widerlegt. Bei bestätigten Aberrationen wurde mittels FISH-Analysen an Chromosomenpräparaten der Eltern bestimmt, ob die Veränderung ererbt oder *de novo* entstanden war, und die exakten Bruchpunkte wurden bestimmt. Mögliche Aberrationen wurden bei 47 Patienten detektiert, von denen je eine Imbalance bei sieben Patienten mittels FISH-Analyse bestätigt werden konnte. FISH-Experimente an Metaphasechromosomen der Eltern bewiesen, dass bei drei Patienten die Aberrationen *de novo* entstanden waren. Zwei als kausativ eingeschätzte Aberrationen wurden von einem gesunden Elternteil ererbt. Ein Elternteil eines Patienten stand für weitere Analysen nicht zur Verfügung. Insgesamt wurden in sechs von 60 analysierten MR-Patienten wahrscheinlich kausative genomische Imbalancen identifiziert.



**Abbildung 9.** Array-CGH-Profil der aberranten Chromosomen. Die Profile zeigen die Mittelpunkte der Klone des jeweiligen Chromosoms vom p- zum q-Arm (X-Achse) gegen die auf der Y-Achse aufgetragenen normalisierten  $\log_2$  Test/Referenz-Verhältnisswerte. Alle Aberrationen mit Ausnahme der 6q Deletion wurden auf dem 8k-Array detektiert. Die grauen vertikalen Balken markieren die Heterochromatinblöcke der perizentromerischen Regionen der Chromosomen 1 und 19. (A) 10,8 Mb Deletion in Chromosom 6q der Patientin 3/01. (B) 4 Mb Deletion in Chromosom Xq des Patienten 18/02. (C) 3,8 Mb Deletion in Chromosom 1q der Patientin 91/00.

(D) 2,8 Mb Duplikation in Chromosom 22 der Patientin 128/00b. (E) 2,1 Mb Deletion in Chromosom 19 der Patientin 11/03. (F) 1,1 Mb Deletion in Chromosom 4p der Patientin 54/00.

Patient 3/01: Dieses 7-jährige Mädchen wies eine moderate MR/Entwicklungsverzögerung (selbstständiges Sitzen: 13 Monate, selbstständiges Laufen: 22 Monate, Sprechen: Im Alter von 3 Jahren weniger als 20 Wörter, im Alter von 7 8/12 Jahren Entwicklungsstand einer 3-jährigen), leichte Hirnanomalie, *Pes valgus*, faziale Dismorphien und häufige Infekte auf. Mittels Array-CGH wurde ein Verlust von neun Klonen (RP11-506N21 bis RP11-256L9) in 6q11-q13 detektiert (Abbildung 9). Diese Deletion wurde mittels FISH-Analyse bestätigt und nach Analyse der elterlichen Chromosomen konnte gezeigt werden, dass dieser Verlust *de novo* entstanden war (Abbildung 11). Die exakte Bruchpunktbestimmung ergab eine Deletionsgröße von  $10,8 \pm 0,10$  Mb (flankierende Klone im proximalen Bruchpunkt: RP11-330M10 und RP1-271N20; flankierende Klone im distalen Bruchpunkt: RP11-88K15 und RP11-738G10).

Patient 18/02 (Abbildung 8): Dieser 6-jährige Junge wurde aufgrund seiner Lernbehinderung (IQ 78/Snijder Oomen Test), chirurgisch korrigierter Leisten- und Nabelhernien, Hypospadie und leichten fazialen Dismorphien analysiert. Mittels Array-CGH wurde ein Verlust der Klone RP11-361B11 bis RP1-199L16 in Xq21.31-q21.33 detektiert (Abbildung 9). Die Deletion wurde mittels FISH bestätigt (Abbildung 11). Die Mutter des Jungen zeigte auf einem X-Chromosom die gleiche Deletion. Durch X-Inaktivierungsuntersuchungen wurde bei ihr eine Verschiebung des X-Inaktivierungsmusters, ein sog. „*skewing*“, detektiert. Diese Imbalance wurde also von der gesunden Mutter ererbt, jedoch als kausativ für den Jungen betrachtet. Die Deletionsgröße konnte mittels FISH auf  $4,0 \pm 0,14$  Mb eingegrenzt werden (flankierende Klone am proximalen Bruchpunkt: RP13-17E1 und RP13-138P15; flankierende Klone am distalen Bruchpunkt: RP11-560B1 und RP11-641M1).

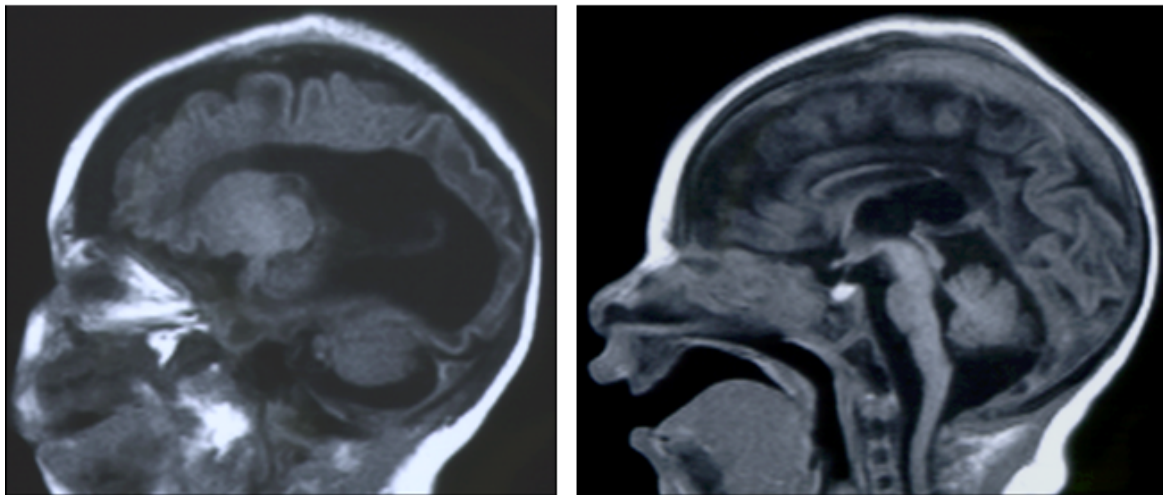
Patientin 91/00 (Abbildung 8): Dieses 10-jährige Mädchen wies eine moderate bis schwere MR/Entwicklungsverzögerung insbesondere ihrer Sprachentwicklung (einzelne Worte mit 10 Jahren), ein Anfallsleiden, Hyperkinesien, sowie faziale und nicht-faziale Dismorphien auf. Die Array-CGH-Analyse detektierte einen Verlust von 31 Klonen (RP11-525G13 bis RP4-780M13) in 1q24.1-q24.2 (Abbildung 9), der mittels FISH bestätigt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass die Aberration *de novo* entstanden war (Abbildung 11). Da der 8 k-Array für diese Region eine *tiling-path* Abdeckung aufwies, waren keine weiteren FISH-Analysen zur Bruchpunktbestimmung notwendig. Die flankierenden balancierten Klone waren RP11-466F5 (proximaler Bruchpunkt) und RP1-117P20 (distaler Bruchpunkt).

Patient 128/00b (Abbildung 8): Dieses 12-jährige Mädchen wurde aufgrund von milder MR/Entwicklungsverzögerung (7 Jahre: IQ 69, Kiphard Schilling Test), Mikrozephalie bei Geburt und leichten fazialen und nicht-fazialen Dysmorphien analysiert. Die Array-CGH-Analyse zeigte einen Gewinn eines Einzelklons in 22q11.2 (XX-91c), der die DiGeorge/VCFS kritische Region umfasst (Abbildung 9 D). Diese Duplikation wurde mittels Interphase-FISH mit der kommerziell erhältlichen Sonde für die kritische DiGeorge/Velokardiofaziales Syndrom (VCFS) Region (TUPLE1, Vysis, Downer's Grove, UK; Abbildung 11) bestätigt. Die exakte Bruchpunktbestimmung war nicht möglich, da die Duplikation proximal von repetitiven Sequenzen der perizentromerischen Region begrenzt wurde, so dass proximalere Klone, wie RP11-657F7, multiple Signale auch in normalen Kontrollen zeigten. Der letzte eindeutig duplizierte Klon war RP11-1151A3. Der distale Bruchpunkt in 22q11.22 wurde durch die flankierenden Klone RP11-317J15 und RP11-307O16 definiert, so dass die Duplikation  $2,8 \pm 0,19$  Mb groß war. Die FISH-Analysen der Eltern zeigten, dass die Duplikation von dem phänotypisch normalen Vater ererbt wurde (Abbildung 11). Bei der Schwester (128/00c, 9 Jahre alt) und dem Bruder (128/00a, 6 Jahre alt) der Patientin wurde die gleiche Aberration diagnostiziert. Die Schwester wies eine Entwicklungsverzögerung, Verhaltensauffälligkeiten, eine Skoliose, faziale Dysmorphien, eine milde Hyperopie sowie häufige Infekte auf. Der Bruder zeigte eine psychomotorische und Sprachentwicklungsverzögerung, eine Skoliose, faziale Dysmorphien, eine milde Hyperopie und häufige Infekte.

Patient 11/03: Dieses Mädchen wurde im Alter von 18 Monaten vorstellig und zeigte eine milde Entwicklungsverzögerung (selbstständiges Sitzen: 15 Monate, keine Sprache und erste Krabbelversuche mit 16 Monaten), einen Herzfehler, Wachstumsanomalien und schwere kraniofaziale Dysmorphien. Die Array-CGH-Analyse detektierte einen Verlust von 15 Klonen in 19p13.12 (CTB-55O6 bis RP11-959H20) (Abbildung 9), der mittels FISH bestätigt wurde. Da der genutzte 8k-Array in dieser chromosomalen Region eine *tiling-path* Abdeckung aufwies, konnte die Deletionsgröße auf  $2,1 \pm 0$  Mb ohne zusätzliche FISH-Analysen festgelegt werden. Die flankierenden balancierten Klone waren CTD-3252C9 (distaler Bruchpunkt) und CTD-2231E14 (proximaler Bruchpunkt). FISH-Analysen der Eltern konnten nicht durchgeführt werden.

Patient 54/00 (Abbildung 8): Diese 10-jährige Tochter konsanguiner Eltern wurde aufgrund ihrer schweren MR/Entwicklungsverzögerung (formeller IQ-Test nicht möglich), schweren Hirnfehlbildungen, einem Anfallsleiden, einer Mikrozephalie, einem Kleinwuchs, einer schweren Kyphoskoliose, fazialen und nicht-fazialen Dysmorphien analysiert. Sie starb im Alter von 10 Jahren. Die Array-CGH (8 k-Array) identifizierte einen Verlust der Klone RP11-416A5 und RP11-25B15 in 4p12-p13 (Abbildung 9 F). Eine FISH-Analyse bestätigte die Deletion und die FISH-Analyse

der Eltern zeigte, dass die Deletion *de novo* entstanden war (Abbildung 11). Die exakte Bruchpunktanalyse mittels FISH ergab die flankierenden Klone RP11-460K17 und RP11-705O21 (distal), RP11-791K24 und RP11-946N22 (proximal) und ermittelte eine Deletionsgröße von  $1,1 \pm 0,02$  Mb.

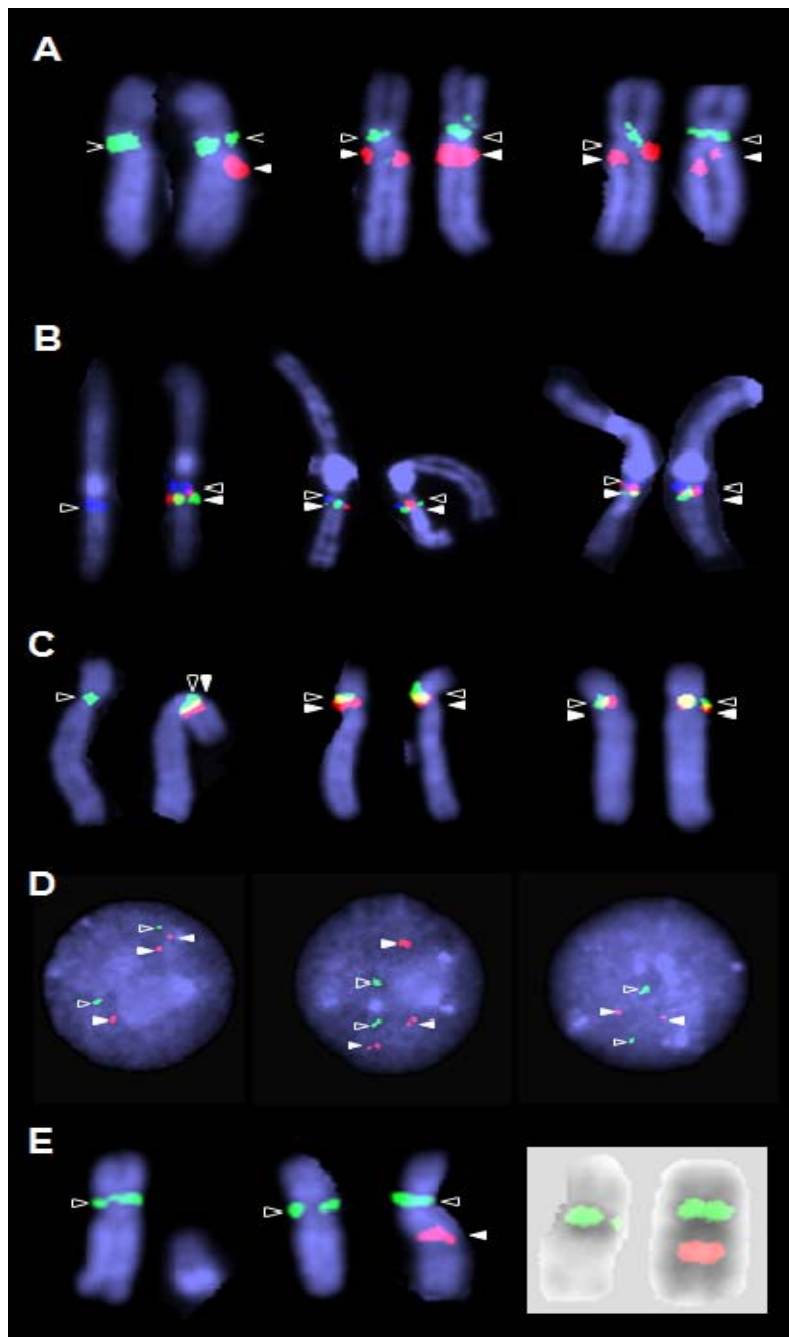


**Abbildung 10.** MRT-Aufnahmen der Patientin 54/00 zeigten eine Hirnatrophie mit ausgeprägter Ventrikulomegalie, hypoplastischem Corpus callosum und groben Gyri. Links: Parasagittale T1-gewichtete Aufnahme. Rechts: Sagittale T1-gewichtete Aufnahme.

### 3.2.2.2 Klinische Konsequenzen

Einige klinische Merkmale wurden mit einem höheren Prozentsatz bei den Patienten mit Mikroimbalancen verglichen mit den Patienten ohne Mikroimbalancen gefunden. Kleinwuchs und Mikrozephalie traten in 2/6 (33 %) bzw. 3/6 (50 %) Fällen der Patienten mit Imbalancen im Gegensatz zu 11/54 (20 %) und 15/54 (28 %) der Fälle ohne Aberration auf. Herabgesetzte Schmerzempfindlichkeit wurde in 1/6 (17 %) Patienten mit und in 5/54 (9 %) Patienten ohne Imbalance diagnostiziert. Der Prozentsatz aller Fälle mit Aberration bei den Patienten mit moderater bis schwerer MR/Entwicklungsverzögerung (3/16; 19 %) war zweimal so hoch wie bei den Patienten mit milder MR/Entwicklungsverzögerung oder Lernbehinderungen (3/29; 10 %). Andere neurologische Befunde wie Anfallsleiden und EEG-Anomalien, muskuläre Hypotonie/Hypertonie traten bei den Patienten mit Imbalancen nicht gehäuft auf.

Der mittlere de Vries (de Vries *et al.* 2005)-Wert der Patienten mit Imbalancen lag ein wenig höher als der des gesamten Kollektivs (vier versus drei Punkte). Die Detektionsrate chromosomaler Imbalancen bei Patienten mit 0-3 de Vries Punkten (0-7 %) war niedriger als bei Patienten mit 4-8 de Vries Punkten (23-50 %).

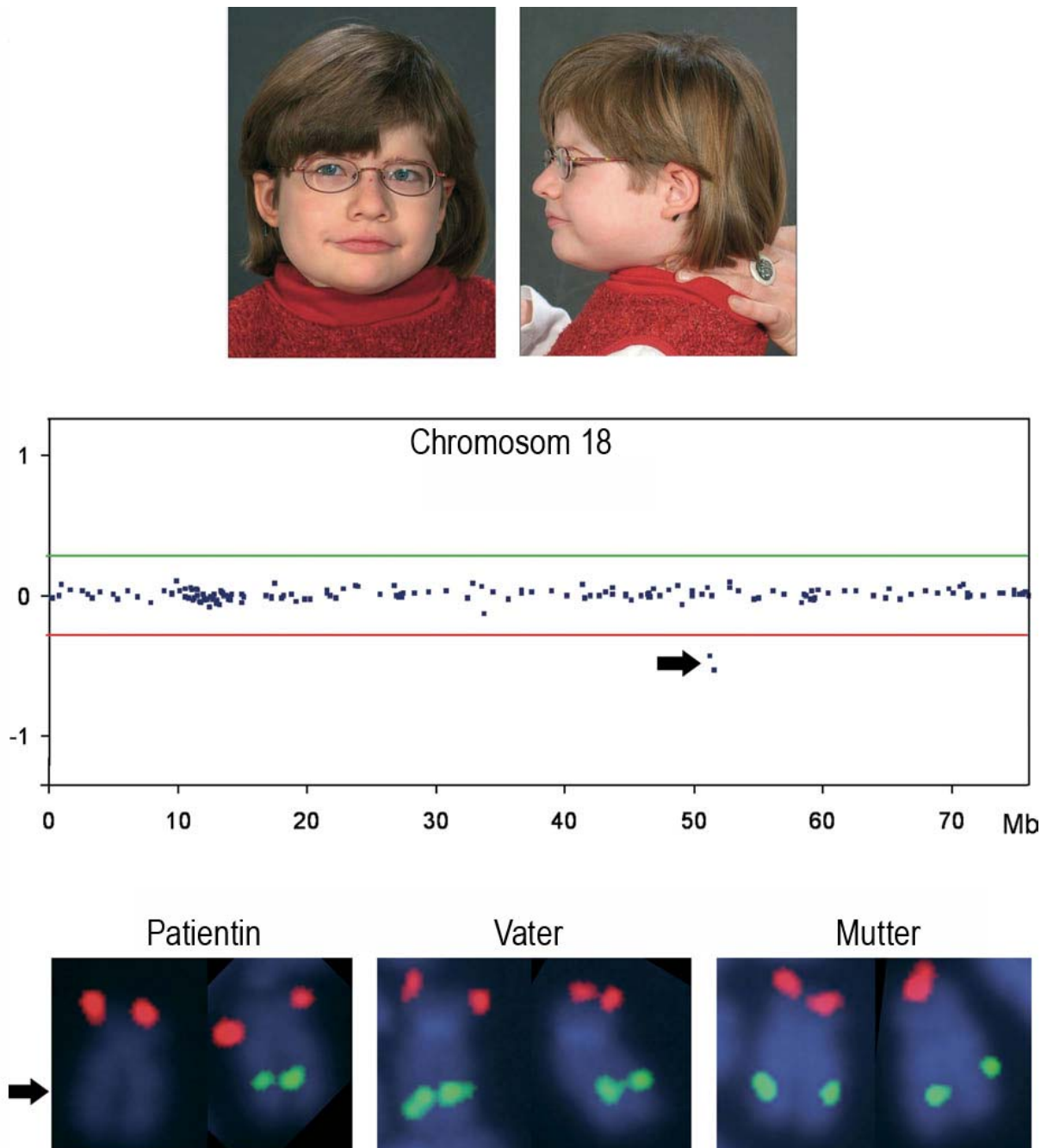


**Abbildung 11.** Übersicht ausgewählter FISH-Ergebnisse, die die derivativen Chromosomen der Patienten und die Chromosomen der Eltern illustrierten. (A) Die Deletion in Chromosom 6q der Patientin 3/01 wurde mittels FISH bestätigt (links, Klon RP11-88K15 (rot, ausgefüllte Pfeilspitze) war deletiert, während zwei Kopien des Kontrollklons RP3-422B11 (grün, unausgefüllte Pfeilspitze) vorlagen). Außerdem wurde gezeigt, dass es sich um eine *de novo* entstandene Deletion handelt, da sie weder in den Chromosomen des Vaters (Mitte) noch in denen der Mutter (rechts) vorlag. (B) Die Deletion in Chromosom 1q der Patientin 91/00 wurde mittels FISH bestätigt (links, Klone RP11-375F2 (rot) und RP1-86F14 (grün, ausgefüllte Pfeilspitze) waren deletiert, während zwei Kopien des Kontrollklons RP11-77M5 (blau, unausgefüllte Pfeilspitze) vorlagen). Außerdem wurde gezeigt, dass es sich um eine *de novo* entstandene Deletion handelt, da sie weder in den Chromosomen des Vaters (Mitte) noch in denen der Mutter (rechts) vorlag. (C) Die Deletion in Chromosom 4p der Patientin 54/00 wurde mittels FISH bestätigt (links, Klon RP11-664L5 (rot, ausgefüllte Pfeilspitze) war deletiert, während zwei Kopien des Kontrollklons RP11-460K17 (grün, unausgefüllte Pfeilspitze) vorlagen). Außerdem wurde gezeigt, dass es sich um eine *de novo* entstandene Deletion

handelt, da sie weder in den Chromosomen des Vaters (Mitte) noch in denen der Mutter (rechts) vorlag. (D) Die Duplikation in Chromosom 22q der Patientin 128/00b wurde mittels Interphase-FISH bestätigt (links, DiGeorge/VCFS Region Sonde TUPLE1 (rot, ausgefüllte Pfeilspitze) war dupliziert, während zwei Kopien der Kontrollsonde ARSA (grün, unausgefüllte Pfeilspitze) vorlagen). Außerdem wurde gezeigt, dass es sich um eine von dem Vater ererbte Duplikation handelt (Mitte), während die Mutter die Duplikation nicht trägt (rechts). (E) Die Deletion in Chromosom Xq des Patienten 18/02 wurde mittels FISH bestätigt (links, Klon RP11-361B11 (rot, ausgefüllte Pfeilspitze) war deletiert, während eine Kopie des Kontrollklons RP11-552E4 (grün, unausgefüllte Pfeilspitze) vorlag). Bei dem Chromosom rechts neben dem X-Chromosom handelt es sich um das Y-Chromosom. Außerdem wurde gezeigt, dass es sich um eine von der Mutter ererbte Deletion handelt (Mitte). Mit FISH nach BrdU-Inkorporation wurde bei der Mutter nachgewiesen, dass das X-Chromosom mit der Deletion überwiegend inaktiviert vorlag. Das aktive X-Chromosom trug keine Deletion.

### 3.2.3 Schwere mentale Retardierung mit Atmungsanomalien (Pitt-Hopkins Syndrom, PHS)

Mittels genomweiter Array-CGH wurde in dieser Studie eine Deletion bei der Patientin AC (Abbildung 12 oben) mit PHS detektiert, die die zwei benachbarten Klone RP11-7L24 und RP11-397A16 in Chromosom 18q21.2 betraf (Abbildung 12 Mitte). Diese Aberration wurde bei der Patientin mittels FISH-Analyse an Metaphasechromosomen mit den gleichen BAC-Klonen bestätigt (Abbildung 12 unten). Die FISH-Analysen an Metaphasechromosomen der Eltern zeigten, dass die Deletion *de novo* entstanden war und diese genomische Veränderung daher höchstwahrscheinlich kausativ für den Phänotyp der Patientin war. Für die betroffene Region war keine Kopienzahlvariation beschrieben worden, so dass für die Patientin ein Polymorphismus ohne Krankheitswert unwahrscheinlich war. Um die Bruchpunkte der Aberration zu bestimmen, wurden FISH-Experimente mit benachbarten BAC-Klonen durchgeführt. Sowohl der proximale als auch der distale Bruchpunkt wurde mit insgesamt sechs überlappenden Klonen genau kartiert. Die Deletionsgröße betrug annähernd 0,5 Mb. Proximal war der Klon RP11-746K23 nicht deletiert und distal zeigte der BAC-Klon RP11-659K3 zwei Signale auf den Chromosomen der Patientin (Abbildung 12 unten).

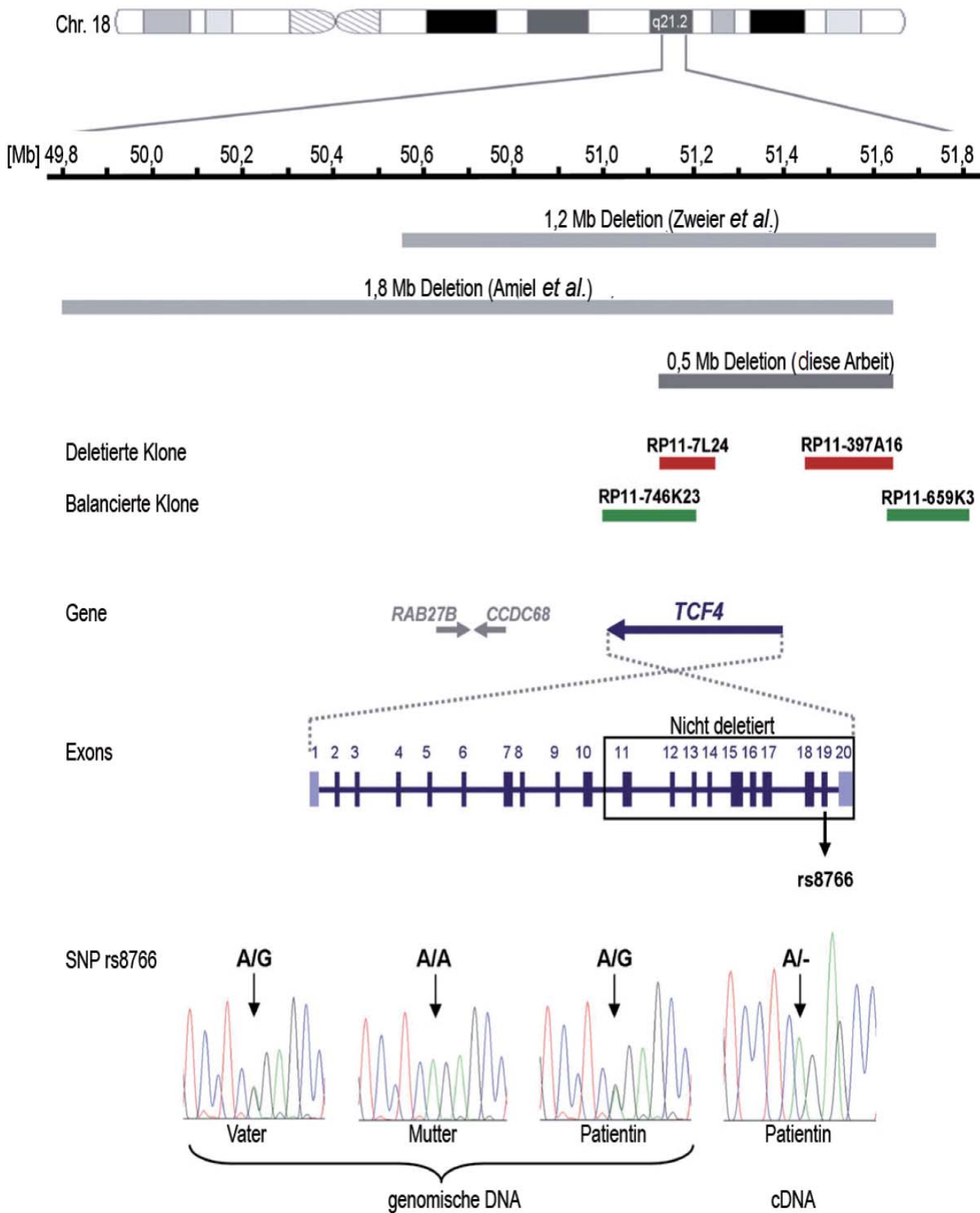


**Abbildung 12.** Patientin AC und Ergebnisse der molekular-zytogenetischen Analysen. Oben: Faziale Merkmale der Patientin im Alter von sechs Jahren. Sie wies ein grobes Gesicht mit einer breiten Nasenwurzel, einen großen Mund mit bogenförmiger Oberlippe und leicht dysmorphen Ohren mit antevvertierten Ohrläppchen auf. Aufgrund der schweren Muskelhypotonie musste der Kopf der Patientin von den Eltern gestützt werden. Mitte: Array-CGH-Profil von Chromosom 18 nach Analyse mit einem 8k-Array. Das Profil zeigt die Mittelpunkte aller Klone des Chromosoms vom p-zum q-Arm (X-Achse) gegen die auf der Y-Achse aufgetragenen normalisierten  $\log_2$  Test/Referenz-Verhältnisswerte. Die deletierten Klone sind mit einem Pfeil markiert. Unten: Die Deletion wurde mittels FISH mit den BAC-Klonen RP11-397A16 (grün) aus der deletierten Region und RP11-324G2 (rot) als Kontrollklon verifiziert. Die Hybridisierung derselben Klone auf Metaphasechromosomen der Eltern zeigte ein normales Signalmuster, so dass die *de novo* Entstehung der Aberration nachgewiesen wurde.



Die von uns identifizierte Deletion in 18q war kleiner als die, die bei PHS-Patienten beschrieben worden waren (Zweier *et al.* 2007; Amiel *et al.* 2007) und war die einzige strukturelle Aberration, die nur *TCF4* (Transkriptionsfaktor 4) und keine anderen Gene enthielt (Abbildung 13).

Der proximale Bruchpunkt schien im *TCF4*-Gen zu liegen, so dass das 5'-Ende des Gens deletiert war, während das 3'-Ende intakt war und die Möglichkeit bestand, dass dadurch ein verkürztes Transkript /Protein mit dominant negativem Effekt entstehen könnte. Um den intragenischen Bruchpunkt weiter zu definieren und um zu überprüfen, ob die Deletion maternalen oder paternalen Ursprungs war, wurden alle kodierenden Exone und angrenzenden Splice Stellen von *TCF4* bei der Patientin und ihren Eltern amplifiziert und sequenziert. Dadurch wurde bei der Patientin für die SNPs rs1788027 im Intron 10 und rs8766 im Exon 19 Heterozygotie nachgewiesen und damit gezeigt, dass mindestens die Exons 11 bis 20 nicht deletiert waren (Abbildung 13). Der exonische SNP rs8766 war beim Vater und der Patientin heterozygot A/G, während er bei der Mutter homozygot A/A vorlag (Abbildung 13, unten). Daher wurden die Exone 17-20 von *TCF4* an der cDNA aus peripherem Blut der Patientin amplifiziert und sequenziert. Der SNP rs8766 lag im hemizygoten Zustand vor, da er nur das Allel A aufwies. Damit konnte gezeigt werden, dass die verkürzte *TCF4*-Kopie des derivativen Chromosoms 18 nicht transkribiert wurde. Außerdem wurde deutlich, dass die Deletion paternalen Ursprungs war. Ein systematisches Mutationsscreening der 18 Exons und flankierenden Spleißstellen von *TCF4* wurde bei 46 Patienten mit idiopathischer MR und mindestens teilweise mit Patientin AC übereinstimmenden Symptomen wie eine fehlende Sprachentwicklung, Ataxie oder muskuläre Hypotonie, durchgeführt. Es wurden keine pathogenen Veränderungen detektiert, so dass eine kausale Beteiligung von *TCF4* in diesen Fällen unwahrscheinlich war.



**Abbildung 13.** Graphische Übersicht der deletierten Regionen in Chromosom 18q21.2 dieser Studie (dunkelgrauer Balken) und der Publikationen von Zweier *et al.* und Amiel *et al.* (hellgrauer Balken). Die deletierten BAC Klone sind als rote Balken dargestellt, nicht-deletierte Klone als grüne Balken. Die schematische Genomstruktur von *TCF4* zeigt die kodierenden Exons in dunkelblau, die nicht-kodierenden Exons 1 und 20 in hellblau. Im Elektropherogramm der genomischen DNA der Patientin AC und ihrer Eltern und der cDNA der Patientin ist der exonische SNP rs8766 (Exon 19) mit einem Pfeil markiert.

### 3.2.4 Nierenfehlbildungen

#### 3.2.4.1 Detektierte Mikroaberrationen in Patienten mit ungeklärten syndromalen Nephropathien

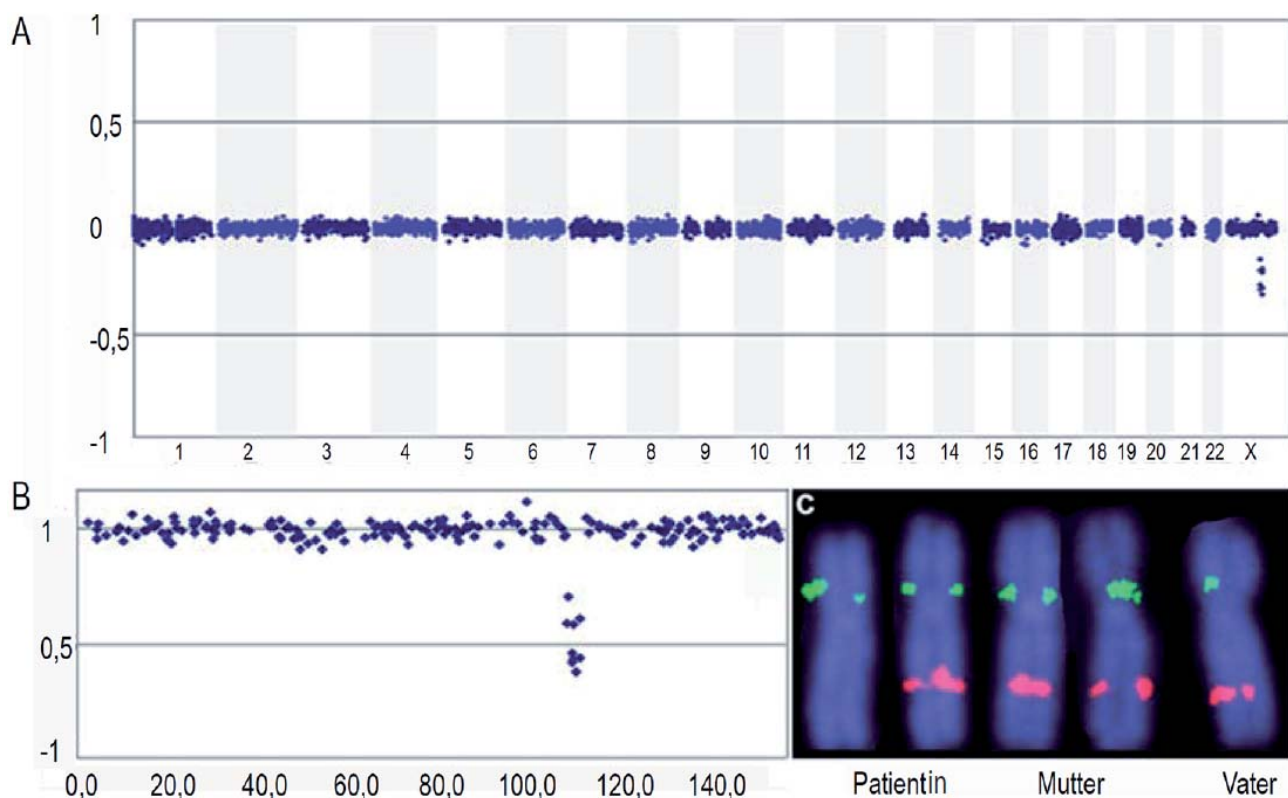
Jeder Klon des 8 k-Arrays wurde in Datenbanken von bekannten genomischen Varianten oder molekular-zytogenetischen Datenbanken, die FISH-Daten der BAC Klone liefern, überprüft (z.B. <http://projects.tcag.ca/variation/>, <http://paralogy.gs.washington.edu/structuralvariation/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/cyto/hbrc.shtml>, <http://www.biologia.uniba.it/rmc/index.html>, <http://www.molgen.mpg.de/~cytogen/probedat.htm>). Die Klone mit Werten außerhalb der diagnostischen Schwellenwerte einschließlich der Einzelklonausreißer, die nicht in den Datenbanken als polymorph aufgeführt oder aufgrund unserer eigenen Experimente als polymorph bekannt waren, wurden als mögliche Mikroimbalancen betrachtet. In zehn untersuchten Patienten wurden 36 mögliche Imbalancen (durchschnittlich 3,6 Klone pro Patient) detektiert. Für jede mögliche Imbalance wurden FISH-Verifizierungsexperimente auf Metaphasepräparaten der Patienten durchgeführt. Bei neun Patienten wurden mögliche Imbalancen nicht bestätigt. Diese Imbalancen waren am ehesten auf Array-oder Hybridisierungsartefakte zurückzuführen. In Patientin 3/MA konnte die Veränderung bestätigt werden und der genaue Bruchpunkt wurde mittels FISH bestimmt. FISH-Experimente an Metaphasepräparaten der Eltern zeigten, dass die Veränderung bei der Patientin *de novo* aufgetreten war. Somit wurde in einer von zehn Patienten mit unklaren syndromalen Nephropathien eine kausative genomische Mikroimbalance mittels Array-CGH identifiziert. Es konnte also in 10% der Fälle eine Diagnose gestellt werden. Tabelle 5 zeigt alle klinischen Daten der analysierten Patienten.

Tabelle 5. Klinische Daten der mittels array-basierter CGH analysierten zehn Patienten mit unklaren syndromalen Nephropathien						
Nr	Alter (J)/ Geschlecht	Niere	Neurologische Befunde	Herz	Wachstums- parameter	Dysmorphien und weitere Auffälligkeiten
1	9/ männlich	Multizystische Dysplasie (rechts), Hypoplasie (links), CKD Stadium 4	Milde MR, Sprachentwicklungs- und motorische Verzögerung, aggressive Verhaltensweise	Subvalvuläre Aortenstenose	Geburt: normal 1 Jahr: KL < 3.P	Tiefsitzende dysplastische Ohren, niedrige Nackenhaargrenze, schlaffe Haut
2	9/ männlich	Bilaterale zystische Nierendysplasie, vesico-ureteraler Reflux III° (links), CKD Stadium 4	Moderate psychomotorische Retardierung, Sprachentwicklungsverzögerung	-	3 Jahre: KU < 3.P KL < 3.P	Chronische Obstipation, Hodenhypoplasie
3	16/ weiblich	Mikrohämaturie, Proteinurie (0,5 g/d), CKD Stadium 1	Moderate bis schwere MR, Sprachentwicklungs- u. motorische Verzögerung, therapie-resistente Epilepsie, Innenohrschwerhörigkeit	-	Normal	Mittelgesichtshypoplasie, eingesunkene Nasenwurzel, tiefe Nackenhaargrenze, kleine Hände u. Finger, spitz zulaufende Finger, Plattfüße, Sandalenlücken bds., gluteale Depigmentierung
4	19/ männlich	Proteinurie (0,3-3g/d), <i>minimal change</i> Glomerulonephritis, CKD Stadium 1	Milde MR, Sprachentwicklungs- u. motorische Verzögerung	Stenose der abführenden Aorta	Normal	Progenie, Mikrophthalmie, kongenitaler Katarakt
5	11/ weiblich	Multizystische Dysplasie (rechts), CKD Stadium 1	Moderate MR, Sprachentwicklungs- u. motorische Verzögerung, bilateraler Nystagmus	-	Normal	Genitalhypoplasie
6	7/ weiblich	Multizystische Dysplasie (rechts), Ureterabgangsstenose (links), CKD Stadium 1		Atrium- u. Ventrikelseptumdefekte	Normal	Dysplastische Ohren, Blepharophimose, dünne Lippen, Strabismus
7	12/ männlich	Steroid resistentes nephrotisches Syndrom, fokale segmentale Glomerulosklerose, CKD Stadium 1	Lernbehinderung, motorische Verzögerung, Innenohrschwerhörigkeit	-	4 Jahre KL < 3.P	Niedrige Stirn- und Nackenhaargrenze, partieller Haaralbinismus, Hypertrichose, beeinträchtigte Gelenkbeweglichkeit
8	5/ weiblich	Duplexniere/vesico-ureteraler Reflux IV° (ob.rechte Niere), Ureterabgangverschluss (links), CKD Stadium 1	Moderate MR, Sprachentwicklungs- u. motorische Verzögerung, Muskelhypotonie	Ventrikelseptumdefekt	Normal	Tiefsitzende Ohren, mongoloide Lidachsen, breite Nasenwurzel, prominente Stirn, bilateral rudimentäre 6. Finger, Hypothyreose
9	4/ männlich	Bilaterale Dysplasie, CKD Stadium 4	Schwere Sprachentwicklungs- u. motorische Verzögerung, Muskelhypotonie, bilaterale Innenohrschwerhörigkeit	Aortenisthmusstenose, Aortenklappenstenose, Vorhofseptumdefekt	0,5 Jahre: KU < 3.P	Tiefsitzende Ohren, tiefliegende Nasenwurzel, Mikro-/Retrognathie, hoher Gaumen, kurzer Hals, tiefe Nackenhaargrenze, Hypertrichose, Pes calcaneus, schlaffe Haut, pulmonaler Sequester
10	13/ weiblich	Bilaterale Hypoplasie, bilateraler vesico-ureteraler Reflux (II° rechts, III° links), CKD Stadium 3	Lernbehinderung, moderate motorische Verzögerung	Aortenisthmusstenose, persistierender Ductus arteriosus	Geburt: normal 0,8 Jahre: KL < 3. P, KU < 3.P 13J.: KL = 3.P*	Vorgewölbte Stirn, Epikanthus, schmale Oberlippe, kleiner Mund, breite Nasenwurzel, Wachstumshormondefizit, nicht-insulin-abhängiger Diabetes mellitus

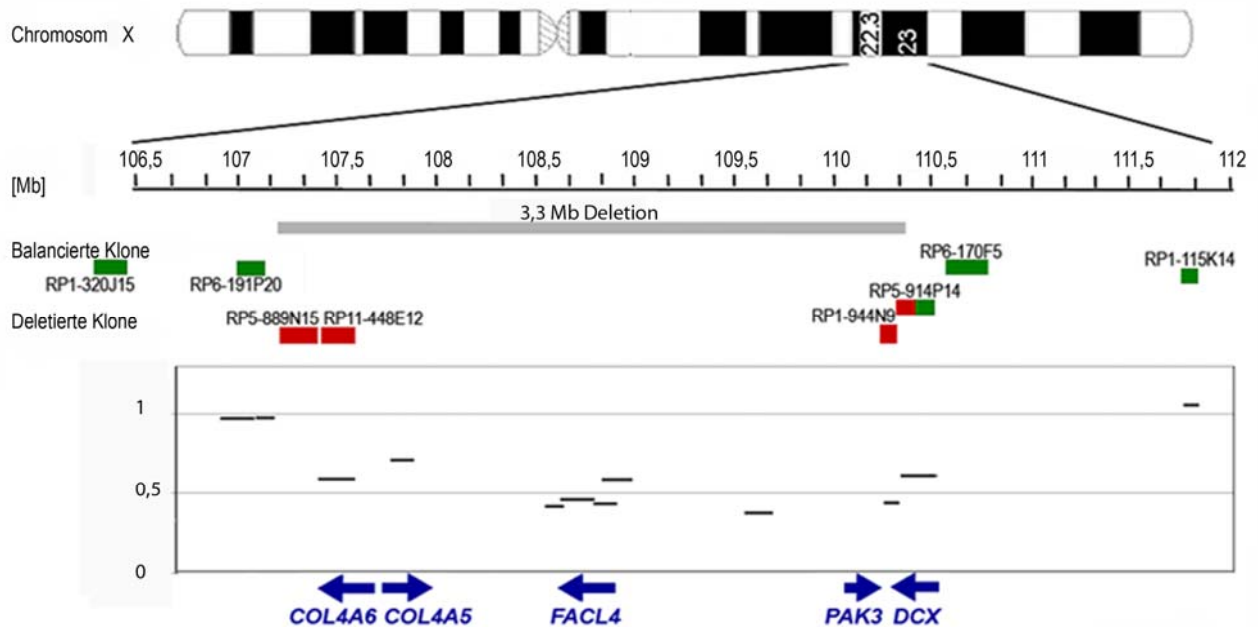
CKD, *chronic kidney disease* (chronische Nierenerkrankung); KL, Körperlänge; KU, Kopfumfang; KG, Körpergewicht; P, Perzentile

## 3.2.4.1.1 Genetischer Befund bei Patientin MA/3

Mittels Array-CGH wurde bei der Patientin MA/3 eine Deletion in Chromosom Xq22.3-q23 (von Klon RP11-448E12 bis Klon RP5-914P14) identifiziert (Abbildung 14 A, B). Die Deletion wurde mittels FISH auf Metaphasechromosomen bestätigt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Deletion uniallelisch vorliegt und, nach FISH-Analysen an den Chromosomen der Eltern, *de novo* aufgetreten war (Abbildung 14 C). Die genaue Bruchpunktbestimmung durch die FISH-Analyse ergab eine Deletionsgröße von 3,3 Mb.



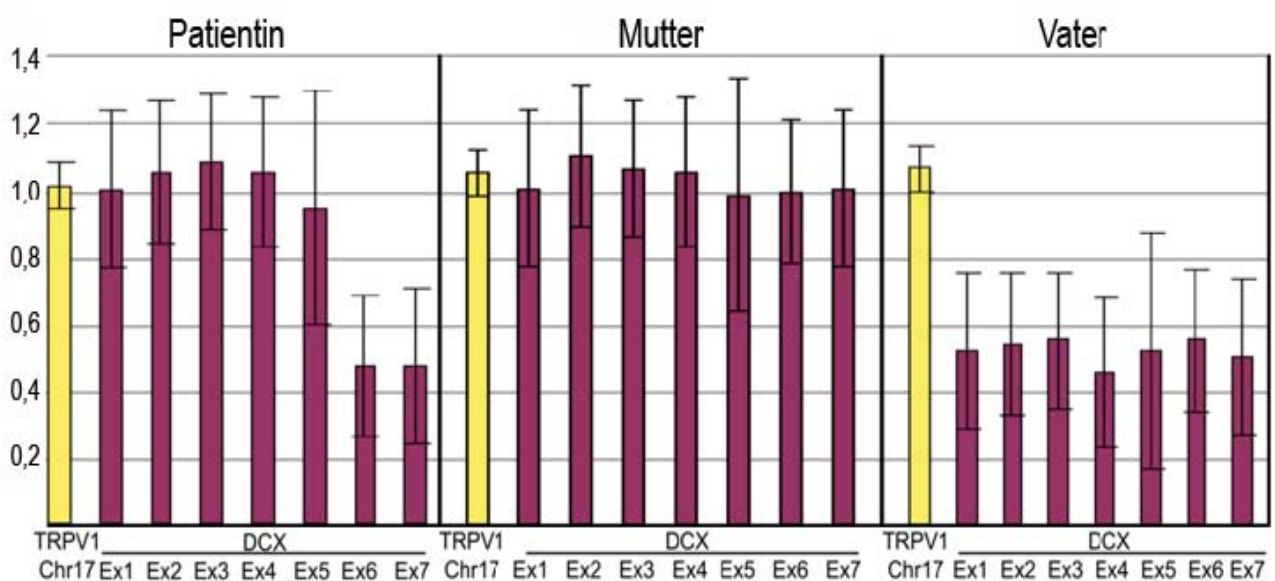
**Abbildung 14.** Genetische Befunde der 16-jährigen Patientin mit Hämaturie, Proteinurie, moderater bis schwerer MR, Innenohrschwerhörigkeit und Epilepsie. A: Mittels Array-CGH wurde eine Mikrodeletion in Xq22.3-q23 detektiert. Die Mittelpunkte aller Klone sind auf der X-Achse in genomischer Reihenfolge von Chromosom 1 bis X gegen die normalisierten  $\log_2$  Test/Referenz-Verhältnisse auf der Y-Achse aufgetragen. B: Das Array-CGH Profil des X-Chromosoms zeigt eine Mikrodeletion von 3,3 Mb. Das Profil zeigt die Mittelpunkte der Klone von Xp bis Xq (X-Achse) gegen die auf der Y-Achse aufgetragenen normalisierten  $\log_2$  Test/Referenz-Verhältnisswerte. C: Die Deletion in Xq wurde bei der Patientin mittels FISH mit dem Klon RP4-557A17 (Xq23) auf einem Homolog des X-Chromosoms bestätigt (rotes Signal auf nur einem X-Chromosom). RP4-689N3 (Xp11.3) diente als Kontrolle (grüne Signale auf beiden X-Chromosomen). Die FISH-Analyse zeigte keine Deletion in den X-Chromosomen der Mutter (Mitte) und im X-Chromosom des Vaters (rechts), so dass die Deletion der Patientin *de novo* entstanden sein musste.



**Abbildung 15.** Übersicht der deletierten Region in Chromosom Xq22.3-q23. Die deletierten BAC-Klone sind als rote Balken dargestellt, nicht-deletierte BAC-Klone als grüne Balken. Die vergrößerte Ansicht der Array-CGH-Klone zeigt deren  $\log_2$  Test/Referenz-Verhältnisswerte und deren genomische Position und Größe. Die blauen Pfeile stellen die Lokalisation und Transkriptionsrichtung der wichtigen Gene dar, die innerhalb der Deletion lokalisiert sind. Klon RP5-914P14, der das 3'-Ende von *DCX* umspannt, war partiell deletiert.

Die flankierenden Klone der proximalen Bruchpunkte waren RP6-191P20 und RP5-889N15; RP5-914P14 war der partiell deletierte Klon am distalen Bruchpunkt. Den Array-CGH- und FISH-Daten zufolge enthielt die deletierte Region die Gene *COL4A6*, *COL4A5*, *FACL4*, *PAK3* und möglicherweise Teile des Gens *DCX*.

Letzteres wurde mittels *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA)- Analyse verifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die *DCX*-Exone 6 und 7 bei der Patientin in einer Kopie des X-Chromosoms deletiert waren, während beide Elternteile keine Deletion im *DCX*-Gen aufwiesen (Abbildung 16). X-Inaktivierungsversuche an Lymphozyten aus peripherem Blut der Patientin ergaben eine ungleiche X-Inaktivierung, da das X-Chromosom mit der Deletion in 100/100 analysierten Zellen inaktiv war.



**Abbildung 16.** Detektion der *DCX* Deletion mittels MLPA. Verglichen mit dem Kontrollloкус in Chromosom 17 (gelber Balken), der in zwei Kopien vorlag (Gendosis: 1,0), zeigten die Exons 6 und 7 von *DCX* der Patientin eine unialelische Deletion (Gendosis: 0,5). Die Mutter, die zwei X-Chromosomen aufwies, trug zwei Kopien aller sieben *DCX*-Exone und der Vater, der ein X-Chromosom trug, jeweils eine Kopie aller sieben Exone. Somit lag keine Deletion bei den Eltern vor.

### 3.2.4.1.2 Renaler und zerebraler Phänotyp der Patientin MA/3

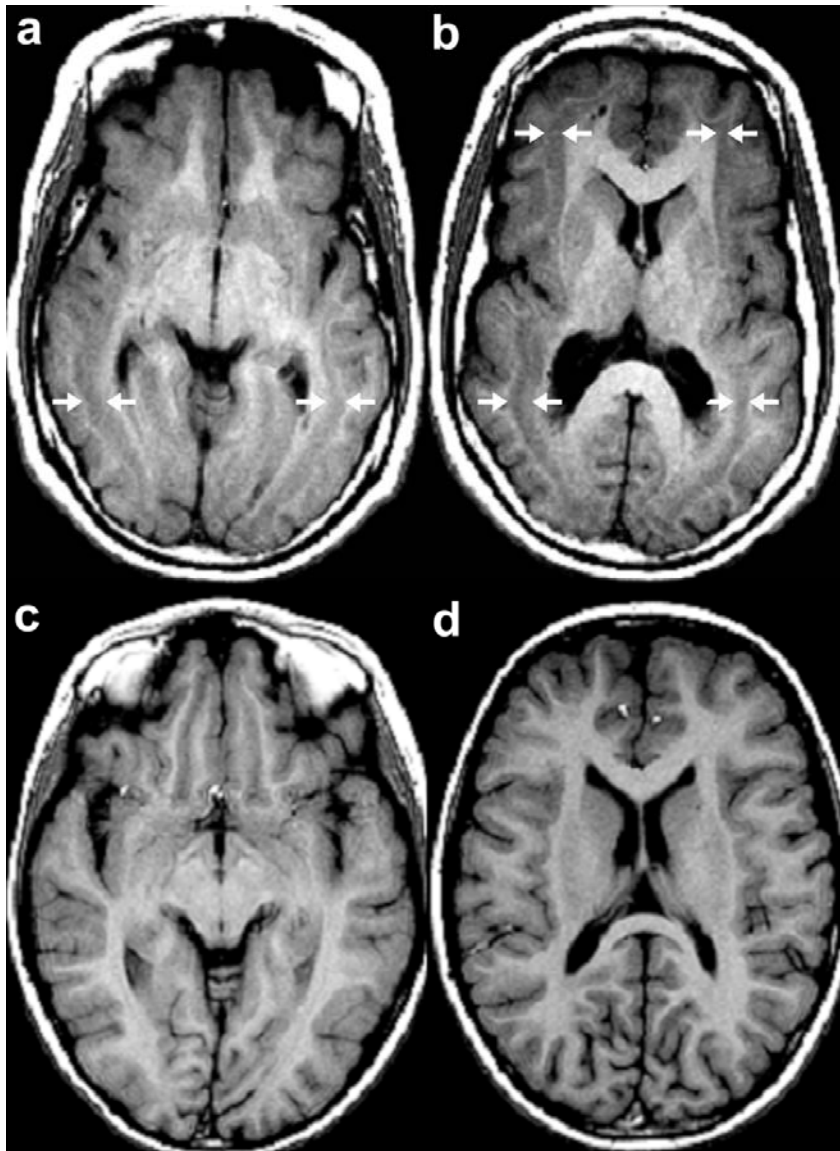
Die Patientin zeigte verschiedene Dysmorphien (Abbildung 17 oben). Es wurde eine Nierenbiopsie durchgeführt. Die Evaluierung unter dem Lichtmikroskop war unauffällig. Eine ultrastrukturelle Untersuchung ergab eine unregelmäßige Verschmächtingung der glomerulären Basalmembran und eine segmentale Aufsplitterung der Lamina densa (Abbildung 17 unten). Beide Befunde sind hinweisend auf das Vorliegen eines Alport Syndroms.



**Abbildung 17.** Faziale Merkmale und ultrastrukturelle Evaluation der Nierenbiopsie der 16-jährigen Patientin mit Mikrodeletion in Xq22.3-q23, die die Gene *COL4A6*, *COL4A5*, *FACL4*, *PAK3* und die Exons 6 und 7 des *DCX* Gens umfasste. Oben: Die Patientin wies eine Mittelgesichtshypoplasie, eine eingesunkene Nasenwurzel, eine tiefe Nackenhaargrenze, kleine Hände und Finger, Plattfüße und bilaterale Sandalenlücken auf. Einverständniserklärungen der Eltern zur nicht-anonymisierten Abbildung der Patientin lagen vor. Unten: Ausschnitt einer glomerulären Kapillare mit unregelmäßiger Verdünnung der Basalmembran und segmentalen Aufsplitterung der Lamina densa. Beide Befunde sind kompatibel mit dem Vorliegen eines Alport Syndroms. EM: x2100.

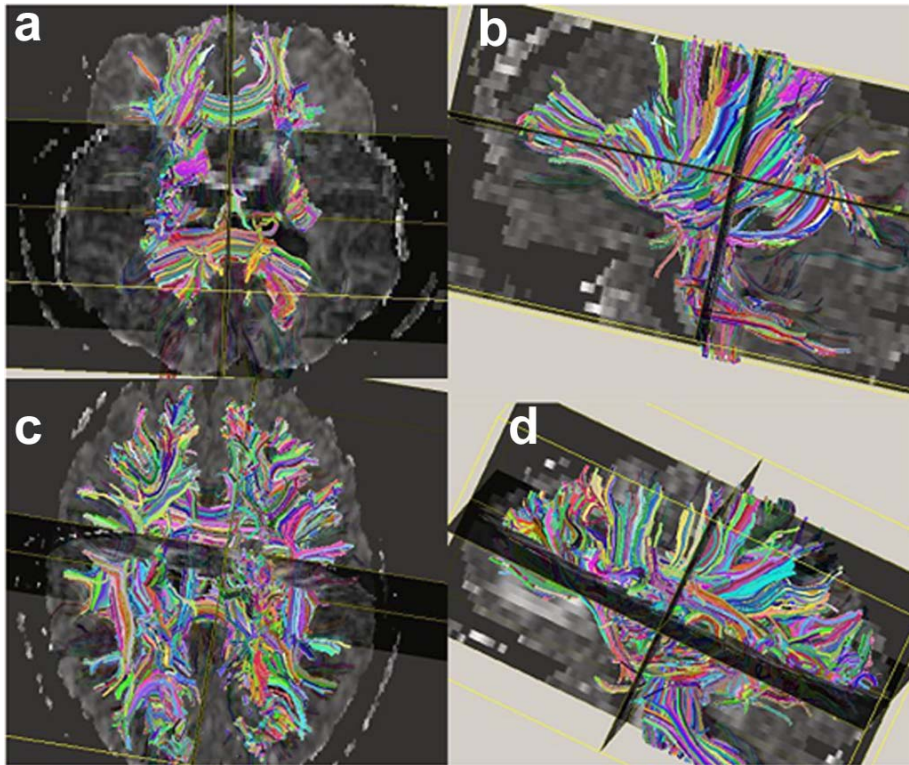


Eine kraniale Magnetresonanztomografie lies bilateral eine subkortikale Heterotopie mit einer Bandbreite von 3-9 mm parallel zum gyrierten Cortex erkennen (Abbildung 18). Dieser Befund ist typisch für eine *double cortex*-Bildung, die auf einer schweren neuronalen Migrationsstörung beruht.



**Abbildung 18.** Transaxiales T1 gewichtetes kraniales MRT in der horizontalen Ebene des Tractus opticus (a und c) und des Striatums mit dem Genu des Corpus callosums (b und d). (a, b) Die 16-jährige Patientin mit Mikrodeletion in Xq22.3-q23 einschließlich der Exons 6 und 7 von DCX zeigt ein 3–9 mm breites Band, das die gleiche Signalintensität zeigt wie der Cortex, parallel zum gyrierten Cortex (Pfeile). Diese Befunde sind typisch für eine gestörte neuronale Migration mit *double cortex*-Bildung. (c, d) Zum Vergleich das transaxiale T1 gewichtete kraniale MRT einer 13-jährigen weiblichen Kontrollperson.

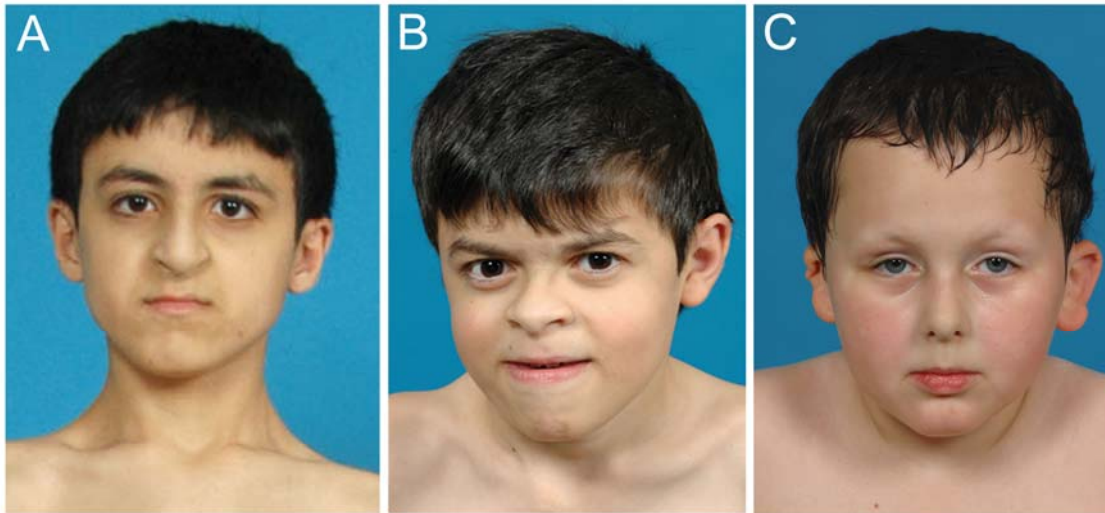
Die Darstellung der zerebralen Bahnsysteme durch *diffusion tensor imaging* (DTI) zeigte eine vollständige Desorientierung im Bereich des *double cortex* und eine ausgeprägte Reduktion des fronto-occipitalen Bahnsystems (Abbildung 19).



**Abbildung 19.** 3D-Rekonstruktionen der Bahnen der weißen Substanz in horizontaler Ansicht (a und c) und links in der lateralen Ansicht (b und d). (a, b) Die 16-jährige Patientin zeigt eine komplette Desorientierung der Bahnen der weißen Substanz in der Region des *double cortex* und eine Reduktion der fronto-occipitalen Bahnsysteme. (c, d) Zum Vergleich die Bahnen der weißen Substanz einer 13-jährigen weiblichen Kontrollperson.

### 3.2.4.2 Detektierte Mikroaberrationen bei CAKUT-Patienten

Bei drei der 30 Patienten mit einem CAKUT-Phänotyp und mindestens einem zusätzlichem extrarenalen Symptom wurden mittels Array-CGH vermutlich ursächliche genomische Mikroimbalancen identifiziert und mittels FISH-Analyse bestätigt. Es konnte also in 10% der Fälle eine Diagnose gestellt werden.



**Abbildung 20.** Faziale Merkmale der Patienten (A) HD01 im Alter von 12 Jahren, (B) HD01-2 (Bruder von HD01) im Alter von 10 Jahren, (C) HD16 im Alter von 9 Jahren. Einverständniserklärungen der Eltern zur nicht-anonymisierten Abbildung der Patienten lagen vor.

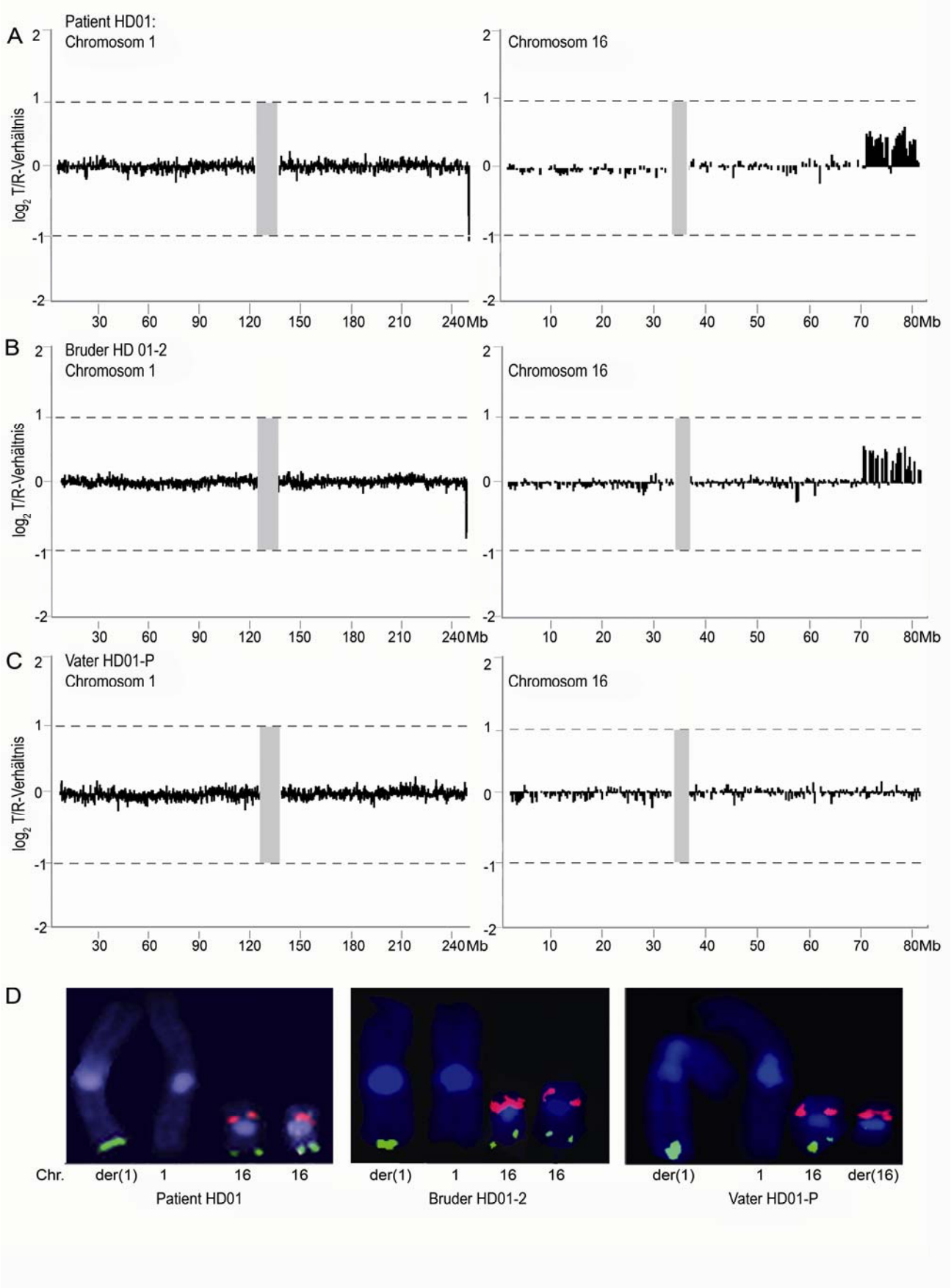
#### 3.2.4.2.1 Patient HD01

Bei dem 12-jährigen Jungen wurde eine Hypospadie, ein Scrotum bipartitum und ein Kryptorchismus, sowie eine mentale Retardierung, ein Ohranhängsel, Augenfehlbildungen, eine Gaumenspalte, eine Laryngomalazie und eine Trichterbrust diagnostiziert. Die MRT-Untersuchung zeigte unspezifische Gehirnveränderungen. Im Alter von neun Jahren trat eine persistierende nicht-infektiöse Mikrohämaturie auf. Die Array-CGH-Analyse detektierte einen Verlust im chromosomalen Band 1q44 vom BAC-Klon RP11-407H12 (246,57-246,74 Mb) bis zum Telomer. Die Größe dieses Verlustes betrug  $0,59 \pm 0,15$  Mb. Darüber hinaus zeigte sich ein  $6,55 \pm 0,13$  Mb großer Gewinn von 16q23.3-q24.3 vom Klon RP11-298D21 bis zum Telomer (Abbildung 21 A). Durch eine FISH-Analyse konnte gezeigt werden, dass diese Imbalancen auf eine unbalancierte Translokation  $der(1)t(1;16)(q44;q23.3)$  zurückzuführen sind (Abbildung 21 D, links). Diese unbalancierte Translokation verursachte eine partielle Monosomie des chromosomalen Bands 1q44 und eine Trisomie der Banden 16q23.3 bis 16q24.3. Beim 10-jährigen Bruder des Patienten

(Patient HD01-2) wurden mittels Array-CGH-Analyse dieselben Bruchpunkte in den Chromosomenbanden 1q und 16q nachgewiesen, die ebenfalls laut FISH-Analyse auf eine unbalancierte Translokation  $der(1)t(1;16)(q44;q23.3)$  zurückzuführen waren (Abbildung 21 B und 21 D Mitte). Der Patient HD01-2 stimmte in vielen klinischen Merkmalen mit dem Patient HD-1 überein, wies aber zusätzlich eine Kraniosynostose, eine Mikrozephalie (KU 49 cm, < 3. Perzentile), eine Tetraplegie und muskuläre Hypertonie, Herzfehlbildungen (Anomalie der pulmonalvenösen Einmündungen, ASD II, PDA) und eine Nabelhernie auf. Außerdem zeigte er dysmorphe Merkmale wie abfallende Lidachsen, eine kleine Nase mit breiter Nasenwurzel, einen kleinen Mund mit dünner Oberlippe, tiefsitzende Ohren, einen unilateralen Klumpfuß und Anomalien der Zehen. Das zerebral MRT detektierte ein Mittellinienlipom. Bei einer augenärztlichen Untersuchung wurden ein Strabismus und eine Hyperopie diagnostiziert. Der Abdominalultraschall ließ eine Ektopie der linken Niere erkennen. Beide Brüder wiesen eine normale Nierenfunktion auf. Die Tabelle 6 zeigt einen Vergleich der klinischen Symptome des Patienten HD01 und seines Bruders HD01-2. Die FISH-Analyse des Vaters detektierte eine 1;16-Translokation in balancierter Form. Die Array-CGH bestätigte ein balanciertes Profil für die Chromosomen 1 und 16 des Vaters (Abbildung 21C). Folglich wurden die unbalancierten Translokationen der Patienten HD01 und HD01-2 von dem klinisch nicht betroffenen Vater ererbt.

	<b>Patient HD01</b>	<b>Patient HD01-2</b>
<b>Alter (Jahre)</b>	12	10
<b>Geschlecht</b>	Männlich	Männlich
<b>Wachstumsparameter</b>	Körpergröße: 157 cm Körpergewicht: 44 kg Kopfumfang: 55,5 cm	Körpergröße: 132 cm Körpergewicht: 25 kg Kopfumfang: 49 cm
<b>Nieren-/Urogenital-Phänotyp</b>	Hypospadie, Scrotum, Mikrohämaturie	Kryptorchismus, bipartitum, Kryptorchismus, Nierenektomie
<b>Neurologische Auffälligkeiten</b>	Mentale Retardierung, EEG Auffälligkeiten	Mentale Retardierung, Tetraplegie, Muskelhypertonie, zerebrales Mittellinienlipom
<b>Augen-anomalien</b>	Exkavation der Papille, Glaukom	Strabismus, Hyperopie
<b>Ohr anomalien</b>	Tiefsitzende Ohren, unilaterales Ohranhängsel	Tiefsitzende Ohren
<b>Faziale Dysmorphien</b>	Prominente Stirn, abfallende Lidachsen, schnabelförmige Nase, langes Philtrum, kleiner Mund und dünne Lippen	Abfallende Lidachsen, kleine Nase mit breiter Nasenwurzel, kleiner Mund mit dünner Oberlippe
<b>Herzfehler</b>	-	Anomalie der pulmonalvenösen Einmündungen, ASD II, PDA
<b>Hautanomalien</b>	Pterygium colli, Hämangiom am linken Bein	-
<b>Knochen und weitere Auffälligkeiten</b>	Pectus excavatum, Fingeranomalien, Gaumenspalte, Laryngomalazie	Kraniosynostose, unilateraler Klumpfuß, Anomalien der Zehen, Nabelhernie

**Tabelle 6.** Phänotyp des Patienten HD01 und seines Bruders HD01-2, die beide einen Verlust von 0,59 Mb in 1q44 und einen Gewinn von 6,55 Mb in 16q23.3-q24.3 aufgrund einer unbalancierten Translokation t(1;16)(q44;q23.3) aufwiesen.



**Abbildung 21.** Genetische Befunde des Patienten HD01 und seines Bruders HD01-2, die einen CAKUT-Phänotyp und verschiedene extrarenale Symptome aufwiesen und die Befunde des nicht-betroffenen Vaters. (A) Patient HD01: Array-CGH Profile von Chromosom 1 und 16. Chromosom 1 zeigte einen terminalen Verlust in der chromosomalen Bande 1q44 und Chromosom 16 einen terminalen Gewinn von 6,55 Mb in 16q23.3-q24.3. Die Mittelpunkte aller Klone sind auf der X-Achse in genomischer Reihenfolge von 1p bis 1q bzw. 16p bis 16q gegen die normalisierten  $\log_2$  Test/Referenz-Verhältnisse auf der Y-Achse aufgetragen. (B) Patient HD01-2 (Bruder von HD01): Array-CGH Profile der Chromosomen 1 und 16, die die gleichen Imbalancen mit den gleichen Bruchpunkten zeigten wie die des Patienten HD01. (C) Array-CGH Profile der Chromosomen 1 und 16 des Vaters von HD01 und HD01-2: Die Profile waren balanciert. (D) Patient HD01 (links) und HD01-2 (Mitte): Mittels FISH Analyse konnte gezeigt werden, dass eine unbalancierte Translokation ( $\text{der}(1)\text{t}(1;16)(\text{q}44;\text{q}23.3)$ ) vorlag. Das derivative Chromosom 1 wies eine terminale Deletion in 1q und zusätzliches Material von 16q auf. Die grünen Signale von Klon RP11-24M10, die auf 16q23.3 kartieren, wurden auf einem Chromosom 1 und auf beiden Chromosomen 16 detektiert. Die roten Signale auf 16p stellen die Kontrollsignale von Klon RP11-455F5 dar. (Rechts): In der FISH-Analyse des Vaters waren die grünen Signale von Klon RP11-24M10, der in 16q23.3 kartiert, auf einem Chromosom 1 und auf einem Chromosom 16 zu sehen. Der Vater wies die 1;16-Translokation also in balancierter Form auf.

#### 3.2.4.2.2 Patient HD16

Dieser 9-jährige Patient wies eine unilaterale Nierenhypoplasie und eine proximale Ureterstenose neben einer mentalen Retardierung, einer Makrozephalie, einer Innenohratriesie, einer Mikrotie und multiplen hypopigmentierten Hautläsionen auf (Details siehe Tabelle 7). Die Nierenfunktion war zum Zeitpunkt der Vorstellung normal. Die Array-CGH detektierte einen Gewinn von  $2,4 \pm 0,31$  Mb in der chromosomalen Bande 1q21.1, der die Klone RP11-337C18 (145,07-145,27 Mb) bis RP11-1148E18 (147,48-147,65 Mb) umfasste (Abbildung 22 A, B). Die Duplikation der Klone RP11-433J22 auf 1q21.1 wurde mittels Interphase-FISH-Analyse bestätigt. Die FISH-Analyse an Chromosomenpräparaten der Eltern ergab keinen Hinweis auf eine Duplikation (Abbildung 22 D).

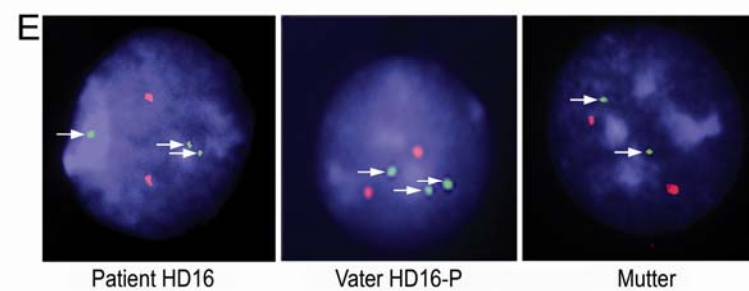
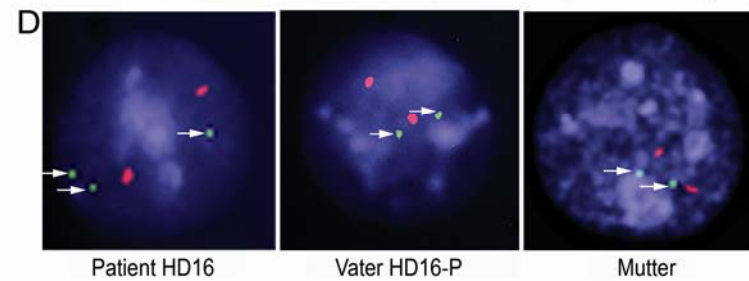
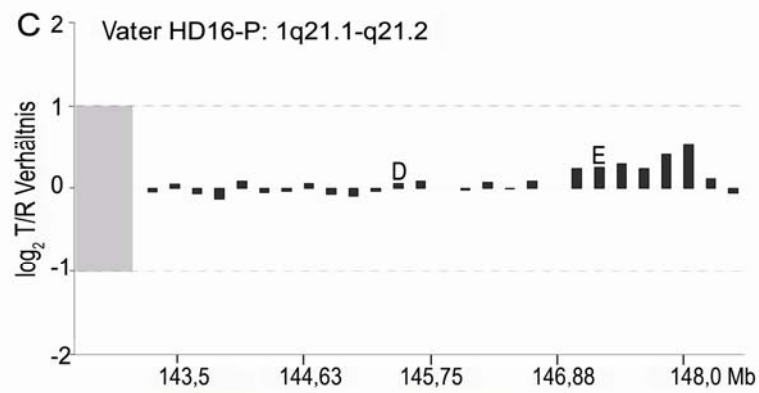
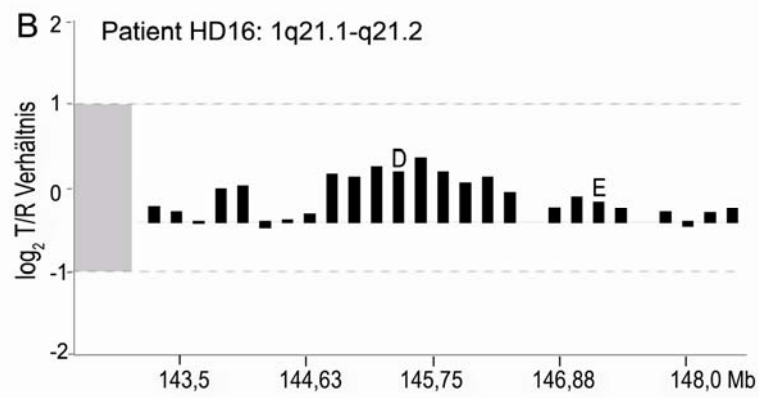
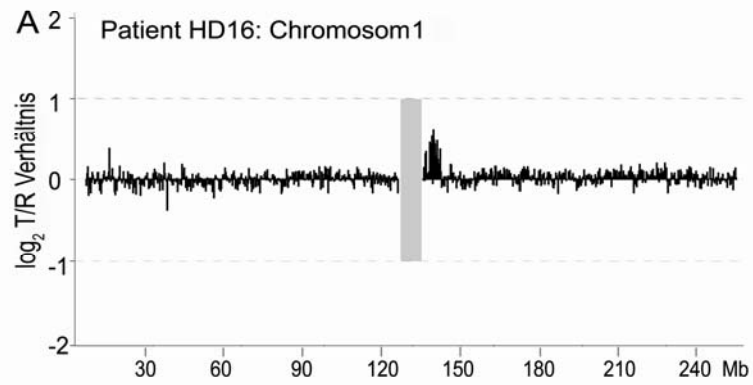
Die Array-CGH-Analyse des Vaters des Patienten identifizierte einen Gewinn von  $1,3 \pm 0,28$  Mb in 1q21.1-q21.2 von Klon RP11-744H18 (147,27-147,38 Mb) bis Klon RP11-125H17 (148,54-148,71 Mb) (Abbildung 22 D). Dieser Gewinn überlappte mit dem distalen Teil des Gewinns des Patienten. Hierbei handelt es sich um eine chromosomale Region, die als segmentale Duplikation beschrieben wurde. Diese sowohl beim Vater als auch beim Sohn duplizierte Region wurde mittels Interphase-FISH-Analyse mit dem Klon RP11-744H18 verifiziert (Abbildung 22 E). Um zu beurteilen, ob die Duplikation in 1q21.1-q21.2 mit einem Phänotyp beim Vater einherging, wurden klinische Untersuchungen und Nierenultraschalluntersuchungen durchgeführt. Im Ultraschall fanden sich keine Auffälligkeiten der Nieren oder des Urogenitaltrakts beim Vater. Seine Intelligenz war normal, der Kopfumfang im Normbereich. Die Ohren waren zwar groß, aber normal geformt und

es lag keine Gehörgangsatresie vor. Eine hypopigmentierte Hautläsion und abfallende Lidachsen wurden beobachtet. Ein Vergleich der genetischen Befunde und der klinischen Merkmale des Patienten und seines Vaters ist in Tabelle 7 aufgeführt.

	<b>Patient HD16</b>	<b>Vater HD16-P</b>
<b>Alter (Jahre)</b>	9	41
<b>Geschlecht</b>	Männlich	Männlich
<b>Genotyp</b>	2,93 ± 0,31 Mb Duplikation in 1q21.1 von Klon RP11-640M9 (143,16-143,33 Mb) bis RP11-301M17 (146,15-146,20 Mb)	1,23 ± 0,18 Mb Duplikation in 1q21.1-q21.2 von Klon RP11-744H18 (147,27-147,38 Mb) bis RP11-125H17 (148,56-148,71 Mb)
<b>Wachstumsparameter</b>	Körpergröße: 141 cm (75. Perz.) Körpergewicht: 45 kg (97. Perz.) Kopfumfang: 59 cm (> 97. Perz.)	Körpergröße: 173 cm (normal) Körpergewicht: 64 kg (normal) Kopfumfang: 55,5 cm (normal)
<b>Nieren-/Urogenital-Phänotyp</b>	Unilaterale Nierenhypoplasie / proximale Ureterstenose	-
<b>Neurologische Auffälligkeiten</b>	Mentale Retardierung, Sprachentwicklungsverzögerung	-
<b>Ohranomalien</b>	Unilaterale Atresie des Innenohrs, Mikrotie	-
<b>Faziale Dysmorphien</b>	Vorgewölbte Stirn, kleiner Mund, kleines Kinn	Große Ohren
<b>Haut-auffälligkeiten</b>	Hypopigmentierte Stellen (n > 20), occipital weiße Haarsträhne	Hypopigmentierte Stelle (n = 1)

**Tabelle 7.** Genotyp und Phänotyp des Patienten HD16 und seines Vaters HD16-P



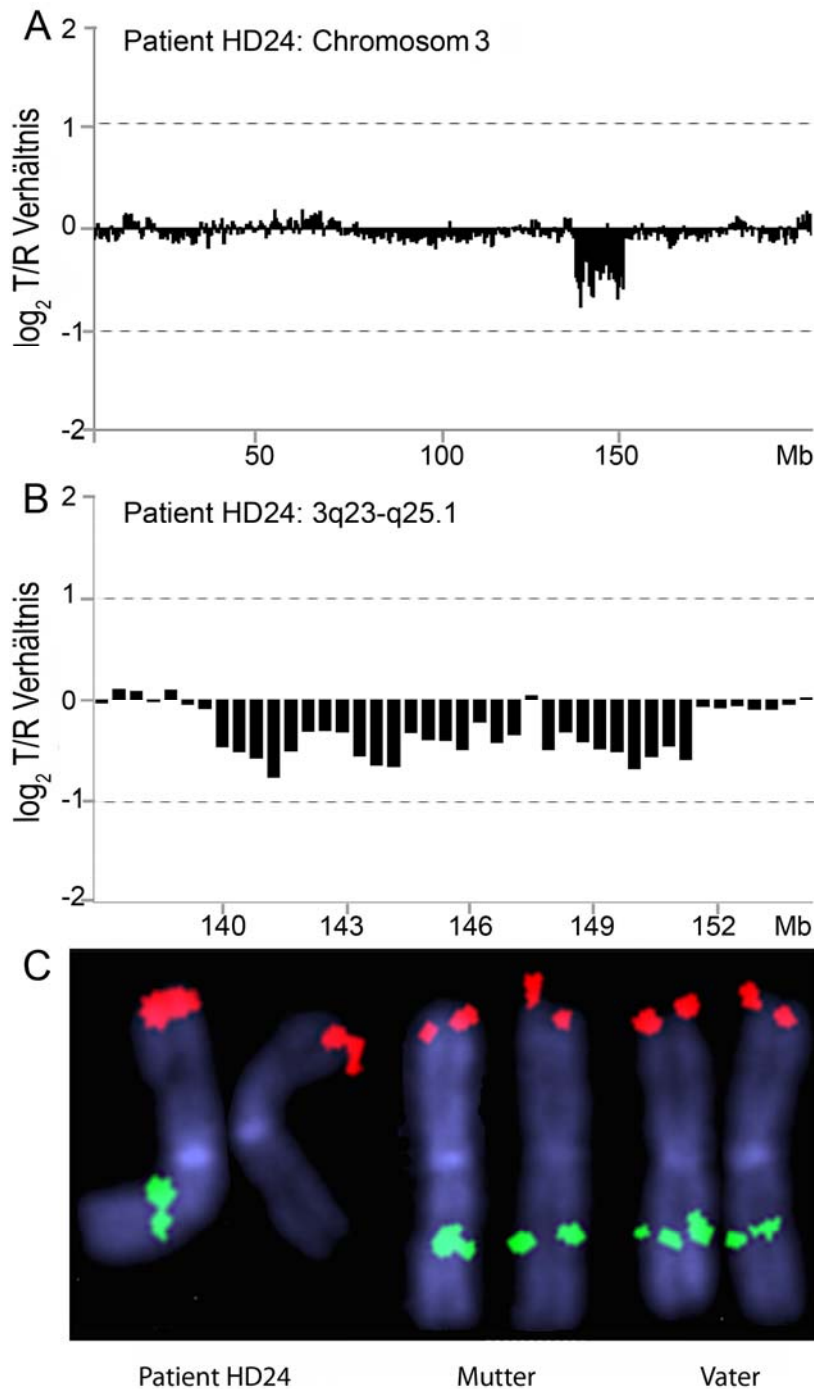


**Abbildung 22.** Genetische Befunde des Patienten HD16, der einen CAKUT-Phänotyp mit unilateraler renaler Hypoplasie, proximaler Ureterstenose und verschiedenen extrarenalen Symptomen aufwies, und seines Vaters. A: Patient HD16: Array-CGH-Profil von Chromosom 1 zeigte eine Mikroduplikation. Die Mittelpunkte aller Klone sind auf der X-Achse in genomischer Reihenfolge von 1p bis 1q gegen die normalisierten  $\log_2$  Test/Referenz-Verhältnisse auf der Y-Achse aufgetragen. B: Vergrößerte Ansicht der 2,93 Mb großen duplizierten Region in 1q21.1. D, BAC Klon RP11-433J22 (1q21.1) wurde in der Interphase-FISH in (D) eingesetzt. BAC Klon RP11-744H18 (1q21.1) wurde in der Interphase-FISH in (E) eingesetzt. C: Die Array-CGH-Analyse des Vaters des Patienten (HD16-P) detektierte einen Gewinn in 1q21.1-q21.2. Die Vergrößerung der duplizierten Region zeigt einen Gewinn von 1,23 Mb, der mit dem distalen Teil des Gewinns des Patienten überlappt. D, BAC Klon RP11-433J22 (1q21.1) wurde in der Interphase-FISH in (D) eingesetzt. E, BAC Klon RP11-744H18 (1q21.1) wurde in der Interphase-FISH in (E) eingesetzt. D: Durch Interphase-FISH mit dem Klon RP11-433J22 (1q21.1) wurde die Duplikation bei dem Patienten HD16 bestätigt (links: Drei grüne Signale, Pfeile), und zeigte einen normalen diploiden Status auf den Chromosomen der Eltern (Mitte und rechts: Zwei grüne Signale, Pfeile). RP11-465B22 (1p36.33) (rote Signale) diente als Kontrolle. E: Bestätigung der Duplikation des BAC Klons RP11-744H18 (1q21.1) bei Patient HD16 und seinem Vater HD16-P (links und Mitte: Jeweils drei grüne Signale, Pfeile), während bei der Mutter keine Duplikation vorlag (rechts: Zwei grüne Signale, Pfeile). RP11-465B22 (1p36.33) (rote Signale) diente als Kontrolle.

#### 3.2.4.2.3 Patient HD24

Dieser 22-jährige Patient zeigte eine bereits pränatal diagnostizierte, bilaterale Nierendysplasie mit Hydronephrose der linken Seite. Außerdem wurden eine mentale Retardierung, eine Mikrozephalie, eine Wachstumsstörung, multiple Gelenkkontrakturen, eine Blepharophimose und eine Ptosis diagnostiziert. Die CT-Untersuchung zeigte eine Dandy Walker-Zyste. Die Nierenfunktion war normal.

Mittels Array-CGH wurde ein Verlust in den Chromosomenbanden 3q23-q25.1 identifiziert, der den Bereich von Klon RP11-89E16 bis Klon RP11-210G22 betraf (Abbildung 23 A, B). Diese Deletion wurde mittels FISH-Analyse bestätigt. An den parental Chromosomen konnte gezeigt werden, dass keine Deletion vorlag und somit die Deletion des Patienten *de novo* entstanden war (Abbildung 23 C). Die exakte Bruchpunktbestimmung mittels FISH grenzte die Deletionsgröße auf  $11,93 \pm 2,19$  Mb ein (flankierende Klone am proximalen Bruchpunkt: RP11-2A4 (138,89-139,05 Mb) und RP11-397E9 (140,27-140,45 Mb); flankierende Klone am distalen Bruchpunkt: RP11-210G22 (152,21-152,37 Mb) und RP11-3F11 (153,00-153,17 Mb)). Ferner führten wir eine Mutationsanalyse der verbleibenden Kopie des *AGTR1* Gens durch, welches durch den partiellen 3q-Verlust beim Patienten heterozygot deletiert war. Es wurden keine pathogenen Veränderungen des *AGTR1*-Gens detektiert. Besonderes Augenmerk wurde auf eine potentielle *AGTR1*-Mutation 110\_111insT und 845C-T gelegt, die in einem Feten mit autosomal-rezessiver renaler tubulärer Dysgenese beschrieben worden war (Gribouval *et al.* 2005).



**Abbildung 23.** Genetische Befunde des Patienten HD24, der einen CAKUT-Phänotyp mit bilateraler renaler Dysplasie, unilateraler Hydronephrose und verschiedenen extrarenalen Symptomen aufwies. A: Array-CGH-Profil von Chromosom 3 zeigt eine Deletion. Die Mittelpunkte aller Klone sind auf der X-Achse in genomischer Reihenfolge von 3p bis 3q gegen die normalisierten  $\log_2$  Test/Referenz-Verhältnisse auf der Y-Achse aufgetragen. B: Vergrößerte Ansicht der 11,93 Mb großen deletierten Region in 3q23-q25. C: Mittels FISH-Analyse mit dem BAC Klon RP11-349D24 wurde die Deletion in 3q bei Patient HD24 bestätigt (links: Ein grünes Signal) und mittels FISH-Analyse der elterlichen Chromosomen gezeigt, dass die Deletion *de novo* entstanden war (Mitte und rechts: Zwei grüne Signale). RP11-122D19 (3p21.1) (rote Signale) diente als Kontrolle.

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Reproduktionsgenetik

Da mit einer CGH-Analyse Aneuploidien aller Chromosomen in einem Experiment detektiert werden können, würde sie eine ideale Technik für die Pränataldiagnostik darstellen, um numerische sowie unbalancierte strukturelle Aberrationen zu detektieren. Die Anwendung wurde bisher durch die Dauer der konventionellen Protokolle erschwert, die eine Zeit von mehr als drei Tagen in Anspruch nehmen. Daher war es das erste Ziel dieser Studie, ein schnelles aber zuverlässiges CGH-Protokoll zu entwickeln. Um ein Aneuploidiescreening an Polkörpern oder Blastomeren in der PGD zu ermöglichen, musste das Protokoll an Einzelzellen anwendbar sein. Daher war es unser zweites Ziel, das schnelle CGH-Protokoll an Einzelzellen anzuwenden (Schnell-CGH). Das dritte Ziel war es, das etablierte Schnell-CGH-Protokoll zum Aneuploidie-Screening an Polkörpern von Patientinnen einzusetzen, die wegen Infertilität mit den Indikationen „erhöhtes mütterliches Alter“ (*advanced maternal age*, AMA) oder „wiederholtes Implantationsversagen“ (*repeated implantation failure*, RIF) in Behandlung waren.

Um das Schnell-CGH-Protokoll zu etablieren, evaluierten wir jeden Schritt, der für die Analyse benötigt wurde und modifizierten diesen, sofern eine Reduktion der Dauer möglich war. Anschließend analysierten wir eine Tumorzelllinie mit bekannten Aneuploidien großer und kleiner Chromosomen und konnten zeigen, dass das Schnell-CGH-Protokoll innerhalb von zwölf Stunden zuverlässig die bekannten Imbalancen detektierte. Somit konnte die Analysezeit der Standardprotokolle (Weber *et al.* 1996) von ungefähr 64 h reduziert werden. Für die Anwendung an Einzelzellen mussten zwei zusätzliche Schritte für die DNA-Extraktion aus der Einzelzelle und die DNA-Amplifikation ergänzt werden. Dadurch wurde die Dauer des Schnell-CGH-Protokolls auf 16 h erhöht. Weiter konnten wir zeigen, dass mit dem Schnell-CGH-Protokoll numerische und unbalancierte strukturelle Aberrationen in dieser kurzen Zeitspanne und mit einer geringen DNA-Menge, die der DNA-Menge einer Einzelzelle entspricht, zuverlässig detektierbar waren. Einzelne Lymphozyten und Fibroblasten konnten ebenfalls erfolgreich analysiert werden.

Mit dem Schnell-CGH-Protokoll ist es nun möglich, ein Aneuploidie-Screening über Nacht an Einzelzellen oder einer geringen DNA-Menge durchzuführen. Diese Zeitspanne entspricht der einer FISH Untersuchung, die routinemäßig in der Pränataldiagnostik zur Detektion von Aneuploidien der Chromosomen 13, 18, 21, X und Y an unkultivierten Amniozyten angewandt wird (Eiben *et al.* 1999). Die CGH-Analyse hat allerdings den Vorteil der numerischen Analyse von 19 weiteren Chromosomen.

Wir konnten zeigen, dass die Schnell-CGH chromosomale Aneuploidien in diploiden und haploiden Zellen detektieren kann, indem wir Kontrollexperimente an einem Lymphozytenkern und einem Polkörper mit bekannten numerischen Aberrationen durchführten. Wir stellten uns die Frage, ob Polkörper, die auf Glasobjektträgern fixiert waren, nach Mikrodissektion analysiert werden können. Mit dem Schnell-CGH-Protokoll untersuchten wir 32 erste Polkörper die vor der Fertilisierung der Oozyten biopsiert wurden. Diese ersten Polkörper, die von 16 Patientinnen im Alter von 33 bis 44 Jahren (durchschnittliches Alter: 38 Jahre), die wegen AMA oder RIF behandelt wurden, stammten, wiesen eine Aneuploidierate von 75 % auf. Dieses lässt auf eine Aneuploidierate der zugehörigen Eizellen schließen, die mindestens so hoch ist, da die Fehlverteilungen, die in der Meiose II in den Oozyten auftreten, nicht detektiert werden können, wenn der erste Polkörper untersucht wird. Bei der Untersuchung von Polkörpern der Eizellen von 46 Patientinnen mit dem Standard-CGH-Protokoll fanden Fragouli *et al.* (2006) eine Aneuploidierate von 22 %. Diese niedrige Anzahl an detektierten numerischen Aberrationen ist auf die unterschiedlichen Indikationen der Patientinnen, deren Polkörper und Oozyten untersucht wurden, zurückzuführen. Nur zwei der 46 Patientinnen, über die in Fragouli *et al.* berichtet wurde, waren aufgrund von AMA oder RIF behandelt worden. Diese beiden Indikationen sind jedoch die, die in unserem und anderen IVF-Zentren vorherrschend sind, insbesondere im Hinblick auf PGD, so dass wir unseren Fokus auf die Polkörper dieser Patientinnen legten.

Die von uns bestimmte Polkörper-Aneuploidierate von 75 % stimmt mit der Studie von Wells *et al.* überein. In der Arbeit wurden mittels CGH detektierte chromosomale Imbalancen in neun von zehn Polkörpern einer 40-jährigen Patientin mit Implantationsversagen beschrieben. Voullaire *et al.* (2002) publizierten eine CGH-Analyse an Blastomeren von 20 Patientinnen mit Implantationsversagen, von denen 60 % der untersuchten Embryonen mindestens eine chromosomale Aberration aufwiesen. Einerseits können postzygotische Ereignisse die Aneuploidierate in Blastomeren, verglichen mit der in Polkörpern, erhöhen, andererseits kann eine etwas niedrigere Aneuploidierate in Embryonen auf den frühen genetischen Selektionsprozess zurückgeführt werden. Sobald eine Oozyte numerische Chromosomenaberrationen trägt, hat der respektive Embryo ein höheres Risiko, das 6-12 Zellstadium nicht zu erreichen. Dementsprechend zeigen viele Embryonen, insbesondere die von Patientinnen mit AMA oder RIF, bereits in einem frühen Stadium nach der IVF *in vitro* keine Weiterentwicklung mehr. Das durchschnittliche Patientinnenalter in der Studie von Voullaire *et al.* war 34 Jahre, während das Durchschnittsalter unserer Patientinnen bei 38 Jahren lag. Dies ist eine weitere Erklärung für die höhere Aneuploidierate, die in dieser Studie nachgewiesen wurde.

Der genetische Selektionsprozess in der frühen Embryonalentwicklung wird durch das Spektrum der in Abortmaterial gefundenen Aneuploidien belegt. Chromosomale Aberrationen, wie z.B. Monosomien oder Trisomien von Chromosomen, die viele Gene enthalten (z.B. die Chromosomen 1, 5, 6, 11, 19) werden nicht oder sehr selten in Fehlgeburten des ersten Trimesters gefunden (Boue *et al.* 1985). Das ist auf den selektiven Verlust der aberranten Embryonen während der frühen Schwangerschaft zurückzuführen. In unserer Studie lagen fast alle Chromosomen, auch die Chromosomen 5, 6, 11 und 19 mindestens ein Mal in unbalanciertem Zustand vor. Insbesondere waren 40 % der detektierten Aneuploidien in den Polkörpern Zugewinne, was die Monosomierate in fertilisierten Oozyten verglichen mit der in Frühaborten verdoppeln würde (Schreck *et al.* 2002). Das Aneuploidiescreening der Blastomeren mittels CGH zeigte außerdem, dass viele Chromosomen involviert waren, was anzeigt, dass frühe Embryonen mit vielen numerischen Aberrationen das 6-12 Zellstadium erreichen können. Unsere Daten weisen allerdings darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit eines *in vitro*-Entwicklungsstillstandes bei Embryonen mit Aneuploidien erhöht ist.

Eine Standardmethode für das Aneuploidiescreening in der PGD ist die FISH-Analyse mit Sonden für die fünf Chromosomen 13, 16, 18, 21, 22 (Stumm *et al.* 2006) oder sechs Chromosomen mit einer zusätzlichen Sonde für das X-Chromosom. Hätten wir das FISH-Sondenset mit fünf Sonden für die Analyse der Polkörper verwendet, wären nur 23 % der mittels CGH detektierten Aneuploidien erkannt worden. Das Sondenset der FISH mit sechs Sonden hätte die Detektionsrate der Aneuploidien auf 26 % erhöht. Nach der 6-Farben-FISH-Analyse hätten 13 der 32 (40 %) Oozyten aufgrund von einer oder mehrerer numerischer Aberrationen der ersten Polkörper verworfen werden müssen. Mittels CGH wurden Aneuploidien in zusätzlichen 11 der 23 (35 %) Polkörper gefunden, die der FISH-Analyse entgangen wären. Insgesamt ergibt sich damit eine Aneuploidierate von 75 %, die durch die CGH identifiziert wurde.

Es wurde bislang angenommen, dass der Großteil der Oozyten von Frauen ab dem Alter von 40 Jahren aneuploid sein kann (Hassold *et al.* 1985). Obwohl sich diese Annahme bei einer 44-jährigen Frau mit zwei und fünf Aberrationen in den zwei untersuchten Polkörpern bestätigte, analysierten wir jeweils zwei Zellen von Patientinnen im Alter von 44 und 41 Jahren von denen mindestens eine euploid war. Andererseits waren bei einer 33-jährigen Patientin, die aufgrund von RIF behandelt wurde, alle sechs untersuchten Polkörper aneuploid. Insgesamt zeigte sich in unserer Studie kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Aberrationen in den Polkörpern von Patientinnen, die aufgrund von RIF behandelt wurden und Patientinnen, die

ein erhöhtes, mütterliches Alter aufwiesen. Patientinnen mit RIF würden also aus der PGD mit der CGH-Analyse profitieren, auch wenn sie erst Anfang 30 sind.

Wir etablierten und validierten ein Schnell-CGH-Protokoll, das in zwölf Stunden; bzw. eine Einzelzell- und Polkörperanalyse, die in 16 Stunden durchgeführt werden kann. Diese kurze Zeitspanne ermöglicht neue Anwendungen dieser genomweiten Screeningmethode in der Pränataldiagnostik einschließlich der PGD. Nach der Anwendung der Schnell-CGH an 32 ersten Polkörpern von Patientinnen, die hauptsächlich aufgrund von AMA und RIF behandelt wurden, detektierten wir eine Aneuploidierate von 75 %, die fast alle Chromosomen betraf. Diese Daten sind für die Reproduktionsbiologie und hinsichtlich der Meiose I-Fehlverteilungen, sowie für die Anwendung der PGD in der assistierten Reproduktion interessant.

## 4.2 Klinische Genetik

### 4.2.1 Detektierte Mikroaberrationen in Patienten mit mentaler Retardierung

Wir nutzten die Array-CGH zur genomweiten Detektion von Mikrodeletionen und Mikroduplikationen in 60 klinisch gut charakterisierten Patienten mit unklarer MR/Entwicklungsverzögerung und zusätzlichen kongenitalen Anomalien. Vor der Analyse wurden verschiedene bekannte Ursachen für MR/Entwicklungsverzögerung (Chromosomen- und Subtelomeraberrationen, Mikrodeletionssyndrome, Fragiles X-Syndrom und Stoffwechselerkrankungen) ausgeschlossen. Die genomweite Array-CGH-Untersuchung wurde mit DNA-Chips durchgeführt, die entweder 6000 oder 8000 *large insert* Klone mit einer durchschnittlichen Auflösung von 0,5 Mb und *tiling-path* Abdeckung einiger chromosomaler Regionen trugen. Alle unbalanciert erscheinenden Klone (außer den Kopienzahlvarianten gemäß der *Database of Genomic Variants*) inklusive Einzelklonaberrationen wurden mittels FISH verifiziert. Nach Bestätigung wurden die elterlichen Chromosomen mit FISH untersucht. Mit dieser Vorgehensweise war es möglich, sechs höchstwahrscheinlich kausative Mikroimbancen zu detektieren und zu kartieren.

Der Schweregrad der Phänotypen der Patienten korrelierte nicht mit der Größe der Aberration, sondern mit dem Gengehalt der aberranten Region. Die zwei größten Deletionen (10,8 Mb auf 6q und 4 Mb auf Xq) enthielten 14 bzw. 8 Gene, während kleinere Deletionen (3,8 Mb auf 1q und 2,1 Mb auf 19p) 42 bzw. 64 Gene umfassten. Dementsprechend wies der Junge mit der Nullisomie von acht Genen auf Xq eine Lernbehinderung und leichte Dysmorphien auf, während das Mädchen mit der Monosomie von 42 Genen auf Chromosom 1q von einer moderaten bis schweren MR/Entwicklungsverzögerung und einem Anfallsleiden betroffen war. Das Mädchen mit der

Monosomie von 64 Genen auf Chromosom 19p hatte eine milde MR/Entwicklungsverzögerung, Wachstumsstörungen und ausgeprägte faziale Dysmorphien.

Vier der 14 deletierten Gene auf 6q11.1 bis 6q13 der Patientin mit moderater MR/Entwicklungsverzögerung waren aufgrund ihrer Expression und/oder Funktion interessante Kandidatengene für den neurologischen Phänotyp. *PTP4A1* (*protein-tyrosine phosphatase, type 4A member 1*) und *BAI3* (*brain-specific angiogenesis inhibitor 3*) werden im embryonalen und adulten Gehirn der Ratte (Takano *et al.* 1996) bzw. der Maus (Kee *et al.* 2004) exprimiert. Das *SMAP1*-Genprodukt (*stroma membrane associated protein 1*) reguliert die Funktion von Arf6 (Tanabe *et al.* 2005), einem Regulator für die Bildung von murinen dendritischen *Spikes* (Miyazaki *et al.* 2005) sowie für die Elongation der Axone und deren Verzweigung während der Hirnentwicklung der Ratte (Hernandez-Deviez *et al.* 2004). Das *RIMS1*-Gen (*regulating synaptic membrane exocytosis 1*) kodiert für ein Protein, das die Neurotransmitterausschüttung an der aktiven Zone der Synapse reguliert (Schoch *et al.* 2002) und entscheidend für das Lernen und das Gedächtnis der Mäuse ist (Powell *et al.* 2004).

Die Mikrodeletion Xq21.3 des Jungen mit Lernbehinderung umfasste zwei Gene, die eine Rolle im Zentralnervensystem (ZNS) spielen. *NAP1L3* (*nucleosome assembly protein 1-like 3*) wird spezifisch im humanen fetalen und adulten Gehirn exprimiert (Watanabe *et al.* 1996). Das *PCDH11X* Gen (*protocadherin 11, X-linked*), das ebenfalls im humanen fetalen Gehirn exprimiert wird, kodiert für ein Mitglied der Protocadherin-Familie (Yoshida und Sugano, 1999), das in der Bildung der funktionellen Synapsen im ZNS involviert ist.

Die kleinste detektierte Deletion (1.1 Mb auf 4p), die jedoch mit schwerer MR, Hirnatrophie, neurologischen Auffälligkeiten und Wachstumsstörung assoziiert war, enthält nur zwei Gene. Diese deletierten Gene, *GABRG1* und *GABRA2* (*GABA<sub>A</sub> receptor subunits gamma-1 and alpha-2*), sind Teil des GABA<sub>A</sub> Rezeptorgenclusters auf Chromosom 4p. Da *knockout*-Mäuse eine ungleiche Reifung der dendritischen *Spikes* zeigten, wird die GABA<sub>A</sub> Rezeptor-alpha-Untereinheit mit der Hirnentwicklung in Zusammenhang gebracht (Heinen *et al.* 2003). Daher gingen wir davon aus, dass die Monosomie der Gene, die für die Untereinheiten des Rezeptors Gamma-1 und Alpha-2 kodieren, einen Einfluss auf den Phänotyp unserer Patientin hat. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der Phänotyp teilweise auf eine rezessive Erkrankung zurückzuführen ist, da die Eltern der Patientin konsanguin waren.

Interessanterweise waren zwei der detektierten Imbalancen in dieser Studie zwar vererbt, schienen aber trotzdem kausativ für den Phänotyp der Patienten zu sein. Die Mikrodeletion auf Xq21.3 wurde von der Mutter des Patienten vererbt, die keine phänotypischen Auffälligkeiten



aufwies. Wir konnten zeigen, dass das X-Chromosom mit der Deletion präferentiell inaktiviert worden war. Gesunde weibliche Trägerinnen kleiner Deletionen auf dem X-Chromosom mit ungleicher X-Inaktivierung wurden bereits häufig beschrieben (Rosenberg *et al.* 2006; Lugtenberg *et al.* 2006a, 2006b). Außerdem wurde in der Literatur über einen weiteren männlichen Patienten mit MR und einem hohen, bogenförmigen Gaumen berichtet, der eine Deletion in Xq aufwies, die mit der Deletion unseres Patienten überlappt (Hodgson *et al.* 1987; Philippe *et al.* 1995).

Die einzige Mikroduplikation, die in dieser Studie detektiert wurde, betraf die chromosomale Bande 22q11.2 einschließlich der für das DiGeorge/VCFS-Syndrom kritischen Region (DGCR). Diese wurde vom phänotypisch normalen Vater vererbt und bei drei betroffenen Geschwistern detektiert. Das publizierte klinische Spektrum der Patienten mit Mikroduplikation der DGCR (Ensenauer *et al.* 2003; Yobb *et al.* 2005) entsprach im wesentlichen den Merkmalen bei den hier beschriebenen Geschwistern, bei denen eine MR/Entwicklungsverzögerung, muskuläre Hypotonie, Schlafapnoen, Mikrozephalie bei Geburt, einige Dysmorphien, Verhaltensauffälligkeiten, gehäufte Infekte und Hyperopie diagnostiziert wurden. In der Literatur wurden Elternteile, die diese Aberration trugen und nur milde phänotypische Ausprägung wie faziale Merkmale (Hassed *et al.* 2004) oder leichte Lernschwierigkeiten (Ensenauer *et al.* 2003; Menten *et al.* 2006) aufwiesen, beschrieben. Diese familiäre 22q11.2-Mikroduplikation zeigt, dass Imbalancen, die von gesunden Eltern vererbt wurden, durch Demaskierung rezessiver Mutationen oder durch epigenetische Effekte Phänotypen mit variabler Expressivität verursachen können. Daher scheint es voreilig zu sein, Imbalancen, die in zwei oder mehr Generationen einer Familie auftreten und keinen pathologischen Phänotyp zur Folge haben, unbeachtet zu lassen.

Vor der Array-CGH-Analyse von MR-Patienten sollten Fälle, die aufgrund ihrer klinischen Auffälligkeiten mit hoher Wahrscheinlichkeit eine kausative Mikrodeletion oder –duplikation aufweisen, im Hinblick auf Kostenreduzierung und Arbeitsaufwand gezielt ausgewählt werden. Um eine solche Vorauswahl zu treffen, stellten de Vries *et al.* (2005) ein Punktesystem vor, bei dem Punkte für klinische Merkmale vergeben wurden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer chromosomalen Veränderung korrelieren (MR in der Familiengeschichte, prä- oder postnatale Wachstumsstörungen, faziale, dysmorphe Merkmale, nicht-faziale Dysmorphien oder kongenitale Fehlbildungen). In Übereinstimmung mit diesen Autoren (de Vries *et al.* 2005), hatten in dieser Studie alle sechs Patienten mit kausativen Imbalancen faziale Dysmorphien verschiedener Ausprägung. Außerdem wiesen überdurchschnittlich viele Patienten mit Aberrationen, im Vergleich zu Patienten ohne Imbalancen, einen Kleinwuchs und/oder eine Mikrozephalie auf.

Der durchschnittliche Wert der Patienten mit Aberration betrug vier Punkte. Die Detektionsrate wäre somit höher, wenn nur Patienten mit vier oder mehr Punkten mit Array-CGH untersucht worden wären. Daher zeichnet sich ab, dass ein Wert von mindestens vier Punkten als Kriterium für eine klinische Vorauswahl gelten sollte. Allerdings wäre bei Anwendung dieses Schwellenwertes die Aberration eines unserer Patienten nicht detektiert worden. Aus diesem Grund sollten weitere klinisch wichtige Merkmale in das Wertesystem aufgenommen werden.

In dieser Studie war der Prozentsatz der Fälle mit Aberration unter den Patienten mit moderaten bis schweren Entwicklungsverzögerungen doppelt so hoch wie bei den Patienten mit milder MR/Entwicklungsverzögerung oder Lernbehinderung. Hätte die Patientin mit der Mikrodeletion auf 1q einen Punkt für ihre moderate bis schwere MR bekommen, hätte der Gesamtwert vier Punkte betragen und unseren Schwellenwert erreicht. Daher sollte der Schweregrad der MR/Entwicklungsverzögerung ein Kriterium im de Vries-Wertesystem werden. Unsere Daten zeigten, dass mittels MRT diagnostizierte Hirnfehlbildungen überdurchschnittlich häufig vorlagen. Demnach sollten auch Hirnfehlbildungen in die Kategorie „Kongenitale Fehlbildungen“ im Wertesystem aufgenommen werden.

#### **4.2.1.1 Schwere mentale Retardierung mit Atmungsanomalien (Pitt-Hopkins Syndrom, PHS)**

Mittels Array-CGH wurde eine neue Mikrodeletion auf dem langen Arm des Chromosoms 18 bei einem Mädchen mit schwerer mentaler Retardierung und fehlender Sprachentwicklung, muskulärer Hypotonie, Ataxie, Atmungsanomalien und einem groben Gesicht identifiziert, bei der klinisch ein Verdacht auf PHS bestand. Die Deletion, die mittels FISH genauer eingegrenzt wurde, ist annähernd 0,5 Mb groß und umfasst Teile des *TCF4*-Gens. Dieser Transkriptionsfaktor ist aus zwei Gründen ein optimales Kandidatengen zur Erklärung der MR der Patientin: Erstens ist das *TCF4*-Gen das einzige Gen in der deletierten Region und zweitens wird *TCF4* im Gehirn exprimiert und interagiert z.B. mit dem Tyrosinhydroxylase-Enhancer (Yoon *et al.* 1994), so dass die MR und die Anomalien des autonomen Nervensystems, die charakteristisch für das PHS sind, erklärt werden können. *TCF4* wird in sich entwickelnden embryonalen humanen Geweben hauptsächlich im Gehirn (Pscherer *et al.* 1996) und auch im adulten Gehirn reichlich exprimiert (Liu *et al.* 1998). Es scheint in der neuronalen Entwicklung und Differenzierung eine wichtige Rolle zu spielen. Dass *TCF4* tatsächlich für das PHS verantwortlich ist, ist gleichzeitig von zwei anderen Arbeitsgruppen entdeckt worden (Zweier *et al.* 1997; Amiel *et al.* 1997). Sie identifizierten größere genomische Aberrationen sowie *nonsense* und *missense* Mutationen bei insgesamt zehn Patienten mit PHS. Die Daten aller drei Publikationen bestätigen, dass Haploinsuffizienz der wahrscheinlichste

Mechanismus der Krankheitsentstehung ist. Interessanterweise zeigen *tcf4-knockout*-Mäuse frühe Letalität, während heterozygote *tcf4+/-* Mäuse keinen auffälligen Phänotyp aufzuweisen scheinen (Zhuang *et al.* 1996). Dieses sollte im Hinblick auf unsere Ergebnisse überprüft werden.

Das klinische Bild der PHS-Patienten weist überstimmende folgende Merkmale auf: Eine schwere MR mit fehlender Sprachentwicklung, grobe Gesichtszüge und Atmungsanomalien, zumindest ab einem bestimmten Alter, während andere klinische Merkmale variabler zu sein scheinen. Die Tatsache, dass die Atmungsanomalien nicht bereits bei Geburt auftreten müssen, was für die hier beschriebene Patientin zutrifft, könnte die Diagnosestellung verzögern, da es sich hierbei um ein richtungsweisendes Symptom handelt. Nach der Identifizierung des ursächlichen Gens ist es nun möglich, die klinische Diagnose mittels genetischer Testung zu überprüfen. Auch vor dem Einsetzen der Hyperventilation können Patienten, bei denen aufgrund von schwerer MR und typischen fazialen Merkmalen der Verdacht auf ein PHS besteht, daraufhin untersucht werden. Die genetische Beratung und die weitere medizinische Behandlung könnten von einer frühen Diagnosestellung profitieren. Da größere genetische Umbauten neben Mikrodeletionen oder Punktmutationen beschrieben wurden, ist zu empfehlen, die genetische Testung mit zwei Techniken durchzuführen. Um größere Umbauten auszuschließen, sollten geeignete Methoden wie z.B. die MLPA angewandt werden, während kleinere Veränderungen durch Sequenzierung des Gens, insbesondere des hoch-konservierten C-terminalen Bereichs, detektiert werden können.

Sowohl die Publikation von Zweier *et al.* als auch diese Studie zeigen, dass *TCF4*-Mutationen keine häufige Ursache für idiopathische mentale Retardierung oder andere Syndrome mit übereinstimmenden klinischen Merkmalen darstellen, so dass zu diesem Zeitpunkt ein generelles Screening von *TCF4* bei schwerer MR nicht gerechtfertigt erscheint.

## **4.2.2 Nierenfehlbildungen**

### **4.2.2.1 Detektierte Mikroaberrationen in Patienten mit ungeklärten syndromalen Nephropathien**

Dieses war die erste systematische Studie, um die Häufigkeit von submikroskopischen chromosomalen Deletionen und Duplikationen bei Patienten mit unklaren syndromalen Nephropathien zu evaluieren, die mittels Array-CGH detektierbar sind. Während bekannt ist, dass die Array-CGH einen erheblichen Beitrag zur genetischen Analyse von Patienten mit mentaler Retardierung liefert (Fiegler *et al.* 2003; Zielinski *et al.* 2005; Fensterer *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2006; Raven *et al.* 2006; Vissers *et al.* 2003; Shaw-Smith *et al.* 2004; De Vries *et al.* 2005; Menten

*et al.* 2006), wurde dieses noch nicht für ein Kollektiv von Patienten mit renalem Phänotyp und zusätzlichen extrarenalen Auffälligkeiten gezeigt. Daher untersuchten wir zehn ungeklärte Fälle, die entweder Glomerulopathien oder kongenitale Fehlbildungen der Nieren und des Urogenitaltrakts sowie zusätzliche Auffälligkeiten, wie z.B. pathologische neurologische Befunde (n=9), Herzfehlbildungen (n=6), Wachstumsanomalien (n=5) oder faziale- und nicht-faziale Dismorphien, aufwiesen. In diesem Patientenkollektiv konnte mittels Array-CGH eine kausative Mikrodeletion bei einer Patientin detektiert werden. Diese wurde mittels FISH-Analyse an den Chromosomen der Patientin verifiziert, und stellte sich durch die Untersuchung der elterlichen Chromosomen als *de novo* heraus. Diese Daten zeigen, dass genomische Mikroimbalancen in bis zu 10 % der Fälle mit unklaren syndromalen Nephropathien kausativ sein können. Diese Detektionsrate ähnelt der in Patienten mit ungeklärter mentaler Retardierung (Fiegler *et al.* 2003; Zielinski *et al.* 2005; Fensterer *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2006; Raven *et al.* 2006; Vissers *et al.* 2003; Shaw-Smith *et al.* 2004; De Vries *et al.* 2005; Menten *et al.* 2006).

Die kausative Mikrodeletion wurde bei einer Patientin identifiziert, bei der im Wesentlichen ein neurologischer Phänotyp (therapie-resistente Epilepsie, Entwicklungsverzögerung, Innenohrschwerhörigkeit) und faziale sowie nicht-faziale Dismorphien einschließlich einer Mittelgesichtshypoplasie diagnostiziert worden waren. Die ersten renalen Auffälligkeiten traten im Alter von fünf Jahren auf. Es handelte sich hier um eine Mikrohämaturie, der im Alter von sechs Jahren eine glomeruläre Proteinurie (0,5 g/d) folgte. Vor ihrem 14. Lebensjahr wurde die Patientin zu keinem pädiatrischen Nephrologen überwiesen. Der komplexe Phänotyp der Patientin konnte keinem bekannten Syndrom zugeordnet werden, so dass keine spezifische genetische Testung sinnvoll war. Daher führten wir eine Array-CGH-Untersuchung für ein genomweites Screening auf Mikroaberrationen durch. Die detektierte Mikrodeletion mit einer Größe von 3,3 Mb in der chromosomalen Region Xq22.3-q23 wurde mittels FISH- und MLPA-Analysen weiter charakterisiert. Sie enthielt die Gene *COL4A6*, *COL4A5*, *FACL4*, *PAK3* und die Exone 6 and 7 des *DCX* Gens, so dass erwiesen war, dass es sich hier um ein bisher unbeschriebenes *contiguous gene* Syndrom handelt.

Die darauf folgende klinische Charakterisierung umfasste die ultrastrukturelle Begutachtung der Nierenbiopsie, die eine Verschmälerung der glomerularen Basalmembran und eine Aufsplitterung der Lamina densa zeigte. Diese Symptome sind mit dem Alport-Syndrom vereinbar. Die klassischen histologischen Auffälligkeiten wie z.B. eine diffuse Verdickung der glomerulären Kapillarwände in Kombination mit einer korbgeflecht-artigen Transformation der Lamina densa, wurde bei unserer Patientin nicht beobachtet. Ein Fehlen dieser typischen Veränderung wurde

auch in der Literatur bei manchen weiblichen Patientinnen beobachtet (Kashtan *et al.* 2008). Jedoch konnte die Diagnose des „Alport-Syndroms“ aufgrund der Innenohrschwerhörigkeit der Patientin und der Detektion der unialelischen Deletion der Gene *COL4A5* und *COL4A6* eindeutig gestellt werden. Es ist bekannt, dass Mutationen im Gen für die Alpha-5-Kette des Basalmembrankollagens das X-chromosomale Alport-Syndrom verursachen (ATS: MIM #301050) (Alport *et al.* 1927; Barker *et al.* 1990), wobei 80 % der Aberrationen in *COL4A5* kleine Mutationen und nur 20 % Deletionen verschiedener Größe sind (Lemmink *et al.* 1997). Selten wurden Patienten mit größeren Deletionen beschrieben, die außerdem das Gen für die Alpha-6-Kette des Typ IV-Kollagens (*COL4A6*) umfassen. *COL4A6* befindet sich auf dem X-Chromosom in unmittelbarer Nähe von *COL4A5*. Mutationen, die nur *COL4A6* betreffen, wurden bislang nicht beschrieben (Zhou *et al.* 1993; Heidet *et al.* 1995; Hashari *et al.* 1996). Die Kombination aus Alport-Syndrom und diffuser Leiomyomatose, die bei Patienten mit *COL4A5*-Deletion und partieller *COL4A6*-Deletion beschrieben wurde, trat bei unserer Patientin vermutlich aufgrund der kompletten Deletion des *COL4A6* nicht auf (Zhou *et al.* 1993; Heiskari *et al.* 1996). Die Diagnose des Alport-Syndroms hatte therapeutische Konsequenzen für die Patientin. Eine Therapie mit einem ACE-Inhibitor wurde begonnen, die die Proteinurie normalisiert hat.

Zusätzlich zum Alport-Syndrom und der Mittelgesichtshypoplasie wurde bei unserer Patientin durch die Bestimmung des IQ-Wertes von unter 70 eine MR diagnostiziert. Dieser kombinierte Phänotyp wurde bisher bei einigen Patienten beschrieben und AMME-Komplex oder ATS-MR (MIM #300194) genannt. Er wird durch Mikrodeletionen verursacht, die sowohl das *FACL4*-Gen, das für die Fettsäure CoA Ligase 4 kodiert, als auch das *COL4A5*-Gen enthalten. Die fazialen Auffälligkeiten unserer Patientin, insbesondere die eingesunkene Nasenwurzel und die Mittelgesichtshypoplasie, ähnelten denen von zwei Patienten mit dem *contiguous gene* Syndrom ATS-MR (Vitelli *et al.* 1999). Mutationen im *FACL4*-Gen wurden sowohl bei weiblichen, als auch bei männlichen Patienten mit unspezifischer X-chromosomaler mentaler Retardierung gefunden (Meloni *et al.* 2002). Diese Befunde legen nahe, dass die *FACL4* Deletion auch in unserer Patientin zum Phänotyp ihrer mentalen Retardierung beiträgt. Da die Mikrodeletion unserer Patientin zusätzlich das Gen *PAK3* enthält, das für die p21-aktivierte Kinase 3 kodiert, und das in Familien mit unspezifischer X-chromosomaler mentaler Retardierung mutiert vorliegen kann (Allen *et al.* 1998; Bienvenu *et al.* 2000; Gedeon *et al.* 2003), trägt ein weiteres MR-Gen zu diesem Phänotyp bei.

Die therapie-resistente Epilepsie unserer Patientin ist nicht Teil des ATS-MR Phänotyps. Daher ist es wahrscheinlich, dass dieses Symptom aufgrund eines weiteren, deletierten Gens außerhalb

der ATS-MR Deletionsregion auftritt. Der distale Bruchpunkt, der hier beschriebenen Mikrodeletion liegt innerhalb des *DCX*-Gens, das für Doublecortin kodiert. Bei hemizygoter Mutation von *DCX* in männlichen Patienten kommt es zum Vollbild der X-chromosomalen Lissenzephalie, die häufig letal in der Kindheit ist. Heterozygote weibliche Betroffene bilden eine subkortikale Heterotopie bzw. einen *double cortex* aus (Peippo *et al.* 2007; Gleeson *et al.* 1998; des Portes *et al.* 1998). Mittels MLPA-Analyse konnten wir zeigen, dass die Exone 6 und 7 von *DCX* bei unserer Patientin deletiert waren, so dass der distale Deletionsbruchpunkt eine Trunkierung des *DCX*-Gens verursacht. Trunkierungsmutationen der Exone 4 bis 7 von *DCX* wurden bereits als verursachend für eine diffuse subkortikale Heterotopie/ *double cortex* beschrieben (Guerrini *et al.* 2006). Folglich ist der eruierte Genotyp kompatibel mit den MRT Befunden (diffuser *double cortex*) und der mittels des *white fiber trackings* detektierten kompletten Desorientierung der Bahnsysteme dieser Region. Die neuronale Migrationsstörung war wiederum ursächlich für die therapie-resistente Epilepsie und beeinflusste den MR-Phänotyp der Patientin.

Voraussichtlich wäre diese Mikrodeletion bei hemizygoten männlichen Individuen früh letal gewesen. Unsere weibliche heterozygote Patientin hingegen zeigte eine präferentielle Inaktivierung des X-Chromosoms mit der Mikrodeletion, so dass sie einen geringfügigeren Phänotyp als ein männlicher Betroffener hatte. Allerdings war unsere Patientin schwerwiegender betroffen als vier in der Literatur beschriebene Patientinnen, die kleinere nur die ATS-MR-Region enthaltende Deletionen in der chromosomalen Bande Xq22.3, aufwiesen. Diese Patientinnen waren zwar von Mikrohämaturie und Schwerhörigkeit betroffen, wiesen jedoch keine MR auf (Vitelli *et al.* 1999). Dieser Unterschied im Schweregrad des Phänotyps ist vermutlich auf die zusätzliche (partielle) Deletion des *PAK3*- und des *DCX*-Gens bei unserer Patientin zurückzuführen, bei der sich die Mikrodeletion von Xq22.3 bis Xq23 erstreckt.

Bei den Patienten des vorliegenden Kollektivs ist der behandelnde Arzt mit einer Kombination eines renalen und eines extrarenalen Phänotyps konfrontiert, die keinem bekannten Syndrom zugeordnet werden können. Die Ursache dieser komplexen Phänotypen aufzuklären, stellt eine große Herausforderung dar. Wir konnten mit unseren Ergebnissen belegen, dass die array-basierte CGH eine geeignete Methode ist, um genetische Ursachen in syndromalen Nephropathien zu identifizieren. Bis zu 10 % der Patienten zeigten Mikroaberrationen, die mit molekularzytogenetischen Techniken detektierbar sind. Durch die Anwendung kann in einem signifikanten Prozentsatz der Fälle eine Diagnose gestellt werden.

#### 4.2.2.2 Detektierte Mikroaberrationen in CAKUT-Patienten

Das Ziel dieser Studie war es, chromosomale Regionen zu identifizieren, die Gene enthalten, deren Veränderung mit einem CAKUT-Phänotyp einhergehen. Daher untersuchten wir 30 Patienten, die sowohl einen CAKUT-Phänotyp als auch extrarenale Symptome aufwiesen mit Array-CGH. Bei diesen Patienten war die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von Mikrodeletionen oder -duplikationen, die mit molekular-zytogenetischen Techniken detektierbar sind, erhöht.

Mit Array-CGH identifizierten wir vier vermutlich kausative Imbalancen: Zwei Verluste und zwei Gewinne bei drei Patienten. Die betroffenen chromosomalen Banden waren 1q21.1, 1q44 und/oder 16q23.3-q24.3 und 3q23-q25.1.

Bei Patient HD01 detektierte die Array-CGH einen terminalen Verlust von 0,59 Mb in der chromosomalen Bande 1q44 und einen terminalen Gewinn von 6,55 Mb in den chromosomalen Banden 16q23.3-q24.3. Anschließende FISH-Untersuchungen zeigten, dass diese Imbalancen auf eine unbalancierte 1;16-Translokation zurückzuführen waren. Da der Patient zwei Imbalancen aufwies, war unklar, ob der CAKUT-Phänotyp des Patienten von der partiellen Monosomie 1q oder der partiellen Trisomie 16q herrührte.

Bis zum Jahr 2008 waren lediglich 21 Individuen mit submikroskopischen Deletionen im distalen Chromosom 1q in der Literatur beschrieben worden (van Bon *et al.* 2008). Interessant ist, dass Patienten mit 1qter-Deletionssyndrom viele verschiedene Mittelliniendefekte, wie z.B. Corpus callosum Anomalien, Herz-, Gastroösophagealtrakt- und Urogenitaltraktanomalien aufweisen (Mankinen *et al.* 1976; Johnson *et al.* 1985; Meinecke und Vogtel 1987; Murayama *et al.* 1991; Gentile *et al.* 2003; van Bon *et al.* 2008). Eine Hypospadie wurde bei einem Jungen beschrieben, bei dem eine *de novo*, interstitielle Deletion von 13 Mb in den Chromosomenbanden 1q42.1-q44 identifiziert worden war, die proximal der Deletion unseres Patienten lag (Boland *et al.* 2007). Außerdem wurden Hypospadien bei zwei Jungen mit *de novo* 1q-Subtelomerdeletionen beschrieben, die durch FISH- und MLPA-Analysen identifiziert und ohne präzise Bruchpunktbestimmung beschrieben wurden (de Vries *et al.* 2001; Rooms *et al.* 2004).

Folglich ist unser Patient der dritte Fall mit terminaler 1q-Deletion, der eine Hypospadie aufweist. Unsere Daten belegen, dass ein kritischer Abschnitt für die Ausbildung einer Hypospadie auf Chromosom 1 distal von 246,57 Mb lokalisiert sein kann. In diesem Abschnitt sind annähernd zwölf proteinkodierende Gene wie z.B. *SH3BP5L*, *ZNF672* und *ZNF692* lokalisiert. *SH3BP5L* kodiert für das SH3-Domäne bindende Protein 5-ähnliche Protein, das andere Proteine über die SH3-Domäne binden kann und z.B. in Signalprozessen involviert ist. *ZNF672* und *ZNF692* kodieren für Zinkfingerproteine, die DNA binden und die Transkription regulieren. Alle drei Gene werden in den

meisten Organen, unter anderem in der Niere, exprimiert. *ZNF692* wird auch in der Blase exprimiert und könnte daher ein besonders interessantes Kandidatengen für die Entwicklung einer Hypospadie sein.

Eine Hypospadie wurde weiterhin bei zwei Patienten mit einer distalen 16q-Trisomie, in einem Fall der Banden 16q22-q24 (verbunden mit einer Monosomie distal von 11p14) (Calva *et al.* 1984) und im anderen Fall der Banden 16q23-q24 (verbunden mit einer Monosomie der Bande 3p26) (Maher *et al.* 1991) beschrieben. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hypospadie unseres Patienten durch die Duplikation der Banden 16q23.3-q24.3 verursacht wurde. Unsere Studie engt die mögliche kritische Region auf Chromosom 16q auf die distalsten 6,55 Mb ein.

Ende des Jahres 2008 wurde ein neues genomisches Syndrom beschrieben, das durch ein Rearrangement der chromosomalen Bande 1q21.1 mit einer kritischen Region von 143,65 bis 146,3 Mb verursacht wird (Mefford *et al.* 2008; Brunetti-Pierri *et al.* 2008). Das phänotypische Spektrum der Patienten mit einer 1q21.1 Mikrodeletion oder Mikroduplikation umfasst eine mentale Retardierung oder autistische Störung, eine anormale Kopfgröße, Herzfehlbildungen, einen Katarakt und dysmorphe Merkmale (Mefford *et al.* 2008; Brunetti-Pierri *et al.* 2008). Bei keinem der bisher beschriebenen 26 Patienten mit einer Mikroduplikation in 1q21.1 wurde ein renaler Phänotyp diagnostiziert (Mefford *et al.* 2008; Brunetti-Pierri *et al.* 2008). Daher ist von besonderem Interesse, dass wir bei dem Patienten HD16, der eine unilaterale Nierenhypoplasie und eine proximale Ureterstenose hatte und zusätzlich eine MR, eine Makrozephalie, eine Gehörgangsatresie, eine Mikrotie und multiple hypopigmentierte Hautläsionen aufwies, eine 2,4 Mb große Mikroduplikation in der chromosomalen Bande 1q21.1 (von 143,16 bis 146,2 Mb) identifiziert haben. Der in unserem Patienten duplizierte Bereich liegt in der identifizierten kritischen Region. Daher ergänzt unser Patient das klinische Spektrum der 1q21.1-Duplikation um Nierenfehlbildungen.

Eine 1q21.1-Mikroduplikation wurde ebenfalls beim Vater des Patienten gefunden. Kopienzahlvarianten, die bei einem Elternteil ohne Phänotyp beobachtet werden, gehören normalerweise zu der Gruppe der Polymorphismen ohne Krankheitswert und sind nicht ursächlich für einen pathologischen Phänotyp (Locke *et al.* 2006; Redon *et al.* 2006). Es sind Datenbanken etabliert worden, die alle bisher entdeckten polymorphen Mikroimbalancen auflisten (z.B. <http://projects.tcag.ca/variation/>, <http://paralogy.gs.washington.edu/structuralvariation/>).

Das 1q21.1-Rearrangement allerdings wurde in den meisten Fällen von einem Elternteil vererbt und viele der Eltern, die den Polymorphismus trugen, waren gesund (Mefford *et al.* 2008; Brunetti-Pierri *et al.* 2008). Daher ist auch im Fall unseres Patienten anzunehmen, dass die 1q21.1-



Mikroduplikation für den diagnostizierten renalen Phänotyp kausativ ist, obwohl die Aberration von einem gesunden Elternteil ererbt wurde. Dies ist insbesondere der Fall, da die Duplikation des gesunden Vaters kleiner war als die des Patienten und nur deren distalen Teil umfasst, der als segmentale Duplikation bekannt ist, die häufiger in der Normalbevölkerung auftritt (Locke *et al.* 2006; Redon *et al.* 2006). Da wir keine 1q21.1 Duplikation bei der Mutter des Patienten detektierten, kann spekuliert werden, dass die Mikroimbalance des Patienten vom Vater ererbt wurde, nachdem sie in der paternalen Meiose durch den Mechanismus der nicht-allelichen homologen Rekombination zwischen den segmentalen Duplikationsblöcken, die die kritische Region des 1q21.1-Syndroms flankieren, entstanden ist.

Bei einem 22-jährigen Patienten mit einem komplexen Phänotyp identifizierten wir eine *de novo* Deletion der chromosomalen Region 3q23-q25.1 als kritische Region für die Entwicklung einer renalen Dysplasie mit Hydronephrose. Bisher sind fünf weitere Patienten mit Deletionen der Region 3q23-q25 beschrieben worden, bei denen jedoch von keinem renalen Phänotyp berichtet wurde (Martsof *et al.* 1983; Al-Awadi *et al.* 1986; Alvarado *et al.* 1987; Chandler *et al.* 1997; Ko *et al.* 2003). Allerdings wurde in diesen Fällen kein Nierensonographie durchgeführt, so dass Auffälligkeiten der Nieren möglicherweise unentdeckt blieben. Interessanterweise ist das Gen *AGTR1*, welches für den Angiotensinrezeptor 1 (AT1) kodiert, der kardiovaskulären Effekte von Angiotensin II vermittelt, in der deletierten Region unseres Patienten lokalisiert. *Compound heterozygote AGTR1*-Mutationen wurden bei einem Feten mit schweren renalen Fehlbildungen, d.h. einer renalen Tubulusdysgenese, die häufig zu perinataler Mortalität führt, beschrieben (Gribouval *et al.* 2005). Daher ist es denkbar, dass heterozygote *AGTR1*-Verluste, die zu einer Haploinsuffizienz führen, mit weniger schweren Fehlbildungen der Niere einhergehen, wie z.B. bilateralen Nierendysplasien mit unilateraler Hydronephrose, die bei unserem Patienten pränatal diagnostiziert wurden. Um den heterozygoten *AGTR1* Status unseres Patienten mit der unialelischen Deletion sicherzustellen, analysierten wir das verbleibende Allel auf Mutationen hin. Es wurden keine pathogenen Veränderungen nachgewiesen. Insbesondere fanden sich nicht die zwei Mutationen, die bei dem Feten mit der autosomal-rezessiven renalen Tubulusdysgenese beschrieben worden waren (Gribouval *et al.* 2005). Der renale Phänotyp einer dysplastischen Niere in Verbindung mit einer Hydronephrose ist daher bei unseren Patienten gegebenenfalls auf den heterozygoten Verlust von *AGTR1* zurückzuführen, der in der Haploinsuffizienz des Angiotensinrezeptors resultiert. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstrichen, dass mutante AT1 null Mäuse (*Agtr1*<sup>-/-</sup>) eine Hydronephrose ausbilden, was auf eine Fehlentwicklung des Mechanismus der Harnperistaltik während der Perinatalperiode zurückzuführen sein könnte

---

(Miyazaki und Ichikawa, 2001; Niimura *et al.* 2006).

### 4.3 Kopienzahlvarianten

Für die in dieser Arbeit dargestellten Projekte wurden verschiedene zytogenetische und molekular-zytogenetische Techniken angewandt. Es bedarf genauer Kenntnisse über die Möglichkeiten und Grenzen jeder (molekular)-zytogenetischen Methode, um die genetischen Ursachen für verschiedene Phänotypen strukturiert identifizieren und genetische Fragestellungen beantworten zu können.

Aufgrund umfassender *in silico* Recherchen über betroffene genomische Regionen und deren genomische Architektur und Struktur, die in verschiedenen Datenbanken (*UCSC Genome Browser*: <http://genome.ucsc.edu/>, *Ensembl Genome Browser*: <http://www.ensembl.org/index.html>) durchgeführt werden können, besteht heute die Möglichkeit, auf alle bereits beschriebenen Informationen zugreifen zu können. Seit der Analyse des Genoms mit hochauflösenden Array-Techniken, sind die Kenntnisse über die Genomarchitektur rapide angestiegen. Die Struktur jedes einzelnen Genoms ist variabler als jemals angenommen wurde. Etwa zwölf Prozent des Genoms stellen Kopienzahlvarianten dar (Redon *et al.* 2006), die in der „*Database of Genomic Variants*“ zusammengetragen sind. Somit wurde die Annahme, dass Individuen genetisch zu 99,9% übereinstimmen und sich lediglich in den SNPs unterscheiden, widerlegt. Bei der Auswertung der Array-CGH besteht daher die Schwierigkeit, zwischen für den Phänotyp ursächlichen Aberrationen und Kopienzahlvarianten ohne Krankheitswert zu unterscheiden. Eine Analyse sollte besonders aufmerksam durchgeführt werden, da viele Mikrodeletions- und Mikroduplikationsloci von segmentalen Duplikationen flankiert sind und so eine Veränderung der nicht-polymorphen Region leicht übersehen werden kann. Die Kartierung aller humanen Kopienzahlvarianten und die Interpretation ihres möglichen Einflusses auf genetische Merkmale stellt eine spannende Herausforderung dar. Es ist anzunehmen, dass der Wissensstand auf diesem Gebiet zunehmen wird, so dass in Zukunft die Kausalität von familiären oder *de novo* auftretenden Varianten für einen Phänotyp besser beurteilt werden kann.

## 5 Zusammenfassung

Diese Arbeit beruht auf fünf Teilprojekten (ein reproduktionsgenetisches und vier klinisch-genetische). Im Rahmen des reproduktionsgenetischen Projekts wurde ein Schnell-CGH-Protokoll zur Einzelzell- und Polkörperanalyse entwickelt, indem jeder Schritt des konventionellen CGH-Protokolls verändert bzw. verkürzt worden war, so dass die Durchführung von einem Zeitraum von 72 h auf 16 h reduziert werden konnte. Die Technik ermöglicht die simultane Analyse aller Chromosomen in einem Experiment. Das etablierte Protokoll wurde an verschiedenen Fragestellungen validiert und zeigte zuverlässige Ergebnisse, so dass es sich sowohl für eine pränataldiagnostische Anwendung, als auch in der Polkörperdiagnostik eignet. Durch Anwendung des Protokolls an Einzelzellen mit bekannten Trisomien 18 und 21 konnten Gewinne der Chromosomen 18 bzw. 21 detektiert werden. Außerdem wurde das Protokoll an 32 ersten Polkörpern von 16 Patientinnen im Alter von 33 bis 44 Jahren, die hauptsächlich aufgrund von erhöhtem mütterlichen Alter und wiederholtem Implantationsversagen in Behandlung waren, angewandt. Es wurde eine Aneuploidierate von 75 % detektiert, die fast alle Chromosomen betraf (Landwehr *et al.* 2008).

Das erste klinisch-genetische Teilprojekt betraf Patienten mit mentaler Retardierung (MR), die etwa 2-3 % der Bevölkerung ausmachen, wobei die Ursache in 50 % der Fälle ungeklärt bleibt. In dieser Studie wurden mittels genomweiter array-basierter CGH, die das Genom mit einer Auflösung von 0,5 Mb abdeckte, Mikrodeletionen und Mikroduplikationen als Ursache für die MR in 10 % der 60 Fälle mit unklarer Ätiologie identifiziert. Es wurden entweder aufgrund der vollständigen Abdeckung der Region auf den DNA-Chips oder mittels FISH-Analysen exakte Bruchpunkte der Alterationen bestimmt, um deletierte oder duplizierte Gene, die möglicherweise Einfluss auf den MR-Phänotyp haben, zu identifizieren. Bei sechs Patienten konnten Mikroimbalancen detektiert werden, die vermutlich kausativ für deren Phänotyp waren. Fünf Patienten mit MR, fazialen Dysmorphien, neurologischen Auffälligkeiten (drei Fälle), Hirnanomalien (zwei Fälle) und Wachstumsstörungen (zwei Fälle) wiesen Mikrodeletionen in den chromosomalen Banden 6q11.1-q13 (10,8 Mb), Xq21.31-q21.33 (4,0 Mb), 1q24.1-q24.2 (3,8 Mb), 19p13.12 (2,1 Mb) bzw. 4p12-p13 (1,1 Mb) auf. Eine Mikroduplikation wurde in 22q11.2 (2,8 Mb) bei einer Patientin mit milder MR, Mikrozephalie und Dysmorphien detektiert. Drei der Aberrationen entstanden *de novo*, während zwei ererbt worden waren (Engels, Brockschmidt, Hoischen, Landwehr *et al.* 2007).

Im zweiten klinisch-genetischen Projekt wurde eine Patientin untersucht, bei der klinisch ein Pitt-Hopkins Syndrom (PHS) diagnostiziert worden war. Ihr klinisches Bild (schwere MR ohne Sprachentwicklung, Atmungsanomalien, bestimmte faziale Dysmorphien) stimmte mit zuvor beschriebenen PHS-Patienten überein. Wenn sich die Atmungsanomalien, die ein charakteristisches Merkmal darstellen, spät manifestieren, kann es zu einer Verzögerung der Diagnosestellung kommen. Bei der Patientin wurde mittels Array-CGH und FISH-Analysen eine *de novo* Mikrodeletion von annähernd 0,5 Mb in Chromosom 18q21.2 detektiert, die lediglich ein bekanntes Gen, den Transkriptionsfaktor *TCF4*, beinhaltet. Wir konnten mittels RT-PCR-Analyse zeigen, dass die Mikrodeletion unserer Patientin zu einer funktionellen Haploinsuffizienz von *TCF4* führt und somit dieses als PHS-Gen bestätigen. Dieses Ergebnis wurde unabhängig voneinander von zwei anderen Gruppen (Zweier *et al.* 2007; Amiel *et al.* 2007) beschrieben. Nach der Identifizierung des Gens ist es nun möglich, die klinische Diagnose des PHS mittels genetischer Testung zu bestätigen. Da sowohl größere Umbauten, die das gesamte *TCF4*-Gen umfassen, als auch Punktmutationen in diesem Gen beschrieben wurden, sollten bei Verdacht auf ein PHS MLPA-Untersuchungen und Sequenzierungen des Gens durchgeführt werden (Brockschmidt, Todt, Ryu, Hoischen, Landwehr *et al.* 2007).

Im dritten klinisch-genetischen Teilprojekt wurde ein Kollektiv von zehn Patienten mit ungeklärten syndromalen Nephropathien, die renale und extrarenale Symptome aufwiesen und keinem bekannten Syndrom zugeordnet werden konnten, untersucht werden. Durch die Untersuchung dieser Patienten mittels array-basierter CGH konnten wir zeigen, dass es sich um eine geeignete Methode handelt, um genetische Ursachen syndromaler Nephropathien zu identifizieren und eine Diagnose zu stellen. Eine Patientin, ein 14-jähriges Mädchen, wies ein *contiguous gene* Syndrom in Chromosom Xq22.3-q23 auf, das in dieser Form zuvor noch nicht beschrieben worden war. Die 3,3 Mb große, *de novo* entstandene Mikrodeletion wurde mit FISH- und MLPA-Analysen verifiziert und enthielt das X-chromosomale Alport-Syndrom Gen *COL4A5*, die MR-Gene *FACL4* und *PAK3* und Teile des *DCX*-Gens, das mit *double cortex*-Bildung, MR und Epilepsie assoziiert ist. Der Phänotyp unserer Patientin vereint damit Aspekte des Alport-MR *contiguous gene* Syndroms mit *double cortex* und Epilepsie (Hoischen, Landwehr *et al.* 2009).

Im vierten klinisch-genetischen Projekt ermöglichte die array-basierte CGH in einem Kollektiv von 30 Patienten, die sowohl kongenitale Anomalien der Nieren und ableitenden Harnwege (CAKUT) als auch zusätzliche extrarenale Symptome aufwiesen, die Kartierung von vier chromosomalen Regionen, die mit dem CAKUT-Phänotyp assoziiert sind. Bei einem Patienten und seinem Bruder fanden sich ein terminaler Verlust von 0,59 Mb in 1q44 und ein Gewinn von

6,55 Mb in 16q23.3-q24.3. Diese Imbalancen können bei der Entstehung einer Hypospadie eine Rolle spielen. Eine FISH-Analyse zeigte, dass die Aberrationen der Patienten auf eine vorliegende unbalancierte 1;16-Translokation zurückzuführen waren. Der gesunde Vater der beiden Patienten wies eine balancierte 1;16-Translokation auf. Außerdem wurde bei einem Patienten eine 11,93 Mb große Deletion der Region 3q23-25.1 detektiert und es konnte gezeigt werden, dass diese Deletion, die das *AGTR1*-Gen enthält, mit einer renalen Dysplasie und einer Hydronephrose einhergehen kann, so dass eine Haploinsuffizienz von *AGTR1* kausativ für den renalen Phänotyp sein könnte. Da bei einem CAKUT-Patienten eine 2,93 Mb große Mikroduplikation im chromosomalen Band 1q21.1 identifiziert wurde, konnte das Spektrum der Symptome des bereits beschriebenen 1q21.1 Mikroduplikationssyndroms um einen renalen Phänotyp erweitert werden, der bisher in diesem Zusammenhang nicht beschrieben worden war.

---

**Literaturverzeichnis**

- Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Weil D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bedbeder P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nature Genet* 1997, 15: 157-164.
- Alport AC .Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Brit Med J* 1927, 1:504-506.
- Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC, Walsh CA. PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nature Genet* 1998, 20(1):25-30.
- Alvarado M, Bocian M, Walker AP. Interstitial deletion of the long arm of chromosome 3: Case report, review, and definition of a phenotype. *Am J Med Genet* 1987,27:781 – 786.
- Al-Awadi SA, Teebi AS, Sundareshan TS. Complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 11, 13, 14 and 18 resulting in monosomy for 13q32-qter. *Ann Genet* 1985, 28(3):181-4.
- Amiel J., Rio M., de Pontual L., Redon R., Malan V., Boddaert N., Plouin P., Carter NP, Lyonnet S, Munnich A and Colleaux L. Mutations in TCF-4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet* 2007, 80:988-93.
- Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL, Tryggvason, K. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990, 248(4960):1224-1227.
- Berry-Kravis E, Israel J. X-linked pachygyria and agenesis of the corpus callosum: evidence for an X chromosome lissencephaly locus. *Ann Neurol* 1994, 36(2):229-233.
- Bienvenu T, des Portes V, McDonnell N, Carrie A, Zemni R, Couvert P, Ropers HH, Moraine C, van Bokhoven H, Fryns JP, Allen K, Walsh CA, Boue J, Kahn A, Chelly J, Beldjord C. Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. *Am J Med Genet* 2000, 93(4):294-298.
- Bingham C, Bulman MP, Ellard S, Allen LI, Lipkin GW, Hoff WG, Woolf AS, Rizzoni G, Novelli G, Nicholls AJ, Hattersley AT. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 2001, 68: 219-224.
- Boland E, Clayton-Smith J, Woo VG, McKee S, Manson FD, Medne L, Zackai E, Swanson EA, Fitzpatrick D, Millen KJ, Sherr EH, Dobyns WB, Black GC. Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum. *Am J Hum Genet* 2007, Aug;81(2):292-303.

- van Bon BW, Koolen DA, Borgatti R, Magee A, Garcia-Minaur S, Rooms L, Reardon W, Zollino M, Bonaglia MC, De Gregori M, Novara F, Grasso R, Ciccone R, van Duyvenvoorde HA, Aalbers AM, Guerrini R, Fazzi E, Nillesen WM, McCullough S, Kant SG, Marcelis CL, Pfundt R, de Leeuw N, Smeets D, Sistermans EA, Wit JM, Hamel BC, Brunner HG, Kooy F, Zuffardi O, de Vries BB. Clinical and molecular characteristics of 1qter microdeletion syndrome: delineating a critical region for corpus callosum agenesis/hypogenesis. *J Med Genet* 2008, 45(6):346-54.
- Boue A, Boue J, Gropp A. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet* 1985,14:1-57.
- Brockschmidt A, Todt U, Ryu S, Hoischen A, Landwehr C, Birnbaum S, Frenck W, Radlwimmer B, Lichter P, Engels H, Driever W, Kubisch C, Weber RG. Severe mental retardation with breathing abnormalities (Pitt-Hopkins syndrome) is caused by haploinsufficiency of the neuronal bHLH transcription factor TCF4. *Hum Mol Genet* 2007, 16:1488-1494.
- Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, Lalani SR, Graham B, Lee B, Shinawi M, Shen J, Kang SH, Pursley A, Lotze T, Kennedy G, Lansky-Shafer S, Weaver C, Roeder ER, Grebe TA, Arnold GL, Hutchison T, Reimschisel T, Amato S, Geraghty MT, Innis JW, Obersztyn E, Nowakowska B, Rosengren SS, Bader PI, Grange DK, Naqvi S, Garnica AD, Bernes SM, Fong CT, Summers A, Walters WD, Lupski JR, Stankiewicz P, Cheung SW, Patel A. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly/dermacrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet* 2008, 40(12):1466-71.
- Calva P, Frias S, Carnevale A, Reyes P. Partial trisomy 16q resulting from maternal translocation 11p/16q. *Ann Genet* 1984, 27(2):122-5.
- Chandler KE, de Die-Smulders CEM, Engelen JJM, Schrandt JJP. Severe feeding problems and congenital laryngostenosis in a patient with 3q23 deletion. *Eur J Pediatr* 1997. 156:636-638.
- Cochat P, Guibaud P, Torres R, Roussel B, Guarnier V, Larbre F. Diffuse leiomyomatosis in Alport syndrome. *J Pediatr* 1988,113:339-343.
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H *et al.* Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 1993, 90:590-610.
- Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Epplen JT. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation of > 3,000 cases. *Fetal Diagn Ther* 1999, 14:193-7.
- Engels H, Brockschmidt A, Hoischen A, Landwehr C, Bosse K, Walldorf C, Toedt G, Radlwimmer B, Propping P, Lichter P, Weber RG. DNA microarray analysis identifies candidate regions and genes in unexplained mental retardation. *Neurology* 2007, 68(10):743-750.
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS,

- Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 2003, 73:1027-40.
- Fensterer H, Radlwimmer B, Strater J, Buchholz M, Aust DE, Julie C, Radvanyi F, Nordlinger B, Belluco C, Van Cutsem E, Kohne CH, Kestler HA, Schwaenen C, Nessling M, Lutz MP, Lichter P, Gress TM, EORTC Gastrointestinal (GI) Group. Matrix-comparative genomic hybridization from multicenter formalin-fixed paraffin embedded colorectal cancer tissue blocks. *BMC Cancer* 2007, 7(2):58.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* (2003) 36(4):361-374.
- Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC *et al.* Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod* 2006, 21:2319-28.
- Gedeon, AK, Nelson J, Gecz J, Mulley JC. X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3 X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3. *Am J Med Genet* 2003, 120A(4):509-517.
- Gentile M, Di CA, Volpe P, Pansini A, Nanna P, Valenzano MC, Buonadonna AL. FISH and cytogenetic characterization of a terminal chromosome 1q deletion: clinical case report and phenotypic implications. *Am J Med Genet A* 2003, 117:251-4.
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 1998, 92(1):63-72.
- Gribouval O, Gonzales M, Neuhaus T, Aziza J, Bieth E, Laurent N, Bouton JM, Feuillet F, Makni S, Ben Amar H, Laube G, Delezoide AL, Bouvier R, Dijoud F, Ollagnon-Roman E, Roume J, Joubert M, Antignac C, Gubler MC. Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. *Nat Genet* 2005, Sep;37(9):964-8.
- Haas OA. Das Selbstverständnis der Zytogenetik im Wandel der Zeit. *J Med Genet* 1999, 11:350-353.
- Hassed SJ, Hopcus-Niccum D, Zhang L, Li S, Mulvihill JJ. A new genomic duplication syndrome complementary to the velocardiofacial (22q11 deletion) syndrome. *Clin Genet* 2004, 65:400-4.
- Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985, 70:11-7.



- Heidet L, Dahan K, Zhou J, Xu Z, Cochat P, Gould JDM, Leppig KA, Proesmans W, Guyot C, Roussel B, Tryggvason K, Grunfeld JP, Gubler MC, Antignac C. Deletions of both alpha 5(IV) and alpha 6(IV) collagen genes in Alport syndrome and in Alport syndrome associated with smooth muscle tumours. *Hum Mol Genet* 1995, 4(1):99-108.
- Heinen K, Baker RE, Spijker S, Rosahl T, van Pelt J, Brussaard AB. Impaired dendritic spine maturation in GABAA receptor alpha1 subunit knock out mice. *Neuroscience* 2003, 122:699-705.
- Heiskari N, Zhang X, Zhou J, Leinonen A, Barker D, Gregory M, Atkin CL, Netzer KO, Weber M, Reeders S, Gronhagenriska C, Neumann HPH, Trembath R, Tryggvason K. Identification of 17 mutations in ten exons in the COL4A5 collagen gene, but no mutations found in four exons in COL4A6: a study of 250 patients with hematuria and suspected of having Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1996, 7(5):702-709.
- Hernandez-Deviez DJ, Roth MG, Casanova JE, Wilson JM. ARNO and ARF6 regulate axonal elongation and branching through downstream activation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha. *Mol Biol Cell* 2004, 15:111-20.
- Hodgson SV, Robertson ME, Fear CN, Goodship J, Malcolm S, Jay B, Bobrow M, Pembrey ME. Prenatal diagnosis of X-linked choroideremia with MR, associated with a cytologically detectable X-chromosome deletion. *Hum Genet* 1987, 75:286-90.
- Inoue K, Lupski JR. Molecular Mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002, 3:199-242.
- Jiang H, van Zijl PC, Kim J, Pearlson GD, Mori S. DtiStudio: resource program for diffusion tensor computation and fiber bundle tracking. *Comput Methods Programs Biomed* 2006, 81(2):106-116.
- Johnson VP, Heck LJ, Carter GA, Flom JO. Deletion of the distal long arm of chromosome 1: a definable syndrome. *Am J Med Genet* 1985, 22:685-94.
- Jonsson JJ, Renieri A, Gallagher PG, Kashtan CE, Cherniske EM, Bruttini M, Piccini M, Vitelli F, Ballabio A, Pober BR. Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia, and elliptocytosis: a new X linked contiguous gene deletion syndrome? *J Med Genet* 1998, 35(4):273-278.
- Kageyama, R. and Nakanishi, S. Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 1997, 7, 659-665.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992, 258:818-
- Kashtan, CE. Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. Geary DF, Schaefer F, eds. *Comprehensive Pediatric Nephrology* 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier 2008.

- Kee HJ, Ahn KY, Choi KC, Won Song J, Heo T, Jung S, Kim JK, Bae CS, Kim KK. Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 3 (BAI3) in normal brain and implications for BAI3 in ischemia-induced brain angiogenesis and malignant glioma. *FEBS Lett.* 2004, 569:307-16.
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:4494-9.
- Ko WT, Lam WF, Lo FM, Chan WK, Lam TS. Wisconsin syndrome in a patient with interstitial deletion of the long arm of chromosome 3: further delineation of the phenotype. *Am J Med Genet A* 2003, 120A(3):413-7.
- Lane W, Robson M, Lowry RB. X-linked recessive nephritis with mental retardation, sensorineural hearing loss, and macrocephaly. *Clin Genet* 1994, 45(6):314-317.
- Lemmink HH, Schroder CH, Monnens LAH, Smeets HJM. The clinical spectrum of type IV collagen mutations. *Hum Mut* 1997, 9(6):477-499.
- Limwongse C and Cassidy SB. Syndromes and malformations of the urinary tract. Avner ED, Harman WE, Niaudet P, eds. *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Philadelphia, Baltimore, New York, London: Lippincott Raven 2003.
- Liu, Y., Ray, S.K., Yang, X.Q., Luntz-Leybman, V. and Chiu, I.M. A splice variant of E2-2 basic helix-loop-helix protein represses the brain-specific fibroblast growth factor 1 promoter through the binding to an imperfect E-box. *J Biol Chem* 1998, 273, 19269-19276.
- Locke DP, Sharp AJ, McCarroll SA, McGrath SD, Newman TL, Cheng Z, Schwartz S, Albertson DG, Pinkel D, Altshuler DM, Eichler EE. Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am J Hum Genet* 2006, 79(2):275-90.
- Lugtenberg D, de Brouwer AP, Kleefstra T, Oudakker AR, Frints SG, Schrandt-Stumpel CT, Fryns JP, Jensen LR, Chelly J, Moraine C, Turner G, Veltman JA, Hamel BC, de Vries BB, van Bokhoven H, Yntema HG. Chromosomal copy number changes in patients with non-syndromic X linked mental retardation detected by array CGH. *J Med Genet* 2006a, 43:362-70.
- Lugtenberg D, Yntema HG, Banning MJ, Oudakker AR, Firth HV, Willatt L, Raynaud M, Kleefstra T, Fryns JP, Ropers HH, Chelly J, Moraine C, Gecz J, Reeuwijk J, Nabuurs SB, de Vries BB, Hamel BC, de Brouwer AP, Bokhoven H. ZNF674: A New Kruppel-Associated Box-Containing Zinc-Finger Gene Involved in Nonsyndromic X-Linked MR. *Am J Hum Genet* 2006b, 78:265-78.
- Lupski JR. Genomic disorders: Structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 1998, 14:417-422.
- Lupski JR: Genomic disorders recombination-based disease resulting from genomic architecture. *Am J Hum Genet* 2003, 72:246-252.

- Maher ER, Willatt L, Cuthbert G, Chapman C, Hodgson SV. Three cases of 16q duplication. *J Med Genet* 1991, 28(11):801-2.
- Mankinen CB, Sears JW, Alvarez VR. Terminal (1)(q43) long-arm deletion of chromosome no. 1 in a three-year-old female. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1976,12:131-6.
- Martsolf JT, Ray M. Interstitial deletion of the long arm of chromosome 3. *Ann Genet* 1983, 26(2):98-9.
- Massari, ME and Murre, C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 2000, 20:429-440.
- Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, Mewborn SK, Dudlicek LL, Ramocki MB, Pilz DT, Mills PL, Das S, Ross ME, Ledbetter DH, Dobyns WB. Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* 2001, 9(1):5-12
- Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, Baralle D, Collins A, Mercer C, Norga K, de Ravel T, Devriendt K, Bongers EM, de Leeuw N, Reardon W, Gimelli S, Bena F, Hennekam RC, Male A, Gaunt L, Clayton-Smith J, Simoncic I, Park SM, Mehta SG, Nik-Zainal S, Woods CG, Firth HV, Parkin G, Fichera M, Reitano S, Lo Giudice M, Li KE, Casuga I, Broomer A, Conrad B, Schwerzmann M, Räber L, Gallati S, Striano P, Coppola A, Tolmie JL, Tobias ES, Lilley C, Armengol L, Spyschaert Y, Verloov P, De Coene A, Goossens L, Mortier G, Speleman F, van Binsbergen E, Nelen MR, Hochstenbach R, Poot M, Gallagher L, Gill M, McClellan J, King MC, Regan R, Skinner C, Stevenson RE, Antonarakis SE, Chen C, Estivill X, Menten B, Gimelli G, Gribble S, Schwartz S, Sutcliffe JS, Walsh T, Knight SJ, Sebat J, Romano C, Schwartz CE, Veltman JA, de Vries BB, Vermeesch JR, Barber JC, Willatt L, Tassabehji M, Eichler EE. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med* 2008, 359(16):1685-99.
- Meinecke P, Vogtel D. A specific syndrome due to deletion of the distal long arm of chromosome 1. *Am J Med Genet* 1987, 28:371-6.
- Meloni I, Vitelli F, Pucci L, Lowry RB, Tonlorenzi R, Rossi E, Ventura M, Rizzoni G, Kashtan CE, Pober B, Renieri A. Alport syndrome and mental retardation: clinical and genetic dissection of the contiguous gene deletion syndrome in Xq22.3 (ATS-MR). *J Med Genet* 2002, 39(5):359-360.
- Meloni I, Muscettola M, Raynaud M, Longo I, Bruttini M, Moizard MP, Gomot M, Chelly J, des Portes V, Fryns JP, Ropers HH, Magi B, Bellan C, Volpi N, Yntema HG, Lewis SE, Schaffer JE, Renieri A. *FACL4*, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. *Nature Genet* 2002, 30(4):436-440.
- 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. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalances in patients with idiopathic MR and multiple congenital

- anomalies: a new series of 140 patients and review of the literature. *J Med Genet* 2006, 43(8):625-633
- Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, Okamoto N, Kurosawa K, Kawame H, Iwakoshi M, Kosho T, Fukushima Y, Makita Y, Yokoyama Y, Yamagata T, Kato M, Hiraki Y, Nomura M, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Mizuguchi T, Niikawa N, Matsumoto N. BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic MR. *Am J Med Genet A*. 2006, 140:205-11.
- Miyazaki H, Yamazaki M, Watanabe H, Maehama T, Yokozeki T, Kanaho Y. The small GTPase ADP-ribosylation factor 6 negatively regulates dendritic spine formation. *FEBS Lett*. 2005, 579:6834-8
- Miyazaki Y, Ichikawa I. Role of the angiotensin receptor in the development of the mammalian kidney and urinary tract. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001, 128(1):89-97.
- Montag M, van der Ven K, Delacrétaz G, Rink K, van der Ven H. Laser assisted microdissection of zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil Steril* 1998, 69:539-42.
- Montag M, van der Ven K, Dorn C, van der Ven H. Outcome of laser-assisted polar body biopsy. *Reprod Biomed Online* 2004a, 9:425-9.
- Montag M, Limbach N, Sabarstinski M, van der Ven K, Dorn C, van der Ven H. Polar body biopsy and aneuploidy testing by simultaneous detection of six chromosomes. *Prenat Diagn* 2005, 25:867-71.
- Montag M, van der Ven K, van der Ven H. Polar body biopsy. Gardner DK, Weissman A, Howles CM and Shoham Z, eds. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*. Lancaster, UK: Taylor & Francis Medical Text Books. 2004b, 391-404.
- Müller D, Klopocki E, Neumann LM, Mundlos S, Taupitz M, Schulze I, Ropers HH, Querfeld U, Ullmann R. A complex phenotype with cystic renal disease. *Kidney Int* 2006, 70:1656-1660.
- Murayama K, Greenwood RS, Rao KW, Aylsworth AS. Neurological aspects of del(1q) syndrome. *Am J Med Genet* 1991, 40:488-92.
- Niimura F, Kon V, Ichikawa I. The renin-angiotensin system in the development of the congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Curr Opin Pediatr*. 2006, 18(2):161-6.
- Orrico A, Galli L, Zappella M, Lam CW, Bonifacio S, Torricelli F and Hayek G. Possible case of Pitt-Hopkins syndrome in sibs. *Am J Med Genet* 2001, 103, 157-159.
- Peippo M, Koivisto AM, Sarkamo T, Sipponen M, von Koskull H, Ylisaukko-oja T, Rehnstrom K, Froyen G, Ignatius J, Jarvela I. PAK3 related mental disability: further characterization of the phenotype. *Am J Med Genet* 2007, 143A(20):2406-2416.

- Peippo MM, Simola KO, Valanne LK, Larsen AT, Kahkonen M, Auranen MP and Ignatius J. Pitt-Hopkins syndrome in two patients and further definition of the phenotype. *Clin Dysmorphol* 2006, 15, 47-54.
- Philippe C, Arnould C, Sloan F, van Bokhoven H, van der Velde-Visser SD, Chery M, Ropers HH, Gilgenkrantz S, Monaco AP, Cremers FP. A high-resolution interval map of the q21 region of the human X chromosome. *Genomics* 1995, 27:539-43.
- Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, Pober BR, Jonsson JJ, Villanova M, Zollo M, Borsani G, Ballabio A, Renieri A. *FACL4*, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. *Genomics* 1998, 47(3):350-358.
- Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998, 20:207-11.
- Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM *et al.* Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995, 19:10-26.
- Pitt D and Hopkins I. A syndrome of mental retardation, wide mouth and intermittent overbreathing. *Aust Paediatr J* 1978, 14, 182-184.
- des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrie A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala M, Kahn A, Beldjord C, Chelly J. A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* (1998), 92(1):51-61.
- Powell CM, Schoch S, Monteggia L, Barrot M, Matos MF, Feldmann N, Sudhof TC, Nestler EJ. The presynaptic active zone protein RIM1alpha is critical for normal learning and memory. *Neuron*. 2004, 42:143-53.
- Pscherer, A., Dorflinger, U., Kirfel, J., Gawlas, K., Ruschoff, J., Buettner, R. and Schule, R. The helix-loop-helix transcription factor SEF-2 regulates the activity of a novel initiator element in the promoter of the human somatostatin receptor II gene. *Embo J* 1996, 15, 6680-6690.
- Raven JC, Raven J, Court JH, Bullheller S, Häcker H. Raven's progressive matrices and vocabulary scales. 3rd ed. Frankfurt: Harcourt Test Services (2006).
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006, 444(7118):444-54.

- Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreels F. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol.* 1997, 39:125-32.
- Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, Van Den Ende J, Van Bever Y, Kooy RF. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat* 2004, 23(1):17-21.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 2006, 43:180-6.
- Ross SE, Greenberg ME and Stiles CD. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 2003, 39, 13-25.
- Ruf RG, Xu PX, Silvius D, Otto EA, Beekmann F, Muerb UT, Kumar S, Neuhaus TJ, Kemper MJ, Raymond RM Jr, Brophy PD, Berkman J, Gattas M, Hyland V, Ruf EM, Schwartz C, Chang EH, Smith RJ, Stratakis CA, Weil D, Petit C, Hildebrandt F. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8090-8095, 2004
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998.
- Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont MEM, Sullivan MJ, Dobyns WB, Eccles MR. Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nature Genet* 1995, 9: 358-364.
- Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, Schmitz F, Malenka RC, Sudhof TC. RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* 2002, 415:321-6.
- Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjold M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic MR by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 2005, 42:699-705.
- Schreck R, Silverman N. Fetal loss. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BK, eds. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics* 4<sup>th</sup> ed. London-Edinburgh, UK: Churchill-Livingstone 2002, 982-997.
- Schuffenhauer S. Klinische Zytogenetik-gestern, heute, morgen: ein Überblick. *J Med Genet* 1999, 11:354-358
- 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. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and

- duplications in patients with learning disability/MR and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004, 41:241-8.
- Singh, H.A. Mental retardation, macrostomia and hyperpnoea syndrome. *J Paediatr Child Health* 1993, 29, 156-157.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997, 20:399-407.
- Soosaar A, Chiaramello A, Zuber MX and Neuman T. Expression of basic-helix-loop-helix transcription factor ME2 during brain development and in the regions of neuronal plasticity in the adult brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1994, 25, 176-180.
- Stumm M, Wegner RD, Bloechle M, Eckel H. Interphase M-FISH applications using commercial probes in prenatal and PGD diagnostics. *Cytogenet Genome Res* 2006;114:296-301.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 1992, 13:718-25.
- Takano S, Fukuyama H, Fukumoto M, Kimura J, Xue JH, Ohashi H, Fujita J. PRL-1, a protein tyrosine phosphatase, is expressed in neurons and oligodendrocytes in the brain and induced in the cerebral cortex following transient forebrain ischemia. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996, 40:105-15.
- Tanabe K, Torii T, Natsume W, Braesch-Andersen S, Watanabe T, Satake M. A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Mol Biol Cell*. 2005,16:1617-28.
- Tyson C, Harvard C, Locker R, Friedman JM, Langlois S, Lewis ME, Van Allen M, Somerville M, Arbour L, Clarke L, McGilivray B, Yong SL, Siegel-Bartel J, Rajcan-Separovic E. Submicroscopic deletions and duplications in individuals with intellectual disability detected by array-CGH. *Am J Med Genet A*. 2005, 139:173-85.
- Van Balkom, I.D., Quartel, S. and Hennekam, R.C. Mental retardation, "coarse" face, and hyperbreathing: confirmation of the Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet* 1998, 75:273-276.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans A, Holt RA *et al.*: The sequence of the human genome. *Science* 2001, 1304-1351.
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet*. 2003, 73:1261-70.

- Vitelli F, Piccini M, Caroli F, Franco B, Malandrini A, Pober B, Jonsson J, Sorrentino V, Renieri A. Identification and characterization of a highly conserved protein absent in the Alport syndrome (A), mental retardation (M), midface hypoplasia (M), and elliptocytosis (E) contiguous gene deletion syndrome (AMME). *Genomics* 1999, 55(3):335-340.
- Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T, Williamson R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod* 2002, 8:1035-41.
- de Vries BB, Knight SJ, Homfray T, Smithson SF, Flint J, Winter RM. Submicroscopic subtelomeric 1qter deletions: a recognisable phenotype? *J Med Genet* 2001, 38:175-78.
- de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw N, Smeets D, Sijm EA, Feuth T, van Ravenswaaij-Arts CM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA. Diagnostic genome profiling in MR. *Am J Hum Genet.* 2005, 77:606-16.
- Watanabe TK, Fujiwara T, Nakamura Y, Hirai Y, Maekawa H, Takahashi E. Cloning, expression pattern and mapping to Xq of NAP1L3, a gene encoding a peptide homologous to human and yeast nucleosome assembly proteins. *Cytogenet Cell Genet.* 1996, 74:281-5.
- Weber RG, Sommer C, Albert FK, Kiessling M, Cremer T. Clinically distinct subgroups of glioblastoma multiforme studied by comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 1996, 74:108-19.
- Weber RG, Scheer M, Born IA, Joos S, Cobbers JM, Hofele C *et al.* Recurrent chromosomal imbalances detected in biopsy material from oral premalignant and malignant lesions by combined tissue microdissection, universal DNA amplification, and comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1998,153:295-303.
- Weber S, Taylor JC, Winyard PJD, Baker KF, Sullivan-Brown J, Schild R, Knüppel T, Zurowska AM, Caldas-Alfonso A, Litwin M, Emre S, Ghiggeri GM, Bakaloglu A, Mehls O, C. Antignac C, ESCAPE Study Group, Schaefer F, Burdine RD. SIX2 and BMP4 associate with anomalous kidney development in humans and zebrafish. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19:891-903.
- Weber S, Mir S, Schlingmann KP, Nürnberg G, Becker C, Kara PE, Ozkayin N, Konrad M, Nürnberg P, Schaefer F. Gene locus ambiguity in posterior urethral valves/prune-belly syndrome. *Pediatr Nephrol* 2005, 20:1036-1042
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munne S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002, 78:543-9.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JDA. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 1999, 27:1214-8.



- Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* 2001, 345:1537-41.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2003, 80:860-8.
- Woolf AS: A molecular and genetic view of human renal and urinary tract malformations. *Kidney Int* 58: 500-512, 2000.
- Yeargin-Allsopp M, Murphy CC, Cordero JF, Decoufle P, Hollowell JG. Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10-year-old children, metropolitan Atlanta, 1985 to 1987. *Dev Med Child Neurol.* 1997, 39:142-9.
- Yobb TM, Somerville MJ, Willatt L, Firth HV, Harrison K, MacKenzie J, Gallo N, Morrow BE, Shaffer LG, Babcock M, Chernos J, Bernier F, Sprysak K, Christiansen J, Haase S, Elyas B, Lilley M, Bamforth S, McDermid HE. Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome. *Am J Hum Genet.* 2005, 76:865-76.
- Yoon SO and Chikaraishi DM. Isolation of two E-box binding factors that interact with the rat tyrosine hydroxylase enhancer. *J Biol Chem* 1994, 269, 18453-18462.
- Yoshida K, Sugano S. Identification of a novel protocadherin gene (PCDH11) on the human XY homology region in Xq21.3. *Genomics.* 1999, 62:540-3.
- Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, Antignac C, Laurila P, de Paepe A, Tryggvason K, Reeders ST. Deletion of the paired alpha 5(IV) and alpha 6(IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science* 1993, 261:1167-1169
- Zhuang Y, Cheng P and Weintraub H. B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol* 1996, 16, 2898-2905
- Zielinski B, Gratias S, Toedt G, Mendrzyk F, Stange DE, Radlwimmer B, Lohmann DR, Lichter P. Detection of chromosomal imbalances in retinoblastoma by matrix-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005, 43:294-301.
- Zweier, C., Peippo, M.M., Hoyer, J., Sousa, S., Bottani, A., Clayton-Smith, J., Reardon, W., Saraiva, J., Cabral, A., Göhring, A., Devriendt, K., de Ravel, T., Bijlsma, E., Hennekam, RCM, Orrico, A, Cohen, M., Dreweke, A., Reis, A., Nuernberg, P. and Rauch, A. (2007) Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *Am J Hum Genet* 2007, 80:994-1001.

## **Danksagung**

Abschließend möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die die Anfertigung meiner Dissertation ermöglicht und mich bei der Erstellung unterstützt haben. Es war schön, mich stets auf ein motivierendes und hilfreiches Umfeld verlassen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ruthild Weber für das Überlassen der interessanten und aktuellen Themengebiete, die ich im Rahmen der Doktorarbeit bearbeitet habe. Darüberhinaus bedanke ich mich für die Unterstützung, die Anregungen und die engmaschige Betreuung.

Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann danke ich für seine Bereitschaft diese Dissertation als Vertreter des Fachbereichs Biologie zu begutachten.

PD Dr. Markus Montag, Prof. Dr. Dieter Haffner, Prof. Dr. Franz Schäfer und ihren Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung des Patientenmaterials, der Patientendaten und die gute Kooperation.

Für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima im Labor gebührt mein Dank vor allem Frau Sabrina Wolf und der gesamten zytogenetischen Abteilung. Herrn Dr. Nils Rahner und Herrn Alexander Zink danke ich für die amüsanten Mittagspausen.

Frau Dr. Antje Brockschmidt möchte ich herzlich für die lehrreiche, humorvolle und ausgesprochen freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Ihre Anregungen waren sehr hilfreich und ihre eigene Begeisterung hat mich stets motiviert.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle Begleitung und die großartige Unterstützung während dieser Jahre.



---

**Publikationsliste Christina Landwehr**

## Originalarbeiten

1. Engels H, Brockschmidt A, Hoischen A, Landwehr C, Bosse K, Walldorf C, Toedt G, Radlwimmer B, Propping P, Lichter P, Weber RG. DNA microarray analysis identifies candidate regions and genes in unexplained mental retardation. *Neurology*. 2007 Mar 6;68(10):743-750.
2. Brockschmidt A, Todt U, Ryu S, Hoischen A, Landwehr C, Birnbaum S, Frenck W, Radlwimmer B, Lichter P, Engels H, Driever W, Kubisch C, Weber RG. Severe mental retardation with breathing abnormalities (Pitt-Hopkins syndrome) is caused by haploinsufficiency of the neuronal bHLH transcription factor *TCF4*. *Hum Mol Genet*. 2007 Jun 15;16(12):1488-1494.
3. Landwehr C, Montag M, van der Ven K, Weber RG. Rapid comparative genomic hybridization protocol for prenatal diagnosis and its application to aneuploidy screening of human polar bodies. *Fertil Steril*. 2008 Sep;90(3):488-496.
4. Hoischen A, Ehrler M, Fassunke J, Simon M, Baudis M, Landwehr C, Radlwimmer B, Lichter P, Schramm J, Becker AJ, Weber RG. Comprehensive characterization of genomic aberrations in gangliogliomas by CGH, array-based CGH and interphase FISH. *Brain Pathol*. 2008 Jul;18(3):326-337.
5. Kübler K, Arndt PF, Wardelmann E, Landwehr C, Krebs D, Kuhn W, van der Ven K. Genetic alterations of HLA-class II in ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2008 Sep 15;123(6):1350-1356.
6. Hoischen A, Landwehr C (geteilte Erstautorenschaft), Kabisch S, Ding XQ, Trost D, Stropahl G, Wigger M, Radlwimmer B, Weber RG, Haffner D. Array-CGH in unclear syndromic nephropathies identifies a microdeletion in Xq22.3-q23. *Pediatr Nephrol*. 2009 May 24:1673-1681

## Abstracts

1. Landwehr C, Montag M, Weber RG. Aneuploidy-screening in single cells by a rapid comparative genomic hybridization protocol for prenatal diagnostics. Array-CGH-Marie Curie Conference, Bari, Italien, 19.-22.10.2005
2. Engels H, Ehrbrecht A, Hoischen A, Landwehr C, Ehrler M, Bosse K, Pagenstecher C, Radlwimmer B, Tödt G, Lichter P, Weber RG. Genome-wide array-CGH screening of 52 patients with mental retardation of unknown etiology - Detection of two causative imbalances inherited from a parent and four *de novo* deletions. 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Heidelberg, 08.-11.03.2006
3. Ehrbrecht A, Engels H, Hoischen A, Landwehr C, Pagenstecher C, Birnbaum S, Reutter H, Mangold E, Wolf S, Ehrler M, Radlwimmer B, Lichter P, Propping P, Weber RG. Array-CGH bei 60 Patienten mit mentaler Retardierung: Identifizierung von sieben kausativen Imbalancen. 42. Arbeitstreffen Klinische Genetik Nordrhein, Aachen, 21.03.2006

4. Landwehr C, Montag M, Weber RG. Application of a rapid CGH-protocol to detect numerical and structural aberrations. Array-CGH-Marie Curie Conference, Leuven, Belgien, 13.09.-16.09.2006
5. Landwehr C, van der Ven K, Montag M, Weber RG. A rapid comparative genomic hybridization protocol for prenatal diagnostics and its application to aneuploidy screening of human polar bodies. 16. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Bonn, 07.-10.03.2007
6. Landwehr C, Hoischen A, Kabisch S, Ding XQ, Krüger G, Wigger M, Radlwimmer B, Haffner D, Weber RG. Array-CGH investigations in patients with unclear syndromic nephropathies identifies a microdeletion in Xq22.3-q23 in a female patient with Alport Syndrome, mental retardation, and focal epilepsy. Marie Curie Conference on genome architecture with relation to disease (MC-GARD), Amsterdam, Niederlande, 02.-05.05.2007
7. Hoischen A, Ehrler M, Fassunke J, Landwehr C, Radlwimmer B, Lichter P, Schramm J, Becker AJ, Weber RG. Comprehensive characterization of genomic aberrations in gangliogliomas by comparative genomic hybridization (CGH), array-based CGH and interphase-FISH. Marie Curie Conference on genome architecture with relation to disease (MC-GARD), Amsterdam, Niederlande, 02.-05.05.2007
8. Kabisch S, Hoischen A, Landwehr C, Radlwimmer B, Lichter P, Wigger M, Weber RG, Haffner D. Array-CGH investigations in patients with unclear syndromic nephropathies identifies a microdeletion in Xq22.3-q23 in a female patient with Alport Syndrome, mental retardation, and focal epilepsy. Tagung der International Pediatric Nephrology Association (IPNA), Budapest, Ungarn, 31.08.2007-04.09.2007
9. Renkert M, Landwehr C, Hoischen A, Wühl E, Radlwimmer B, Weber S, Schaefer F, Weber RG. Analyse kongenitaler Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege (CAKUT) mittels array-basierter comparativer genomischer Hybridisierung (Array-CGH). 39. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie Jena, 13.-15.03.2008
10. Kabisch S, Hoischen A, Landwehr C, Ding XQ, Krüger G, Wigger M, Radlwimmer B, Weber RG, Haffner D. Array-CGH-Analysen bei unklarer syndromaler Nephropathie: Identifizierung einer Mikrodeletion in Xq22.3-q23 bei einer Patientin mit Mikrohämaturie, glomerulärer Proteinurie, mentaler Retardierung (MR) und fokaler Epilepsie 39. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie Jena, 13.-15.03.2008
11. Landwehr C, Hoischen A, Kabisch S, Ding XQ, Trost D, Krüger G, Wigger M, Radlwimmer B, Haffner D, Weber RG. Array-CGH investigations in patients with unclear syndromic nephropathies identifies a microdeletion in Xq22.3-q23 in a female patient with Alport Syndrome, mental retardation, and focal epilepsy. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik Hannover, 08.04.-10.04.2008
12. Landwehr C, Wißkirchen M, Kaufmann A, Vogt S, Stienen D, Propping P, Friedl W, Weber RG, Aretz S. A 4.8 Mb Microdeletion in 10q23 Encompassing *PTEN* and *BMPRI1A* in a Child with Juvenile Polyposis of Infancy. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik Hannover, 08.04.-10.04.2008

13. Brockschmidt A, Todt U, Filippi A, Ryu S, Hoischen A, Landwehr C, Birnbaum S, Frenck W, Radlwimmer B, Lichter P, Engels H, Driever W, Kubisch C, Weber RG. Severe mental retardation with breathing abnormalities (Pitt-Hopkins syndrome) is caused by haploinsufficiency of the neuronal bHLH transcription factor *TCF4*. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik Hannover, 08.04.-10.04.2008
14. Landwehr C, Renkert M, Hoischen A, Wühl E, Radlwimmer B, Weber S, Schaefer F, Weber RG. Analysis of patients with congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) by array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) and fluorescence in situ hybridization (FISH). Marie Curie Conference (MC Gard) Genome Architecture in Relation to Disease Madrid, 04.05.-07.05.2008
15. Brockschmidt A, Todt U, Filippi A, Ryu S, Hoischen A, Landwehr C, Birnbaum S, Frenck W, Radlwimmer B, Lichter P, Engels H, Driever W, Kubisch C, Weber RG. Severe mental retardation with breathing abnormalities (Pitt-Hopkins syndrome) is caused by haploinsufficiency of the neuronal bHLH transcription factor *TCF4*. 19. Marie Curie Conference (MC Gard) Genome Architecture in Relation to Disease Madrid, 04.05.-07.05.2008
16. Landwehr C, Hoischen A, Kabisch S, Ding XQ, Trost D, Stropahl G, Wigger M, Radlwimmer B, Haffner D, Weber RG. Array-CGH-Analyse identifiziert eine Xq22.3-q23-Mikrodeletion bei einer Patientin mit Hämaturie, Proteinurie, mentaler Retardierung und Epilepsie. 47. Arbeitstreffen Klinische Genetik Nordrhein, Aachen, 23.09.08
17. Landwehr C, Renkert M, Weber S, Hoischen A, Wühl E, Radlwimmer B, Schaefer F, Weber RG. Array-CGH-Analyse identifiziert eine 1q21-Mikroduplikation bei einem Patienten mit CAKUT-Phänotyp. 48. Arbeitstreffen Klinische Genetik Nordrhein in Bonn, 17.03.09
18. Landwehr C, Weber S, Renkert M, Hoischen A, Wühl E, Radlwimmer B, Schaefer F, Weber RG. Analysis of Congenital Anomalies of the Kidneys and Urinary Tract (CAKUT) using Array-Based Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH). 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik Aachen, 01.-03.04.2009
19. Priebe L, Mühleisen TW, Herms S, Mattheisen M, Ludwig KU, Landwehr C, Nieratschker V, Breuer R, Moebus S, Jöckel KH, Schreiber S, Rietschel M, Nöthen MM, Cichon S. SNP array-based genome scan for copy number variants associated with bipolar disorder. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik Aachen, 01.-03.04.2009
20. Landwehr C, Weber S, Renkert M, Hoischen A, Wühl E, Radlwimmer B, Schaefer F, Weber RG. Mapping of Candidate Regions and Genes for Congenital Anomalies of the Kidneys and Urinary Tract (CAKUT) using Array-Based Comparative Genomic Hybridization. European Human Genetics Conference, Wien, 23.-26.05.2009
21. Brockschmidt A, Külshammer E, Klink B, Landwehr C, Radlwimmer B, Sabel M, Schramm J, Westphal G, Schackert G, Tonn J, Pietsch T, Berger M, Löffler M, Weller M, Reifenberger G, Weber RG. Array-based comparative genomic hybridization profiling of diffuse astrocytomas for genomic aberrations linked to prognosis. European Human Genetics Conference, Wien, 23.-26.05.2009