

# **Deletionsgrößenbestimmung bei Patienten mit Mikrodeletionssyndrom 22q11.2**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Chan-Hee Lischke**  
geboren am 12.02.1980 in Seoul/ Republik Korea

Gießen, 2011

Aus dem Institut für Humangenetik  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. Harbott

Tag der Disputation: 29.11.2011

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Klinische Syndrome bei Mikrodeletion 22q11.2.....	2
1.1.1 DiGeorge-Syndrom (DGS).....	2
1.1.2 Velokardiofaziales-Syndrom (VCFS).....	3
1.1.3 <i>Conotruncal anomaly face</i> -Syndrom (CAFS).....	4
1.2 Mikrodeletionssyndrom 22q11.2.....	4
1.3 Diagnostik des DiGeorge-, des Velokardiofazialen- und des <i>Conotruncal anomaly face</i> -Syndroms.....	8
1.3.1 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	9
1.4 <b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Patienten und Methoden.....</b>	<b>12</b>
2.1 Patienten: Klinische Kriterien.....	12
2.1.1 Gruppe A: Patienten mit Mikrodeletion 22q11.2.....	12
2.1.2 Gruppe B: Patienten mit klinischem Bild einer Mikrodeletion 22q11.2 ohne detektierte Deletion.....	13
2.2 Herstellung der Chromosomenpräparate.....	15
2.2.1 Ansatz und Abbruch der Lymphozytenkulturen.....	15
2.2.2 Aufarbeitung der Lymphozytenkulturen.....	16
2.2.3 Herstellung der Präparate.....	16
2.2.4 Vorbehandlung der Präparate.....	17
2.3 Herstellung der FISH-Sonden aus DNA von BAC-Klonen.....	18
2.3.1 Amplifizierung der Human-DNA mittels DOP-PCR.....	18
2.3.2 Nick-Translation.....	21
2.3.3 DNA-Fällung der Nick-Translationsprodukte.....	23
2.4 Hybridisierung.....	24
2.4.1 Posthybridisierungswaschungen.....	25
2.5 Ko-Hybridisierung der aus BAC-Klonen hergestellten „Nick-Sonden“ mit der 22qtel-Subtelomersonde.....	26
2.6 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung unter Verwendung der Vysis® -Sonden DiGeorge Region Probe - LSI® TUPLE1 und Vysis® DiGeorge Region Probe - LSI® N25.....	28
2.7 Mikroskopische Auswertung.....	29
2.8 Bearbeitung und Dokumentation.....	30

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1	Chromosom 22 spezifische BACs.....	31
3.2	Deletionsgrößenbestimmung von Patienten der Gruppe A.....	32
3.2.1	Deletionsgröße 2,4 Mb bei Patienten der Gruppe A.....	35
3.2.2	Deletionsgröße 2,42 Mb bei Patienten der Gruppe A.....	36
3.2.3	Deletionsgröße 1,1 Mb bei Patienten der Gruppe A.....	38
3.2.3.1	Patientin 27 der Gruppe A.....	38
3.2.3.2	Patientin 28 der Gruppe A.....	40
3.2.3.3	Patient 29 der Gruppe A.....	41
3.2.3.4	Patient 30 der Gruppe A.....	42
3.2.3.5	Patientin 31 der Gruppe A.....	43
3.2.4	Deletionsgröße 2,2 Mb bei Patienten der Gruppe A.....	45
3.3	Deletionsgrößen der Patienten der Gruppe A.....	47
3.4	Klinische Symptome der Patienten der Gruppe A.....	48
3.5	Untersuchung von Patienten der Gruppe B mit einem für das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 typischen Phänotyp ohne Deletion.....	50
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>52</b>
4.1	Deletionsgrößenbestimmung der Patientengruppe A.....	52
4.1.1	Klinische Symptome und Deletionsgrößen.....	56
4.1.2	Optimierung der Sondenkombination zur Differenzierung der typischen Deletionsgrößen des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2....	60
4.2	Untersuchung auf atypische Deletionsbereiche der Gruppe B.....	61
4.3	Ausblick.....	65
4.4	Zusammenfassung der Diskussion.....	66
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>70</b>
6.1	Charakterisierte Deletionsbereiche mit Angabe der deletierten Gene.....	70
6.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	72
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	73
6.4	Stamm- und Gebrauchslösungen.....	74
6.5	Material-, Geräte- und Softwareliste.....	75

<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>89</b>
<b>9.</b>	<b>Veröffentlichung.....</b>	<b>90</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>91</b>

### 1. Einleitung

Die Prävalenz klinisch relevanter kongenitaler Fehlbildungen bei Neugeborenen beträgt abhängig von der Studie 3 bis 8 % (Paylor *et al.*, 2006; Queisser-Luft *et al.*, 2002, S. 169-170). Etwa 6 bis 10 % der Neugeborenen mit schweren Entwicklungsdefekten weisen eine Chromosomenaberration auf. Neben numerischen (Genommutationen) finden sich auch strukturelle Aberrationen (Chromosomenmutationen). Chromosomenmutationen zeichnen sich durch Umbauten innerhalb eines oder von mehreren Chromosomen aus. Balancierte Chromosomenveränderungen führen selten zu einem auffälligen Phänotyp, zum Beispiel, wenn eine Bruchstelle in einem Gen liegt. Bei unbalancierten Aberrationen kommt es dagegen in den meisten Fällen durch Duplikation und/oder Deletion zu phänotypisch manifesten Auffälligkeiten als Folge der gestörten Genexpression. Als hinweisend auf eine Chromosomenstörung bei einem Patienten gelten folgende Merkmale: prä- und postpartale Wachstumsstörung, geistige Retardierung, multiple Fehlbildungen und das Vorliegen von Dysmorphiezeichen, die insbesondere Gesicht, Extremitäten und Skelett betreffen können. Darüber hinaus kann das Fehlen sekundärer Geschlechtsmerkmale, Infertilität und bestimmte maligne Erkrankungen bei Jugendlichen und Erwachsenen hinweisend auf Chromosomenanomalien sein. Beispiele für genetisch bedingte maligne Erkrankungen sind die chronisch myeloische Leukämie, bei der eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 vorliegt und das Burkitt-Lymphom, welches durch eine Translokation des langen Arms des Chromosoms 8 auf Chromosom 14, 2 oder 22 hervorgerufen wird (Buselmaier und Tariverdian, 2007, S. 161-168).

Doch auch wenn die oben genannten klinischen Kriterien für eine Chromosomenanomalie sprechen, finden sich in vielen Fällen bei der konventionellen zytogenetischen Analyse keine sichtbaren Veränderungen des Karyotyps. Bei einer Bandenauflösung (Resolution) von etwa 550 Banden im haploiden Chromosomensatz liegt die Grenze der im Lichtmikroskop erkennbaren Strukturabweichungen in der Größenordnung von 5 bis 10 Mb. Der Verlust eines kleineren DNA-Abschnitts ist im Lichtmikroskop nicht erkennbar, kann aber mit Hilfe molekular-zytogenetischer Techniken wie der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) sichtbar gemacht werden. Derart kleine Deletionen werden auch als Mikrodeletionen bezeichnet. Sie führen zum Verlust eines Gens oder mehrerer

Gene. Sind mehrere Gene deletiert, so wird die resultierende Erkrankung auch als *contiguous gene syndrome* bezeichnet.

Die häufigste Mikrodeletion des Menschen ist mit einer geschätzten Häufigkeit von 1:4000 die Mikrodeletion 22q11.2 (Henwood et al., 2001).

### 1.1 Klinische Syndrome bei Mikrodeletion 22q11.2

Das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 ist ein *contiguous gene syndrome*. Das bedeutet, dass dem Syndrom der Verlust mehrerer in der deletierten Region gelegener Gene zugrunde liegt. Die beim Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 vorliegende Deletion tritt meist *de novo* auf, nur in etwa 5 bis 10 % wird sie vererbt (Scambler et al., 1992). Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ist die Standardmethode zur Diagnostik.

Mehrere klinisch unterschiedliche Syndrome sind bei Vorliegen einer Mikrodeletion im langen Arm von Chromosom 22 (q11.2) beschrieben worden. Dazu zählen das DiGeorge-, das Velokardiofaziale- und das *Conotruncal Anomaly Face*- Syndrom. Zu beachten ist, dass es sich bei diesen Syndromen um klinische Diagnosen handelt, die anhand des Auftretens bestimmter Symptomkombinationen gestellt werden. Insgesamt sind für die verschiedenen Syndrome der Mikrodeletion 22q11.2 mehr als 180 Anomalien, von denen häufig mehrere in Kombinationen vorkommen, beschrieben worden (VCFS, 2009).

#### 1.1.1 DiGeorge-Syndrom (DGS)

Erstmals wurde das DiGeorge-Syndrom 1965 auf einem Immunologie-Kongress beschrieben und drei Jahre später in einer Fallvorstellung von DiGeorge näher charakterisiert (Cooper et al., 1965; DiGeorge, 1968).

Das DGS wird durch drei Hauptsymptome charakterisiert: 1) neonatale Hypokalzämie, verursacht durch Hypoplasie der *Glandula parathyroidea*, 2) Thymushypoplasie oder Thymusaplasie, die mit Immundefiziten einhergeht, und 3) kongenitale konotrunkale Herzfehler (OMIM, 2009a; Yamagishi, 2002). Zusätzlich können verschiedene Dysmorphiezeichen vorhanden sein, wie eine Mikrognathie, tief angesetzte, dysplastische Ohrmuscheln mit verringertem vertikalen Durchmesser, Telekanthus mit kurzen Lidspalten und mongoloider oder

antimongoloider Lidachsenstellung. Das Philtrum ist typischerweise kurz und der Mund relativ klein. Bei älteren Kindern überschneiden sich die fazialen Anomalien, mit denen des Velokardiofazialen-Syndroms: in beiden Fällen sind eine bulböse Nase (engl. *bulbous nose*), eine eckige Nasenspitze und hypernasale Sprache assoziiert mit einer submukösen oder offenen Gaumenspalte beschrieben (Abb.1). Darüber hinaus sind beim DGS Kleinwuchs und geringgradige mentale Retardierung häufig. Auch einige psychiatrische Erkrankungen sind im Zusammenhang mit dem DiGeorge-Syndrom beschrieben worden, darunter Schizophrenie und Major Depression im Erwachsenenalter. Seltener treten Hypothyreoidismus, Lippenspalten und Schwerhörigkeit auf (OMIM, 2009a).

### 1.1.2 Velokardiofaziales-Syndrom (VCFS)

Das Velokardiofaziale-Syndrom, synonym auch als konotrunkales- oder Shprintzen-Syndrom bezeichnet (OMIM, 2009b), wurde erstmals 1981 beschrieben (Shprintzen et al., 1981). Dieses Syndrom ist charakterisiert durch eine kraniofaziale und palatale Symptomatik (Hay, 2007). Es handelt sich um ein Fehlbildungs-Retardierungssyndrom mit hochvariablem Phänotyp.

Die typische Physiognomie der Patienten zeigt sich in Form eines langen, schmalen Gesichts mit Mikrogenie, vorspringender breitrückiger Nase mit hypoplastischen Flügeln und leicht verformten Ohren (Wiedemann und Kunze, 2001b, Abb.1).

Bei 85 % der Patienten treten kardiovaskuläre Anomalien auf (Shprintzen, 2008) und etwa 36 % der Patienten haben renale Anomalien (Worthington et al., 1997).

Offene, submuköse Gaumenspalten liegen etwa bei 9 % der Patienten vor.

Eine Hypokalzämie besteht bei etwa 60 % der Patienten (Bassett et al., 2005).

Bei 40 % der Patienten wird eine milde bis mäßige mentale Entwicklungsretardierung beschrieben (Shprintzen et al., 1981).

Für die Therapie ist eine Früherkennung wichtig, da durch Operation von Herzvitien und Gaumenspalten, eventuelle Hör- und Sprachhilfen, Kalziumsubstitution und Immunprophylaxe eine Prävention von sekundären Behinderungen erfolgen kann (Wiedemann und Kunze, 2001b).



### 1.1.3 *Conotruncal anomaly face*-Syndrom (CAFS)

Das *Conotruncal anomaly face syndrome* oder Takao-Syndrom wurde erstmals 1976 beschrieben (OMIM, 2009a). Das Syndrom ist durch konotrunkale Herzfehler und charakteristische faziale Dysmorphien gekennzeichnet. Eine kardiovaskuläre Fehlbildung liegt bei jedem Patienten vor. Das klinische Spektrum deckt sich mit dem des DGS (Burn et al., 1993).

## 1.2 Mikrodeletionssyndrom 22q11.2

Nachdem die klinisch unterschiedlichen Syndrome DGS, VCFS und CAFS oben näher beschrieben worden sind, kann festgehalten werden, dass es bei der Mikrodeletion 22q11.2 eine große Variabilität des Phänotyps vorliegt.

Der del(22)(q11.2) Syndrom-Komplex, umfasst eine große Anzahl an Symptomen und betrifft mehrere Organsysteme. Der Phänotyp kann innerhalb einer Familie (Kasprzak et al., 1998) und sogar bei eineiigen Zwillingen variieren (Goodship et al., 1995; Vincent et al., 1999). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Häufigkeit von Symptomen, die mit der Deletion 22q11.2 assoziiert sind. Zu den drei am häufigsten auftretenden Anomalien zählen:

1. **faziale Dysmorphien** (Abb.1),
2. **velopharyngeale Insuffizienz mit und ohne Gaumenspalte** und
3. **kongenitale Herzfehler** (Hay, 2007).

Zur Vereinfachung der Nomenklatur schlug Wilson 1993 (Wilson *et al.*, 1993a) das Akronym „CATCH 22“ (**c**ardiac abnormality, **a**bnormal facies, **T**-cell deficit due to thymic hypoplasia, **c**left palate, **h**ypocalcemia due to hypoparathyroidism) für die verschiedenen Krankheitsbilder mit derselben genetischen Ätiologie vor.

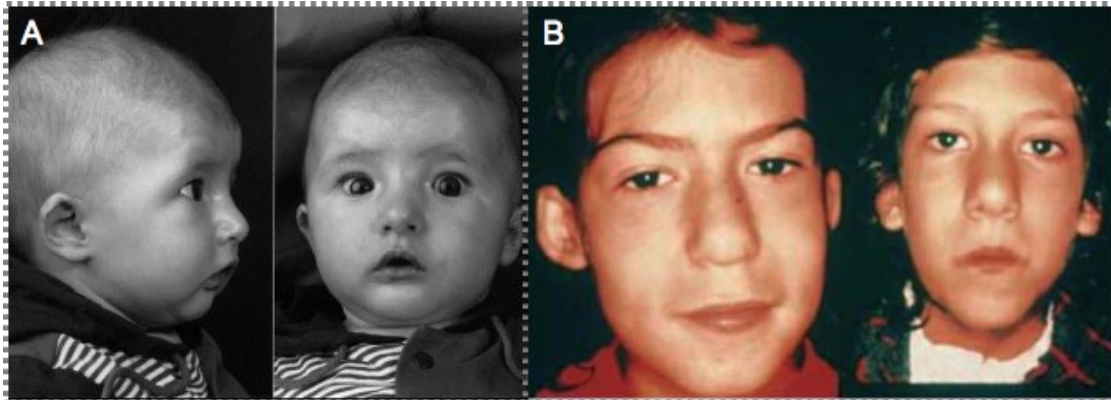
Hauptsymptome bei „CATCH 22“ sind Herzfehler, insbesondere komplexe Ausflusstraktfehlbildungen im Aortenbogen und Fallot'sche Tetralogie (Theveniau-Ruissy et al., 2008).

**Tab.1: Häufigkeit von Symptomen beim Mikrodeletionssyndrom 22q11.2** (Hay, 2007; Kobrynski und Sullivan, 2007; Ryan *et al.*, 1997; Sandrin-Garcia *et al.*, 2007; Swillen *et al.*, 1997; Wiedemann und Kunze, 2001b, S.76f.).

<b>Sehr häufige Symptome des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 (&gt;50%)</b>	<b>Häufigkeit in % (etwa)</b>
SGA ( <u>S</u> mall for <u>G</u> estational <u>A</u> ge)	72
Wachstumsretardierung < 50. Perzentile	83
typische faciale Dysmorphien	bis 100
kongenitale Herzfehler	66
Palatale Fehlbildungen	85
Immuninsuffizienz	77
Entwicklungsretardierung im Säuglingsalter	75
Sprachentwicklungsretardierung	82
Lernstörungen	77
<b>Häufige Symptome des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 (20-50%)</b>	<b>Häufigkeit in % (etwa)</b>
Wachstumsretardierung < 3. Perzentile	36
Ophthalmologische Fehlbildungen	39
renale Fehlbildungen	37
Skelettale Fehlbildungen	27
Hypokalzämie	39
Hypokalzämisch bedingte zerebrale Krampfanfälle	39
Mentale Retardierung	45
Verhaltensauffälligkeiten/psychiatrische Erkrankungen	30
<b>Gelegentliche Symptome des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 (&lt;20%)</b>	<b>Häufigkeit in % (etwa)</b>
Neurologische Fehlbildungen	9
Hyposomatotropismus	4

Zusätzlich zeigen die Patienten charakteristische Gesichtsdysmorphien, wie ein langes, schmales, ausdrucksloses Gesicht mit ausgeprägter Nase und Nasenwurzel, abstehende Ohren, eine schmale Stirn und ein kleines Kinn. (Abb.1). Häufig besteht ein Immundefizit aufgrund einer Thymushypo-/aplasie (Jawad *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 1993a). Die Gaumenspalte kann bei diesen Patienten offen oder submukös sein und ebenso wie ein kurzes Gaumensegel eine näselnde Sprache zur Folge haben. Ferner kann eine Hypokalzämie infolge einer Unterfunktion der Nebenschilddrüse auftreten (Gidding *et al.*, 1988).

Das Akronym „CATCH 22“ gilt heute als unpassend und nicht ausreichend zur Beschreibung des Krankheitsbildes (Yamagishi, 2002). Im englischen Sprachgebrauch bedeutet „catch“ Falle. „Catch-22“ ist der Titel eines satirischen Romans von Joseph Heller (1961) in dem es um die Absurdität des Krieges geht. Der Begriff „Catch-22“ bezeichnet in diesem Buch ein Dilemma oder eine ausweglose Situation.



**Abb.1: Patienten mit Mikrodeletionssyndrom 22q11.2: typische Gesichtsdysmorphien** (Jaensch, 2002). **A** Auffallend sind Hypertelorismus, verbreiteter Nasenrücken, kleine, tief angesetzte Ohrmuscheln, kleiner Mund und Retrognathie. **B** Älterer Patient mit stärker ausgeprägten typischen Dysmorphien: lange schmale Gesichtsform, Hypertelorismus, verbreiteter Nasenrücken, kleine, tief angesetzte Ohrmuscheln und kleiner Mund.

Da der Begriff „CATCH 22“ für die betroffenen Familien die Akzeptanz der Diagnose erschweren kann und als diskriminierend empfunden wird, sollte er nicht verwendet werden. Burn schlug stattdessen die Bezeichnung „Mikrodeletionssyndrom 22q11.2“ vor (Burn, 1999).

Da alle oben genannten Syndrome durch einen spezifischen Deletionsbereich verursacht werden, werden sie nunmehr als unterschiedliche phänotypische Manifestationen der Mikrodeletion 22q11.2 angesehen (Hay, 2007).

Das DiGeorge- und das Velokardiofaziale-Syndrom werden durch eine 1,5 bis 3,0 Mb große, heterozygote Deletion in Chromosom 22q11.2 verursacht.

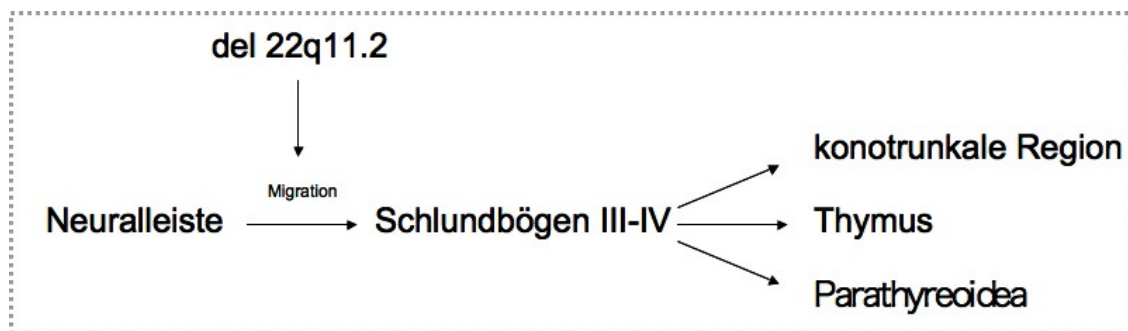
Die meisten der betroffenen Patienten (etwa 90 %) weisen in der typischerweise deletierten Region (TDR: *typical deleted region*) eine 3 Mb große Deletion auf, die ungefähr 30 Gene einschließt. Eine kleinere Gruppe von Patienten (etwa 10 %) hat eine 1,5 Mb große Deletion in der so genannten PDR (*proximal deleted region*), mit etwa 24 Genen. Da sich diese kleinere Deletion im 3 Mb großen Deletionsbereich befindet, wird sie auch als *nested deletion* bezeichnet (Lindsay, 2001).

Die Region des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 ist vollständig sequenziert (Ensembl, 2010). Im 22q11.2 Sequenzbereich wurden LCRs (*low copy repeats*) nachgewiesen (Edelmann et al., 1999a; Edelmann et al., 1999b), die zu interchromosomalen und auch zu intrachromosomalen Rekombinationsereignissen führen können (Shaikh et al., 2000).

Ähnliche Vorgänge sind für andere Mikrodeletionssyndrome, wie das Williams-, das Prader-Willi- und das Angelman-Syndrom beschrieben (Amos-Landgraf et al., 1999; Chen et al., 1997; Peoples et al., 2000).

Für das Krankheitsbild bei Patienten mit Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 ist eine Entwicklungsstörung der III. und IV. Schlundtasche in der 12. Schwangerschaftswoche verantwortlich, die auf einer Störung der Migration der Neuralleistenzellen in die Schlundregion während der Embryogenese beruht (Kirby und Waldo, 1995, Abb.2). Zusätzlich kann die Entwicklung aller, mindestens aber die der I., II., oder VI. Schlundtasche betroffen sein (Thomas und Graham, 1997).

Allerdings ist keine Phänotyp-Genotyp-Korrelation feststellbar (Carlson et al., 1997; Gong et al., 1996; Lindsay et al., 1995a; Lindsay et al., 1995b). Der Phänotyp kann durch die Größe der Deletion, durch Umwelteinflüsse oder durch zufällige Ereignisse während der Embryonalentwicklung beeinflusst werden (Yamagishi, 2002).



**Abb.2: Pathogenese bei Mikrodeletion 22q11.2.**

Die Mikrodeletion 22q11.2 führt zu einer Störung der Migration der Neuralleistenzellen in die Schlundbögen III-IV. Diese Störung resultiert in einer gestörten Embryogenese der konotrunkalen Region, der Thymusdrüse und der Parathyreoidea (verändert nach McLean-Tooke *et al.*, 2007).

### **1.3 Diagnostik des DiGeorge-, des Velokardiofazialen- und des *Conotruncal anomaly face*-Syndroms**

Die Methode FISH stellt die Standardmethode bei der Diagnostik des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 dar (Halder *et al.*, 2008). Mittels FISH können bei Patienten mit DGS, VSFS und CAFS unbalancierte Translokationen, aber auch interstitielle Deletionen nachgewiesen werden, die zu klein sind, um im Lichtmikroskop erkannt zu werden. Die derzeitige Auflösungsgrenze bei der Kartierung von Genen in der Metaphase liegt bei etwa 1-1,5 Mb (Lawrence *et al.*, 1990; Trask *et al.*, 1989), wohingegen mit FISH-Sonden in der Interphase unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Sonden, aufgrund des geringeren Kondensationsgrads der Chromosomen, ein Abstand von 50 kb differenziert werden kann (Trask *et al.*, 1993; van den Engh *et al.*, 1992). So ist es möglich, in der Interphase mittels FISH Duplikationen und Deletionen im Bereich von etwa 1 Mb zu beschreiben, welche in der Metaphase nicht beschrieben werden können (Lupski *et al.*, 1991; Shaffer *et al.*, 1997).

Mittels FISH konnte gezeigt werden, dass das DiGeorge-Syndrom auf eine Mikrodeletion im Bereich 22q11.2 zurückzuführen ist (Augusseau *et al.*, 1986; Greenberg *et al.*, 1984; Greenberg *et al.*, 1988; Kelley *et al.*, 1982; Wilson *et al.*, 1992).

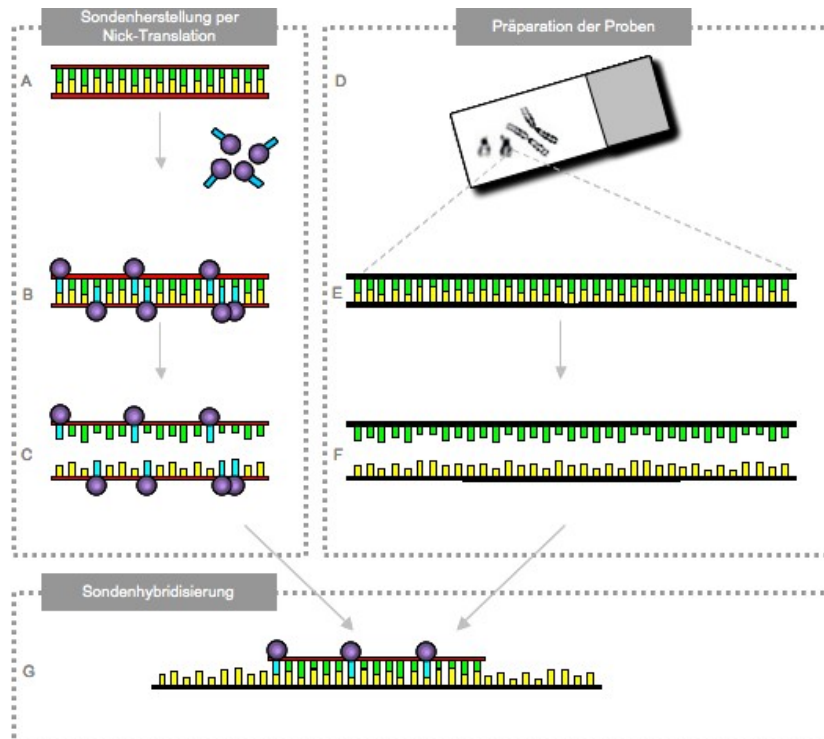
Bei 90 % der Patienten mit DGS liegt diese Deletion vor, vereinzelt wurden aber auch Fälle beschrieben, bei denen andere Chromosomenaberrationen bestanden (Carey *et al.*, 1992; Driscoll *et al.*, 1993). Deletionen des Chromosoms 10 im Bereich 10p13-p15 verursachen einen dem DGS ähnlichen Phänotyp (Schuffenhauer *et al.*, 1995). Entsprechend wird dieses Krankheitsbild als DiGeorge-Syndrom 2 bezeichnet (Schuffenhauer *et al.*, 1998).

Patienten mit VCFS weisen in etwa 83 % eine Mikrodeletion in 22q11.2 auf (Carlson *et al.*, 1997).

Bei 98 % der Patienten mit CAFS wird eine Mikrodeletion 22q11.2 identifiziert (Valsangiacomo, 2009). 1994 wurde das CAFS dem Syndromkreis der Mikrodeletion 22q11.2 zugeordnet (Matsuoka *et al.*, 1994).

### 1.3.1 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die molekularbiologische Methode der *in situ*-Hybridisierung (ISH) ermöglicht es, Nukleinsäuresequenzen in einem biologischen Präparat darzustellen. Bei dieser Methode hybridisiert eine aus Nukleinsäuren bestehende Sonde „*in situ*“ über Basenpaarung mit der nachzuweisenden komplementären Nukleinsäuresequenz von Interphasekernen oder Metaphasechromosomen (Gall und Pardue, 1969; John *et al.*, 1969). Die *in situ*-Hybridisierung kann mit radioaktiv markierten Proben oder mit nicht-radioaktiven Markierungsmethoden, wie z.B. Biotin (Brigati *et al.*, 1983; Langer *et al.*, 1981) oder Digoxigenin (Heiles *et al.*, 1988) durchgeführt werden. Bei der nicht-radioaktiven Methode erfolgt die Detektion anhand einer Kaskade von fluoreszierenden Antikörpern (Bauman *et al.*, 1980; Lichtner *et al.*, 1992). Bei Verwendung von Sonden mit fluoreszenzmarkierten Farbstoffen handelt es sich um die Methode FISH (**f**luoreszenz-**i**n **s**itu-**h**ybridisation).



**Abb.3: Prinzip der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung.**

**Sondenherstellung per Nick-Translation:** **A** Ein Vektor beinhaltet die spezifische Sondensequenz **B** Die Sondensequenz wird z.B. mittels Nick-Translation mit fluoreszierenden Farbstoffen (lila und blau) markiert. **C** Denaturierung der Sonden; **Präparation der Proben:** **D** Präparation der Proben über Herstellung einer Chromosomensuspension **E** Zielsequenzbereich **F** Denaturierung des Zielsequenzabschnittes; **Sondenhybridisierung:** **G** Spezifisch hergestellte, fluoreszenzmarkierte Sonde bindet an den Zielsequenzbereich.

Die Abbildung 3 zeigt das Prinzip der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, die heutzutage eine etablierte Technik in der Forschung, Tumorzytogenetik, physikalischen Kartierung und der Chromosomendiagnostik im prä- und postnatalen Bereich darstellt (Adinolfi und Crolla, 1994; Gosden *et al.*, 1991). FISH kann beispielsweise mit Amniozyten- und Nabelschnurblutzellen (Chen *et al.*, 2004), peripheren Blutlymphozyten (Consevage *et al.*, 1996) und Herzmuskelzellen (Patel *et al.*, 2006) durchgeführt werden. Mittels der Methode gelang es in der molekularen Zytogenetik unter anderem, strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen, sowie auch Mikroduplikationen und Mikrodeletionen näher zu charakterisieren und zu analysieren (Shaffer *et al.*, 1997, siehe oben). Im Gegensatz zu klassischen Bänderungsanalyse-Techniken dient die Methode FISH neben der Analyse von Metaphasechromosomen auch der Beschreibung von Interphasekernen (Cremer *et al.*, 1988; Jauch *et al.*, 1990). Mikrodeletionen können dank spezifischer Sonden mittels Interphase-FISH durch die Auswertung von Signalen und unter Verwendung von Kontrollsonden nachgewiesen werden (Lux *et al.*, 1990; Roa *et al.*, 1993). Die Detektion von Deletionen erfolgt hierbei durch sequenzspezifische Sonden, die mittels DNA-Sequenzmatrizen generiert werden (Abb.3). Die DNA-Sequenzmatrizen werden, je nach Größe des Fragments, in spezifische Vektoren kloniert (Janning und Knust, 2004). Die in dieser Arbeit verwendeten BACs (bacterial artificial chromosomes) sind F-Plasmide, die große DNA-Fragmente von etwa 100-300 kb aufnehmen können und einen geringen Grad an Chimärismus aufweisen (Shizuya *et al.*, 1992).

### **1.4 Ziel der Arbeit**

In den Instituten für Humangenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen und der Philipps-Universität Marburg war bei 38 Patienten im Rahmen der Routinediagnostik eine Mikrodeletion 22q11.2 mit der kommerziellen FISH-Sonde TUPLE1 diagnostiziert worden. Die Deletionsgröße bei den einzelnen Patienten war nicht bestimmt worden. Ein Ziel der Arbeit war die Größenbestimmung der Mikrodeletion bei diesen Patienten. Des Weiteren sollte das klinische Bild der untersuchten Patienten in Hinblick auf eine Korrelation mit der Deletionsgröße untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die genetische Nachuntersuchung von 50 Patienten ohne nachgewiesene Mikrodeletion 22q11.2, aber mit hochgradigem klinischem Verdacht auf eine Deletion. Diese Patienten wurden auf das Vorliegen einer atypischen Deletion in 22q11.2 untersucht, die mit der in der Routinediagnostik eingesetzten Sonde TUPLE1 nicht nachgewiesen werden kann.

Darüber hinaus sollte die Sondenkombination zur Differenzierung der typischen Deletionsgrößen des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 in der Routinediagnostik optimiert werden. Es sollte geprüft werden, ob eine oder mehrere der in dieser Arbeit hergestellten FISH-Sonden im Rahmen der Routinediagnostik eingesetzt werden können, um die vorliegenden Deletionsgrößen zu bestimmen.



## **2. Patienten und Methoden**

### **2.1 Patienten: Klinische Kriterien**

Es wurden 38 Patienten mit nachgewiesener Mikrodeletion 22q11.2 untersucht sowie weitere 53 Patienten mit begründetem klinischem Verdacht auf eine Mikrodeletion 22q11.2, ohne dass mit den üblicherweise verwendeten kommerziellen Sonden eine solche Deletion identifiziert werden konnte.

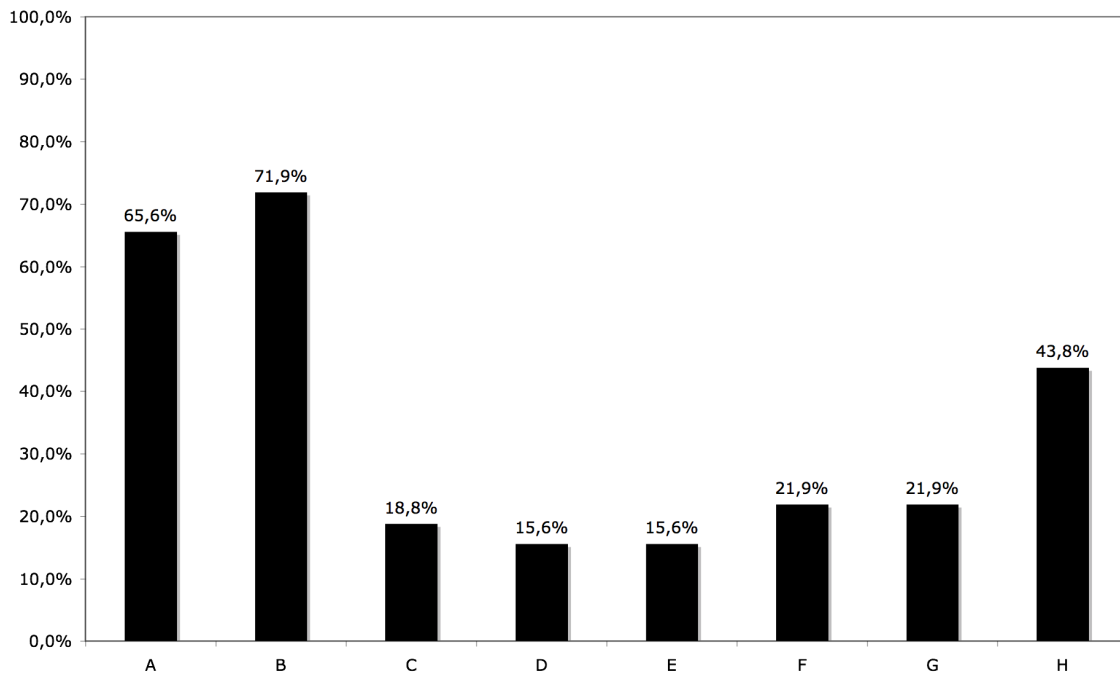
#### **2.1.1 Gruppe A: Patienten mit Mikrodeletion 22q11.2**

Patienten mit diagnostizierter Mikrodeletion werden im Folgenden als Gruppe A bezeichnet.

Aus dem Untersuchungsgut unseres Instituts stammten 26 Proben, 12 Proben erhielten wir vom Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg. Alle Patienten waren bereits mit der käuflichen Sonde TUPLE1 untersucht und eine Mikrodeletion 22q11.2 nachgewiesen worden.

Die klinischen Symptome der Patienten werden im Folgenden anhand der Patientenakten dargestellt. Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die Häufigkeit der wesentlichen Symptome. Klinische Angaben lagen für 32 Patienten (84,2 %) vor. Bei 23 von ihnen wurden faziale Dysmorphien beschrieben. Einen kongenitalen Herzfehler hatten 21 Patienten, in acht Fällen handelte es sich dabei um einen konotrunkalen Defekt. Sieben Patienten waren mental oder in ihrer Entwicklung retardiert oder sie zeigten Verhaltensauffälligkeiten. Bei sechs Patienten wurde eine velopharyngeale Insuffizienz oder eine Lippen- oder Gaumenspalte beschrieben. Jeweils fünf Patienten wiesen eine Hypokalzämie, eine Immuninsuffizienz, eine Leukozytopenie oder gehäufte Infektionen auf. Weitere Fehlbildungen oder andere Symptome wurden bei 14 Patienten beschrieben.

Unter den 38 Patienten mit Mikrodeletion 22q11.2 befand sich ein konkordantes Geschwisterpaar. In einem Fall lag eine paternale Mikrodeletion vor, wobei der Vater keine klinischen Zeichen aufweist. Routinemäßig werden bei allen Patienten mit nachgewiesener Deletion die Eltern untersucht. Bei keinem weiteren in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurde eine familiäre Deletion festgestellt.



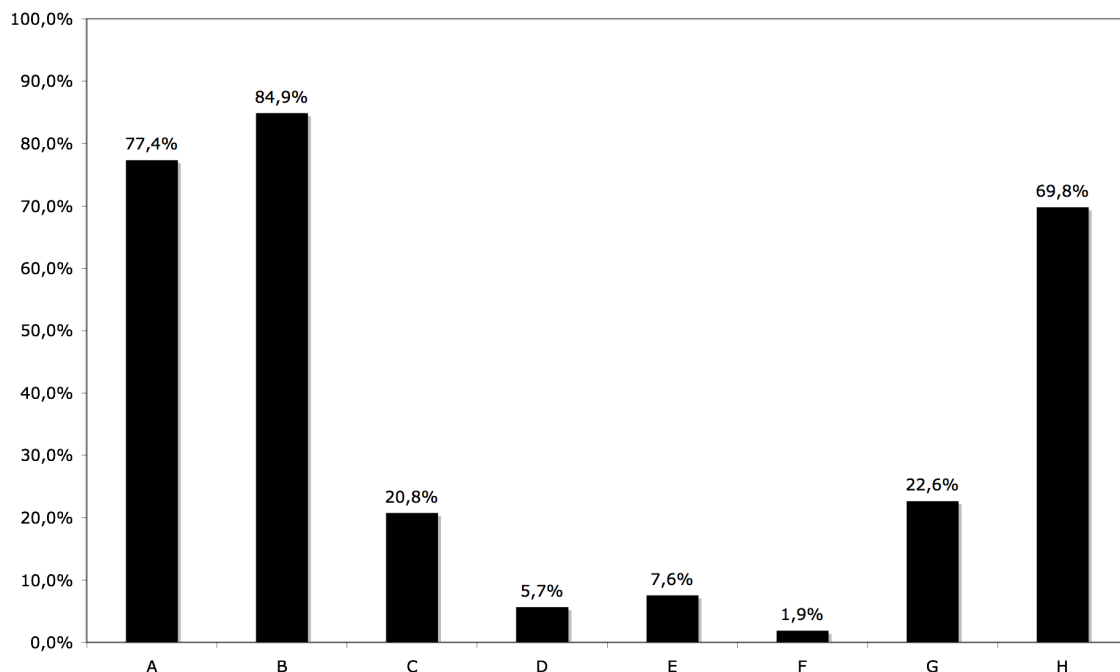
**Abb.4: Klinische Symptome der untersuchten Patienten mit del(22)(q11.2) (Gruppe A).** Das Diagramm zeigt die Häufigkeit (%) der Symptome bezogen auf 32 Patienten mit nachgewiesener del(22)(q11.2). **A** kongenitaler Herzfehler, **B** faziale Dysmorphien, **C** velopharyngeale Insuffizienz und/oder Lippen- oder Gaumenspalte, **D** Hypokalzämie, **E** Immuninsuffizienz, erniedrigte Leukozytenzahlen oder gehäufte Infektionen, **F** Thymushypoplasie oder -aplasie, **G** mentale Retardierung, Entwicklungsretardierung oder Verhaltensauffälligkeiten, **H** andere Symptome oder Fehlbildungen, darunter pulmonale, muskuläre, thorakale und urogenitale Anomalien, sowie Fehlbildungen der Extremitäten und des ZNS. (Quelle: Patientenakten der untersuchten Patienten)

### 2.1.2 Gruppe B: Patienten mit klinischem Bild eines Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 ohne detektierte Deletion

Es wurden 53 Patienten untersucht, deren klinisches Bild für ein Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 sprach, die jedoch mit den kommerziellen FISH-Sonden (Vysis® DiGeorge Region Probe LSI® TUPLE1 und Vysis® DiGeorge Region Probe LSI® N25) keine Deletion zeigten. Die initiale Diagnostik erfolgte im Zeitraum von 1997 bis 2006 am Institut für Humangenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen. Diese Patientengruppe wird im Folgenden als Gruppe B bezeichnet. Kriterium für die Auswahl der Patienten war das Vorliegen eines sehr häufigen und zusätzlich mindestens eines weiteren klinischen Zeichens des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2. In Tabelle 1 (Einleitung) sind die Häufigkeiten der

verschiedenen Symptome, die der Auswahl der Patienten zugrunde gelegt wurden, zusammengefasst.

41 Patienten der Gruppe B hatten einen kongenitalen Herzfehler, der sich bei 13 Patienten als konotrunkaler Herzfehler darstellte. Bei 45 Patienten waren faziale Dysmorphien beschrieben, die mit dem Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 vereinbar sind. Elf Patienten hatten eine velopharyngeale Insuffizienz oder eine Lippen- oder Gaumenspalte. Eine Hypokalzämie trat bei drei Patienten auf. Bei vier Patienten wurde eine Immuninsuffizienz, eine Leukozytopenie oder eine gehäufte Infektionsrate festgestellt, darunter bei einem Patienten eine Thymusaplasie. Mentale Retardierung, Entwicklungsretardierung oder Verhaltensauffälligkeiten zeigten 12 Patienten. Bei 37 Patienten wurden weitere Fehlbildungen oder Symptome, wie pulmonale, muskuläre, thorakale und urogenitale Anomalien, sowie Fehlbildungen der Extremitäten und des ZNS diagnostiziert. Abbildung 5 zeigt die prozentuale Verteilung der klinischen Zeichen dieser Gruppe.



**Abb.5: Symptome der 53 untersuchten Patienten ohne Mikrodeletion 22q11.2 (Gruppe B).** Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten (%) der Symptome bezogen auf 53 Patienten. **A** kongenitale Herzfehler, **B** faziale Dysmorphien, **C** velopharyngeale Insuffizienz und/oder Lippen- oder Gaumenspalte, **D** Hypokalzämie, **E** Immuninsuffizienz, erniedrigte Leukozyten oder gehäufte Infektionen, **F** Thymushypoplasie oder Thymusaplasie, **G** mentale Retardierung, Entwicklungsretardierung oder Verhaltensauffälligkeiten, **H** andere Symptome

## 2.2 Herstellung der Chromosomenpräparate

Die Untersuchungen wurden an Mitosen und Zellkernen aus Lymphozytenkulturen der Patienten durchgeführt.

### 2.2.1 Ansatz und Abbruch der Lymphozytenkulturen

verwendete Materialien/ Lösungen

- *LymphoGrow* (Komplettmedium)
- *PB-Max* (Komplettmedium)
- Synchronisierungslösung (Synchroset)
- Ethidiumbromid (1 mg/ml)
- Colchicin (0,4 mg/ml)

Von jeder Blutprobe wurden 2 Kulturen mit unterschiedlichen Komplettmedien angesetzt. Diese Medien enthalten Antibiotika (Streptomycin), L-Glutamin und Fetales Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) sowie als Mitogen Phytohämagglutinin (PHA).

Beide Parallelkulturen wurden zur Steigerung der Rate von Prometaphasestadien durch Zugabe zweier Lösungen eines Synchronisierungskits behandelt.

Dieses Kit enthält Thymidin und Fluorodeoxyuridin. Durch Zugabe von Thymidin wird der Zellzyklus am Übergang der G1/S-Phase gestoppt. Diese Blockade wird nach einem definierten Zeitintervall (12-17 Stunden) durch Zugabe von Fluorodeoxyuridin aufgehoben, so dass die arretierten Zellen nun synchron die S-Phase und die weiteren Abschnitte des Zellzyklus durchlaufen. Erfolgt nach einer definierten Zeit (5 Stunden) nach dem Auflösen der Blockade in der frühen Mitose der Abbruch der Kultur, so ist der Anteil an Prometaphasen deutlich höher als bei nicht-synchronisierten Kulturen.

Zusätzlich wurden beide Kulturen mit Ethidiumbromid behandelt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der interkalar in die DNA eingebaut wird und so die Kondensation der Chromosomen reduziert.

Durch Zugabe von Colchicin, einem Mitosegift, das die Ausbildung der Spindel verhindert, werden die Mitosen im Stadium der Metaphase gestoppt.

### Durchführung

Für jeden Lymphozytenkultur-Ansatz wurden 8-9 ml Kulturmedium mit 0,8-1 ml Heparinblut gemischt. Pro Patient wurde je eine Kultur mit *LymphoGrow*- und mit *PB-Max*-Medium angesetzt. Die Kulturen wurden für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 52 (48-56) Stunden wurden jeder Kultur 100 µl Thymidin zugesetzt. Nach weiteren 12 -17 Stunden erhielt jede Kultur 100 µl Fluorodeoxyuridin. Die Zugabe von je 100-200 µl Ethidiumbromid und Colchicin erfolgte nach weiteren 5 Stunden für 30 Minuten.

### 2.2.2 Aufarbeitung der Lymphozytenkulturen

- 0,075 M KCl
- 96% Essigsäure
- Fixativ (-20 °C): 2 Teile Methanol plus 1 Teil 96% Essigsäure

### Durchführung

1. Kulturröhrchen für 8 Minuten bei 1100 rpm zentrifugieren
2. Überstand verwerfen und Pellet durch Vortexen (Mischen von Stoffen mit Hilfe einer Schüttelmaschine) lösen
3. Zugabe von etwa 5 ml 0,075 M KCl für 30-45 min bei 37°C
4. Zugabe von 1 bis 2 Tropfen Essigsäure
5. Zentrifugieren (8 Minuten bei 1100 rpm), Überstand verwerfen und Pellet durch Vortexen lösen
6. Zugabe von etwa 5 ml eiskaltem Fixativ
7. Fixativ sooft wechseln, bis das Zellsediment möglichst weiß und der Überstand klar ist
8. Röhrchen verschließen und für mindestens 1 Stunde bei minus 20°C inkubieren

### 2.2.3 Herstellung der Präparate

Die fixierten Lymphozytenkulturen wurden zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einer seiner Größe angemessenen Menge frischen Fixativs resuspendiert.

Von der Zellsuspension wurden 2 bis 3 Tropfen aus 10-20 cm Höhe auf fettfreie, kalte und feuchte Objektträger getropft. Für die Qualität der Mitosen ist die Kombination von Temperatur und Feuchtigkeit am Auftropfplatz entscheidend. Daher wurde bei zu trockener Luft über Wasserdampf aufgetropft. Die Objektträger wurden dann kurz auf einer 37°C-Wärmeplatte getrocknet und anschließend für eine Stunde auf einer 60°C-Wärmeplatte „gealtert“. Durch Kontrolle der trockenen Präparate im Phasenkontrastmikroskop wurde überprüft, ob die Anzahl der zytoplasmafreien Mitosen ausreichend ist und die Chromosomen gut gespreitet sind.

### 2.2.4 Vorbehandlung der Präparate

Die Hybridisierung von FISH-Sonden auf Chromosomenpräparaten gelingt häufig besser, wenn die Objektträger vorbehandelt werden.

- 10xPBS: 1,37M NaCl, 26,8 mM KCl, 80,9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 17,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7
- Stabilisierungslösung: 1xPBS, 1% Formaldehyd (35-37%), 50 mM MgCl<sub>2</sub>

Die Präparate wurden in 1xPBS für 5 min inkubiert. Dann wurden sie für 10 min in die Stabilisierungslösung gestellt und abschließend nochmals für 5 min in 1xPBS gespült. Danach wurden sie getrocknet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

#### Dehydrierung

- Ethanol 70%, 80% und 95%; bei -20°C vorgekühlt

Die Präparate wurden in der eiskalten, aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 2 min bei RT dehydriert und nach Trocknung auf der 37°C-Wärmeplatte für weitere 15 min auf der 60°C-Wärmeplatte belassen.

**Tab.2: Bezeichnung, Lokalisation und Größe der BAC-Klone.** Als Vektor wurde pBACe3.6 verwendet. (Ensembl, 2010)

Clone-IDs	Chr./Bande	Genaue Position (bp)	Länge
CTD-2367L15	22q11.21	bp 16129906 - bp 16219556	89.651 bp
CTD-2536F14	22q11.21	bp 16826188 - bp 17028141	201.954 bp
CTD-2522F24	22q11.21	bp 17313884 - bp 17446339	132.456 bp
RP11-138C22	22q11.21	bp 18259187 - bp 18435258	176.072 bp
RP11-54C2	22q11.21	bp 19538298 - bp 19730795	192.498 bp
RP11-22M5	22q11.22	bp 20569869 - bp 20724983	155.115 bp
RP11-659D9	22q11.22	bp 20815412 - bp 20991636	181.671 bp
RP11-694E12	3q28-q29	bp 193639657 - bp 193835968	196.311 bp

### 2.3 Herstellung der FISH-Sonden aus DNA von BAC-Klonen

Die Abschätzung der Größe der spezifischen Deletion wurde mit Hilfe von BAC-Klonen (BAC, *bacterial artificial chromosome*) mit definierter Lokalisation in 22q11.2 durchgeführt. DNA der folgenden acht BAC-Klone, CTD-2367L15, CTD-2536F14, CTD-2522F24, RP11-138C22, RP11-694E12, RP11-54C2, RP11-22M5 und RP11-659D9 wurde vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, zur Verfügung gestellt.

#### 2.3.1 Amplifizierung der Human-DNA mittels DOP-PCR

Mittels DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction*) wurde die DNA der oben genannten BAC-Klone amplifiziert. Die DOP-PCR ermöglicht die Vermehrung unbekannter genomischer DNA mit Hilfe eines universellen Primers, der eine Region aus sechs degenerierten Nukleotiden enthält. In den ersten Zyklen der DOP-PCR erfolgt bei niedriger Temperatur eine unspezifische Primer-Anlagerung, die statistisch betrachtet über das gesamte Genom verteilt ist.

DOP-PCR-Kit (Roche)

Dieses Kit enthält:

- DOP-PCR Mastermix: DOP-PCR Puffer, 1 x 2,5 U in Brij 35, 0,005% (v/v), 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM dTTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- DOP-PCR primer (22mer, 5'-OH CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTGG OH-3, dabei: N = A, C, G, T etwa zu gleichen Teilen: 2 µM

- Steriles redestilliertes H<sub>2</sub>O
- Kontroll-DNA: humane genomische DNA von der Lymphoblastenzelllinie BJA (1 ng/μl in sterilem Wasser)

Durchführung

1. Auftauen der Reagenzien auf Raumtemperatur
2. Vortexen der Reagenzien
3. Kurzes Zentrifugieren der Reagenzien
4. 50 μl DOP-PCR Mastermix, 5 μl DOP-PCR Primer, 1 μl Template DNA 50 ng/μl, 44 μl steriles H<sub>2</sub>O bidest. in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettieren
5. Pro DOP-PCR Ansatz wird eine Positiv-Kontrolle mit Kontroll-DNA und eine Negativ-Kontrolle mit 1 μl sterilem H<sub>2</sub>O bidest. angesetzt.
6. DOP-PCR Protokoll.

**Tab.3: DOP-PCR Protokoll.**

<b>1.</b>	5 min	95 °C
<b>2.</b>	5 Zyklen:	
	60 sec	94 °C
	90 sec	30 °C
	10 sec	32,3 °C
	10 sec	34,6 °C
	10 sec	37,0 °C
	10 sec	39,3 °C
	10 sec	41,6 °C
	10 sec	44,0 °C
	10 sec	46,3 °C
	10 sec	48,6 °C
	10 sec	51,0 °C
	10 sec	53,3 °C
	10 sec	55,6 °C
	10 sec	58,0 °C
	10 sec	60,3 °C
	10 sec	62,6 °C
	10 sec	65,0 °C
	10 sec	67,3 °C
	10 sec	69,6 °C
	10 min	72,0 °C
	3	72,0 °C
<b>3.</b>	35 Zyklen	
	1 min	94 °C
	1 min	62 °C
	3 min	72 °C
<b>4.</b>	7 min	71 °C



### Analyse der DOP-PCR-Produkte

Die Analyse der DOP-PCR-Produkte erfolgte durch Auftrennung der Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese.

#### Reagenzien:

- Ladepuffer: 0,25 % Xylencyanol, 0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin
- Agarose
- 1xTBE: 10,8 g TRIS Base, 5,5 g Borsäure, 0,7 g EDTA-Na<sub>2</sub> ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O, pH 8,0
- Längenstandard Ready-Load™ 1Kb Plus DNA Ladder

Es wurden 20 µl des Reaktionsgemisches mit 5 µl Ladepuffer auf einem 1%igen Agarosegel in 1 x TBE-Puffer bei 20 V für 3 h aufgetrennt. Als Längenstandard wurde die Ready-Load™ 1Kb Plus DNA Ladder verwendet. Die Größe der DOP-PCR-Produkte soll zwischen etwa 500 und etwa 2000 bp liegen.

#### Ethanol-fällung der DOP-PCR-Produkte

- 3 M NaAC: 29,218 g NaAC, ad 200 ml H<sub>2</sub>O, pH 5,5
- 100% EtOH
- 70% EtOH
- 1 x TE: 20 ml 50xTAE, 980 ml dH<sub>2</sub>O

#### Durchführung

1. 80 µl DOP-PCR-Produkt, 8 µl 3 M NaAC, 240 µl 100% EtOH, in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettieren
2. Lösung mindestens 1 h bei -20 °C inkubieren
3. Eppendorfreaktionsgefäße 20 min bei 12000 rpm zentrifugieren
4. Verwerfen des Überstandes
5. Zugabe von 100 µl eiskaltem (-20 °C) 70% EtOH
6. Zentrifugieren der Eppendorfreaktionsgefäße 5 min bei 12000 rpm
7. Verwerfen der Überstandes
8. Pellet bei RT trocknen
9. Pellet in 50 µl 1x TE aufnehmen

Die gemessene DNA-Konzentration der DOP-PCR-Produkte nach der Ethanolfällung variierte und betrug bis zu 0,410 µg/µl.

### 2.3.2 Nick-Translation

Mit Hilfe der Nick-Translation wurden die DOP-PCR-Produkte mit den Fluorophoren *SpectrumOrange-dUTP* bzw. *SpectrumGreen-dUTP* markiert.

Die Nick-Translation ist ein Verfahren zur *in vitro*-Markierung von DNA. Mit Hilfe einer Endonuklease, z.B. DNase I, werden zufällige Einzelstrangbrüche, so genannte *nicks*, in der zu markierenden DNA erzeugt. Dabei entstehen freie 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden. In Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>-Ionen schneidet das Enzym nur einen der beiden DNA-Stränge, der Doppelstrang bleibt somit erhalten. Die zufälligen Einzelstrangbrüche werden von der DNA-Polymerase I erkannt. Das 3'-Ende stellt den Startpunkt zum Einbau neuer Nukleotide dar, während das 5'-Ende gleichzeitig abgebaut wird. Der gleichzeitige Auf- und Abbau führt dazu, dass sich die Bruchstelle den DNA-Strang entlang bewegt. Dabei werden Fluorophor-markierte dNTP's eingebaut. Bei niedriger Temperatur (etwa +15 °C) wird die DNA einmal vollständig erneuert. Die Reaktion setzt sich dann nicht weiter fort. Die Länge der markierten DNA-Fragmente und die spezifische Aktivität der Sonden sind abhängig von der Menge der eingesetzten DNase I und der Inkubationszeit. Als optimal gilt eine Fragment-Länge von etwa 400-800 bp.

Die BAC-Klone, CTD-2367L15, CTD-2536F14, CTD-2522F24, RP11-138C22, RP11-54C2, RP11-22M5, RP11-659D9 und RP11-694E12, wurden mittels Nick-Translation mit *SpectrumOrange-dUTP* oder mit *SpectrumGreen-dUTP* markiert.

Nick-Translations-Kit

Dieses Kit enthält:

- Nukleasefreies ddH<sub>2</sub>O
- 0,3 mM dTTP
- 0,3 mM dCTP
- 0,3 mM dATP

- 0,3 mM dGTP
- 10 x Nick-Translationspuffer: 500 mM Tris-HCl, pH 7,2, 100 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM DTT
- Nick-Translationsenzym: DNA Polymerase I, DNase I in 50% Glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM DTT, 0,5 mg/mL nukleasefreies BSA

### weitere Reagenzien

- 1 mM *SpectrumOrange-dUTP*: 50 nmol *SpectrumOrange-dUTP* in 50 µl ddH<sub>2</sub>O
- 1 mM *SpectrumGreen-dUTP*: 50 nmol *SpectrumGreen-dUTP* in 50 µl ddH<sub>2</sub>O
- 1 µg extrahierte DNA: Konzentration etwa 0,5 µg/µl ddH<sub>2</sub>O

### Ansätze:

- 0,2 mM *SpectrumOrange-* oder *SpectrumGreen-dUTP*:  
10 µl 1 mM *SpectrumOrange-* oder *SpectrumGreen-dUTP* + 40 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O in je ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettieren
- 0,1 mM dTTP:  
10 µl 0,3 mM dTTP + 20 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettieren
- 0,1 mM dNTP mix:  
10 µl 0,3 mM dATP + 10 µl 0,3 mM dCTP + 10 µl 0,3 mM dGTP in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettieren

### Durchführung

1. Auf Eis durchführen: 15,5 µl nukleasefreies ddH<sub>2</sub>O, 2 µl DNA, 2,5 µl 0,2 mM *SpectrumOrange-* oder *SpectrumGreen-dUTP*, 5 µl 0,1 mM dTTP, 10 µl 0,1 mM dNTP mix und 5 µl 10 x Nick-Translationspuffer in Eppendorfreaktionsgefäße pipettieren
2. Eppendorfreaktionsgefäße kurz vortexen
3. 10 µl Nick-Translationsenzym zugeben
4. Eppendorfreaktionsgefäße kurz vortexen
5. Eppendorfreaktionsgefäße 16 h bei +15 °C inkubieren
6. Stoppen der Nick-Translation durch 10 min Erhitzen der Eppendorfreaktionsgefäße auf +70 °C

### 7. Kühlen der Eppendorfreaktionsgefäße auf Eis

#### Analyse der Nick-Translationsprodukte

Die Analyse der Nick-Translationsprodukte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Nach Markierung mit dem Fluorophor *SpectrumOrange-dUTP* wurden etwa 300-550 bp lange Nick-Translationsprodukte nachgewiesen. Die Markierung mit *SpectrumGreen-dUTP* ergab etwa 70 bp lange Produkte.

#### 2.3.3 DNA-Fällung der Nick-Translationsprodukte

Die Fällung der markierten DNA erfolgte zur Erhöhung der Konzentration, da für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nur jeweils 10 µl DNA-Mix pro Hybridisierungsareal eingesetzt werden können. Zu der markierten DNA wurden Fishsperm-DNA und C<sub>0</sub>t Human-DNA hinzugefügt. Bei der Fishsperm-DNA handelt es sich um eine Blockade-DNA, die auf eine Länge von etwa 500 bp geschert ist. Sie wird verwendet, um unspezifische Signale zu supprimieren. Die C<sub>0</sub>t Human-DNA besteht weitestgehend aus repetitiven Sequenzen wie SINEs (*small interspersed repetitive sequences*) und LINEs (*large interspersed repetitive sequences*), die im menschlichen Genom ubiquitär verteilt sind. C<sub>0</sub>t Human-DNA wird aus menschlicher Plazenta-DNA gewonnen. Ihre Aufgabe ist es, bei der Hybridisierung als unmarkierte DNA die repetitiven Sequenzen abzudecken und somit eine spezifische Bindung der Sonde zu ermöglichen. Dies wird auch als Chromosomen-*in situ*-Suppressions-Hybridisierung (CISS) bezeichnet.

#### Fällung der Nick-Translationsprodukte

- Nick-Translationsprodukt
- C<sub>0</sub>t Human-DNA (1 mg/ml)
- Fishsperm-DNA (10 mg/ml)
- 3 M NaAc: 29,218 g NaAc, ad 200 ml H<sub>2</sub>O, pH 5,5
- 100% EtOH (-20 °C)
- deionisiertes Formamid: 100 ml Formamid mit 5 g Resin über 2 h durch Rühren deionisiert
- Mastermix (4 x SSC, 20% Dextransulfat): 200 µl 20 x SSC, 400 µl

50% Dextransulfat, 400  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O

Das im Mastermix enthaltene Dextransulfat ist ein Polyanion mit hohem Molekulargewicht. In wässriger Lösung liegt es stark hydriert vor und erhöht somit die Sondenkonzentration. Dadurch wird die Geschwindigkeit der Hybridisierung verdreifacht (Leitch, 1994).

### Durchführung

1. 100  $\mu$ l Nick-Translationsprodukt, 62,5  $\mu$ l C<sub>0</sub>t Human-DNA, 25  $\mu$ l Fishperm-DNA, 18,75  $\mu$ l 3 M NaAc pH 5,5 und 562,5  $\mu$ l eiskaltes 100% EtOH (-20 °C) in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettieren
2. mindestens 1 h bei -20 °C inkubieren
3. Eppendorfreaktionsgefäß für 20 min bei 12000 rpm zentrifugieren
4. Überstand verwerfen
5. Pellet bei RT trocknen lassen
6. Präzipitat für 1 h in 15  $\mu$ l deionisiertem Formamid bei 37 °C lösen
7. 15  $\mu$ l Mastermix zufügen

Nach Etablierung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit einzelnen BAC-Klonen wurden jeweils 100  $\mu$ l Nick-Translationsprodukt von zwei unterschiedlich markierten Klonen gefällt. So können pro Hybridisierung zwei Klone gleichzeitig untersucht werden.

## 2.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung der Sonden mit den zu untersuchenden Mitosen erfolgte auf den unter 2.3.1 beschriebenen Präparaten im Vysis® HYBrite, der eine Ko-Denaturierung von Sonde und Ziel-DNA ermöglicht.

- Sondenmix aus Nick-Translationsprodukten
- Fixogum
- Vysis® HYBrite

### Durchführung

- 10 µl Sondenmix auf das Hybridisierungsareal der Chromosomenpräparate auftragen
- mit einem Deckglas (24 x 26 mm) blasenfrei abdecken
- Hybridisierungsareal mit Fixogum versiegeln
- Objektträger im Vysis® HYBrite platzieren
- Ko-Denaturierung der Sonde und der Ziel-DNA für 2 min bei 74 °C
- Hybridisierung für 12-24 h bei 37 °C

### 2.4.1 Posthybridisierungswaschungen

Die nachfolgend beschriebene Behandlung der Präparate wurde obligatorisch nach jeder Hybridisierung durchgeführt.

Die einzelnen Waschschriffe verringern unspezifische Hintergrundsignale durch Entfernung der nicht oder nur schwach gepaarten Sonden. Einwertige Kationen der Waschlösungen treten mit den Nukleinsäuren in elektrostatische Wechselwirkung und verringern die elektrostatische Abstoßung zwischen den Strängen der Doppelhelix. Waschlösungen mit geringem Salzgehalt sind demnach stringenter als solche mit hohem Salzgehalt. Die Stringenz der Waschlösung ist darüber hinaus abhängig von der Temperatur der Lösung: je höher die Temperatur desto höher die Stringenz.

- 2 x SSC/0,1%NP-40: 100 ml 20xSSC (pH 5,3) + 850ml destilliertes H<sub>2</sub>O, 1 ml NP-40 dazugeben, pH-Messung; pH 7,0 +/- 0,2 mit NaOH einstellen, mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 1 L ergänzen
- 2 x SSC: 100 ml 20xSSC (pH 5,3) + 850ml destilliertes H<sub>2</sub>O, pH 7,0-7,5 mit NaOH einstellen, mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 1 L ergänzen
- Aqua dest.
- DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindol): Konzentration 0,07 µg/ml
- Vectashield: Diese Antifade-Lösung verzögert das Verblässen der Fluoreszenzsignale während der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

### Durchführung

1. Fixogum und Deckgläser vorsichtig vom Objektträger entfernen
2. Objektträger 30 sec in 2 x SSC bei 72 °C waschen
3. Objektträger 30 sec in 2 x SSC/0,1%NP-40 bei RT waschen
4. Objektträger in Aqua dest. spülen
5. Objektträger 1 min in DAPI färben
6. Objektträger in Aqua dest. spülen
7. Objektträger auf einer 37 °C Wärmeplatte unter Lichtschutz trocknen
8. 10 µl Vectashield auf das Hybridisierungsareal geben und mit einem Deckglas 24x26 mm abdecken

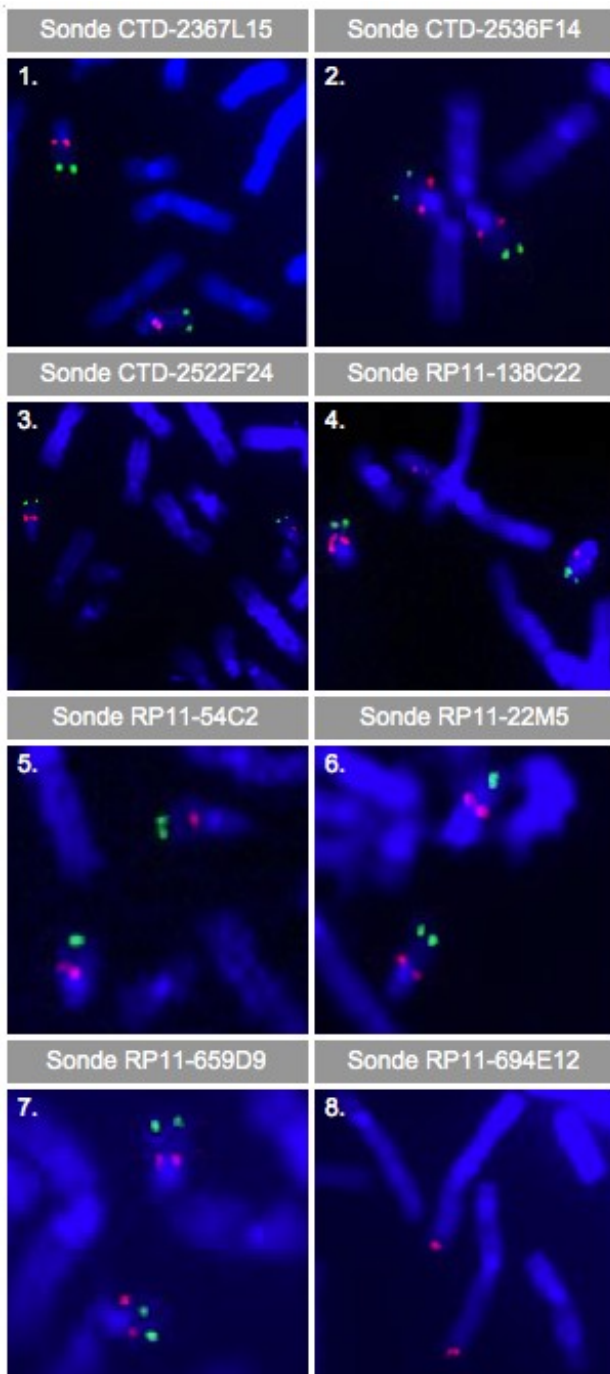
### **2.5 Ko-Hybridisierung der aus BAC-Klonen hergestellten „Nick-Sonden“ mit der 22qtel-Subtelomersonde**

Für jede der acht aus den BAC-Klonen hergestellten Sonden (BAC-Sonden) musste gezeigt werden, dass das spezifische Signal auf dem Chromosom 22 liegt.

Um dies nachzuweisen, erfolgte eine Ko-Hybridisierung mit einer zweiten Sonde, die außerhalb der zu untersuchenden Region auf dem Chromosom 22 lokalisiert ist (Kontrollsonde). Wir haben eine kommerziell erhältliche Subtelomersonde 22q verwendet. Die *Aquarius® 22qtel Subtelomer Specific Probe* wird als Kit geliefert und enthält die Sonde in konzentrierter Form und Hybridisierungslösung zur Verdünnung. Zum Nachweis der Lokalisation der BAC-Sonden auf Chromosomen einer gesunden Kontrollperson wurde jeweils eine mit SpectrumOrange-dUTP markierte Sonde mit der FITC (Fluorescein Isothiocyanate)-markierten Aquarius® 22qtel-Kontrollsonde ko-hybridisiert.

Jedem BAC-Sondenmix wurde jeweils 1 µl der 22qtel Subtelomersonde hinzugefügt. Hybridisierung, Posthybridisierungswaschungen und Gegenfärbung mit DAPI erfolgten wie oben beschrieben. Abbildung 6 zeigt die Lokalisation der einzelnen BAC-Sonden und der 22qtel-Subtelomer-Kontrollsonde.

Die BAC-Klone CTD-2367L15, CTD-2536F14, CTD-2522F24, RP11-138C22, RP11-54C2, RP11-22M5 und RP11-659D9 zeigten Signale in 22q11. Die Kontrollsonde 22qtel bindet in der Subtelomerregion in q13 des Chromosoms 22. RP11-694E12 ist auf Chromosom 3, in der Subtelomerregion des q-Arms (q29) lokalisiert und wurde deshalb für unsere Untersuchungen nicht eingesetzt.



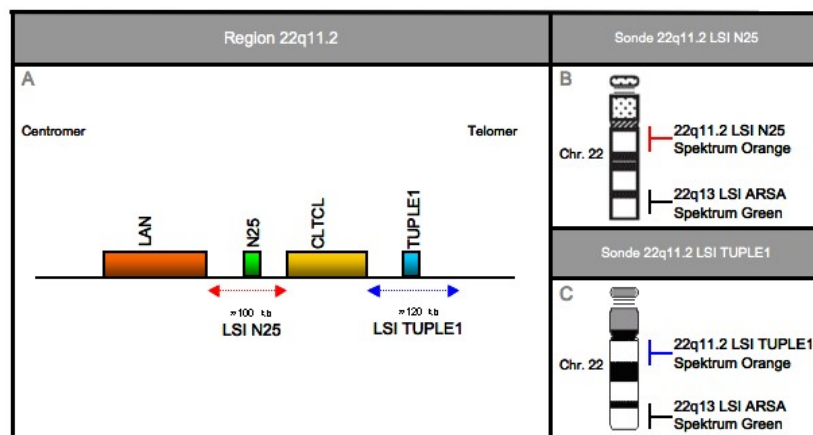
**Abb.6: Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung der hergestellten Sonden in Kombination mit der 22qtel-Subtelomersonde.**

Die Signale der rot-markierten Sonden 1. CTD-2367L15, 2. CTD-2536F14, 3. CTD-2522F24, 4. RP11-138C22, 5. RP11-54C2, 6. RP11-22M5 und 7. RP11-659D9 erscheinen in 22q11, die grün markierte Kontrollsonde in 22q13. 8. Die Signale der Sonde RP11-694E12 liegen in 3q27.



## 2.6 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung unter Verwendung der Vysis®-Sonden DiGeorge Region Probe - LSI® TUPLE1 und Vysis® DiGeorge Region Probe - LSI® N25

LSI (locus specific identifier)-Sonden sind Locus-spezifisch und hybridisieren nur ein einziges Mal im Genom. Sie bestehen aus einem markierten DNA-Abschnitt eines spezifischen Gens oder DNA-Locus. Sie sind mit Blocking-DNA versetzt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Vysis® DiGeorge Region Probe - LSI® TUPLE1-Sonde ist ein Gemisch aus der Spectrum Orange-markierten LSI® TUPLE1-Sonde und der Spectrum Green-markierten LSI® ARSA (Arylsulfatase A Gen)-Kontrollsonde, die in 22q13.3 lokalisiert ist (Abb.7). Die Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® N25 Sonde enthält Spectrum Orange-markierte LSI® N25-Sonde und Spectrum Green-markierte LSI® ARSA-Kontrollsonde (Abb.7). Beide Sonden werden mit LSI® Hybridisierungs-Puffer geliefert.



**Abb.7: Schematische Darstellung Region 22q11.2 und Bindungsbereiche der Sonden 22q11.2 LSI N25 und 22q11.2 LSI TUPLE1.**

**A** Genregion 22q11.2 mit den Genen LAN (orange), N25 (grün), CLTCL (gelb) und TUPLE1 (blau). Roter Pfeil: Bindungsregion der Sonde 22q11.2 LSI N25; blauer Pfeil: Bindungsregion der Sonde 22q11.2 LSI TUPLE1. **B** Rot: Bindungsregion der Sonde 22q11.2 LSI N25; schwarz: Bindungsregion der Kontroll-Sonde 22q13 LSI ARSA **C** Blau: Bindungsregionen der Sonde 22q11.2 LSI TUPLE1; schwarz: Bindungsregion der Kontrollsonde 22q13 LSI ARSA.

### Durchführung

1. Ansatz 3xSondenmix: 2 µl LSI<sup>®</sup>-Sonde, 21 µl LSI<sup>®</sup>-Hybridisierungs-Puffer und 7 µl Aqua dest. in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettieren, kurz vortexen und kurz zentrifugieren
2. 10 µl Sondenmix auf das Hybridisierungsareal der Chromosomenpräparate auftragen
3. mit einem Deckglas (24 x 26 mm) blasenfrei abdecken
4. Hybridisierungsareal mit Fixogum versiegeln
5. Objektträger im Vysis<sup>®</sup> HYBrite platzieren
6. Ko-Denaturierung von Sonde und Ziel-DNA für 2 min bei 74 °C
7. Hybridisierung für 12-24 h bei 37 °C

Posthybridisierungswaschungen, DAPI-Färbung und Auftragen der Antifade-Lösung erfolgten wie unter 2.4.1 beschrieben.

### 2.7 Mikroskopische Auswertung

Die Präparate wurden an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss<sup>®</sup> (Axiophot) ausgewertet. Die Sonden-Signale wurden mit einem Fluorescein-Propidiumjodid-Kombinations-Filtersystem sichtbar gemacht. Dieses Filtersystem besteht aus einem Anregungsfilter und einem Emissionsfilter. Die Fluorophoren werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und erscheinen im Fluoreszenzmikroskop in der entsprechenden Farbe. Das Anregungsmaximum der grünen Signale liegt bei 495 nm, das der roten Signale bei 575 nm. Das Emissionsmaximum ist 515 nm für Grün und 600 nm für Rot. Für grüne Signale wurde ein FITC (Fluorescein Isothiocyanate)-Filter und für rote Signale ein TRITC (Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate)-Filter verwendet. Die Kontrollsignale der Vysis<sup>®</sup> DiGeorge Region-Sonden erscheinen grün (22q13) und die spezifischen Signale rot (22q11.2). Die Signale der „BAC-Sonden“ sind je nach Markierung grün (*SpectrumGreen-dUTP*) oder rot (*SpectrumOrange-dUTP*). Die *Aquarius<sup>®</sup> 22qtel Subtelomer Specific Probe* ist grün. Die DNA der Chromosomen und der Zellkerne wurde mit DAPI gegengefärbt. DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA an und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht blau.

Pro „BAC-Sonde“ wurden jeweils 20 Mitosen und 20 Interphasen eines Hybridisierungs-Spots ausgewertet.

### **2.8 Bearbeitung und Dokumentation**

Die Dokumentation der Ergebnisse der Hybridisierung erfolgte durch Aufnahme ausgewählter Metaphasen und Interphasen in 1000-facher Vergrößerung über eine angeschlossene Videokamera. Die Bearbeitung der Aufnahmen am PC erfolgte mit Hilfe des Programms Isis®-FISH Imaging System (MetaSystems). Dabei wurden zur optimalen Darstellung der Hybridisierungssignale Helligkeit und Kontrast angepasst und in Einzelfällen offensichtliche Artefakte entfernt.

### 3. Ergebnisse

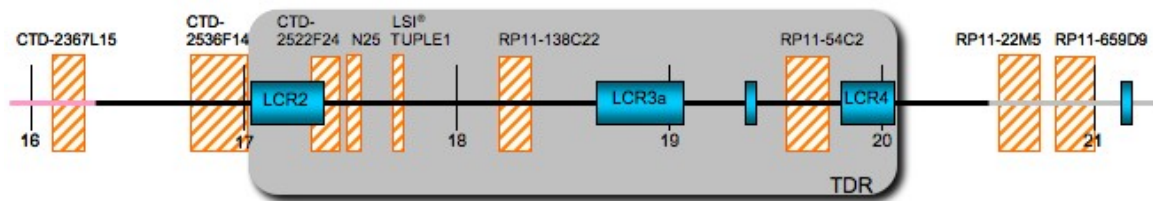
Zum besseren Verständnis sind die Ergebnisse der Arbeit einleitend kurz zusammengefasst:

- In der **Gruppe A** (Patienten mit bereits nachgewiesener Mikrodeletion 22q11.2) konnten mit den in dieser Arbeit verwendeten FISH-Sonden vier unterschiedliche Deletionsgrößen bestimmt werden: eine etwa 2,4 Mb große, eine etwa 2,42 Mb große, eine etwa 1,1 Mb große und eine etwa 2,2 Mb große Deletion (3.2 bis 3.4).
- Bei der Nachuntersuchung der Patienten mit klinischem Verdacht auf ein Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 (**Gruppe B**) konnte keine Deletion nachgewiesen werden (3.5).
- Die Sonde RP11-54C2 eignet sich zur Differenzierung zwischen der 3 Mb und der 1,5 Mb großen Deletion der Mikrodeletion 22q11.2.

Im Folgenden werden die Ergebnisse ausführlich dargestellt.

#### 3.1 Chromosom 22 spezifische BACs

Sieben der hergestellten FISH-Sonden CTD-2367L15, CTD-2536F14, CTD-2522F24, RP11-138C22, RP11-54C2, RP11-22M5 und RP11-659D9 hybridisierten im Sequenzbereich von 22q11.2 (UCSC, 2009). Als Template zur Herstellung der FISH-Sonden dienten für den Chromosomenbereich 22q11 spezifische Klone (Tab.2 in Patienten und Methoden). Die Lokalisation des Hybridisierungsbereichs der verwendeten Sonden erstreckte sich über den genomischen Bereich des Chromosoms 22 von bp 16129906 - bp 20991636. Der spezifische Hybridisierungsbereich der einzelnen Sonden ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt. Die Sonden RP11-138C22 und RP11-54C2 binden innerhalb der TDR (*typical deleted region*) des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 (UCSC, 2009; Abb.8, grau unterlegte Fläche).



**Abb.8: Schematische Darstellung der Hybridisierungsbereiche der verwendeten Sonden im Sequenzbereich von 22q11.2** (etwa bp 16000000 - bp 21000000): schwarze Linie: 22q11.21; graue Linie: 22q11.22; pinkfarbene Linie: proximal beginnender Zentromerabschnitt; grau unterlegte Fläche: TDR des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2; orange-gestreifte Blöcke: Hybridisierungsbereiche der einzelnen Sonden; blaue Blöcke: LCRs;

Die Sonden CTD-2367L15 und CTD-2536F14 liegen proximal, die Sonden RP-11-22M5 und RP-11-659D9 distal der TDR. CTD-2522F24 überspannt den proximalen Bruchpunkt der TDR und ist identisch mit einem Teil des LCR2 (*low copy repeat*) (Abb.8; Pavlicek *et al.*, 2005; Torres-Juan *et al.*, 2007).

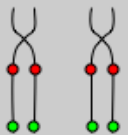

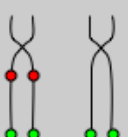

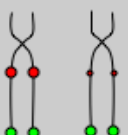

### 3.2 Deletionsgrößenbestimmung von Patienten der Gruppe A

Mittels der FISH-Methode mit sequenzspezifischen Sonden wurden 38 Patienten mit bereits diagnostizierter Mikrodeletion 22q11.2 untersucht (Gruppe A). Bei diesen Patienten bestand aufgrund ihres Phänotyps der Verdacht auf DGS/„CATCH 22“ (Patientenakten). Die Routine-Diagnostik wurde mit der kommerziellen Sonde TUPLE1 durchgeführt, ohne Bestimmung der Größe des deletierten Bereiches. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob unterschiedliche Deletionsgrößen vorliegen. Dies erfolgte mit Hilfe von spezifischen, selbst hergestellten FISH-Sonden (Abb.8 und Tab.2 in Patienten und Methoden). Dafür wurden für jede Sonde die Fluoreszenz-Signale von 20 Mitosen und 20 Interphasen ausgewertet. Die möglichen Signalmuster sind in Abbildung 9 dargestellt.

Für 34 Patienten der Gruppe A lagen eindeutige Fluoreszenz-Signale vor. Die Auswertung ergab vier unterschiedlich große Deletionsbereiche von etwa 2,42; 2,4; 2,2 und 1,1 Mb (Abb.19). In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen zur Größenbestimmung für jeden Patienten dargestellt.

Die Patienten A1 bis A26 wiesen für die Sonden CTD-2367L15, CTD-2536F14, RP11-22M5 und RP11-659D9 2 Hybridisierungssignale auf.

Die Sonde CTD-2522F24 zeigte 1 starkes und 1 kleineres Signal. Für die Sonden N25, TUPLE1, RP11-138C22 und RP11-54C2 konnte jeweils 1 Signal detektiert werden (Tab.4). Die Patienten A27 bis A31 zeigten im Gegensatz zu den oben beschriebenen Signalen für die Sonde RP11-54C2 zwei Hybridisierungssignale (Tab.4). Bei der Auswertung der FISH-Signale für die Patientin A32 wurden für die Sonden CTD-2367L15, CTD-2536F14, RP11-22M5 und RP11-659D9 zwei Signale und für die Sonden CTD-2522F24, N25, TUPLE1, RP11-138C22 und RP11-54C2 ein Signal detektiert (Tab.4). Die beiden Patienten A33 und A34 unterschieden sich in dem Hybridisierungsmuster zu Patientin A32 dadurch, dass sie für die Sonde CTD-2522F24 jeweils 2 Signale aufwiesen (Tab.4). Für die Patienten 35 bis 38 der Gruppe A waren die Hybridisierungssignale nicht eindeutig. Sie wurden daher in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

	Metaphase	Interphase	Ergebnis
1			Keine Deletion
2			Deletion
3			Partielle Deletion

**Abb.9: Schema möglicher Signalmuster der FISH-Sonden.**

Grün: Signale der Kontrollsonde in 22q13; rot: Signale der spezifischen Sonde in 22q11.2.

**1.** Normalbefund: rote und grüne Signale auf beiden Chromosomen 22; je 2 rote und grüne Signale im Interphasekern. **2.** Mikrodeletion 22q11.2: grüne Signale auf beiden Chromosomen 22, rotes Signal nur auf einem Chromosom 22; 2 grüne und 1 rotes Signal im Interphasekern. **3.** Partielle Deletion: grüne Signale auf beiden Chromosomen 22, 1 starkes und 1 kleineres rotes Signal auf den Chromosomen 22; 2 grüne sowie 1 starkes und 1 kleineres Signal im Interphasekern.

(Mitosechromosomen bestehen aus 2 Chromatiden, dementsprechend sind häufig jeweils 2 eng beieinander liegende Signale sichtbar.)

**Tab.4: Hybridisierungssignale der spezifischen FISH-Sonden der einzelnen**

**Patienten der Gruppe A.** Tabellarisch sind für jeden Patienten der Gruppe A die Anzahl der detektierten Fluoreszenzsignale der einzelnen Sonden dargestellt. Keine Deletion: 2 Signale; Deletion: 1 Signal; partielle Deletion: 1½ Signale. Die Hybridisierungssignale der Patienten 35 bis 38 waren nicht eindeutig auswertbar und wurden bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. In der Tabelle sind sie grau dargestellt.

Gruppe A	Blutkultur-Nr.	CTD-2367L15	CTD-2536F14	CTD-2522F24	N25	TUPLE1	RP11-138C22	RP11-54C2	RP11-22M5	RP11-659D9
1.	14397	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
2.	15128	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
3.	15440	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
4.	16061	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
5.	16760	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
6.	18037	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
7.	18202	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
8.	18587	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
9.	18622	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
10.	18628	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
11.	18664	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
12.	18763	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
13.	18977	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
14.	19005	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
15.	19035	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
16.	6/01	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
17.	90/01	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
18.	128/01	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
19.	327/01	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
20.	293/01	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
21.	96/03	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
22.	253/03	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
23.	57/05	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
24.	118/05	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
25.	83/06	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
26.	90/06	2	2	1 ½	1	1	1	1	2	2
27.	15073	2	2	1 ½	1	1	1	2	2	2
28.	18822	2	2	1 ½	1	1	1	2	2	2
29.	18983	2	2	1 ½	1	1	1	2	2	2
30.	19111	2	2	1 ½	1	1	1	2	2	2
31.	19214	2	2	1 ½	1	1	1	2	2	2
32.	15699	2	2	1	1	1	1	1	2	2
33.	15133	2	2	2	1	1	1	1	2	2
34.	294/01	2	2	2	1	1	1	1	2	2
35.	14590	2	2?	2	1	1	1	1?	2	1?
36.	14655	0	0	0	0	1	0	0	0	0
37.	15667	2	0	0	1	1	1	0	0	0
38.	16338	2?	0	1?	0	1	0	1?	0	0

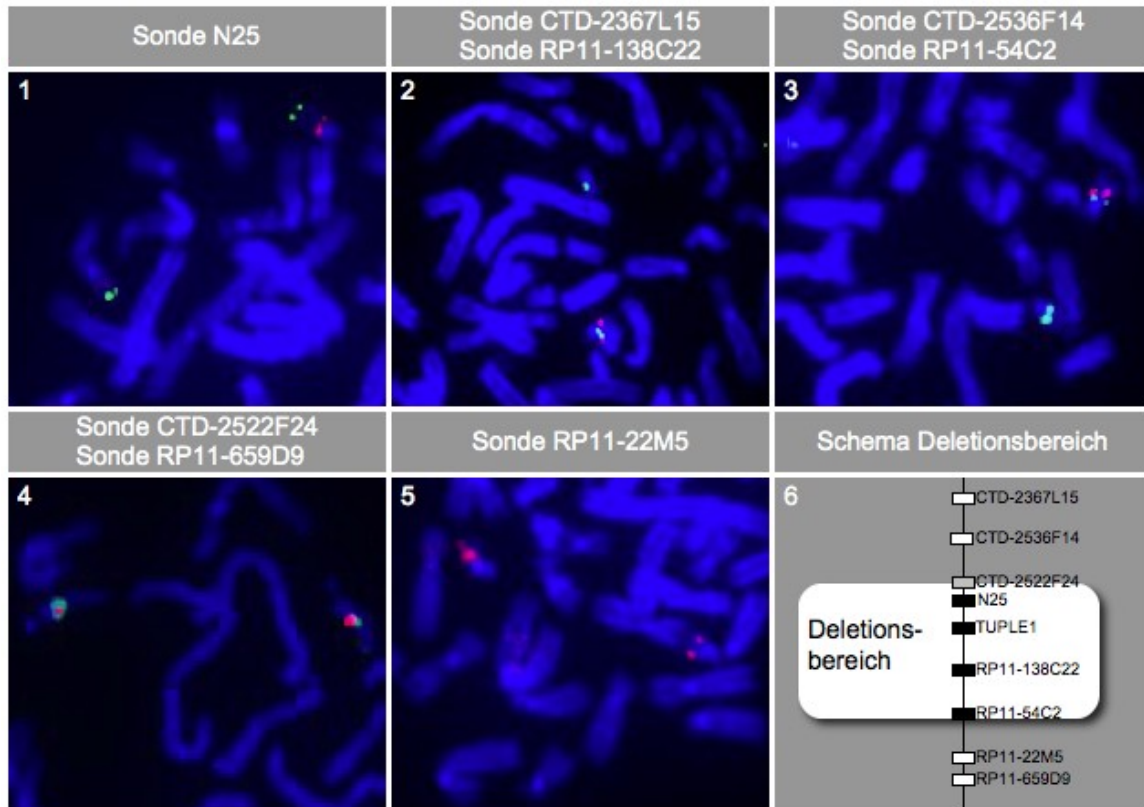
Im Folgenden wird auf die einzelnen Deletionsgruppen mit Fallbeispielen näher eingegangen.

### 3.2.1 Deletionsgröße 2,4 Mb bei Patienten der Gruppe A

Die Patienten 1-26 der Gruppe A zeigten eine übereinstimmende 2,4 Mb große Deletion (Abb.19). Da uns von sechs Patienten keine klinischen Angaben vorlagen, werden diese in der folgenden Auswertung der klinischen Symptome nicht berücksichtigt, so dass diese Gruppe insgesamt 20 Fälle umfasst. Ein kongenitaler Herzfehler ist bei zwölf Patienten (60 %) diagnostiziert worden. Faziale Dysmorphien fielen bei 15 Patienten (75 %) auf. Eine velopharyngeale Insuffizienz mit oder ohne Lippen-/Kieferspalte trat in fünf Fällen (25 %) auf. Bei einem Patient wurde eine Hypokalzämie festgestellt. Drei Patienten (15 %) zeigten eine Immuninsuffizienz, rezidivierende Infektionen oder eine Leukozytopenie. In sechs Fällen (30 %) traten mentale- und/oder Entwicklungsretardierung bzw. Verhaltensauffälligkeiten auf. Andere Symptome oder weitere Fehlbildungen sind bei acht Patienten (40 %) beschrieben (Abb.20.1).

Bei diesen Patienten zeigten die Sonden CTD-2367L15 (Abb.10.2 grün), CTD-2536F14 (Abb.10.3 grün), RP11-22M5 (Abb.10.5 rot) und RP11-659D9 (Abb.10.4 rot) jeweils 2 Signale. Die Sonde CTD-2522F24 zeigte ein starkes und ein deutlich kleineres Signal (Abb.10.4 grün). Diese Sonde hybridisiert am proximalen Ende der TDR (Shaikh *et al.*, 2000). Der Bruchpunkt befand sich im Bereich des kleineren Signals. Demnach lag eine partielle Deletion vor (Abb.10.4 grün). Die Hybridisierung der Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® N25 (Abb.10.1 rot) und der Sonden RP11-138C22 (Abb.10.2 rot) und RP11-54C2 (Abb.10.3 rot) zeigten jeweils ein distinktes Signal. Die Patienten wiesen einen Deletionsbereich von etwa bp 17380112 - bp 19730795 auf (Abb.19, blauer Pfeil). Hier sind etwa 50 Gene lokalisiert (UCSC, 2009, Tab.5 im Anhang).





**Abb.10: Hybridisierungssignale der Gruppe A: Deletionsgröße 2,4 Mb.**

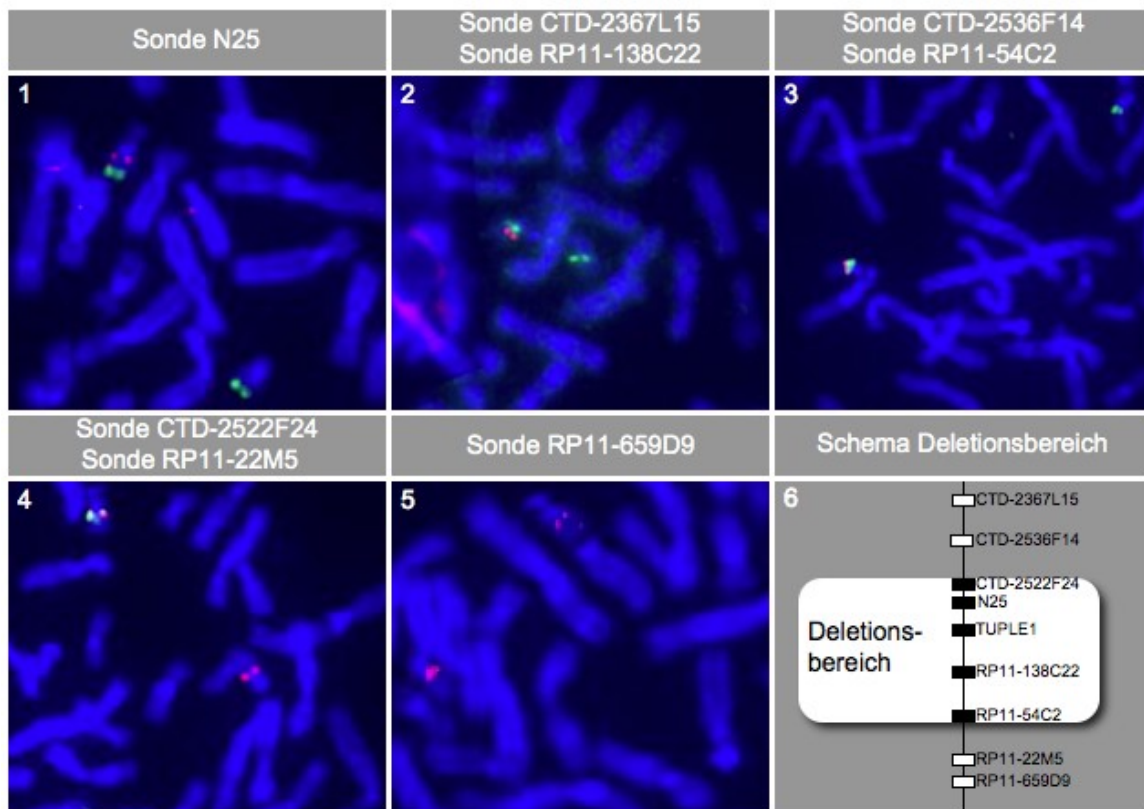
1. Deletion für die Sonde Vysis® DiGeorge Region Probe LSI® N25 (1 spezifisches rotes Signal) und Kontrollsonde 22q13.3 (grün). 2. Keine Deletion für CTD-2367L15 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-138C22 (1 rotes Signal). 3. Keine Deletion für CTD-2536F14 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-54C2 (1 rotes Signal). 4. Partielle Deletion für CTD-2522F24 (1 starkes und 1 kleineres grünes Signal). Keine Deletion für RP11-659D9 (2 rote Signale). 5. Keine Deletion für RP11-22M5 (2 rote Signale). 6. Weiß unterlegte Fläche: Deletionsbereich; weiß: nicht deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; schwarz: deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; grau: partielle Deletion für den Hybridisierungsbereich von CTD-2522F24.

### 3.2.2 Deletionsgröße 2,42 Mb bei Patienten der Gruppe A

Bei Patientin A32 wurde eine größere Deletion von etwa 2,42 Mb festgestellt (Abb.19, schwarzer Pfeil). Die Patientin hatte einen kongenitalen Herzfehler, faciale Dysmorphien und eine Hypokalzämie (Abb.20.4). Bei Geburt bestanden ein Ventrikelseptumdefekt, ein rechtsseitiger Aortenbogen und eine Pulmonalarterienatresie. Es fielen folgende Dysmorphiezeichen auf (Patientenakten): tiefer Haaransatz, kurzer Hals mit auffälliger Hautfalte, tiefsitzende, leicht dysplastische Ohren, relativ schlanke Finger, beidseits tief ansetzende Daumen, relativ große Großzehen beidseits und eine Schwellung der Mammae, die rechts stärker als links ausgeprägt war. Des Weiteren lag eine Hypokalzämie vor. Der konotrunkale Herzfehler in Kombination mit den beschriebenen Minor-Anomalien und

der Hypokalzämie führte zu dem Verdacht auf die Mikrodeletion 22q11.2 (Patientenakten). In der zytogenetischen Untersuchung zeigte sich ein numerisch und strukturell unauffälliger weiblicher Karyotyp. Die Routine-FISH-Untersuchung hatte eine Mikrodeletion 22q11.2 ergeben (Patientenakten).

Bei der Untersuchung der Deletionsgröße der Patientin zeigte sich, dass die Sonden CTD-2367L15 (Abb.11.2 grün), CTD-2536F14 (Abb.11.3 grün), RP11-22M5 (Abb.11.4 rot) und RP11-659D9 (Abb.11.5 rot) Signale auf beiden Chromosomen 22 zeigen. Für die Sonden CTD-2522F24 (Abb.11.4 grün), Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® N25 (Abb.11.1 rot), Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® TUPLE1 (Patientenakten), Sonde-RP11-138C22 (Abb.11.2 rot) und Sonde-RP11-54C2 (Abb.11.3 rot) wurde jeweils 1 Signal festgestellt. Der Deletionsbereich der Patientin umfasst den chromosomalen Bereich von etwa bp 17313884 - bp 19730795. Hier sind etwa 50 Gene beschrieben (UCSC, 2009, Tab.5 im Anhang).



**Abb.11: Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patientin 32.**

1. Deletion für die Sonde Vysis® DiGeorge Region Probe LSI® N25 (1 spezifisches rotes Signal) und Kontrollsonde 22q13.3 (grün). 2. Keine Deletion für CTD-2367L15 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-138C22 (1 rotes Signal). 3. Keine Deletion für CTD-2536F14 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-54C2 (1 rotes Signal). 4. Deletion für CTD-2522F24 (1 grünes Signal). Keine Deletion für RP11-22M5 (2 rote Signale). 5. Keine Deletion für RP11-659D9 (2 rote Signale). 6. Weiß unterlegte Fläche: Deletionsbereich; weiß: nicht deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; schwarz: deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden.

### 3.2.3 Deletionsgröße 1,1 Mb bei Patienten der Gruppe A

Fünf Patienten der Gruppe A (A27-A31) hatten eine 1,1 Mb große Deletion, die als proximale Deletion bezeichnet wird (Abb.19, roter Pfeil).

Die Sonden N25, TUPLE1 und RP11-138C22 zeigten nur ein spezifisches Signal, entsprechend einer Deletion. CTD-2522F24 zeigte dagegen 1 starkes und 1 kleineres Signal, was einer partiellen Deletion entspricht. Der Bereich dieser Deletion reichte demnach von bp 17380112 - bp 18435258 (Abb.19, roter Pfeil) und enthält etwa 20 Gene (UCSC, 2009, Tab.5 im Anhang). Für die Sonden CTD-2367L15, CTD-2536F14, RP11-54C2, RP11-22M5 und RP11-659D9 zeigten sich jeweils 2 distinkte Hybridisierungssignale (Abb.12, Abb.13, Abb.14, Abb.15 und Abb.16).

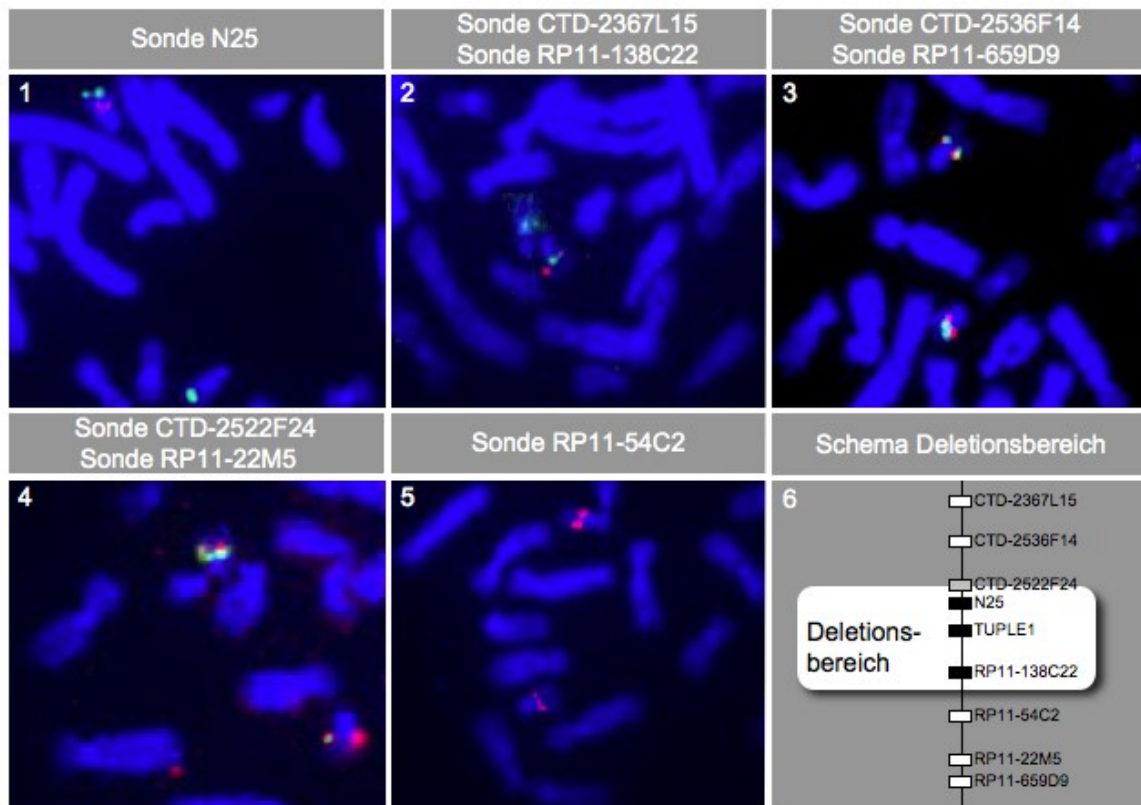
Vier der fünf Patienten (80 %) mit einer 1,1 Mb großen Deletion wiesen einen kongenitalen Herzfehler auf. Faziale Dysmorphien sind bei drei Patienten (60 %) beschrieben (Patientenakten). Palatale Fehlbildungen oder eine Hypokalzämie lagen bei keinem Patienten vor. In 2 Fällen (40 %) wurde eine Immuninsuffizienz festgestellt. Eine Patientin (20 %) wies eine Thymushypoplasie oder Thymusaplasie auf. Eine Entwicklungsretardierung lag in einem Fall (20 %) vor. Weitere Fehlbildungen wurden bei einer Patientin (20 %) beschrieben (Abb.20.2). Im Folgenden werden die klinischen Symptome der Patienten 27 bis 31 näher dargestellt.

#### 3.2.3.1 Patientin 27 der Gruppe A

Nach den Patientenakten zeigte die Patientin im Alter von 3 Monaten folgende faziale Dysmorphien: tief angesetzte, nach hinten rotierte Ohren bei beidseitiger Mikrotie, stecknadelkopfgroßes preauriculäres Anhängsel links, antimongoloide Lidachsenstellung, Hypertelorismus, faziale Schwäche links, im Sinne eines tiefer hängenden linken Mundwinkels, Mikrognathie und kurzer Hals. Seit sie 4 ½ Jahre alt ist, hat die Patientin zur Korrektur einer Hyperopie eine Brille mit einer Stärke von + 4 Dioptrien getragen. Sie hatte einen Epikanthus, einen Hypertelorismus, kleine dysmorphe, tiefsitzende Ohren, eine leichte Innenohrschwerhörigkeit, einen breiten Schädel und einen breiten, kurzen Nacken. Die rechte Schulter stand tiefer. Beide Schultern waren abfallend. Der rechte Arm konnte von der Patientin nicht aktiv über

die Horizontale gehoben werden. Es lag eine erhöhte Infektanfälligkeit vor. Das Mädchen war in logopädischer Behandlung und besuchte eine normale Schule mit integrierter Sonderpädagogik. Die zytogenetische Untersuchung ergab einen numerisch und strukturell unauffälligen weiblichen Karyotyp. Mittels der FISH-Hybridisierung unter Verwendung der Standardsonden war eine Mikrodeletion 22q11.2 festgestellt worden. Weiterführende immunologische Untersuchungen zeigten eine normale T-Zellfunktion bei gestörter Granulozytenfunktion (Patientenakten).

Die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung sind in Abbildung 12 dargestellt.



**Abb.12: Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patientin 27.**

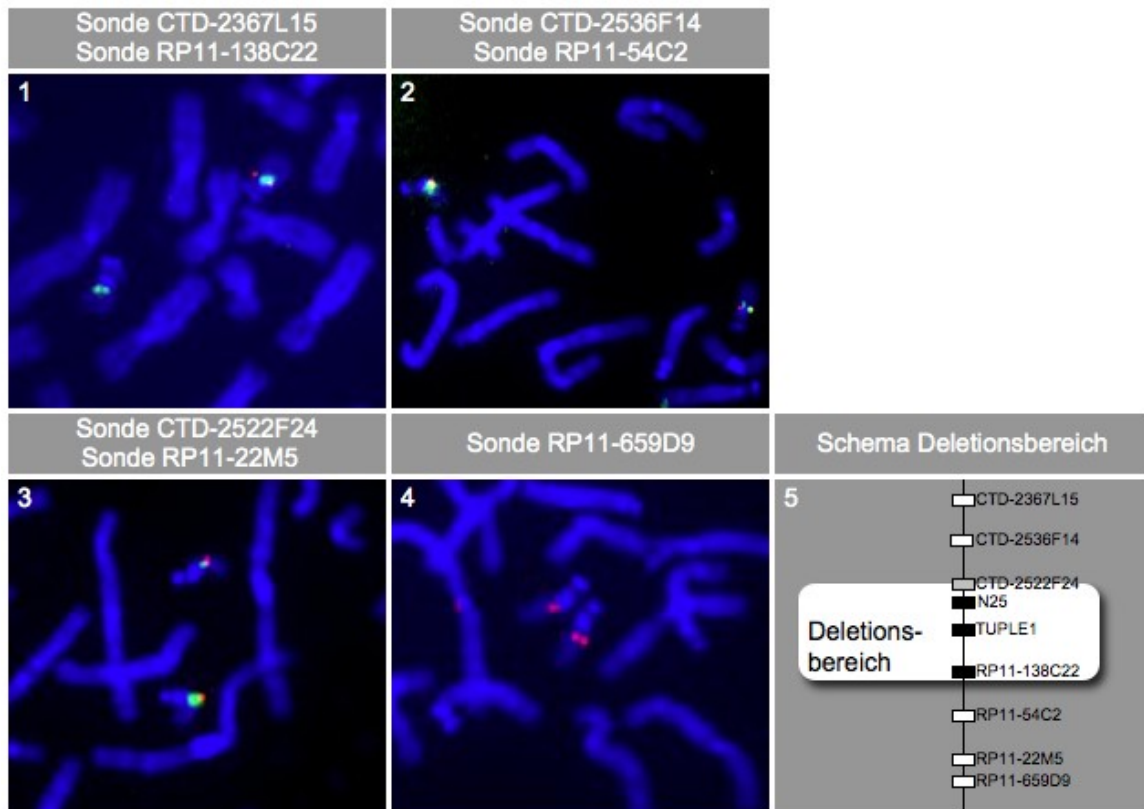
1. Deletion für die Sonde Vysis- DiGeorge Region Probe LSI- N25 (1 spezifisches rotes Signal) und Kontrollsonde 22q13.3 (grün). 2. Keine Deletion für CTD-2367L15 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-138C22 (1 rotes Signal). 3. Keine Deletion für CTD-2536F14 (2 grüne Signale). Keine Deletion für RP11-659D9 (2 rote Signale). 4. Partielle Deletion für CTD-2522F24 (1 starkes und 1 kleineres grünes Signal). Keine Deletion für RP11-22M5 (2 rote Signale). 5. Keine Deletion für RP11-54C2 (2 rote Signale). 6. Weiß unterlegte Fläche: Deletionsbereich; weiß: nicht deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; schwarz: deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; grau: partielle Deletion für den Hybridisierungsbereich von CTD-2522F24.

### 3.2.3.2 Patientin 28 der Gruppe A

Die Patientin wurde in der 28+3 Schwangerschaftswoche per Sectio wegen vaginaler Blutungen bei Placenta praevia geboren. Das Geburtsgewicht betrug 1350 g. Der vorliegende Herzfehler umfasste einen unterbrochenen Aortenbogen, einen Ventrikelseptumdefekt und eine Subaortenstenose. Zum Schutz der Pulmonalgefäße vor einer erhöhten Durchblutung wurde eine Drosselung des Pulmonalarterienhauptstammes (PA-Banding) durchgeführt (Patientenakten). Ferner wurde der Ductus arteriosus durch Gabe von Minprog<sup>®</sup> offen gehalten. Die Patientin hatte ein Atemnotsyndrom III<sup>o</sup>, das die viermalige Gabe von Surfactant und die Beatmung erforderlich machte. Es lag zudem eine Hyperbilirubinämie vor. Eine Thymusaplasie oder -hypoplasie wurde diagnostiziert. An Minor-Anomalien wurden ein längliches Gesicht, eine abgeflachte und verbreiterte Helix beider Ohren, schmale lange Finger und grazile Zehen beschrieben. Die äußeren primären Geschlechtsorgane waren ambivalent, soweit bei der vorliegenden Frühgeburtlichkeit beurteilbar.

Die zytogenetische Diagnostik ergab einen numerisch und strukturell unauffälligen weiblichen Karyotyp. In Abbildung 13 sind die Hybridisierungsergebnisse der einzelnen Sonden dargestellt.



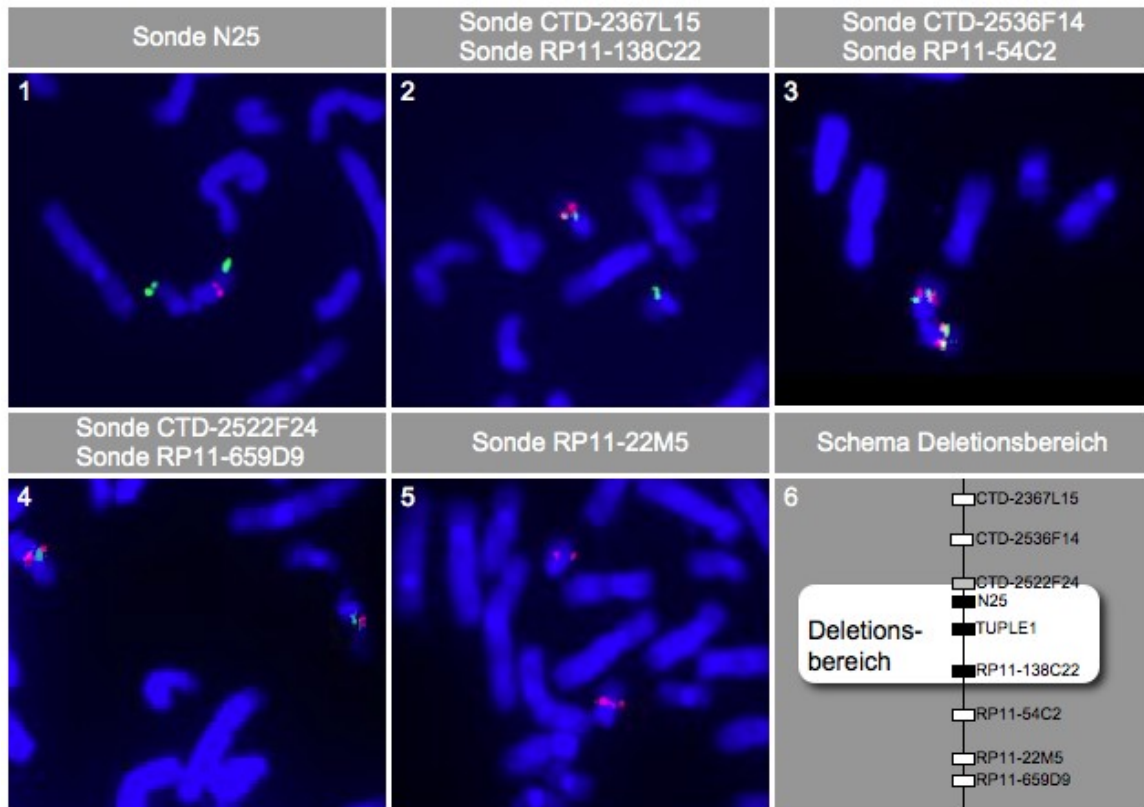


**Abb.13: Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patientin 28.**

1. Keine Deletion für CTD-2367L15 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-138C22 (1 rotes Signal).  
 2. Keine Deletion für CTD-2536F14 (2 grüne Signale). Keine Deletion für RP11-54C2 (2 rote Signale).  
 3. Partielle Deletion für CTD-2522F24 (1 starkes und 1 kleineres grünes Signal). Keine Deletion für RP11-22M5 (2 rote Signale). 4. Keine Deletion für RP11-659D9 (2 rote Signale). 5. Weiß unterlegte Fläche: Deletionsbereich; weiß: nicht deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; schwarz: deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; grau: partielle Deletion für den Hybridisierungsbereich von CTD-2522F24.

### 3.2.3.3 Patient 29 der Gruppe A

Klinisch wurde bei dem Patienten ein persistierender Ductus arteriosus und ein rechtsseitiger Aortenbogen diagnostiziert. Die zytogenetische Untersuchung ergab einen numerisch und strukturell unauffälligen männlichen Karyotyp (Patientenakten). Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit den Sonden CTD-2367L15, CTD-2536F14, CTD-2522F24, RP11-138C22, RP11-54C2, RP11-22M5, RP11-659D9 und Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® N25.

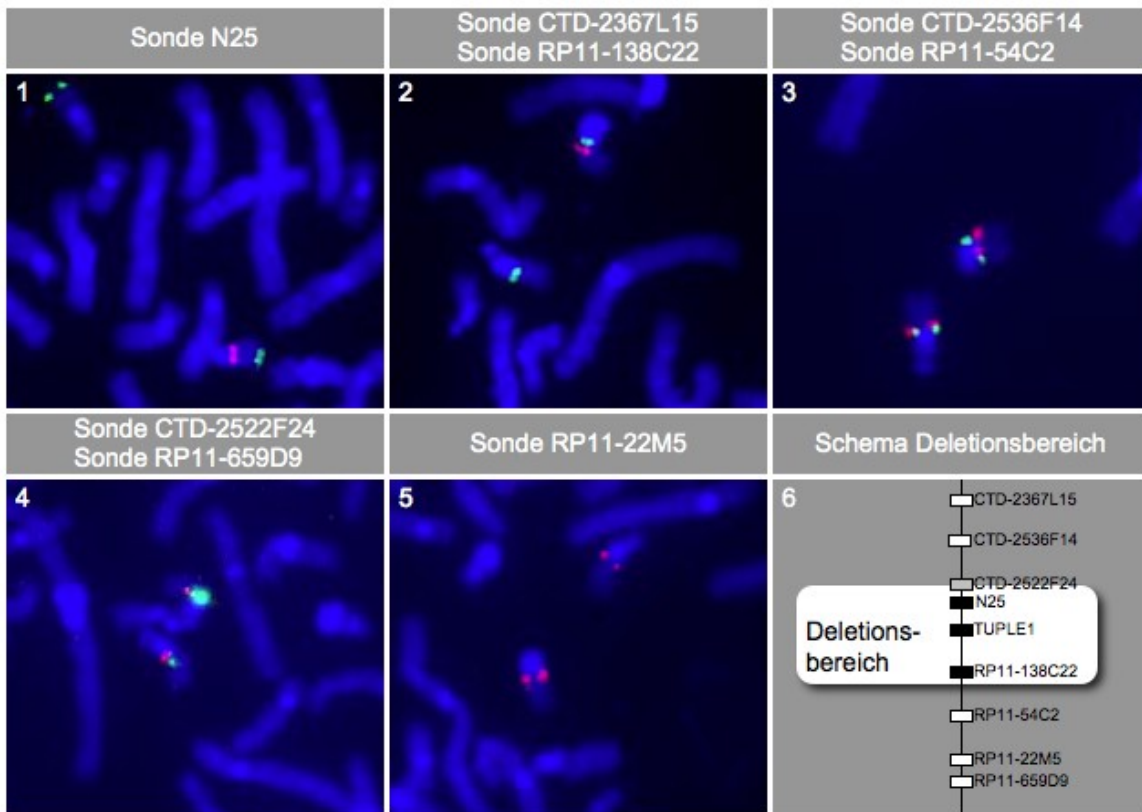


**Abb.14: Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patient 29.**

1. Deletion für die Sonde Vysis® DiGeorge Region Probe LSI® N25 (1 spezifisches rotes Signal) und Kontrollsonde 22q13.3 (grün). 2. Keine Deletion für CTD-2367L15 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-138C22 (1 rotes Signal). 3. Keine Deletion für CTD-2536F14 (2 grüne Signale). Keine Deletion für RP11-54C2 (2 rote Signale). 4. Partielle Deletion für CTD-2522F24 (1 starkes und 1 kleineres grünes Signal). Keine Deletion für RP11-659D9 (2 rote Signale). 5. Keine Deletion für RP11-22M5 (2 rote Signale). 6. Weiß unterlegte Fläche: Deletionsbereich; weiß: nicht deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; schwarz: deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; grau: partielle Deletion für den Hybridisierungsbereich von CTD-2522F24.

### 3.2.3.4 Patient 30 der Gruppe A

Bei dem Neugeborenen lag ein Vitium cordis und der Verdacht auf einen Immundefekt vor (Patientenakten). Die zytogenetische Untersuchung ergab einen numerisch und strukturell unauffälligen männlichen Karyotyp. Abbildung 15 zeigt die Hybridisierungsergebnisse der verwendeten Sonden.



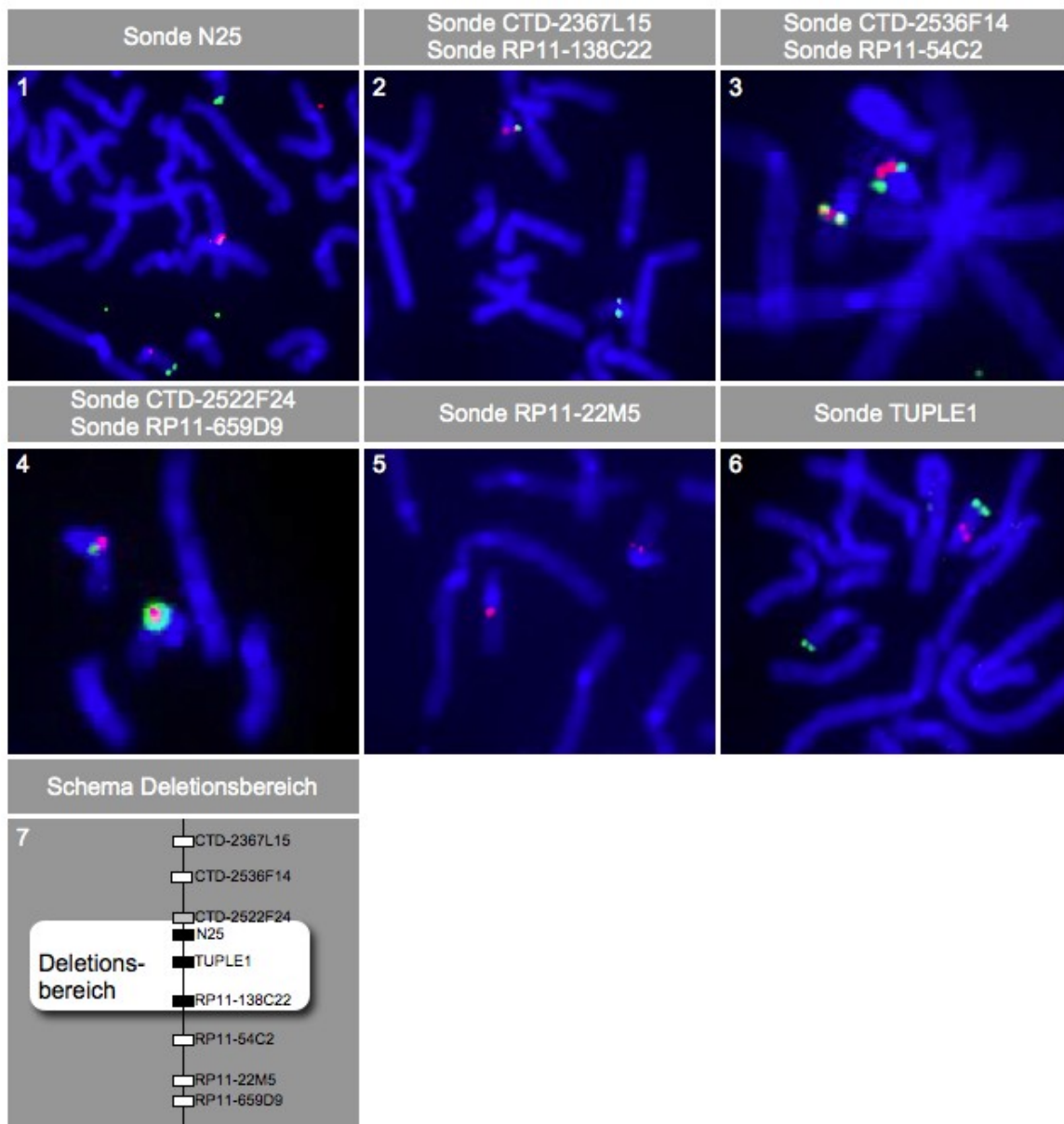
**Abb.15: Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patient 30.**

1. Deletion für die Sonde Vysis® DiGeorge Region Probe LSI® N25 (1 spezifisches rotes Signal) und Kontrollsonde 22q13.3 (grün). 2. Keine Deletion für CTD-2367L15 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-138C22 (1 rotes Signal). 3. Keine Deletion für CTD-2536F14 (2 grüne Signale). Keine Deletion für RP11-54C2 (2 rote Signale). 4. Partielle Deletion für CTD-2522F24 (1 starkes und 1 kleineres grünes Signal). Keine Deletion für RP11-659D9 (2 rote Signale). 5. Keine Deletion für RP11-22M5 (2 rote Signale). 6. Weiß unterlegte Fläche: Deletionsbereich; weiß: nicht deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; schwarz: deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; grau: partielle Deletion für den Hybridisierungsbereich von CTD-2522F24.

### 3.2.3.5 Patientin 31 der Gruppe A

Klinisch zeigt die Patientin einen Ventrikelseptumdefekt, tiefsitzende Ohren, eine globale Entwicklungsverzögerung und weitere mit dem Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 vereinbare Dysmorphiezeichen. Letztere sind in der Patientenakte nicht näher beschrieben. Die zytogenetische Untersuchung ergab einen numerisch und strukturell unauffälligen weiblichen Karyotyp (Patientenakten). Eine etwa 1,1 Mb große Mikrodeletion 22q11.2 wurde durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit den Sonden CTD-2367L15, CTD-2536F14, CTD-2522F24, RP11-138C22, RP11-54C2, RP11-22M5, RP11-659D9, Vysis® DiGeorge Region Probe - LSI® TUPLE1 und Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® N25 bestimmt (Abb.16).





**Abb.16: Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patientin 31.**

1. Deletion für die Sonde Vysis® DiGeorge Region Probe LSI® N25 (1 spezifisches rotes Signal) und Kontrollsonde 22q13.3 (grün). 2. Keine Deletion für CTD-2367L15 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-138C22 (1 rotes Signal). 3. Keine Deletion für CTD-2536F14 (2 grüne Signale). Keine Deletion für RP11-54C2 (2 rote Signale). 4. Partielle Deletion für CTD-2522F24 (1 starkes und 1 kleineres grünes Signal). Keine Deletion für RP11-659D9 (2 rote Signale). 5. Keine Deletion für RP11-22M5 (2 rote Signale). 6. Deletion für Vysis® DiGeorge Region Probe - LSI® TUPLE1 (1 spezifisches rotes Signal). 7. Weiß unterlegte Fläche: Deletionsbereich; weiß: nicht deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; schwarz: deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; grau: partielle Deletion für den Hybridisierungsbereich von CTD-2522F24.

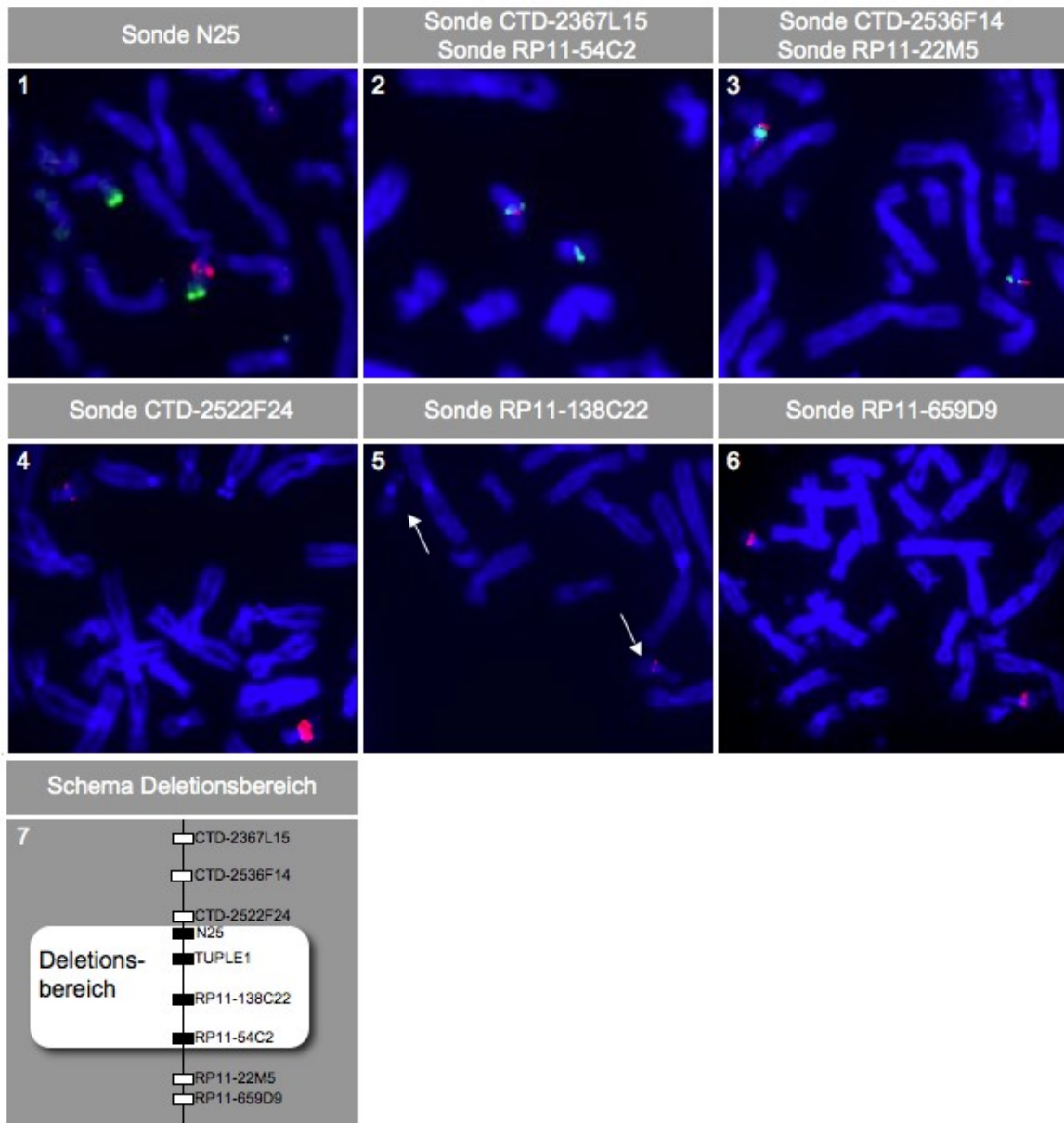
### 3.2.4 Deletionsgröße 2,2 Mb bei Patienten der Gruppe A

Die Patienten A33 und A34 wiesen eine etwa 2,2 Mb große Mikrodeletion 22q11.2 auf. Im Vergleich zu der etwa 2,4 Mb großen Deletion der Patienten A1-A26 lag das proximale Ende der Deletion weiter distal (Abb.19, grüner Pfeil). Der Deletionsbereich reichte von bp 17484474 - bp 19730795.

Beide Patienten hatten keinen kongenitalen Herzfehler, keine velopharyngeale Insuffizienz, keine Immuninsuffizienz und keine mentale- oder Entwicklungsretardierung (Patientenakten). Bei Patientin A33 wurden Hypokalzämie und Tetanien diagnostiziert. Patient A34 fiel durch faziale Dysmorphien, Thymushypoplasie und Leistenbruch auf (Abb.20.3).

Die zytogenetische Untersuchung ergab bei beiden einen numerisch und strukturell unauffälligen Karyotyp (Patientenakten).

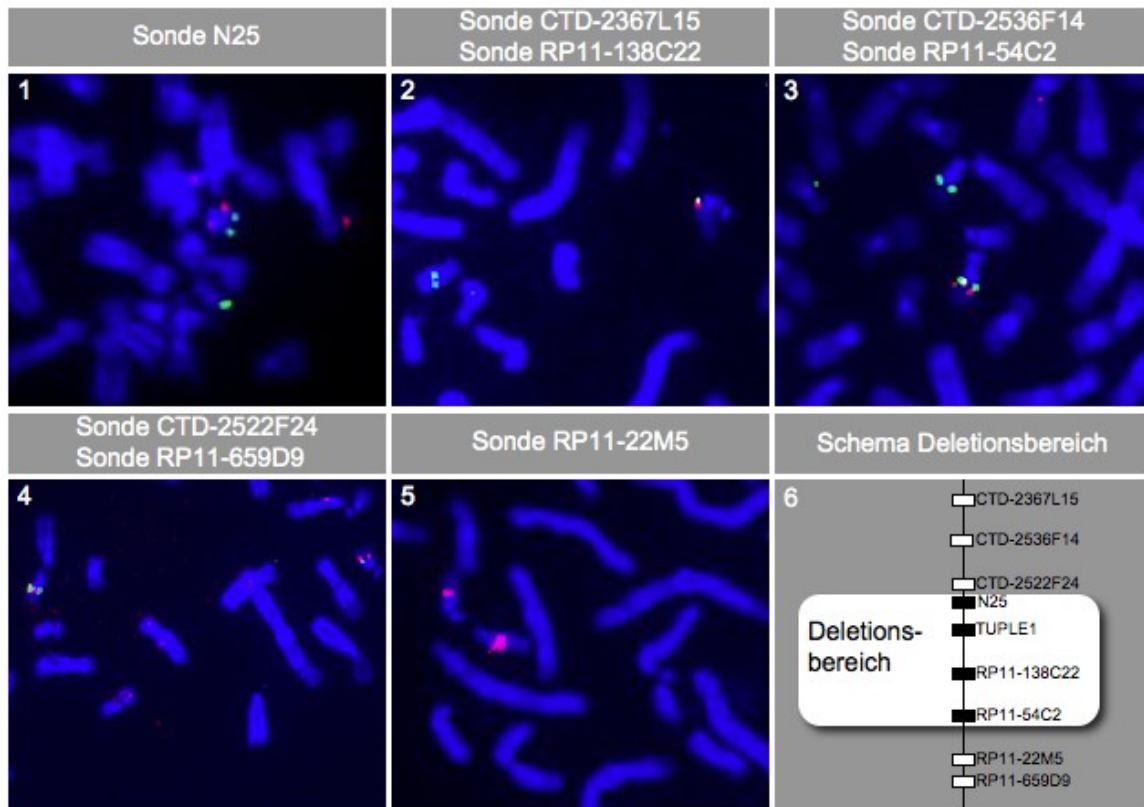
Patientin 33 war ein knapp 4 Monate alter, eutropher Säugling in gutem Allgemeinzustand. Sie fiel durch faziale Dysmorphien auf. Beschrieben wurden: Mikrogenie, „Karpfenmund“ mit schmalen Lippenrot, kleine, gebogene Nase mit breiter Nasenwurzel und kleine runde Ohren (Patientenakten). Ferner wurde ein Leistenbruch diagnostiziert. Die kardiologische Abklärung ergab reine Herztöne, keine Herzgeräusche, beidseits gut tastbare Femoralispulse und unauffällige EKG- und Echo-Befunde. Der Thymus war ultrasonographisch nicht darstellbar. Eine Hepatosplenomegalie lag nicht vor (Patientenakten). Die Untersuchung der Patientin 33 mit den Sonden N25 (Abb.17.1 rot), TUPLE1, RP11-138C22 (Abb.17.5 rot) und RP11-54C2 (Abb.17.2 rot) zeigte, dass der deletierte Bereich von etwa bp 17484474 - bp 18435258 reicht. Die Sonden CTD-2367L15 (Abb.17.2 grün), CTD-2522F24 (Abb.17.4 rot), CTD-2536F14 (Abb.17.3 grün), RP11-22M5 (Abb.17.3 rot) und RP11-659D9 (Abb.17.6 rot) zeigten jeweils 2 distinkte Hybridisierungssignale.



**Abb.17: Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patientin 33.**

1. Deletion für die Sonde Vysis® DiGeorge Region Probe LSI® N25 (1 spezifisches rotes Signal) und Kontrollsonde 22q13.3 (grün). 2. Keine Deletion für CTD-2367L15 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-54C2 (1 rotes Signal). 3. Keine Deletion für CTD-2536F14 (2 grüne Signale). Keine Deletion für RP11-22M5 (2 rote Signale). 4. Keine Deletion für CTD-2522F24 (2 rote Signale). 5. Deletion für RP11-138C22 (1 rotes Signal); Pfeile: Chromosomen 22. 6. Keine Deletion für RP11-659D9 (2 rote Signale). 7. Weiß unterlegte Fläche: Deletionsbereich; weiß: nicht deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; schwarz: deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden.

Patient 34 zeigte dasselbe Hybridisierungsmuster wie Patientin 33 (Abb.18). In dem bei Patientin 33 und Patient 34 deletierten Bereich sind etwa 50 Gene lokalisiert (UCSC, 2009, Tab.5 im Anhang).



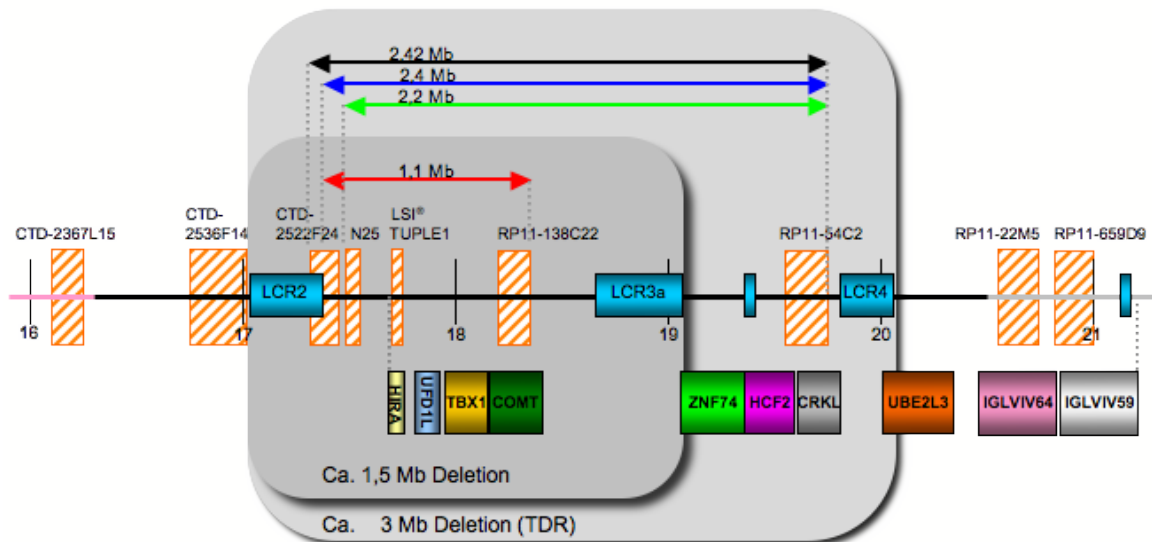
**Abb.18: Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patient 34.**

1. Deletion für die Sonde Vysis® DiGeorge Region Probe LSI-N25 (1 spezifisches rotes Signal) und Kontrollsonde 22q13.3 (grün). 2. Keine Deletion für CTD-2367L15 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-138C22 (1 rotes Signal). 3. Keine Deletion für CTD-2536F14 (2 grüne Signale). Deletion für RP11-54C2 (1 rotes Signal). 4. Keine Deletion für CTD-2522F24 (2 grüne Signale). Keine Deletion für RP11-659D9 (2 rote Signale). 5. Keine Deletion für RP11-22M5 (2 rote Signale). 6. Weiß unterlegte Fläche: Deletionsbereich; weiß: nicht deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden; schwarz: deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden.

### 3.3 Deletionsgrößen der Patienten der Gruppe A

Abschließend sind die für die Patientengruppe A bestimmten vier Deletionsgrößen in Abbildung 19 schematisch dargestellt. Die Patienten A27 bis A31 weisen eine mindestens 1,1 Mb große Deletion auf (Abb.19, roter Pfeil). Der Deletionsbereich umfasst unter anderem die Gene HIRA, UFD1L, TBX1 und COMT (Abb.19; Tab.5 im Anhang).

Eine 2,2 Mb große Deletion wurde bei den Patienten A33 und A34 festgestellt. Die Patienten A1 bis A26 hatten eine etwa 2,4 Mb große (Abb.19, blauer Pfeil) und die Patientin A32 eine etwa 2,42 Mb große Deletion (Abb.19, schwarzer Pfeil). Diese Deletionen überschneiden sich größtenteils mit der 2,2 Mb großen Deletion.



**Abb.19: Schematische Darstellung der typischen 3 Mb und der selteneren 1,5 Mb Deletion in Bezug auf die für die Patientengruppe A bestimmten Deletionsgrößen** (etwa bp 16000000 – bp 21000000): schwarze Linie: 22q11.21; graue Linie: 22q11.22; pinkfarbene Linie: proximal beginnender Zentromerabschnitt; hellgrau unterlegte Fläche: 3 Mb große Deletion; dunkelgrau unterlegte Fläche: 1,5 Mb große Deletion; orange-gestreifte Blöcke: Hybridisierungsbereiche der einzelnen Sonden; blaue Blöcke: LCRs; schwarzer Pfeil: mindestens 2,42 Mb große Deletion (Patientin A32); blauer Pfeil: 2,4 Mb-Deletion (Patienten A1 bis A26); grüner Pfeil: mindestens 2,2 Mb große Deletion (Patienten A33 und A34); roter Pfeil: etwa 1,1 Mb-Deletion (Patienten A27 bis A31). Farbige Blöcke parallel zu 22q11.2: in diesem Bereich lokalisierte Gene: *HIRA* (hellgelb), *UFD1L* (hellblau), *TBX1* (gelb), *COMT* (dunkelgrün), *ZNF74* (grün), *HCF2* (violett), *CRKL* (dunkelgrau), *UBE2L3* (braun), *IGLVIV64* (rosa) und *IGLVIV59* (hellgrau).

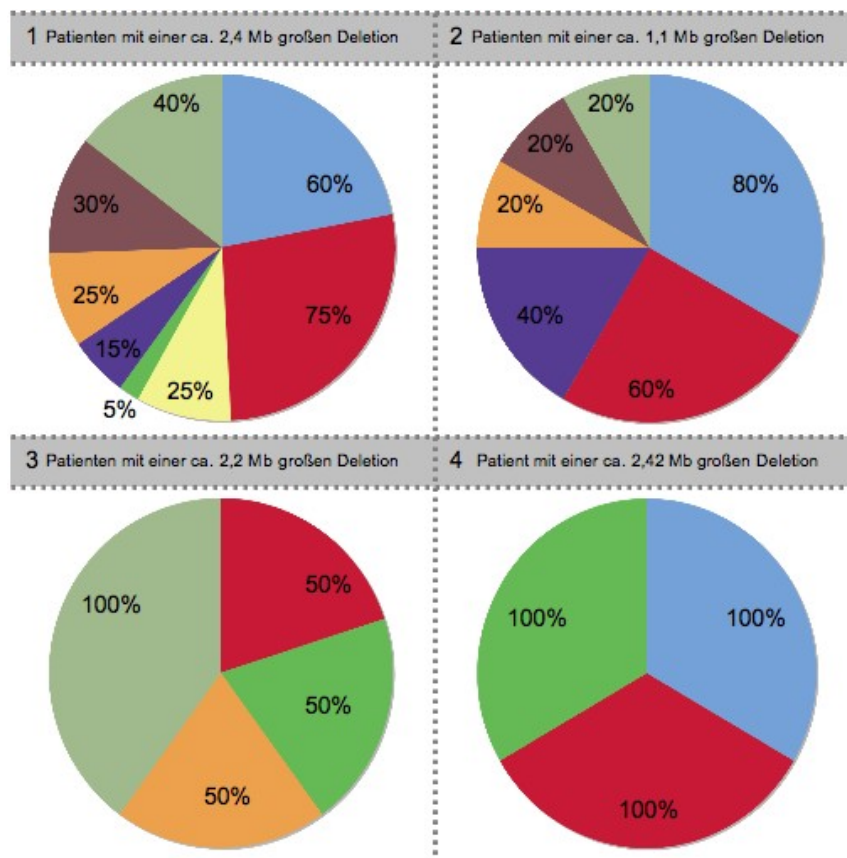
Neben den in der 1,1 Mb großen Deletion betroffenen Gene *HIRA*, *UFD1L*, *TBX1* und *COMT* waren bei der 2,2-, 2,4- und 2,42 Mb großen Deletionen unter anderem die Gene *ZNF74*, *HCF2* und *CRKL* deletiert (Abb.19; Tab.5 im Anhang).

### 3.4 Klinische Symptome der Patienten der Gruppe A

In der Abbildung 20 wurden die klinischen Symptome bei verschiedenen Deletionsgrößen der Patienten der Gruppe A dargestellt. Die Patienten A1 bis A26 (2,4 Mb großen Deletion) hatten in 75 % faciale Dysmorphien, in 60 % kongenitale Herzfehler, in 30 % mentale Retardierung, Entwicklungsretardierung oder Verhaltensauffälligkeiten, in 25 % velopharyngeale Insuffizienz oder Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, in 25 % Thymushypoplasie oder Thymusaplasie, in 15 % Immuninsuffizienz oder rezidivierende Infekte, in 5 % Hypokalzämie und in 40 % weitere Fehlbildungen oder Symptome (Abb.20.1; siehe Patientenakten).



Bei den Patienten A27 bis A31 (1,1 Mb große Deletion) wurden in 80 % kongenitale Herzfehler, in 60 % faziale Dysmorphien, in 40 % Immunsuffizienz oder rezidivierende Infekte, in 20 % mentale Retardierung, Entwicklungsretardierung oder Verhaltensauffälligkeiten, in 20 % Thymushypoplasie oder Thymusaplasie und in 20 % weitere Fehlbildungen oder Symptome beschrieben (Abb.20.2; siehe Patientenakten). Bei den Patienten A33 und A34 wurde eine 2,2 Mb große Deletion nachgewiesen (Abb.20.3; siehe Patientenakten). Patientin A33 hatte eine Hypokalzämie und Tetanien. Bei Patient A34 wurden faziale Dysmorphien, eine Thymushypoplasie und ein Leistenbruch diagnostiziert. Die Patientin A32 hatte eine etwa 2,42 Mb große Deletion und fiel klinisch durch einen kongenitalen Herzfehler, faziale Dysmorphien und eine Hypokalzämie auf (Patientenakten).



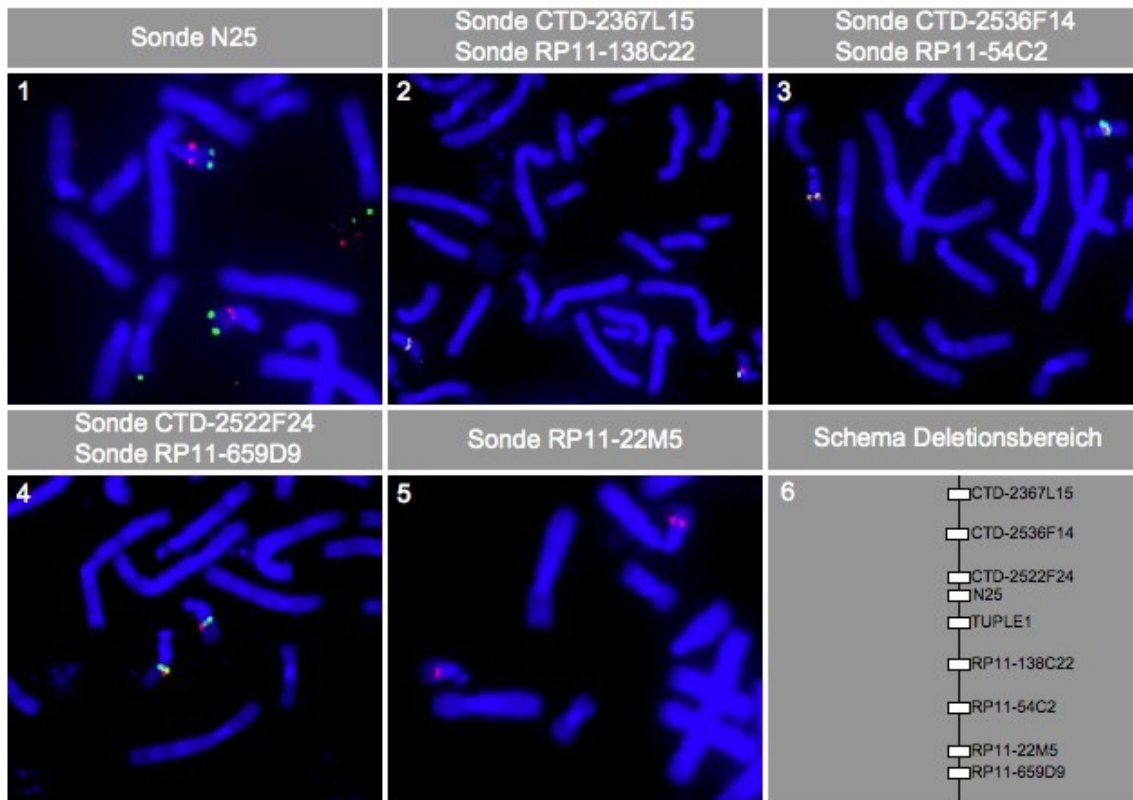
**Abb.20: Deletionsgrößen und klinische Symptome der Gruppe A.** Die Abbildung zeigt die in der Arbeit bestimmten Deletionsgrößen der Gruppe A und die klinischen Symptome (Patientenakten) (blau: kongenitale Herzfehler, rot: faziale Dysmorphien, gelb: velopharyngeale Insuffizienz oder Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, grün: Hypokalzämie, lila: Immunsuffizienz oder rezidivierende Infekte, orange: Thymushypoplasie oder Thymusaplasie, braun: mentale Retardierung, Entwicklungsretardierung oder Verhaltensauffälligkeiten, hellgrün: andere Fehlbildungen oder Symptome) **1.** Patienten A1 bis A26 mit etwa 2,4 Mb großer Deletion. **2.** Patienten A27 bis A31 mit etwa 1,1 Mb großer Deletion. **3.** Patienten A33 und A34 mit etwa 2,2 Mb großer Deletion. **4.** Patientin A32 mit etwa 2,42 Mb großer Deletion.

### **3.5 Untersuchung von Patienten der Gruppe B mit einem für das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 typischen Phänotyp ohne Deletion**

In diagnostischen Routineuntersuchungen waren 50 Patienten mit Symptomen, die einem Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 entsprechen, mit der kommerziellen Sonde Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® TUPLE1 untersucht worden. Bei diesen Untersuchungen konnten keine Deletionen festgestellt werden (Patientenakten). Die in dieser Arbeit verwendeten, aus BAC-Klonen hergestellten Sonden deckten im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Sonden einen etwa elfmal größeren Sequenzbereich ab (siehe Abb. 19).

Hierfür wurden die Sonden CTD-2367L15, CTD-2536F14, CTD-2522F24, RP11-138C22, RP11-54C2, RP11-22M5, RP11-659D9 und Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® N25 eingesetzt. Pro Patient wurden jeweils 20 Mitosen und 20 Interphasen ausgewertet. Die Hybridisierungen mit diesen Sonden wurden zum Ausschluss einer atypischen Deletion durchgeführt.

Mit keiner dieser Sonden wurde eine Deletion identifiziert. Abbildung 21 zeigt die typischen Hybridisierungsmuster für die Gruppe B.



**Abb.21: Hybridisierungssignale der Gruppe B.**

1. Keine Deletion für die Sonde Vysis® DiGeorge Region Probe LSI-N25 (2 spezifische rote Signale) und Kontrollsonde 22q13.3 (grün). 2. Keine Deletion für CTD-2367L15 (2 grüne Signale). Keine Deletion für RP11-138C22 (2 rote Signale). 3. Keine Deletion für CTD-2536F14 (2 grüne Signale). Keine Deletion für RP11-54C2 (2 rote Signale). 4. Keine Deletion für CTD-2522F24 (2 grüne Signale). Keine Deletion für RP11-659D9 (2 rote Signale). 5. Keine Deletion für RP11-22M5 (2 rote Signale). 6. Weiß: nicht deletierte Hybridisierungsbereiche der Sonden.



## 4. Diskussion

Für das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 sind unterschiedlich große Deletionsbereiche beschrieben. Als typisch wird eine Deletion von etwa 3 bzw. 1,5 Mb angegeben (Lindsay, 2001). In Einzelfällen kommen auch davon abweichende Deletionsbereiche vor. Eine klare Korrelation zwischen Größe der Deletion und Ausprägung des Phänotyps wurde bisher nicht festgestellt. Die phänotypische Ausprägung des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 ist sehr heterogen und umfasst ein breites Spektrum klinischer Symptome. Häufig sind charakteristische faziale Dysmorphien, kongenitale Herzfehler, palatale Fehlbildungen, Immuninsuffizienz, mentale Retardierung und Lernschwäche (Hay, 2007; Kobrynski und Sullivan, 2007; Ryan *et al.*, 1997; Sandrin-Garcia *et al.*, 2007; Swillen *et al.*, 1997; Wiedemann und Kunze, 2001b, S.76f.).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Patientengruppe mit bereits nachgewiesener Mikrodeletion 22q11.2 (Gruppe A) und eine Patientengruppe mit dem Phänotyp des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2, aber normalem FISH-Befund (Gruppe B) mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung untersucht.

Ziel der Arbeit war die Bestimmung der Deletionsgröße, eine Optimierung der Sondenkombination zur Differenzierung der typischen Deletionsgrößen, sowie die Auswertung der klinischen Symptome in Bezug auf die Deletionsgröße in der Gruppe A. Die Patienten der Gruppe B wurden auf atypische Deletionen in 22q11.2 untersucht.

### 4.1 Deletionsgrößenbestimmung der Patientengruppe A

Die Gruppe A umfasste 34 Patienten. Diagnostische Routineuntersuchungen mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung hatten bereits gezeigt, dass bei diesen Patienten eine submikroskopische Deletion im Bereich 22q11.2 vorliegt (Patientenakten). Bei diesen Patienten sollte die Größe der Mikrodeletion mittels spezifischer FISH-Sonden genauer bestimmt werden. Mit kommerziell erhältlichen Sonden kann das Vorliegen einer Deletion im jeweiligen Hybridisierungsbereich nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden, wobei keine Aussage über die Größe der Deletion getroffen wird. Zur näheren Bestimmung der Deletionsgröße wurden sieben, von uns markierte

FISH-Sonden verwendet. Dabei wurden vier unterschiedlich große Deletionen festgestellt.

Bei den Patienten A1 bis A26 wurde eine etwa 2,4 Mb (Abb.19 in Ergebnisse, blauer Pfeil) und bei dem Patienten A32 eine 2,42 Mb große Deletion (Abb.19 in Ergebnisse, schwarzer Pfeil) bestimmt. Bei den Patienten A27 bis A32 lag eine etwa 1,1 Mb große Deletion (Abb.19 in Ergebnisse, roter Pfeil) vor. Die Patienten A33 und A34 zeigten eine etwa 2,2 Mb große submikroskopische Deletion (Abb.19 in Ergebnisse, grüner Pfeil).

Für die Entstehung der unterschiedlichen Deletionen im proximalen langen Arm des Chromosoms 22 wird die Existenz mehrerer LCRs (*low copy repeats*) in dieser Region angesehen (Abb.19 in Ergebnisse, schwarze Linie). LCRs sind 10-300 kb lang. Sie bestehen aus repetitiven Sequenzen, die eine 97-98 %ige Übereinstimmung aufweisen (Shaikh *et al.*, 2000). Solche LCRs verursachen fehlerhafte interchromosomale Austauschereignisse während der Meiose. Grundsätzlich kann nicht-allelische homologe Rekombination eines chromosomalen Abschnitts zu Deletion, Duplikation, Inversion und Translokation führen. In 22q11 sind insgesamt 8 LCRs bekannt. Die Anordnung unserer Sonden und der drei relevanten LCRs gestaltete sich folgendermaßen: Die Sonden CTD-2536F14 und CDT-2522F24 flankierten LCR2. Proximal von LCR3a lag RP11-138C22. RP11-54C2 befand sich distal von LCR3a. LCR4 lag zwischen den Sonden RP11-54C2 und RP11-M22M5 (Abb.19 in Ergebnisse, blaue Kästen).

Edelmann *et al.* konnten zeigen, dass die typische 3 Mb große Deletion durch nicht-allelische homologe Rekombination entsteht (Edelmann *et al.*, 1999a; Edelmann *et al.*, 1999b). Die bei dem Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 in 90 % der Fälle deletierte 3 Mb große Region wird von LCR2 und LCR4 flankiert. Uddin und Mitarbeiter wiesen eine atypische 2,3 Mb große Deletion nach, bei der der proximale Bruchpunkt dem proximalen Bruchpunkt der TDR entsprach. Der distale Bruchpunkt wies eine 270 bp große Region auf, die zu 90 % mit der Sequenz des proximalen Bruchpunktes übereinstimmt (SSBR - *shared sequence of the breakpoint regions*) und zudem große Ähnlichkeit mit Alu-Sequenzen in den LCRs aufwies. Es wird angenommen, dass solche Sequenzen innerhalb von LCRs für die Bruchpunkte der Mikrodeletion verantwortlich zeichnen (Uddin *et al.*, 2006).

Die 2,42 Mb, 2,4 Mb und 2,2 Mb großen Deletionen lagen zwischen LCR2 und LCR4. LCR2 und LCR3a begrenzten die in 2 Fällen detektierte 1,1 Mb große

Deletion. Es ist demnach denkbar, dass nicht-allelische homologe Rekombination von LCR2 und LCR4 bzw. von LCR2 und LCR3a zu diesen Deletionen geführt haben (Abb.19 in Ergebnisse).

Die Untersuchung mit FISH-Sonden lässt nur eindeutige Aussagen über den jeweiligen spezifischen Zielsequenzbereich zu. Binden beispielsweise bei einem Patienten mit einer 2,4 Mb großen Deletion die Sonden CTD-2522F24 und RP11-54C2 nicht, zeigt dies nur, dass diese beiden Regionen des Chromosoms 22 deletiert sind. Über den chromosomalen Abschnitt zwischen diesen Sonden kann keine Aussage getroffen werden. Es wäre also theoretisch möglich, dass die jeweiligen sondenspezifischen Hybridisierungsbereiche deletiert sind und der chromosomale Abschnitt zwischen den beiden Sonden erhalten geblieben ist. Allerdings würde es sich in diesem Fall um 2 sehr eng beieinander liegende, eigenständige Deletionen handeln, für deren Entstehung vier Bruchereignisse angenommen werden müssten. Da dies sehr unwahrscheinlich ist, vermuten wir, dass die zwischen den Sonden liegende chromosomale Region ebenfalls deletiert ist. Diese Vermutung wird zudem von der Tatsache gestützt, dass die Hybridisierungsbereiche der Sonden N25, TUPLE1 und RP11-138C22, die in dem Bereich zwischen den Sonden CTD-2522F24 und RP11-54C2 lokalisiert sind, ebenfalls deletiert sind.

Der Deletionsbereich umfasste somit die chromosomale Region von Chromosom 22 von bp 17380112 - bp19730795 (Abb.19 in Ergebnisse, blauer Pfeil, Tab.2 in Patienten und Methoden). Die distal folgende Sonde RP11-22M5 war in diesem Fall nicht deletiert. Daraus ergab sich ein Ende der deletierten Region zwischen den Sonden RP11-54C2 und RP11-22M5. Die genaue Lokalisation der Bruchpunkte ließ sich mittels der in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungen nicht ermitteln. Es konnte angenommen werden, dass die Bruchpunkte der 2,4 Mb großen Deletion in LCR2 und LCR4 (Abb.19 in Ergebnisse, blaue Kästen) lagen und dass die tatsächliche Deletionsgröße 3 Mb betrug.

Eine einzige Patientin (A32) wies eine größere Deletion auf: sie erstreckte sich von bp 17313884 - bp 19730795 und war etwa 2,42 Mb groß (Tab.2 in Patienten und Methoden). Der zentromerwärts gelegene Beginn der Mikrodeletion lag nur etwa 20 kb proximal der 2,4 Mb großen Deletion. Demnach lag der Deletionsbereich auch hier innerhalb der 3 Mb großen TDR.

Die Patienten A33 und A34 zeigten eine etwa 2,2 Mb große Deletion. Das distale Ende der Deletion stimmte mit dem der häufigen etwa 2,4 Mb großen Deletion überein. Proximal war diese Deletion verkürzt. Sie reichte von etwa bp 17284474 - bp 18435258 (Abb.19 in Ergebnisse, grüner Pfeil; Tab.2 in Patienten und Methoden). Für die Entstehung der unterschiedlich großen Deletionen sind nicht-homologe Crossing over im Bereich der LCRs denkbar.

Bei fünf der 34 untersuchten Patienten (A27, A28, A29, A30 und A31) wurde eine etwa 1,1 Mb große Deletion charakterisiert. Wir nehmen an, dass es sich in diesen Fällen um die in der Literatur beschriebene 1,5 Mb große Deletion handelt (Lindsay, 2001, Abb.19 in Ergebnisse, roter Pfeil). Bei diesen fünf Patienten waren die Hybridisierungsbereiche der Sonden CTD-2522F24, N25, TUPLE1 und RP11-138C22 deletiert. Das distale Ende der Deletion lag zwischen den Sonden RP11-138C22 und RP11-54C2. In diesem chromosomalen Bereich ist LCR3a lokalisiert. Geht man davon aus, dass die Bruchpunkte in LCR2 und LCR3a lagen, kann eine etwa 1,5 Mb große Deletion angenommen werden.

Das Geschwisterpaar A27 und A2 wurde von einer weiteren Arbeitsgruppe bezüglich ihrer Mikrodeletion mit der FISH-Methode untersucht. Die Resultate dieser Untersuchung stimmten mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein: Bei Patientin A27 wurde eine 1,5 Mb große proximale und bei Patient A2 eine 3 Mb große Deletion beschrieben (Rauch *et al.*, 2005).

Für den Bereich distal der TDR des DiGeorge-Syndroms und des Velokardiofazialen-Syndroms sind sowohl Mikrodeletionen als auch Mikroduplikationen unterschiedlicher Größe beschrieben (Ben-Shachar *et al.*, 2008; Coppinger *et al.*, 2009; Descartes *et al.*, 2008; Shaikh *et al.*, 2007). Das Krankheitsbild der distalen 22q11.2 Mikrodeletionen umfasst faziale Dysmorphien, Entwicklungsstörungen und Skelettanomalien. Bei Mikroduplikationen in 22q11.21-q11.23 sind variable Phänotypen beschrieben: mentale Retardierung, faziale Dysmorphien, Krampfanfälle, Herzfehler und Mikro- oder Makrozephalie.

Die Sonden RP11-22M5 und RP11-659D9 hybridisieren distal der TDR. Bei allen untersuchten Patienten ergaben diese beiden Sonden auf den homologen Chromosomen jeweils ein distinktes Hybridisierungssignal. In der Gruppe A lagen keine größeren Deletionen vor, die den Bereich distal der TDR einschließen.

### 4.1.1 Klinische Symptome und Deletionsgrößen

In Bezug auf eine mögliche Genotyp-Phänotyp Korrelation sind in der Literatur viele Thesen zu finden. Patienten, bei denen ein VCFS diagnostiziert wurde, haben in 79-90 % der Fälle eine etwa 3 Mb große Deletion (Carlson *et al.*, 1997; Kerstjens-Frederikse *et al.*, 1999; Rauch *et al.*, 2005; Shaikh *et al.*, 2000). Auch für das DiGeorge-Syndrom ist diese Deletionsgröße charakteristisch (Yamagishi, 2002). Patienten mit dieser Deletion zeigen eine große Variabilität in der phänotypischen Ausprägung der Symptome. Aggarwal und Morrow betonen, dass gerade diese Variabilität das bestimmende Kennzeichen für das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 ist (Aggarwal und Morrow, 2008).

Rauch *et al.* vertreten die Meinung, dass eine Korrelation zwischen Größe und Lage der Mikrodeletion und der Ausprägung des Phänotyps besteht. Sie stellten bei einer Untersuchung von 350 Patienten signifikante Unterschiede zwischen den klinischen Symptomen von Patienten mit einer 1,5 Mb großen oder einer 3 Mb großen Deletion und Patienten mit einer atypischen, distal der TDR gelegenen Deletion fest.

Demnach zeigen Patienten mit typischem VCFS-Phänotyp und konotrunkalem Herzfehler eine 3 Mb oder eine 1,5 Mb große Deletion. Patienten mit untypischen klinischen Symptomen, wie zum Beispiel nur schwach ausgeprägten fazialen Dismorphien und kongenitalen Herzfehlern, die nicht zur Gruppe der konotrunkalen Herzfehler gehören, wiesen dagegen atypische, distale Deletionen auf (Rauch *et al.*, 2005).

Nach Aggarwal und Morrow gibt es keinen Unterschied in der phänotypischen Ausprägung zwischen den einzelnen Deletionsgrößen, wenn die Deletion die proximalen 1,5 Mb der TDR einschließt (Aggarwal und Morrow, 2008). Innerhalb der TDR des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 sind etwa 40 Gene lokalisiert (Portnoi, 2009) (Abb.19 in Ergebnisse, hellgrau unterlegte Fläche, Tab.5 im Anhang).

Zur Erforschung der molekularen Basis eines Syndroms werden oft Modellsysteme herangezogen. Da die Entwicklung des pharyngealen Apparates bei unterschiedlichen Säugetieren ähnlich verläuft, eignen sich Tierexperimente an Mäusen zur Erforschung des DGS/VCFS. In der TDR für das DiGeorge-Syndrom liegen die Gene *TUPLE1* (Halford *et al.*, 1993) und *TBX1* (Tab.5 im Anhang), die im Mausmodell bei Verlust zu kardiovaskulären und parathyreoidalen Defekten führen (Bartsch *et al.*, 2003; Merscher *et al.*, 2001). Das *TBX1*-Gen (Abb.19 in Ergebnisse,

gelber Block) weist eine DNA-bindende Domäne, eine T-Box, auf (Chieffo *et al.*, 1997). T-Box-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation von Entwicklungsprozessen teilnehmen (Naiche *et al.*, 2005). Im Modellsystem Maus wurde die Rolle von *Tbx1* für die Herzentwicklung näher untersucht. Das TBX1-Protein der Maus weist eine 98 %ige Sequenzübereinstimmung mit dem des Menschen auf und unterscheidet sich lediglich in zwei identischen Resten in der T-Box-Domäne (Chieffo *et al.*, 1997). Bei Mäusen führt eine Deletion im *Tbx1*-Gen zu einer Fehlbildung des Aortenbogens (Lindsay *et al.*, 2001). Anhand zahlreicher Versuche konnte gezeigt werden, dass unter den deletierten Genen des 22q11.2-Bereiches lediglich *Tbx1* haploinsuffizient ist (Arnold *et al.*, 2006; Baldini, 2005; Hu *et al.*, 2004; Lindsay *et al.*, 2001). Die Menge des Genprodukts aller anderen, von der Deletion betroffenen Gene unterschied sich nicht im Vergleich zu Wildtyp-Versuchstieren. Aufgrund der Ergebnisse am Mausmodell nimmt man an, dass das *Tbx1*-Gen für einige der Symptome des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 verantwortlich sein könnte (OMIM, 2009d; Zhang *et al.*, 2005).

Patienten mit kongenitalen konotrunkalen Herzfehlern weisen in 18,5 % die typische 3 Mb große oder die proximale 1,5 Mb große Mikrodeletion 22q11.2 auf (Rauch *et al.*, 2005). In beiden Fällen ist das Gen *TBX1* deletiert. Das VCFS tritt in der Regel auf, wenn das für den Transkriptionsfaktor *TBX1* kodierende Gen deletiert ist. Yagi und Mitarbeiter konnten zeigen, dass auch Patienten mit Punktmutationen im *TBX1*-Gen den DGS/VCFS-Phänotyp aufweisen. So waren bei einem Patienten mit einer Frameshift-Mutation und zwei Patienten mit Missense-Mutationen im *TBX1*-Gen der DGS/VCFS-Phänotyp mit fazialen Dysmorphien, konotrunkalen Herzfehlern, Thymushypoplasien, parathyroidaler Dysfunktion und velopharyngealer Insuffizienz zu finden (Yagi *et al.*, 2003).

In der TDR liegen weitere Gene, darunter *CRKL*, *HIRA*, und *UFD1L* (Tab.5 im Anhang). In verschiedenen Modellsystemen konnte gezeigt werden, dass *Crkl* in Mäusen (Guris *et al.*, 2006), *Hira* in Hühnern (Farrell *et al.*, 1999), und *UFD1L* in Menschen und Mäusen (Yamagishi *et al.*, 1999) für die Herzentwicklung mitverantwortlich sind.

Ferner besteht die Annahme, dass der Verlust von *TBX1* für Verhaltensstörungen und psychiatrische Erkrankungen von Patienten mit VCF- und DiGeorge-Syndrom, die bei etwa 35 % der Patienten auftritt, ursächlich sein könnte (Paylor *et al.*, 2006). In der 22q11.2-Region werden mehrere Gene, die unter anderem für die Entwicklung

und Funktion neuronaler Schaltkreise im ZNS verantwortlich sind, vermutet (Bearden *et al.*, 2004; Stark *et al.*, 2008).

Bei Patienten mit proximaler etwa 1,5 Mb großer Deletion scheinen mentale Retardierung oder schwere Lernschwäche seltener aufzutreten, als bei Patienten mit etwa 3 Mb großer Deletion (Bartsch *et al.*, 2003; Rauch *et al.*, 2005). Rauch und Mitarbeiter postulieren, dass Deletionen, die den distalen Abschnitt der TDR einschließlich *CRKL* (Abb.19 in Ergebnisse, dunkelgrauer Block) betreffen, zu mentaler Retardierung und Lernschwäche führen. Patienten, bei denen *CRKL* nicht deletiert ist, zeigten dagegen keine dieser Symptome (Rauch *et al.*, 2005). Neben geistiger Behinderung ist für das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 eine Assoziation mit psychischen und psychiatrischen Erkrankungen bekannt (Prasad *et al.*, 2008). Hier sind beispielsweise Depression, bipolare Störung, Schizophrenie, Zwangsstörung und ADHS (Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung) zu nennen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten, bei denen eine 2,4 Mb große Deletion nachgewiesen wurde, weisen in 60 % kongenitale Herzfehler und in 75 % faziale Dysmorphien auf.

Die Patienten A33 und A34 zeigten eine etwa 2,2 Mb große Deletion, bei der der proximale Bruchpunkt im Vergleich zu der typischen 3 Mb großen Deletion weiter distal gelegen ist. Die 2,2 Mb große Deletion reichte von etwa bp 17284474 – etwa bp 18435258. Sowohl *TBX1* als auch *CRKL* liegen innerhalb des deletierten Bereichs (Tab.5 im Anhang). Trotzdem zeigte keiner der beiden Patienten die für das Mikrodeletionssyndrom typischen Symptome wie kongenitale Herzfehler, velopharyngeale Insuffizienz, Immundefizite oder mentale-/Entwicklungsretardierung. Da die etwa 2,2 Mb große Deletion nur bei zwei Patienten nachgewiesen wurde, ist eine allgemeine Aussage zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation nicht möglich.

Bei Patientin A32 konnte ein 2,42 Mb großer Deletionsbereich bestimmt werden. Diese Deletion ist etwa 20 kb größer als die 2,4 Mb große Deletion, die bei 59 % der untersuchten Patienten der Gruppe A festgestellt wurde. Diese zusätzlich deletierten 20 kb liegen proximal der 2,4 Mb großen Deletion (Abb.19 in Ergebnisse, Tab.5 im Anhang). Da in diesem Bereich bisher keine Gene beschrieben wurden und sowohl die 2,4 Mb als auch die 2,42 Mb große Deletion innerhalb der TDR liegt, vermuten wir, dass sich aus der größeren Deletion keine weiteren klinischen Konsequenzen

ergeben. Patientin A32 wies einen kongenitalen Herzfehler, für das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 charakteristische faziale Dysmorphien und eine Hypokalzämie auf. Die vorliegenden Symptome der Patientin A32 entsprachen den häufig beschriebenen Symptomen des DiGeorge-Syndroms.

In etwa 15 % (fünf von 34) der untersuchten Patienten wurde eine etwa 1,1 Mb große Deletion nachgewiesen. Der proximale Bruchpunkt dieser Deletion war zwischen den Sonden CTD-2536F14 und CTD-2522F24 lokalisiert. In diesem Bereich liegt LCR2. Das distale Ende der Deletion wurde von den Sonden RP11-138C22 und RP11-54C2 definiert. Die Sonde RP11-138C22 war deletiert, die Sonde RP11-54C2 dagegen nicht. Zwischen den beiden Sonden lag LCR3a (Abb.19 in Ergebnisse, roter Pfeil). Wir nehmen an, dass die Bruchpunkte der 1,1 Mb großen Deletion in LCR2 und LCR3a lagen. Auch die Bruchpunkte der in der Literatur beschriebenen 1,5 Mb großen Deletion sind innerhalb dieser beiden LCRs lokalisiert. Die Detektion der unterschiedlichen Größe der beiden Deletionen ist möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher DNA-Sonden zurückzuführen.

Die 1,5 Mb große Deletion tritt bei etwa 7-14 % der del(22)(q11.2)-Patienten auf (Carlson *et al.*, 1997; Kerstjens-Frederikse *et al.*, 1999; Shaikh *et al.*, 2000). Diese Deletion ist mit dem proximalen Bereich der 3 Mb großen Mikrodeletion identisch (Abb.19 in Ergebnisse, dunkelgrauer Kasten) und wird in der Literatur zur eindeutigen Identifizierung auch als „proximale 1,5 Mb große Deletion“ bezeichnet. Sie ist ebenso wie die typische 3 Mb große Deletion mit kongenitalen konotrunkalen Herzfehlern und dem VCFS assoziiert. Diese Übereinstimmung der Phänotypen wird auf die in beiden Fällen vorliegende *TBX1*-Haploinsuffizienz zurückgeführt. (Rauch *et al.*, 2005)

Bei vier der von uns untersuchten Patienten (80 %) mit einer 1,1 Mb großen proximalen Deletion lag ein kongenitaler Herzfehler vor, und drei dieser Patienten (60 %) hatten faziale Dysmorphien.



#### 4.1.2 Optimierung der Sondenkombination zur Differenzierung der typischen Deletionsgrößen des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2

Durch Kombination mehrerer Sonden kann mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung die Größe einer vorliegenden Deletion genauer bestimmt werden. Von den in dieser Arbeit verwendeten Sonden erlaubte RP11-54C2 eine Differenzierung zwischen der 3 Mb- und der proximalen 1,5 Mb-Deletion (Abb.19 in Ergebnisse). Das distale Ende lag im Falle der 3 Mb großen Deletion distal des Hybridisierungsbereichs von RP11-54C2 und im Falle der 1,5 Mb großen Deletion proximal des Hybridisierungsbereichs dieser Sonde. Durch Kombination von RP11-54C2 mit den kommerziell verfügbaren FISH-Sonden Vysis® DiGeorge Region Probe - LSI® TUPLE1 oder Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® N25 kann eine eindeutige Unterscheidung zwischen den beiden häufigsten Varianten der Mikrodeletion 22q11.2 getroffen werden. Somit kann durch eine einzige zusätzliche Hybridisierung die Diagnose sowohl über das Vorliegen als auch die Größe der Mikrodeletion 22q11.2 gestellt werden.

Wird RP11-54C2 beispielsweise mit Vysis® DiGeorge Region Probe - LSI® TUPLE1 kombiniert, werden bei Vorliegen einer 3 Mb großen Deletion folgende Signale detektiert: auf beiden Chromosomen 22 die grünen Signale der Kontrollsonde in q13, aber nur auf einem Chromosom sowohl das rote Signal von TUPLE1 und als auch nur 1 Signal von RP11-54C2. In Interphasekernen wären entsprechend 2 grüne, 1 rotes und 1 Signal von RP11-54C2 zu sehen. Die Sonde RP11-54C2 könnte mit einer dritten Farbe, beispielsweise mit *SpectrumRed-dUTP* oder *SpectrumAqua-dUTP*, markiert werden. Läge hingegen eine 1,5 Mb große Deletion vor, wären in Interphasekernen neben den beiden grünen Kontrollsignalen, 1 rotes Signal von TUPLE1 und 2 Signale von RP11-54C2 (beispielsweise rot oder blau) sichtbar. Dementsprechend würde in der Mitose auf beiden Chromosomen 22 jeweils 1 grünes Signal der Kontrollsonde in q13 und jeweils 1 Signal von RP11-54C2, aber nur auf einem Chromosom 1 rotes Signal von TUPLE1 sichtbar sein.

## 4.2 Untersuchung auf atypische Deletionsbereiche der Gruppe B

Bei den 53 Patienten der Gruppe B bestand klinisch der Verdacht auf das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2. Diese Patienten wiesen für das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 typische Symptome auf: 77,4 % zeigten kongenitale Herzfehler (davon 31,7 % konotrunkale Herzfehler) und 84,9 % hatten typische faziale Dysmorphien. Untersuchungen mittels FISH mit der DiGeorge Region Probe - LSI<sup>®</sup> TUPLE 1 SpectrumOrange und der Kontrollsonde LSI ARSA SpectrumGreen<sup>™</sup> von Vysis<sup>®</sup> hatten einen Normalbefund ergeben. Der Karyotyp aller untersuchten Patienten dieser Gruppe war numerisch und strukturell unauffällig.

Rauch und Mitarbeiter (2005) hatten gezeigt, dass in 6 % ihrer klinisch diagnostizierten Patienten die Mikrodeletion 22q11.2 bei Verwendung der in der Diagnostik üblichen Standardsonde „DiGeorge Region Probe - LSI<sup>®</sup> TUPLE 1“ nicht nachgewiesen wurde. Sie verwendeten zehn FISH-Sonden, die sowohl die TDR sowie atypische proximale und distale Deletionsbereiche in 22q11.2 abdeckten. In der Literatur sind zwei Fälle einer atypischen Deletion bei Mutter und Sohn beschrieben, die mit den Sonden N25 und TUPLE 1 nicht detektiert werden konnten, wohl aber durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit einer *TBX1*-spezifischen Sonde (Beaujard *et al.*, 2009). Die klinischen Symptome des von Beaujard und Mitarbeitern untersuchten Kindes mit fazialen Dysmorphien, einem konotrunkalen Herzfehler und neonataler Hypokalzämie entsprechen dem klassischen Phänotyp bei Mikrodeletionssyndrom 22q11.2.

Mittels der von uns hergestellten FISH-Sonden konnte bei keinem der untersuchten Patienten der Gruppe B eine atypische Deletion im Bereich 22q11.2 oder proximaler bzw. distaler angrenzender Sequenzbereiche nachgewiesen werden (Abb.19 in Ergebnisse). Alle verwendeten Sonden zeigten bei den Patienten der Gruppe B jeweils 2 distinkte Hybridisierungssignale.

In der Literatur wird neben der Mikrodeletion auch eine Mikroduplikation in der Region 22q11.2 beschrieben. Die Erstbeschreibung erfolgte 1999 durch Edelmann *et al.* (Edelmann *et al.*, 1999b). Das Mikroduplikationssyndrom 22q11.2 weist in der Regel eine 3 Mb große Duplikation auf, deren Größe mit der Deletion des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 identisch ist. Weiterhin ist eine 1,5 Mb große Duplikation analog zur 1,5 Mb großen Deletion beschrieben (Portnoi, 2009). Phänotypisch liegt eine große Variabilität des Krankheitsbildes vor. Die auftretenden

Symptome überschneiden sich zum Teil mit denen des Mikrodeletionssyndroms. So sind beispielsweise kongenitale Herzfehler, urogenitale Fehlbildungen und velopharyngeale Insuffizienz mit und ohne Gaumenspalte angegeben.

Mikroduplikationen können mittels FISH anhand des Vorliegens von drei distinkten Signalen diagnostiziert werden. Allerdings ist in der Mitose ein durch eine Mikroduplikation verursachtes stärkeres Fluoreszenzsignal auf einem der homologen Chromosomen nur schwer oder gar nicht zu detektieren. Dagegen sind drei distinkte Signale in der Interphase gut erkennbar: In diesem Fall liegen 2 Signale eng beieinander, während das dritte weiter entfernt lokalisiert ist (Cotter *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden für jede hybridisierte Sonde 20 Mitosen und 20 Interphasekerne ausgewertet. Keine der in der vorliegenden Arbeit verwendeten kommerziellen oder nichtkommerziellen Sonden zeigte mehr als 2 Hybridisierungssignale im Interphasekern.

Durch Analyse der Interphasekerne lässt sich eine Mikroduplikation im Bereich von 22q11.2, sowie eine Mikroduplikation distal der TDR ebenfalls ausschließen (Ben-Shachar *et al.*, 2008; Coppinger *et al.*, 2009; Descartes *et al.*, 2008; Portnoi, 2009; Yobb *et al.*, 2005).

Möglicherweise wird die Ausprägung des Phänotyps bei der 22q11.2-Deletion nicht nur von der Deletionsgröße, sondern auch durch andere Faktoren modifiziert (Rauch *et al.*, 2005; Yamagishi, 2002). Als mögliche, den Phänotyp beeinflussende Faktoren kommen teratogen wirkende Agenzien oder andere chromosomale Aberrationen in Frage.

Liegen mit einem Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 vereinbare Symptome ohne Nachweis einer Deletion vor, wird eine ausführliche Anamnese empfohlen, insbesondere im Hinblick auf teratogene Einflüsse in der Schwangerschaft, wie z.B. Alkohol, Isotretinoin und Diabetes mellitus (Bartsch *et al.*, 1999). Die kausale Wirkung dieser Agenzien ist allerdings bisher noch nicht endgültig erforscht.

So ist bei maternalem insulinpflichtigen Diabetes das Auftreten eines DiGeorge-Phänotyps mit Nierenaplasie ohne Mikrodeletion beschrieben worden (Wilson *et al.*, 1993b).

Vitamin A-Derivate können ebenfalls zu einem dem Mikrodeletionssyndrom 22q11.2-ähnlichen Phänotyp führen (Rosa *et al.*, 1986). Isotretinoin ist ein Vitamin-A-Säure-

Derivat, das in Deutschland und Österreich für die systemische und topische Therapie der *Akne vulgaris* zugelassen ist (OMIM, 2009c). Multiple kongenitale Anomalien können durch die mütterliche Einnahme des Vitamin-A-Säure-Derivats während der Schwangerschaft hervorgerufen werden. Missbildungen betreffen häufig das Zentralnervensystem und das kardiovaskuläre System. Faziale Dismorphien im Sinne von kleinen, dysmorphen oder fehlenden Ohren, Mikrognathie und Gaumenspalten sind für das *Isotretinoin Embryopathy-like Syndrome* beschrieben (Benke, 1984; Braun *et al.*, 1984; Coberly *et al.*, 1996; Lammer *et al.*, 1985). Die durch Isotretinoineinnahme hervorgerufenen Missbildungen beim Embryo können ebenfalls durch eine exzessive Einnahme von Vitamin A während der Schwangerschaft hervorgerufen werden.

Tierexperimente haben gezeigt, dass eine Überdosis von Isotretinoin bei Zebrafischen eine verminderte Transkriptionsrate von *tbx1* im Embryonalstadium bedingt (Zhang *et al.*, 2006).

Alkoholabusus in der Schwangerschaft kann zu einem Fetalen Alkoholsyndrom (FAS) mit variablem Krankheitsbild, das sich teilweise mit dem Phänotyp des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 überschneidet, führen. Die klassischen Symptome schwer betroffener Kinder mit FAS umfassen pränatale und postnatale Wachstumsretardierung, Untergewicht, Mikrozephalie, statomotorische und mentale Retardierung, Hyperaktivität, muskuläre Hypotonie und typische faziale Dismorphien. Weiterhin treten Fehlbildungen insbesondere des Herzens und des Urogenitalsystems auf (Schneider *et al.*, 2011). Ungefähr ein Drittel der Neugeborenen mit einem Fetalen Alkoholsyndrom haben kongenitale Herzfehler. Dabei handelt es sich überwiegend um Septumdefekte (ASD, VSD). Insbesondere Wachstumsretardierung, mentale Retardierung und kongenitale Herzfehler sind auch für das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 typische Symptome. Der von der Mutter konsumierte Alkohol und sein Abbauprodukt Acetaldehyd sind plazentagängig. Bei beiden Stoffen handelt es sich um Mitosegifte, die wachstumshemmend und neurotoxisch wirken. Die genauen Mechanismen der Entstehung der kongenitalen Herzfehler sind aber noch unklar (Lange-Ernst, 2006).

Eine weitere mögliche Ursache für das Auftreten typischer Symptome des DiGeorge-/Velokardiofazialen-Syndroms sind andere chromosomale Aberrationen. Patienten mit klinisch gesichertem DGS/VCFS weisen in bis zu 90 % der Fälle eine

Mikrodeletion 22q11.2 auf (Berend *et al.*, 2000). Bei einigen wenigen Patienten mit den klinischen Symptomen eines DGS/VCFS ohne Mikrodeletion 22q11.2 ist eine interstitielle Deletion des Chromosoms 10(p13-p14) nachgewiesen worden (Daw *et al.*, 1996). Dieser Bereich wurde als DGS 2-Locus beschrieben. Für diesen zweiten Locus des DiGeorge-Syndroms/Velokardiofazialen-Syndroms (DGS 2/VCFS 2) wurde von Schuffenhauer *et al.* eine „critical DGS 2 region“ beschrieben. Dieses etwa 1 cM große Intervall zwischen den Loci D10S547 und D10S585 war bei allen der neun untersuchten Patienten mit einem DGS-Phänotyp deletiert. Die unterschiedlichen Deletionen der einzelnen Patienten reichen von etwa 10 cM bis etwa 50 cM (Schuffenhauer *et al.*, 1998).

Partielle Monosomie 10p führt zu variablen Phänotypen und ist auf Haploinsuffizienz von mindestens zwei unterschiedlichen Regionen zurückzuführen. Man unterscheidet die proximale DGS 2- und die distale HDR 1-Region (*Hypoparathyroidism, Deafness, Renal dysplasia*). Deletionen in der proximalen Region können zu Herzfehlern und T-Zelldefekten führen. Distale Deletionen in diesem Bereich können mit Hypoparathyreoidismus, Taubheit und Nierendysplasien einhergehen (Lichtner *et al.*, 2000). Bartsch *et al.* untersuchten Patienten mit DGS-/VCFS-Phänotyp und unauffälligem Karyotyp auf Mikrodeletionen in 22q11.2 und 10p13-p14. Von 162 untersuchten Patienten zeigten 12 eine Mikrodeletion 22q11.2. Eine Mikrodeletion im Bereich des DGS 2 Locus wurde dagegen in keinem Fall detektiert (Bartsch *et al.*, 1999).

Alle bisher dokumentierten Deletionen im Bereich des DGS 2 Locus sind mit Hilfe konventioneller zytogenetischer Untersuchungen detektierbar gewesen. Dies setzt eine Deletionsgröße von mindestens 5-10 Mb voraus (Berend *et al.*, 2000; Daw *et al.*, 1996; Lichtner *et al.*, 2000). In der Literatur sind bisher keine Mikrodeletionen für den Locus 10(p13-p14) beschrieben worden.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten der Gruppe B waren im Rahmen der Routinediagnostik zytogenetisch untersucht worden. Es zeigten sich in allen Fällen numerisch und strukturell unauffällige Karyotypen. Auf eine FISH-Untersuchung auf Mikrodeletionen im Bereich des DGS 2 Locus wurde verzichtet, da eine solche Deletion bisher nicht beschrieben wurde (Bartsch *et al.*, 1999).

### 4.3 Ausblick

Im Folgenden sollen weitere diagnostische Methoden, die zur weiterführenden Untersuchung der Patienten der Gruppe B in Frage kommen könnten, vorgestellt werden.

Neben der konventionellen Chromosomenanalyse und der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung stehen heute weitere diagnostische Methoden, wie zum Beispiel die Array-Analyse, für die Identifizierung chromosomaler Aberrationen zur Verfügung. DNA-Mikroarrays werden in zunehmendem Maße in der Diagnostik genetischer Erkrankungen eingesetzt (Janning und Knust, 2004, S.322f.). Sie ermöglichen die parallele Analyse vieler tausend DNA-Loci. Diese Methoden erkennen zwar keine balancierten chromosomalen Rearrangements, wohl aber den Verlust (Deletion) oder Zugewinn (Duplikation) genomischer DNA.

Vergleichende Studien von FISH und Array-CGH (*array comparative genomic hybridization*) hinsichtlich der Detektion einer Mikrodeletion im chromosomalen Bereich 22q11.2 haben gezeigt, dass auch die Array-CGH die erforderliche Sensitivität und Spezifität für den diagnostischen Einsatz aufweist (Tokuyasu *et al.*, 2007). Array-Analysen haben gegenüber FISH den Vorteil, dass bei sehr hoher Auflösung gleichzeitig alle Chromosomen auf Veränderungen in der Gendosis „gescannt“ werden können. So kann submikroskopisch der Gewinn oder Verlust von DNA nachgewiesen werden, mit weitaus höherer Auflösung als das mit FISH möglich ist (Brunet *et al.*, 2009; Thuresson *et al.*, 2007). Darüber hinaus sind Array-Analysen im Gegensatz zur Metaphase-FISH nicht auf proliferierende Zellen angewiesen. Mit SNP (Single nucleotide polymorphism)-Arrays können in einem Schritt Variationen in der Kopienzahl, Mosaik, uniparentale Disomien (UPD) und Verlust der Heterozygotie (LOH) festgestellt werden. Gijsbers *et al.* schlagen daher vor, SNP-Array-Analysen in der Diagnostik von mentaler Retardierung und/oder multiplen angeborenen Fehlbildungen noch vor der Karyotypisierung durchzuführen (Gijsbers *et al.*, 2009).

Insbesondere für unsere Patienten der Gruppe B mit einem zum Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 passenden Phänotyp und unauffälligem FISH-Ergebnis wäre eine solche Array-Analyse sinnvoll. In bis zu 20 % der Fälle von

Patienten mit Verdacht auf chromosomale Aberrationen und unauffälligem Karyotyp fand sich ein pathologischer Array-Befund (MGZ-München, 2010).

### 4.4 Zusammenfassung der Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Patienten mit nachgewiesener Mikrodeletion 22q11.2 (Gruppe A) unterschiedlich große Deletionsbereiche innerhalb der TDR im chromosomalen Abschnitt 22q11.2 mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Sechzig Prozent der Patienten mit der etwa 2,4 Mb großen Deletion wiesen einen kongenitalen Herzfehler und 75 % zeigten faziale Dysmorphien. Bei 2 Patienten wurde eine etwa 2,2 Mb große Deletion nachgewiesen. Einer von ihnen hatte eine Hypokalzämie, der andere eine Thymushypoplasie und faziale Dysmorphien. Bei 80 % unserer Patienten mit einer etwa 1,1 Mb großen Deletion lag ein kongenitaler Herzfehler vor. Bei 60 % von ihnen wurden zudem faziale Dysmorphien beschrieben.

Um genauere Aussagen über mögliche Genotyp-Phänotyp Korrelationen treffen zu können, empfehlen wir, die Fallzahlen in den einzelnen Gruppen mit unterschiedlicher Deletionsgröße zu erhöhen.

Die Untersuchung der Patienten mit klinischem Verdacht auf Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 ohne nachgewiesene Deletion (Gruppe B) ergab auch mit den von uns hergestellten FISH-Sonden in keinem Fall eine Mikrodeletion.

In Kombination mit der Vysis® DiGeorge Region Probe - LSI® TUPLE1 oder der Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® N25 war die Sonde-RP11-54C2 zur Diskriminierung zwischen der 3 Mb und der 1,5 Mb großen Deletion geeignet. Die Sonde-RP11-54C2 kann mit den kommerziell erhältlichen Sonden Vysis® DiGeorge Region Probe - LSI® TUPLE1 oder Vysis® DiGeorge Region-Probe - LSI® N25 kombiniert und simultan hybridisiert werden. Diese Sondenkombination erlaubt eine Differenzierung zwischen den beiden häufigsten Deletionsgrößen des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 ohne zusätzlichen Aufwand.

Im Hinblick auf die von Rauch und Mitarbeitern aufgestellte Hypothese, dass die typische 3 Mb große Deletion und die proximale 1,5 Mb große Deletion mit unterschiedlichen Phänotypen korreliert ist, wäre eine Differenzierung zwischen diesen beiden Deletionsgrößen für die weitere Aufklärung einer Genotyp-Phänotyp

## Diskussion

---

Korrelation von Bedeutung. Insbesondere da die von ihnen postulierte These, dass eine Deletion von CRKL mit mentaler Retardierung oder schwerer Lernschwäche assoziiert ist, in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Ferner wird eine Nachuntersuchung der Patienten der Gruppe B mittels Array-Analyse empfohlen.



### 5. Zusammenfassung

Das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 ist mit etwa 1:4000 Geburten das häufigste Mikrodeletionssyndrom (Henwood *et al.*, 2001). Etwa 90 % der Patienten weisen eine 3 Mb große, heterozygote Deletion in 22q11.2 auf. Bei etwa 10 % liegt eine 1,5 Mb große Deletion vor (Lindsay *et al.*, 2001). Das klinische Bild ist sehr heterogen: häufige Symptome, die in mehr als 50 % vorliegen, sind Wachstumsretardierung, typische faziale Dysmorphien, kongenitale Herzfehler, palatale Fehlbildungen, Immuninsuffizienz, Entwicklungs- und mentale Retardierung (Hay, 2007; Kobrynski und Sullivan, 2007; Ryan *et al.*, 1997; Sandrin-Garcia *et al.*, 2007; Swillen *et al.*, 1997; Wiedemann und Kunze, 2001a). Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ist die Standardmethode zur Diagnostik des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2.

In der vorliegenden Arbeit wurden 84 Patienten der Institute für Humangenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen und der Philipps-Universität Marburg mit klinischem Verdacht auf das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 nachuntersucht. Dazu wurden sieben individuell hergestellte FISH-Sonden, die den chromosomalen Bereich der Typical Deleted Region (TDR), sowie die angrenzenden proximalen und distalen Chromosomenabschnitte abdecken, verwendet.

Es wurden 38 Patienten (Gruppe A) mit bereits nachgewiesener del(22)(q11.2) nachuntersucht, um die genaue Deletionsgröße zu bestimmen. In dieser Gruppe wurden vier verschiedene Deletionsgrößen nachgewiesen: eine etwa 2,4 Mb (in 76 %), eine etwa 2,42 Mb (in 3 %), eine etwa 1,1 Mb (in 15 %) und eine etwa 2,2 Mb (in 6 %) große Deletion. Der Nachweis einer Phänotyp-Genotyp-Korrelation beim Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 war nicht möglich.

Weitere 50 Patienten mit klinischem Verdacht auf del(22)(q11.2) (Gruppe B) wurden im Rahmen dieser Arbeit nachuntersucht. Diese Patienten, bei denen mit kommerziellen Sonden keine Deletion nachgewiesen worden war, zeigen mindestens zwei der häufigsten Symptome des Syndroms. Es konnte mittels der hergestellten sieben FISH-Sonden keine Deletion in 22q11.2 sowie den angrenzenden proximalen und distalen Chromosomenbereichen detektiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei die Routinediagnostik des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2 zu verbessern: Die Sonde-RP11-54C2 eignet sich zur Differenzierung zwischen der 3 Mb und der 1,5 Mb großen Deletion des Mikrodeletionssyndroms 22q11.2.

Diese Sonde kann mit den kommerziell erhältlichen Sonden kombiniert und simultan hybridisiert werden.

### **Summary**

The microdeletion in the long arm of chromosome 22(22q11.2) gives rise to the most common microdeletion syndrome with an estimated incidence of 1:4000 (Henwood et al., 2001). Approximately 90 % of patients have a 3 Mb heterozygous deletion, and in 10 % the syndrome is caused by a 1.5 Mb deletion. Clinical signs vary: symptoms that are present in more than 50 % of confirmed cases are growth retardation, characteristic craniofacial anomalies, palatal anomalies, cardiovascular anomalies, immune deficiency, developmental delay and mental retardation (Hay, 2007; Kobrynski und Sullivan, 2007; Ryan et al., 1997; Swillen et al., 1997; Wiedemann und Kunze, 2001). Fluorescence in situ hybridization (FISH) is the standard technique to diagnose the microdeletion syndrome 22q11.2.

In this study I evaluated 84 patients with clinical features of the microdeletion syndrome 22q11.2 (Institute of Human Genetics at the Justus Liebig University Giessen and at the Philipps University Marburg). I designed seven distinct FISH probes, which covered the typical deleted region (TDR) and the adjacent chromosomal segments proximal and distal of the TDR.

Patients were assigned to two groups. In patients of group A a deletion in 22q11.2 had been known prior to this study. Patients of group B displayed clinical features of a 22q11.2 deletion syndrome in the absence of a known deletion.

Group A comprised 38 patients. The exact size of the deletion was determined and four different deletion sizes were detected. In 76 % of patients the size of the deletion was 2.4 Mb. It was 2.42 Mb in 3 %, 2.2 Mb in 6 % and 1.1 Mb in 15 %.

In contrast to a report in the literature, our findings do not confirm a phenotype-genotype-correlation.

Group B included 50 patients. Despite clinical signs consistent with a 22q11.2 deletion syndrome, no deletion was found in any of these patients using the seven FISH probes developed as part of this dissertation.

By establishing a panel of FISH probes, that reliably identify four different deletions, this study will help to improve the molecular diagnosis of the 22q11.2 syndrome.

## 6. Anhang

### 6.1 Charakterisierte Deletionsbereiche mit Angabe der deletierten Gene.

Die Tabelle 5 stellt die charakterisierte Deletionsgröße der untersuchten Patienten unter Angabe des jeweils spezifisch deletierten Genbereichs dar.

**Tab.5: Charakterisierte Deletionsbereiche mit Angabe der deletierten Genen (UCSC, 2009).**

Patienten	Deletionsgröße	Lokalisation	Gene
A1-A26	2,4 Mb	22:17380112-19730795	<i>DGCR2</i> , <i>ACC004471.2</i> , <i>DGCR14</i> , <i>TSSK2</i> , <i>GSC2</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>CLTCL1</i> , <b><i>HIRA</i></b> , <i>MR PL40</i> , <i>C22orf39</i> , <i>UFD1I</i> , <i>CDC45L</i> , <i>CLDN5</i> , <i>SEPT5</i> , <i>GP1BB</i> , <b><i>TBX1</i></b> , <i>GNB1I</i> , <i>C22orf29</i> , <i>TXNRD2</i> , <i>COMT</i> , <i>ARVCF</i> , <i>C22orf25</i> , <i>DGCR8</i> , <i>HTF9C</i> , <i>RANBP1</i> , <i>ZDHHC8</i> , <i>RTN4R</i> , <i>AC007663.29</i> , <i>DGCR6L</i> , <i>AC023490.5</i> , <i>GGTLC3</i> , <i>TMEM191C</i> , <i>P14KAP1</i> , <i>RIMBP3</i> , <i>AC011718.2</i> , <i>AC007731.16-201</i> , <i>AC007731.16-204</i> , <i>USP41</i> , <i>ZNF74</i> , <i>SCARF2</i> , <i>KLHL22</i> , <i>MED15</i> , <i>AC007050.13</i> , <i>P14KA</i> , <i>SERPIND1</i> , <i>SNAP29</i> , <b><i>CRKL</i></b> , <i>AC002470.17</i> , <i>AIFM3</i> , <i>LZTR1</i> , <i>THAP7</i> , <i>AC002472.8-201</i> , <i>P2RX6</i> , <i>SLC7A4</i> , <i>P2RX6P</i>
A27-A31	1,1 Mb	22:17380112-18435258	<i>DGCR2</i> , <i>ACC004471.2</i> , <i>DGCR14</i> , <i>TSSK2</i> , <i>GSC2</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>CLTCL1</i> , <b><i>HIRA</i></b> , <i>MR PL40</i> , <i>C22orf39</i> , <i>UFD1I</i> , <i>CDC45L</i> , <i>CLDN5</i> , <i>SEPT5</i> , <i>GP1BB</i> , <b><i>TBX1</i></b> , <i>GNB1I</i> , <i>C22orf29</i> , <i>TXNRD2</i> , <i>COMT</i> , <i>ARVCF</i> , <i>C22orf25</i>
A33, A34	2,2 Mb	22:17484474-19730795	<i>DGCR2</i> , <i>ACC004471.2</i> , <i>DGCR14</i> , <i>TSSK2</i> , <i>GSC2</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>CLTCL1</i> , <b><i>HIRA</i></b> , <i>MR PL40</i> , <i>C22orf39</i> , <i>UFD1I</i> , <i>CDC45L</i> , <i>CLDN5</i> , <i>SEPT5</i> , <i>GP1BB</i> , <b><i>TBX1</i></b> , <i>GNB1I</i> , <i>C22orf29</i> , <i>TXNRD2</i> , <i>COMT</i> , <i>ARVCF</i> , <i>C22orf25</i> , <i>DGCR8</i> , <i>HTF9C</i> , <i>RANBP1</i> , <i>ZDHHC8</i> , <i>RTN4R</i> , <i>AC007663.29</i> , <i>DGCR6L</i> , <i>AC023490.5</i> , <i>GGTLC3</i> , <i>TMEM191C</i> , <i>P14KAP1</i> , <i>RIMBP3</i> , <i>AC011718.2</i> , <i>AC007731.16-201</i> , <i>AC007731.16-204</i> , <i>USP41</i> , <i>ZNF74</i> , <i>SCARF2</i> , <i>KLHL22</i> , <i>MED15</i> , <i>AC007050.13</i> , <i>P14KA</i> , <i>SERPIND1</i> , <i>SNAP29</i> , <b><i>CRKL</i></b> , <i>AC002470.17</i> , <i>AIFM3</i> , <i>LZTR1</i> , <i>THAP7</i> , <i>AC002472.8-201</i> , <i>P2RX6</i> , <i>SLC7A4</i> , <i>P2RX6P</i>

Patienten	Deletionsgröße	Lokalisation	Gene
A32	2,42 Mb	22:17313884-19730795	<i>DGCR2</i> , <i>ACC004471.2</i> , <i>DGCR14</i> , <i>TSSK2</i> , <i>GSC2</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>CLTCL1</i> , <b><i>HIRA</i></b> , <i>MR PL40</i> , <i>C22orf39</i> , <i>UFD1I</i> , <i>CDC45L</i> , <i>CLDN5</i> , <i>SEPT5</i> , <i>GP1BB</i> , <b><i>TBX1</i></b> , <i>GNB1I</i> , <i>C22orf29</i> , <i>TXNRD2</i> , <i>COMT</i> , <i>ARVCF</i> , <i>C22orf25</i> , <i>DGCR8</i> , <i>HTF9C</i> , <i>RANBP1</i> , <i>ZDHHC8</i> , <i>RTN4R</i> , <i>AC007663.29</i> , <i>DGCR6L</i> , <i>AC023490.5</i> , <i>GGTLC3</i> , <i>TMEM191C</i> , <i>P14KAP1</i> , <i>RIMBP3</i> , <i>AC011718.2</i> , <i>AC007731.16-201</i> , <i>AC007731.16-204</i> , <i>USP41</i> , <i>ZNF74</i> , <i>SCARF2</i> , <i>KLHL22</i> , <i>MED15</i> , <i>AC007050.13</i> , <i>P14KA</i> , <i>SERPIND1</i> , <i>SNAP29</i> , <b><i>CRKL</i></b> , <i>AC002470.17</i> , <i>AIFM3</i> , <i>LZTR1</i> , <i>THAP7</i> , <i>AC002472.8-201</i> , <i>P2RX6</i> , <i>SLC7A4</i> , <i>P2RX6P</i>
TDR	etwa 3 Mb	22:17017000-20242000	<i>USP18</i> , <i>AC008132.35</i> , <i>GGT3P</i> , <i>AC008132.13</i> , <i>AC008103.29</i> , <i>DGCR6</i> , <i>PRODH</i> , <i>DGCR2</i> , <i>ACC004471.2</i> , <i>DGCR14</i> , <i>TSSK2</i> , <i>GSC2</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>CLTCL1</i> , <b><i>HIRA</i></b> , <i>MR PL40</i> , <i>C22orf39</i> , <i>UFD1I</i> , <i>CDC45L</i> , <i>CLDN5</i> , <i>SEPT5</i> , <i>GP1BB</i> , <b><i>TBX1</i></b> , <i>GNB1I</i> , <i>C22orf29</i> , <i>TXNRD2</i> , <i>COMT</i> , <i>ARVCF</i> , <i>C22orf25</i> , <i>DGCR8</i> , <i>HTF9C</i> , <i>RANBP1</i> , <i>ZDHHC8</i> , <i>RTN4R</i> , <i>AC007663.29</i> , <i>DGCR6L</i> , <i>AC023490.5</i> , <i>GGTLC3</i> , <i>TMEM191C</i> , <i>P14KAP1</i> , <i>RIMBP3</i> , <i>AC011718.2</i> , <i>AC007731.16-201</i> , <i>AC007731.16-204</i> , <i>USP41</i> , <i>ZNF74</i> , <i>SCARF2</i> , <i>KLHL22</i> , <i>MED15</i> , <i>AC007050.13</i> , <i>P14KA</i> , <i>SERPIND1</i> , <i>SNAP29</i> , <b><i>CRKL</i></b> , <i>AC002470.17</i> , <i>AIFM3</i> , <i>LZTR1</i> , <i>THAP7</i> , <i>AC002472.8-201</i> , <i>P2RX6</i> , <i>SLC7A4</i> , <i>P2RX6P</i> , <i>AC002472.8-202</i> , <i>AP000550.1-201</i> , <i>AP000550.1-202</i> , <i>KB-1592A4.12</i> , <i>GGT2</i> , <i>AP000552.1-201</i> , <i>AP000552.1-202</i> , <i>AP000552.1-204</i> , <i>RIMBP3B</i> , <i>HIC2</i> , <i>AP000557.2</i> , <i>PI4KAP2</i> , <i>RIMBP3C</i>

Patienten	Deletionsgröße	Lokalisation	Gene
1,5 Mb	etwa 1,5 Mb	22:17017000-19068000	<i>USP18</i> , <i>AC008132.35</i> , <i>GGT3P</i> , <i>AC008132.13</i> , <i>AC008103.29</i> , <i>DGCR6</i> , <i>PRODH</i> , <i>DGCR2</i> , <i>ACC004471.2</i> , <i>DGCR14</i> , <i>TSSK2</i> , <i>GSC2</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>CLTCL1</i> , <b><i>HIRA</i></b> , <i>MR PL40</i> , <i>C22orf39</i> , <i>UFD1I</i> , <i>CDC45L</i> , <i>CLDN5</i> , <i>SEPT5</i> , <i>GP1BB</i> , <b><i>TBX1</i></b> , <i>GNB1I</i> , <i>C22orf29</i> , <i>TXNRD2</i> , <i>COMT</i> , <i>ARVCF</i> , <i>C22orf25</i> , <i>DGCR8</i> , <i>HTF9C</i> , <i>RANBP1</i> , <i>ZDHHC8</i> , <i>RTN4R</i> , <i>AC007663.29</i> , <i>DGCR6L</i> , <i>AC023490.5</i> , <i>GGTLC3</i> , <i>TMEM191C</i> , <i>P14KAP1</i> , <i>RIMBP3</i> , <i>AC011718.2</i> , <i>AC007731.16-201</i> , <i>AC007731.16-204</i> , <i>USP41</i>

## 6.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Die Tabelle zeigt die in der Arbeit aufgeführten Abbildungen.

Nummer	Titel der Abbildung	Seite
Abb.1	Patienten mit Mikrodeletionssyndrom 22q11.2: typische Gesichtsdysmorphien.	6
Abb.2	Pathogenese bei Mikrodeletion 22q11.	7
Abb.3	Prinzip der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung.	9
Abb.4	Klinische Symptome der untersuchten Patienten mit del(22)(q11.2) (Gruppe A).	13
Abb.5	Symptome der 53 untersuchten Patienten ohne Mikrodeletion 22q11.2 (Gruppe B).	14
Abb.6	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung der hergestellten Sonden in Kombination mit der 22qtel-Subtelomersonde.	27
Abb.7	Schematische Darstellung Region 22q11.2 und Bindungsbereiche der Sonden 22q11.2 LSI N25 und 22q11.2 LSI TUPLE1.	28
Abb.8	Schematische Darstellung der Hybridisierungsbereiche der verwendeten Sonden im Sequenzbereich von 22q11.2.	32
Abb.9	Schema möglicher Signalmuster der FISH-Sonden.	33
Abb.10	Hybridisierungssignale der Gruppe A: Deletionsgröße 2,4 Mb.	36
Abb.11	Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patientin 32.	37
Abb.12	Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patientin 27.	39
Abb.13	Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patientin 28.	41
Abb.14	Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patient 29.	42
Abb.15	Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patient 30.	43
Abb.16	Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patientin 31.	44
Abb.17	Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patientin 33.	46
Abb.18	Hybridisierungssignale der Gruppe A: Patient 34.	47
Abb.19	Schematische Darstellung der typischen 3 Mb und der selteneren 1,5 Mb Deletion in Bezug auf die für die Patientengruppe A bestimmten Deletionsgrößen.	48
Abb.20	Deletionsgrößen und klinische Symptome der Gruppe A.	49
Abb.21	Hybridisierungssignale der Gruppe B.	51

Die Tabelle zeigt die in der Arbeit aufgeführten Tabellen.

Nummer	Titel der Tabellen	Seite
Tab.1	Häufigkeiten von Symptomen beim Mikrodeletionssyndrom 22q11.2.	5
Tab.2	Bezeichnung, Lokalisation und Größe der BAC-Klone.	18
Tab.3	DOP-PCR Protokoll.	19
Tab.4	Hybridisierungssignale der spezifischen FISH-Sonden der einzelnen Patienten der Gruppe A.	34
Tab.5	Charakterisierte Deletionsbereiche mit Angabe der deletierten Gene.	70

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

ADHA	<b>A</b> ufmerksamkeits <b>d</b> efizit-/ <b>H</b> yperaktivitäts <b>s</b> törung
BAC	<b>b</b> acterial <b>a</b> rtificial <b>c</b> hromosome
bp	Basenpaare
CAFS	<b>C</b> onotruncal <b>a</b> nomaly <b>f</b> ace- <b>S</b> yndrom
CATCH 22	<b>C</b> ardiac abnormality, <b>a</b> bnormal facies, <b>T</b> -cell deficit due to thymic hypoplasia, <b>c</b> left palate, <b>h</b> ypocalcemia due to hypoparathyroidism
cM	<b>C</b> enti <b>m</b> organ
C <sub>0</sub> t	C <sub>0</sub> (concentration) t (time) Human-DNA
Human-DNA	
DGS	DiGeorge-Syndrom
DOP-PCR	<b>d</b> egenerate <b>o</b> ligonucleotide <b>p</b> rimed <b>p</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction
FAS	<b>F</b> etales <b>A</b> lkohol <b>s</b> yndrom
FCS	<b>F</b> etal <b>c</b> alf <b>s</b> erum
FISH	<b>F</b> luoreszenz- <b>i</b> n <b>s</b> itu- <b>H</b> ybridisierung
g	Gramm
HDR	<b>H</b> ypoparathyroidism, <b>D</b> eafness, <b>R</b> enal dysplasia
LCR	<b>L</b> ow <b>c</b> opy <b>r</b> epeats
M	Molar
Mb	Megabase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	<b>M</b> ili <b>m</b> olar
ng	<b>N</b> ano <b>g</b> ramm
PDR	<b>P</b> roximal <b>d</b> eleted <b>r</b> egion
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
rpm	<b>r</b> ounds <b>p</b> er <b>m</b> inute
sec	Sekunde
SGA	<b>S</b> mall for <b>G</b> estational <b>A</b> ge
SSBR	<b>S</b> hared <b>s</b> equences of the <b>b</b> reakpoint <b>r</b> egions
TDR	<b>T</b> ypical <b>d</b> eleted <b>r</b> egion
VCFS	<b>V</b> elo <b>k</b> ardio <b>f</b> aziales- <b>S</b> yndrom
µl	Mikroliter

### 6.4 Stamm- und Gebrauchslösungen

Fixativ	<ul style="list-style-type: none"><li>• 3 Teile Methanol</li><li>• 1 Teil Essigsäure</li></ul>
2xSSC/0,1%NP-40 Waschlösung	<ul style="list-style-type: none"><li>• 100 ml 20xSSC (pH 5,3) und 850ml destilliertes H<sub>2</sub>O mischen</li><li>• 1 ml NP-40 dazugeben</li><li>• pH-Messung; pH 7,0 +/- 0,2 mit NaOH einstellen</li><li>• ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O</li></ul>
2xSSC Waschlösung	<ul style="list-style-type: none"><li>• 100 ml 20xSSC (pH 5,3) und 850ml destilliertes H<sub>2</sub>O mischen</li><li>• pH-Messung; pH 7,0-7,5 mit NaOH einstellen</li><li>• ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O</li></ul>
20xSSC Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"><li>• 87,65 g NaCl</li><li>• 44,1 g Na-Citrat (Tri-Natriumcitrat-2-hydrat)</li><li>• ad 500 ml dH<sub>2</sub>O</li><li>• pH 7,4</li></ul>
10xPBS	<ul style="list-style-type: none"><li>• 80 g NaCl</li><li>• 2 g KCl</li><li>• 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)</li><li>• 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kaliumhydrogenphosphat)</li><li>• ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O</li><li>• pH 7,0</li></ul>
1xPBS	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10 ml 10xPBS</li><li>• 90 ml dH<sub>2</sub>O</li></ul>
1xTBE	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10,8 g TRIS Base</li><li>• 5,5 g Borsäure</li><li>• 0,7 g EDTA-Na<sub>2</sub></li><li>• ad 1000 ml d H<sub>2</sub>O</li><li>• pH 8,0</li></ul>
0,075 M KCL	<ul style="list-style-type: none"><li>• 5,59 g KCL</li><li>• 1000 ml dH<sub>2</sub>O</li></ul>
1 M MgCl <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 4,76 g MgCl<sub>2</sub></li><li>• ad 50 ml dH<sub>2</sub>O</li><li>• steril filtrieren</li></ul>
1% Formaldehydlösung	<ul style="list-style-type: none"><li>• 2,7 ml 37%iges Formaldehyd</li><li>• 10 ml 10xPBS</li><li>• 5 ml 1 MgCl<sub>2</sub></li><li>• 82,3 ml ddH<sub>2</sub>O</li><li>• 100 ml Gesamtvolumen</li></ul>
1,5% Agarosegel	<ul style="list-style-type: none"><li>• 0,525 g Agarose</li><li>• 35 ml 1xTAE</li><li>• 12,25 µl Ethidiumbromid</li></ul>
50xTAE: 2 M Tris-Base, 50 mM EDTA, 5,71% Eisessig	<ul style="list-style-type: none"><li>• 242 g Tris-Base</li><li>• 58 ml Eisessig</li><li>• 18,62 EDTA</li><li>• ad 1000 ml H<sub>2</sub>O</li></ul>
1xTAE	<ul style="list-style-type: none"><li>• 20 ml 50xTAE</li><li>• 980 ml dH<sub>2</sub>O</li></ul>
10xTAE-Ladepuffer	<ul style="list-style-type: none"><li>• 0,1% Bromphenolblau</li><li>• 0,1% Xylencyanol</li><li>• 50% Glycerin in H<sub>2</sub>O</li><li>• 10xTAE</li></ul>

M NaAc	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 29,218 g NaAc</li> <li>• ad 200 ml H<sub>2</sub>O</li> <li>• pH 5,5</li> </ul>
deionisiertes Formamid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 ml Formamid</li> <li>• 5 g Resin (Ionenaustauscher)</li> <li>• 2 h rühren</li> <li>• durch doppelten Filter filtrieren</li> </ul>
Mastermix: 4xSSC, 20% Dextransulfat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 200 µl 20xSSC</li> <li>• 400 µl 50% Dextransulfat</li> <li>• 400 µl dH<sub>2</sub>O</li> </ul>
4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konzentration: 0,066 µg/ml</li> </ul>
100 x TE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 M Tris-Base</li> <li>• 0,1 M EDTA</li> <li>• pH 8,0</li> </ul>

### 6.5 Material-, Geräte- und Softwareliste

Materialien	Bezugsquelle
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Aquarius® 22qtel Subtelomer Specific Probe	Cytocell, Cambridge, Groß Britannien
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Colchizin	Merck, Darmstadt
COT Human DNA	Roche, Basel, Schweiz
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen
Dextransulfat	Pharmacia, Uppsala, Schweden
4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma, Dreisenhofen
DiGeorge Region Probe - LSI® N25	Vysis, Downers Grove, USA
DiGeorge Region Probe - LSI® TUPLE1	Vysis, Downers Grove, USA
DOP-PCR Kit	Roche, Basel, Schweiz
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100%	Riedel-de Haën, Seelze
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Fishperm-DNA	Roche, Basel, Schweiz
Fixogum	Marabu, Tamm
Fluoreszenz-Immersionöl	Zeiss, Oberkochen
Foetales Kälberserum	Gibco, Gaithersburg, USA
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka Chemika, Buchs, Schweiz
Glycerin	Merck, Darmstadt
Ionenaustauscher Resin	Bio-Rad, Richmond, USA
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Grünenthal, Stolberg



## Anhang

---

<i>LymphoGrow</i> (Komplettmedium)	Cytogen, Sinn
Methanol	Riedel-de Haën, Seelze
MgCl <sub>2</sub>	Sigma, Deisenhofen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaAc	Merck, Darmstadt
Na-Citrat	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nick-Translations-Kit	Vysis, Downers Grove, USA
NP-40	Vysis, Downers Grove, USA
Objekträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
<i>PB-Max</i> (Komplettmedium)	Gibco, Gaithersburg, USA
Penicillin	Grünenthal, Stolberg
Phytohämagglutinin (PHA)	Seromed Biochrom KG, Berlin
Ready-Load™ $\phi$ X174RF DNA/ <i>Hae</i> III Fragments	Invitrogen, Karlsruhe
Ready-Load™ 1Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
SpectrumGreen-dUTP	Vysis, Downers Grove, USA
SpectrumOrange-dUTP	Vysis, Downers Grove, USA
Streptomycin	Grünenthal, Stolberg
Synchroset: Lösung A und Lösung B	Euroclone, Pero, Italien
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Vectashield	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Geräte	Firma
Biofuge	Haereus, Hanau
Brutschrank	Ehret, Emmendingen
Elektrophoresekammer	Keutz Laborgeräte, Reiskirchen
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Heizplatte	LHG, Karlsruhe
Horizon 58	Life Technologies, Carlsbad, USA
HYBrite	Vysis, Downers Grove, USA
Mikrowelle	Sharp, Wien, Österreich
Multifuge 3s	Haereus, Hanau
PCR-Maschine	Techne, Burlington, USA
Ultrospec 3000 pro UV/Visible Spectrophotometer	Biochrom Ltd., Cambridge, Groß Britannien
UV-Transilluminator Macro Vue UV-25	Hoefer, Holliston, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel

Software	Firma
Isis	MetaSystems, Altussheim

## 7. Literaturverzeichnis

Adinolfi, M. and Crolla, J. (1994). Nonisotopic in situ hybridization. Clinical cytogenetics and gene mapping applications. *Adv Hum Genet* 22, 187-255.

Aggarwal, V.S. and Morrow, B.E. (2008). Genetic modifiers of the physical malformations in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 14, 19-25.

Amos-Landgraf, J.M., Ji, Y., Gottlieb, W., Depinet, T., Wandstrat, A.E., Cassidy, S.B., Driscoll, D.J., Rogan, P.K., Schwartz, S. and Nicholls, R.D. (1999). Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 65, 370-386.

Arnold, J.S., Werling, U., Braunstein, E.M., Liao, J., Nowotschin, S., Edelmann, W., Hebert, J.M. and Morrow, B.E. (2006). Inactivation of *Tbx1* in the pharyngeal endoderm results in 22q11DS malformations. *Development* 133, 977-987.

Augousseau, S., Jouk, S., Jalbert, P. and Prieur, M. (1986). DiGeorge syndrome and 22q11 rearrangements. *Hum Genet* 74, 206.

Baldini, A. (2005). Dissecting contiguous gene defects: *TBX1*. *Curr Opin Genet Dev* 15, 279-284.

Bartsch, O., Nemeckova, M., Kocarek, E., Wagner, A., Puchmajerova, A., Poppe, M., Ounap, K. and Goetz, P. (2003). DiGeorge/velocardiofacial syndrome: FISH studies of chromosomes 22q11 and 10p14, and clinical reports on the proximal 22q11 deletion. *Am J Med Genet A* 117A, 1-5.

Bartsch, O., Wagner, A., Hinkel, G.K., Lichtner, P., Murken, J. and Schuffenhauer, S. (1999). No evidence for chromosomal microdeletions at the second DiGeorge syndrome locus on 10p near D10S585. *Am J Med Genet* 83, 425-426.

Bassett, A.S., Chow, E.W., Husted, J., Weksberg, R., Caluseriu, O., Webb, G.D. and Gatzoulis, M.A. (2005). Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome. *Am J Med Genet A* 138, 307-313.

Bauman, J.G., Wiegant, J., Borst, P. and van Duijn, P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res* 128, 485-490.

Bearden, C.E., Jawad, A.F., Lynch, D.R., Sokol, S., Kaner, S.J., McDonald-McGinn, D.M., Saitta, S.C., Harris, S.E., Moss, E., Wang, P.P., Zackai, E., Emanuel, B.S. and Simon, T.J. (2004). Effects of a functional *COMT* polymorphism on prefrontal cognitive function in patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Psychiatry* 161, 1700-1702.

Beaujard, M.P., Chantot, S., Dubois, M., Keren, B., Carpentier, W., Mabboux, P., Whalen, S., Vodovar, M., Siffroi, J.P. and Portnoi, M.F. (2009). Atypical deletion of

22q11.2: detection using the FISH TBX1 probe and molecular characterization with high-density SNP arrays. *Eur J Med Genet* 52, 321-327.

Ben-Shachar, S., Ou, Z., Shaw, C.A., Belmont, J.W., Patel, M.S., Hummel, M., Amato, S., Tartaglia, N., Berg, J., Sutton, V.R., Lalani, S.R., Chinault, A.C., Cheung, S.W., Lupski, J.R. and Patel, A. (2008). 22q11.2 distal deletion: a recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome. *Am J Hum Genet* 82, 214-221.

Benke, P.J. (1984). The isotretinoin teratogen syndrome. *JAMA* 251, 3267-3269.

Berend, S.A., Spikes, A.S., Kashork, C.D., Wu, J.M., Daw, S.C., Scambler, P.J. and Shaffer, L.G. (2000). Dual-probe fluorescence in situ hybridization assay for detecting deletions associated with VCFS/DiGeorge syndrome I and DiGeorge syndrome II loci. *Am J Med Genet* 91, 313-317.

Braun, J.T., Franciosi, R.A., Matri, A.R., Drake, R.M. and O'Neil, B.L. (1984). Isotretinoin dysmorphic syndrome. *Lancet* 1, 506-507.

Brigati, D.J., Myerson, D., Leary, J.J., Spalholz, B., Travis, S.Z., Fong, C.K., Hsiung, G.D. and Ward, D.C. (1983). Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology* 126, 32-50.

Brunet, A., Armengol, L., Heine, D., Rosell, J., Garcia-Aragones, M., Gabau, E., Estivill, X. and Guitart, M. (2009). BAC array CGH in patients with Velocardiofacial syndrome-like features reveals genomic aberrations on chromosome region 1q21.1. *BMC Med Genet* 10, 144.

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

Burn, J., Takao, A., Wilson, D., Cross, I., Momma, K., Wadey, R., Scambler, P. and Goodship, J. (1993). Conotruncal anomaly face syndrome is associated with a deletion within chromosome 22q11. *J Med Genet* 30, 822-824.

Buselmaier, W. and Tariverdian, G. (2007). *Humangenetik mit 162 Tabellen*, 4., neu bearb. edn (Heidelberg, Springer-Medizin-Verl.).

Carey, A.H., Kelly, D., Halford, S., Wadey, R., Wilson, D., Goodship, J., Burn, J., Paul, T., Sharkey, A., Dumanski, J. and et al. (1992). Molecular genetic study of the frequency of monosomy 22q11 in DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet* 51, 964-970.

Carlson, C., Sirotkin, H., Pandita, R., Goldberg, R., McKie, J., Wadey, R., Patanjali, S.R., Weissman, S.M., Anyane-Yeboah, K., Warburton, D., Scambler, P., Shprintzen, R., Kucherlapati, R. and Morrow, B.E. (1997). Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet* 61, 620-629.

Chen, C.P., Chern, S.R., Lee, C.C., Lin, S.P., Chang, T.Y. and Wang, W. (2004). Prenatal diagnosis of mosaic 22q11.2 microdeletion. *Prenat Diagn* 24, 660-662.

Chen, K.S., Manian, P., Koeuth, T., Potocki, L., Zhao, Q., Chinault, A.C., Lee, C.C. and Lupski, J.R. (1997). Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. *Nat Genet* 17, 154-163.

Chieffo, C., Garvey, N., Gong, W., Roe, B., Zhang, G., Silver, L., Emanuel, B.S. and Budarf, M.L. (1997). Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse *Tbx1* gene. *Genomics* 43, 267-277.

Coberly, S., Lammer, E. and Alashari, M. (1996). Retinoic acid embryopathy: case report and review of literature. *Pediatr Pathol Lab Med* 16, 823-836.

Consevage, M.W., Seip, J.R., Belchis, D.A., Davis, A.T., Baylen, B.G. and Rogan, P.K. (1996). Association of a mosaic chromosomal 22q11 deletion with hypoplastic left heart syndrome. *Am J Cardiol* 77, 1023-1025.

Cooper, M.D., Peterson, R.D.A. and Good, R.A. (1965). A new concept of the cellular basis of immunology. *The Journal of Pediatrics* 67, 907-908.

Coppinger, J., McDonald-McGinn, D., Zackai, E., Shane, K., Atkin, J.F., Asamoah, A., Leland, R., Weaver, D.D., Lansky-Shafer, S., Schmidt, K., Feldman, H., Cohen, W., Phalin, J., Powell, B., Ballif, B.C., Theisen, A., Geiger, E., Haldeman-Englert, C., Shaikh, T.H., Saitta, S., Bejjani, B.A. and Shaffer, L.G. (2009). Identification of familial and de novo microduplications of 22q11.21-q11.23 distal to the 22q11.21 microdeletion syndrome region. *Hum Mol Genet* 18, 1377-1383.

Cotter, P.D., Nguyen, H., Tung, G. and Rauen, K.A. (2005). Incidence of microduplication 22q11.2 in patients referred for FISH testing for velo cardiofacial and DiGeorge syndromes. *Eur J Hum Genet* 13, 1245-1246.

Cremer, T., Lichter, P., Borden, J., Ward, D.C. and Manuelidis, L. (1988). Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 80, 235-246.

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

Descartes, M., Franklin, J., de Stahl, T.D., Piotrowski, A., Bruder, C.E., Dumanski, J.P., Carroll, A.J. and Mikhail, F.M. (2008). Distal 22q11.2 microduplication encompassing the *BCR* gene. *Am J Med Genet A* 146A, 3075-3081.

DiGeorge, A.M. (1968). Congenital absence of the thymus and its immunologic consequences: concurrence with congenital hypoparathyroidism. *Birth defects : original article series* 1, 116-121.

Driscoll, D.A., Salvin, J., Sellinger, B., Budarf, M.L., McDonald-McGinn, D.M., Zackai, E.H. and Emanuel, B.S. (1993). Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *J Med Genet* 30, 813-817.

Edelmann, L., Pandita, R.K. and Morrow, B.E. (1999a). Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet* 64, 1076-1086.

Edelmann, L., Pandita, R.K., Spiteri, E., Funke, B., Goldberg, R., Palanisamy, N., Chaganti, R.S., Magenis, E., Shprintzen, R.J. and Morrow, B.E. (1999b). A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* 8, 1157-1167.

Ensembl (2010). Chromosome 22: 1-51,304,566. Online einsehbar unter: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/Chromosome?r=22:1-51304566](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=22:1-51304566).

Farrell, M.J., Stadt, H., Wallis, K.T., Scambler, P., Hixon, R.L., Wolfe, R., Leatherbury, L. and Kirby, M.L. (1999). HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is required for cardiac outflow tract septation. *Circ Res* 84, 127-135.

Gall, J.G. and Pardue, M.L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63, 378-383.

Gidding, S.S., Minciotti, A.L. and Langman, C.B. (1988). Unmasking of hypoparathyroidism in familial partial DiGeorge syndrome by challenge with disodium edetate. *N Engl J Med* 319, 1589-1591.

Gijsbers, A.C., Lew, J.Y., Bosch, C.A., Schuurs-Hoeijmakers, J.H., van Haeringen, A., den Hollander, N.S., Kant, S.G., Bijlsma, E.K., Breuning, M.H., Bakker, E. and Ruivenkamp, C.A. (2009). A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet* 17, 1394-1402.

Gong, W., Emanuel, B.S., Collins, J., Kim, D.H., Wang, Z., Chen, F., Zhang, G., Roe, B. and Budarf, M.L. (1996). A transcription map of the DiGeorge and velo-cardio-facial syndrome minimal critical region on 22q11. *Hum Mol Genet* 5, 789-800.

Goodship, J., Cross, I., Scambler, P. and Burn, J. (1995). Monozygotic twins with chromosome 22q11 deletion and discordant phenotype. *J Med Genet* 32, 746-748.

Gosden, J., Hanratty, D., Starling, J., Fantes, J., Mitchell, A. and Porteous, D. (1991). Oligonucleotide-primed in situ DNA synthesis (PRINS): a method for chromosome mapping, banding, and investigation of sequence organization. *Cytogenet Cell Genet* 57, 100-104.

Greenberg, F., Crowder, W.E., Paschall, V., Colon-Linares, J., Lubianski, B. and Ledbetter, D.H. (1984). Familial DiGeorge syndrome and associated partial monosomy of chromosome 22. *Hum Genet* 65, 317-319.

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

Guris, D.L., Duester, G., Papaioannou, V.E. and Imamoto, A. (2006). Dose-dependent interaction of Tbx1 and Crkl and locally aberrant RA signaling in a model of del22q11 syndrome. *Dev Cell* 10, 81-92.

Halder, A., Jain, M., Kabra, M. and Gupta, N. (2008). Mosaic 22q11.2 microdeletion syndrome: diagnosis and clinical manifestations of two cases. *Mol Cytogenet* 1, 18.

Halford, S., Wilson, D.I., Daw, S.C., Roberts, C., Wadey, R., Kamath, S., Wickremasinghe, A., Burn, J., Goodship, J., Mattei, M.G. and et al. (1993). Isolation of a gene expressed during early embryogenesis from the region of 22q11 commonly deleted in DiGeorge syndrome. *Hum Mol Genet* 2, 1577-1582.

Hay, B.N. (2007). Deletion 22q11: spectrum of associated disorders. *Semin Pediatr Neurol* 14, 136-139.

Heiles, H.B., Genersch, E., Kessler, C., Neumann, R. and Eggers, H.J. (1988). In situ hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papillomaviruses (HPV 16/18) in HeLa and SiHa cells. *Biotechniques* 6, 978-981.

Henwood, J., Pickard, C., Leek, J.P., Bennett, C.P., Crow, Y.J., Thompson, J.D., Ahmed, M., Watterson, K.G., Parsons, J.M., Roberts, E. and Lench, N.J. (2001). A region of homozygosity within 22q11.2 associated with congenital heart disease: recessive DiGeorge/velocardiofacial syndrome? *J Med Genet* 38, 533-536.

Hu, T., Yamagishi, H., Maeda, J., McAnally, J., Yamagishi, C. and Srivastava, D. (2004). Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development* 131, 5491-5502.

Jaensch, B. (2002). Über die Mikrodeletion 22q11.2 unter besonderer Berücksichtigung assoziierter Fehlbildungen im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich (Eine Literaturübersicht). In *Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie* (München, Technische Universität München), pp. 73.

Janning, W. and Knust, E. (2004). *Genetik : allgemeine Genetik, molekulare Genetik, Entwicklungsgenetik ; 29 Tabellen* (Stuttgart u.a., Thieme).

Jauch, A., Daumer, C., Lichter, P., Murken, J., Schroeder-Kurth, T. and Cremer, T. (1990). Chromosomal in situ suppression hybridization of human gonosomes and autosomes and its use in clinical cytogenetics. *Hum Genet* 85, 145-150.

Jawad, A.F., McDonald-McGinn, D.M., Zackai, E. and Sullivan, K.E. (2001). Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr* 139, 715-723.

John, H.A., Birnstiel, M.L. and Jones, K.W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223, 582-587.

Kasprzak, L., Der Kaloustian, V.M., Elliott, A.M., Shevell, M., Lejtenyi, C. and Eydoux, P. (1998). Deletion of 22q11 in two brothers with different phenotype. *Am J Med Genet* 75, 288-291.

Kelley, R.I., Zackai, E.H., Emanuel, B.S., Kistenmacher, M., Greenberg, F. and Punnett, H.H. (1982). The association of the DiGeorge anomalad with partial monosomy of chromosome 22. *J Pediatr* 101, 197-200.

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

Kirby, M.L. and Waldo, K.L. (1995). Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* 77, 211-215.

Kobrynski, L.J. and Sullivan, K.E. (2007). Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet* 370, 1443-1452.

Lammer, E.J., Chen, D.T., Hoar, R.M., Agnish, N.D., Benke, P.J., Braun, J.T., Curry, C.J., Fernhoff, P.M., Grix, A.W., Jr., Lott, I.T. and et al. (1985). Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313, 837-841.

Lange-Ernst, M.-E. (2006). Im Mutterleib der Droge Alkohol schutzlos ausgeliefert. Online einsehbar unter:  
[http://www.bvf.de/fach\\_info.php?r=2&m=0&s=0&artid=256](http://www.bvf.de/fach_info.php?r=2&m=0&s=0&artid=256).

Langer, P.R., Waldrop, A.A. and Ward, D.C. (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6633-6637.

Lawrence, J.B., Singer, R.H. and McNeil, J.A. (1990). Interphase and metaphase resolution of different distances within the human dystrophin gene. *Science* 249, 928-932.

Leitch, A.R. (1994). *In situ-Hybridisierung* (Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.).

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

Lichtner, R.B., Wiedemuth, M., Kittmann, A., Ullrich, A., Schirmacher, V. and Khazaie, K. (1992). Ligand-induced activation of epidermal growth factor receptor in intact rat mammary adenocarcinoma cells without detectable receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 267, 11872-11880.

Lindsay, E.A. (2001). Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet* 2, 858-868.

Lindsay, E.A., Goldberg, R., Jurecic, V., Morrow, B., Carlson, C., Kucherlapati, R.S., Shprintzen, R.J. and Baldini, A. (1995a). Velo-cardio-facial syndrome: frequency and extent of 22q11 deletions. *Am J Med Genet* 57, 514-522.

Lindsay, E.A., Greenberg, F., Shaffer, L.G., Shapira, S.K., Scambler, P.J. and Baldini, A. (1995b). Submicroscopic deletions at 22q11.2: variability of the clinical picture and delineation of a commonly deleted region. *Am J Med Genet* 56, 191-197.

Lindsay, E.A., Vitelli, F., Su, H., Morishima, M., Huynh, T., Pramparo, T., Jurecic, V., Ogunrinu, G., Sutherland, H.F., Scambler, P.J., Bradley, A. and Baldini, A. (2001). *Tbx1* haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410, 97-101.

Lupski, J.R., de Oca-Luna, R.M., Slaugenhaupt, S., Pentao, L., Guzzetta, V., Trask, B.J., Saucedo-Cardenas, O., Barker, D.F., Killian, J.M., Garcia, C.A., Chakravarti, A. and Patel, P.I. (1991). DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66, 219-232.

Lux, S.E., Tse, W.T., Menninger, J.C., John, K.M., Harris, P., Shalev, O., Chilcote, R.R., Marchesi, S.L., Watkins, P.C., Bennett, V. and et al. (1990). Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. *Nature* 345, 736-739.

Matsuoka, R., Takao, A., Kimura, M., Imamura, S., Kondo, C., Joh-o, K., Ikeda, K., Nishibatake, M., Ando, M. and Momma, K. (1994). Confirmation that the conotruncal anomaly face syndrome is associated with a deletion within 22q11.2. *Am J Med Genet* 53, 285-289.

McLean-Tooke, A., Spickett, G.P. and Gennery, A.R. (2007). Immunodeficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome. *Scand J Immunol* 66, 1-7.

Merscher, S., Funke, B., Epstein, J.A., Heyer, J., Puech, A., Lu, M.M., Xavier, R.J., Demay, M.B., Russell, R.G., Factor, S., Tokooya, K., Jore, B.S., Lopez, M., Pandita, R.K., Lia, M., Carrion, D., Xu, H., Schorle, H., Kobler, J.B., Scambler, P., Wynshaw-Boris, A., Skoultschi, A.I., Morrow, B.E. and Kucherlapati, R. (2001). *TBX1* is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 104, 619-629.

MGZ-München (2010). Array-CGH.

Naiche, L.A., Harrelson, Z., Kelly, R.G. and Papaioannou, V.E. (2005). T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet* 39, 219-239.

OMIM (2009a). #188400 DIGEORGE SYNDROME; DGS. Online einsehbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=188400>.

OMIM (2009b). #192430 VELOCARDIOFACIAL SYNDROME. Online einsehbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=192430>.

OMIM (2009c). 243440 ISOTRETINOIN EMBRYOPATHY-LIKE SYNDROME. Online einsehbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=243440>.

OMIM (2009d). \*602054 T-BOX 1; *TBX1*. Online einsehbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602054>.



Patel, Z.M., Gawde, H.M. and Khatkhatay, M.I. (2006). 22q11 microdeletion studies in the heart tissue of an abortus involving a familial form of congenital heart disease. *J Clin Lab Anal* 20, 160-163.

Patientenakten. Diagnostik und Untersuchungsbefunde. In Unveröffentlichte Akten (Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH ).

Pavlicek, A., House, R., Gentles, A.J., Jurka, J. and Morrow, B.E. (2005). Traffic of genetic information between segmental duplications flanking the typical 22q11.2 deletion in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome. *Genome Res* 15, 1487-1495.

Paylor, R., Glaser, B., Mupo, A., Ataliotis, P., Spencer, C., Sobotka, A., Sparks, C., Choi, C.H., Oghalai, J., Curran, S., Murphy, K.C., Monks, S., Williams, N., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., Scambler, P.J. and Lindsay, E. (2006). Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7729-7734.

Peoples, R., Franke, Y., Wang, Y.K., Perez-Jurado, L., Paperna, T., Cisco, M. and Francke, U. (2000). A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome--deletion region at 7q11.23. *Am J Hum Genet* 66, 47-68.

Portnoi, M.F. (2009). Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur J Med Genet* 52, 88-93.

Prasad, S.E., Howley, S. and Murphy, K.C. (2008). Candidate genes and the behavioral phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 14, 26-34.

Queisser-Luft, A., Stolz, G., Wiesel, A., Schlaefer, K. and Spranger, J. (2002). Malformations in newborn: results based on 30,940 infants and fetuses from the Mainz congenital birth defect monitoring system (1990-1998). *Arch Gynecol Obstet* 266, 163-167.

Rauch, A., Zink, S., Zweier, C., Thiel, C.T., Koch, A., Rauch, R., Lascorz, J., Huffmeier, U., Weyand, M., Singer, H. and Hofbeck, M. (2005). Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet* 42, 871-876.

Roa, B.B., Garcia, C.A., Pentao, L., Killian, J.M., Trask, B.J., Suter, U., Snipes, G.J., Ortiz-Lopez, R., Shooter, E.M., Patel, P.I. and Lupski, J.R. (1993). Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 5, 189-194.

Rosa, F.W., Wilk, A.L. and Kelsey, F.O. (1986). Teratogen update: vitamin A congeners. *Teratology* 33, 355-364.

Ryan, A.K., Goodship, J.A., Wilson, D.I., Philip, N., Levy, A., Seidel, H., Schuffenhauer, S., Oechsler, H., Belohradsky, B., Prieur, M., Aurias, A., Raymond, F.L., Clayton-Smith, J., Hatchwell, E., McKeown, C., Beemer, F.A., Dallapiccola, B., Novelli, G., Hurst, J.A., Ignatius, J., Green, A.J., Winter, R.M., Brueton, L., Brondum-Nielsen, K., Scambler, P.J. and et al. (1997). Spectrum of clinical features associated

with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* 34, 798-804.

Sandrin-Garcia, P., Abramides, D.V., Martelli, L.R., Ramos, E.S., Richieri-Costa, A. and Passos, G.A. (2007). Typical phenotypic spectrum of velocardiofacial syndrome occurs independently of deletion size in chromosome 22q11.2. *Mol Cell Biochem* 303, 9-17.

Scambler, P.J., Kelly, D., Lindsay, E., Williamson, R., Goldberg, R., Shprintzen, R., Wilson, D.I., Goodship, J.A., Cross, I.E. and Burn, J. (1992). Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet* 339, 1138-1139.

Schneider, H., Husslein, P. and Schneider, K.-T.M. (2011). *Die Geburtshilfe, Vol 4* (Berlin, Heidelberg, Springer).

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

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

Shaffer, L.G., Kennedy, G.M., Spikes, A.S. and Lupski, J.R. (1997). Diagnosis of CMT1A duplications and HNPP deletions by interphase FISH: implications for testing in the cytogenetics laboratory. *Am J Med Genet* 69, 325-331.

Shaikh, T.H., Kurahashi, H., Saitta, S.C., O'Hare, A.M., Hu, P., Roe, B.A., Driscoll, D.A., McDonald-McGinn, D.M., Zackai, E.H., Budarf, M.L. and Emanuel, B.S. (2000). Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* 9, 489-501.

Shaikh, T.H., O'Connor, R.J., Pierpont, M.E., McGrath, J., Hacker, A.M., Nimmakayalu, M., Geiger, E., Emanuel, B.S. and Saitta, S.C. (2007). Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. *Genome Res* 17, 482-491.

Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. and Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8794-8797.

Shprintzen, R.J. (2008). Velo-cardio-facial syndrome: 30 Years of study. *Dev Disabil Res Rev* 14, 3-10.

Shprintzen, R.J., Goldberg, R.B., Young, D. and Wolford, L. (1981). The velo-cardio-facial syndrome: a clinical and genetic analysis. *Pediatrics* 67, 167-172.

Stark, K.L., Xu, B., Bagchi, A., Lai, W.S., Liu, H., Hsu, R., Wan, X., Pavlidis, P., Mills, A.A., Karayiorgou, M. and Gogos, J.A. (2008). Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat Genet* 40, 751-760.

Swillen, A., Devriendt, K., Legius, E., Eyskens, B., Dumoulin, M., Gewillig, M. and Fryns, J.P. (1997). Intelligence and psychosocial adjustment in velocardiofacial syndrome: a study of 37 children and adolescents with VCFS. *J Med Genet* 34, 453-458.

Theveniau-Ruissy, M., Dandonneau, M., Mesbah, K., Ghez, O., Mattei, M.G., Miquerol, L. and Kelly, R.G. (2008). The del22q11.2 candidate gene *Tbx1* controls regional outflow tract identity and coronary artery patterning. *Circ Res* 103, 142-148.

Thomas, J.A. and Graham, J.M., Jr. (1997). Chromosomes 22q11 deletion syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)* 36, 253-266.

Thuresson, A.C., Bondeson, M.L., Edeby, C., Ellis, P., Langford, C., Dumanski, J.P. and Anneren, G. (2007). Whole-genome array-CGH for detection of submicroscopic chromosomal imbalances in children with mental retardation. *Cytogenet Genome Res* 118, 1-7.

Tokuyasu, T.A., Cotter, P.D., Segraves, R., Harris, J., Elder, M.E., Gonzales, M., Pinkel, D., Albertson, D.G. and Rauen, K.A. (2007). Detection of single clone deletions using array CGH: identification of submicroscopic deletions in the 22q11.2 deletion syndrome as a model system. *Am J Med Genet A* 143A, 925-932.

Torres-Juan, L., Rosell, J., Sanchez-de-la-Torre, M., Fibla, J. and Heine-Suner, D. (2007). Analysis of meiotic recombination in 22q11.2, a region that frequently undergoes deletions and duplications. *BMC Med Genet* 8, 14.

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

Trask, B.J., Allen, S., Massa, H., Fertitta, A., Sachs, R., van den Engh, G. and Wu, M. (1993). Studies of metaphase and interphase chromosomes using fluorescence in situ hybridization. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 767-775.

UCSC (2009). Human (*Homo sapiens*) Genome Browser Gateway. Online einsehbar unter: <http://genome.ucsc.edu/>.

Uddin, R.K., Zhang, Y., Siu, V.M., Fan, Y.S., O'Reilly, R.L., Rao, J. and Singh, S.M. (2006). Breakpoint Associated with a novel 2.3 Mb deletion in the VCFS region of 22q11 and the role of Alu (SINE) in recurring microdeletions. *BMC Med Genet* 7, 18.

Valsangiacomo, E. (2009). Das "Chromosom 22q11 Deletion" Syndrom. Online einsehbar unter: <http://www.swiss-paediatrics.org/paediatrica/vol11/n1/chr22q11del-ge.htm#3>.

van den Engh, G., Sachs, R. and Trask, B.J. (1992). Estimating genomic distance from DNA sequence location in cell nuclei by a random walk model. *Science* 257, 1410-1412.

VCFS (2009). Specialist Fact Sheet. Online einsehbar unter: [www.vcfsef.org](http://www.vcfsef.org).

Vincent, M.C., Heitz, F., Tricoire, J., Bourrouillou, G., Kuhlein, E., Rolland, M. and Calvas, P. (1999). 22q11 deletion in DGS/VCFS monozygotische Zwillinge mit diskordanten Phänotypen. *Genet Couns* 10, 43-49.

Wiedemann, H.-R. and Kunze, J. (2001a). Atlas der klinischen Syndrome für Klinik und Praxis, 5., völlig überarb. u. erw. edn (Stuttgart u.a., Schattauer).

Wiedemann, H.-R. and Kunze, J. (2001b). Atlas der klinischen Syndrome für Klinik und Praxis, 5., völlig überarb. und erw. Aufl. / neu bearb. von Jürgen Kunze edn (Stuttgart, Schattauer).

Wilson, D.I., Burn, J., Scambler, P. and Goodship, J. (1993a). DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet* 30, 852-856.

Wilson, D.I., Goodship, J.A., Burn, J., Cross, I.E. and Scambler, P.J. (1992). Deletions within chromosome 22q11 in familial congenital heart disease. *Lancet* 340, 573-575.

Wilson, T.A., Blethen, S.L., Vallone, A., Alenick, D.S., Nolan, P., Katz, A., Amorillo, T.P., Goldmuntz, E., Emanuel, B.S. and Driscoll, D.A. (1993b). DiGeorge anomaly with renal agenesis in infants of mothers with diabetes. *Am J Med Genet* 47, 1078-1082.

Worthington, S., Colley, A., Fagan, K., Dai, K. and Lipson, A.H. (1997). Anal anomalies: an uncommon feature of velocardiofacial (Shprintzen) syndrome? *J Med Genet* 34, 79-82.

Yagi, H., Furutani, Y., Hamada, H., Sasaki, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Ichida, F., Joo, K., Kimura, M., Imamura, S., Kamatani, N., Momma, K., Takao, A., Nakazawa, M., Shimizu, N. and Matsuoka, R. (2003). Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet* 362, 1366-1373.

Yamagishi, H. (2002). The 22q11.2 deletion syndrome. *Keio J Med* 51, 77-88.

Yamagishi, H., Garg, V., Matsuoka, R., Thomas, T. and Srivastava, D. (1999). A molecular pathway revealing a genetic basis for human cardiac and craniofacial defects. *Science* 283, 1158-1161.

Yobb, T.M., Somerville, M.J., Willatt, L., Firth, H.V., Harrison, K., MacKenzie, J., Gallo, N., Morrow, B.E., Shaffer, L.G., Babcock, M., Chernos, J., Bernier, F., Sryszak, K., Christiansen, J., Haase, S., Elyas, B., Lilley, M., Bamforth, S. and McDermid, H.E. (2005). Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome. *Am J Hum Genet* 76, 865-876.

Zhang, L., Zhong, T., Wang, Y., Jiang, Q., Song, H. and Gui, Y. (2006). TBX1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is inhibited by retinoic acid. *Int J Dev Biol* 50, 55-61.

Zhang, Z., Cerrato, F., Xu, H., Vitelli, F., Morishima, M., Vincentz, J., Furuta, Y., Ma, L., Martin, J.F., Baldini, A. and Lindsay, E. (2005). Tbx1 expression in pharyngeal epithelia is necessary for pharyngeal arch artery development. *Development* 132, 5307-5315.

## **8. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Chan Hee Lischke: Ich habe vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

Ort, Datum

## **9. Veröffentlichung**

Poster: „Re-Investigations in Patients with the 22q11.2 Microdeletion“, Chan Hee Lischke und Dr. Angelika Köhler, 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2006

## **10. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Müller danke ich vielmals für das interessante Thema der Arbeit, sowie die sehr freundliche Aufnahme in seinem Institut.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Angelika Köhler für die kontinuierliche und zeitaufwendige Betreuung dieser Arbeit und ihrer kompetenten und familiären Unterstützung während des gesamten Bearbeitungszeitraumes der Arbeit.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte danke ich für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung in molekulargenetischen Fragen.

Frau Dr. rer. nat. Barbara Fritz des Zentrums für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg danke ich für die Bereitstellung der Proben von Patienten mit Mikrodeletionssyndrom 22q11.2.

Des Weiteren gilt besonderer Dank Herrn Dr. med. Andreas Tzschach des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik, Berlin für die freundliche Bereitstellung der BAC-Klone.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die nette und angenehme Arbeitsatmosphäre im Institut. Insbesondere möchte ich Frau Dr. rer. biol. hum. Ilona Dietze für ihre Hilfsbereitschaft bei Fragen zur Durchführung von Methoden danken.

Ich danke meinen Eltern, Herrn Prof. Dr. Gottfried Lischke und Frau Gabriele Lischke-Naumman, die mir mein Studium bis hin zur Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Herrn Lawrence Lang, für die Unterstützung und Motivation während der gesamten Zeit. Für das Korrekturlesen meiner Arbeit danke ich meinem Lebensgefährten Herrn Lawrence Lang, Herrn Gerd Rös, Herrn Dr. Marten Szibor, Frau Katharina Sames und meinen Eltern.