

Etablierung von DNA-Sonden zur Detektion
numerischer und struktureller Aberrationen der
Chromosomen 13, 21 und 22 mittels
Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (rer. nat.)

Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld

vorgelegt von Daniela Ehling
aus Minden

Januar 2003

Für meine Eltern

0 Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Chromosomenaberrationen	2
2.1.1 Numerische Chromosomenaberrationen	3
2.1.2 Strukturelle Chromosomenaberrationen	3
2.2 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	3
2.3 Numerische und strukturelle Aberrationen des Chromosoms 13	7
2.3.1 Trisomie 13	7
2.3.2 13q- Syndrom	7
2.4 Numerische und strukturelle Aberrationen des Chromosoms 21	8
2.4.1 Trisomie 21	8
2.4.2 Monosomie 21 und partielle Monosomie 21	9
2.5 Strukturelle Aberrationen des Chromosoms 22	10
2.5.1 Mikrodeletions Syndrome DGS/VCFS	10
2.6 Ziel der Arbeit	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Material	13
3.1.1 Humane BAC-Bank	13
3.1.1.1 DNA-Klone anderer Institute	13
3.1.1.2 Zentromer-Proben und WCP21	14
3.1.2 Humane YAC-Bank	14
3.1.3 Oligonukleotide	15
3.1.4 DNA-Längenstandard	18
3.1.5 Enzyme	18
3.1.6 Reagenzien und Antikörper für den Fluoreszenznachweis	18
3.1.7 Verwendete käufliche Systeme (Kit)	19
3.1.8 Chromosom 22 Probenmaterial	19
3.1.9 Zelllinien	19
3.1.10 Zellkulturmedien und Zusätze	19
3.1.11 Medienzusammensetzung	20
3.1.12 Verwendete Datenbanken	20
3.2 Methoden	21
3.2.1 Kultivierung von Bakterienzellen	21
3.2.2 Glycerinkulturen	21
3.2.3 Kultivierung von Zellen	21
3.2.3.1 Subkultivierung von Zellen	21

3.2.3.2 Kryokonservierung von Zellen	22
3.2.3.3 Auftauen von Zellen	22
3.2.4 Chromosomenpräparation aus peripherem Blut	23
3.2.5 May-Grünwald/Giemsa-Färbung	24
3.2.6 DNA-Präparationsmethoden	24
3.2.6.1 Alkalische Lyse	24
3.2.6.2 Plasmid-Maxipräparation (Macherey-Nagel, Düren)	25
3.2.7 Konzentrationsbestimmung isolierter Nukleinsäuren	27
3.2.8 DNA Aufreinigung aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit	27
3.2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten	28
3.2.10 Restriktionsspaltung	28
3.2.11 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	29
3.2.11.1 Agarose-Gelelektrophorese	29
3.2.11.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	30
3.2.11.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.2.12.1 Standard-PCR	32
3.2.12.2 PCR für das Durchmustern einer BAC-Bibliothek	33
3.2.12.3 Kolonie-PCR	33
3.2.12.4 Halb-quantitative PCR	34
3.2.12.5 Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR (DOP-PCR)	34
3.2.13 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	36
3.2.13.1 Markierung der DNA-Sonden durch DOP-PCR	36
3.2.13.2 Markierung der DNA-Sonden durch Nick-Translation	36
3.2.13.3 Markierung der DNA-Sonden durch BioPrime (LifeTechnologies)	37
3.2.13.4 Aufarbeitung der markierten DNA-Sonden	38
3.2.13.5 Vorbehandlung und Denaturierung der Chromosomenpräparate	39
3.2.13.6 Hybridisierung	40
3.2.13.7 Waschen der hybridisierten Chromosomenpräparate	40
3.2.13.8 Detektion der Biotin bzw. Digoxigenin markierter DNA-Sonden	40
3.2.13.9 Gegenfärbung der DNA	41
3.2.13.10 Fluoreszenzmikroskopie und Dokumentation	41
3.3 Fallbeschreibungen	41
3.3.1 Patientin CMI (partielle Trisomie 21)	41
3.3.2 Patientin JP (partielle Monosomie 21)	42
3.3.3 Patient SR (partielle Monosomie 21)	44

4 Ergebnisse	46
4.1 Etablierung von BAC-Klonen für die Chromosomen 13, 21 und 22	46
4.1.1 Chromosom 13 spezifische BACs	46
4.1.1.1 Anwendungsbeispiel für Chromosom 13 spezifische BACs	50
4.1.2 Chromosom 21 spezifische BACs	50
4.1.2.1 Anwendungsbeispiel Chromosom 21 spezifische BACs	56
4.1.3 Chromosom 22 spezifische BACs	57
4.1.3.1 Anwendungsbeispiel Chromosom 22 BACs	60
4.2 Nachweis von Deletion in 22q11 an Patientenmaterial	61
4.3 Charakterisierung des Bruchpunktintervalls einer partiellen Trisomie des Chromosoms 21 (CMI)	64
4.3.1.1 Ergebnisse der Hybridisierungen mit FISH-Sonden der Banden 21q21.1-q21.3 (Patientin CMI)	65
4.3.1.2 Ergebnisse der Hybridisierungen mit FISH-Sonden der Banden 21q22.11-q22.12 (Patientin CMI)	66
4.3.1.3 Ergebnisse der FISH-Analysen von 21q22.13-q22.3 (Patientin CMI)	67
4.3.1.4 Ergebnisse der Hybridisierungen an mütterlichen Chromosomen mit einer reziproken Translokation t(16;21)(q24;q22)	68
4.3.1.5 Ergebnisse der FISH-Analysen mit einem Chromosom 16q23.2 spezifischen YAC (Patientin CMI, Mutter)	70
4.3.2 Molekulargenetische Analysen der Patientin CMI und deren Eltern	72
4.4 Bruchpunktanalysen in zwei Fällen partieller Monosomie 21	76
4.4.1 FISH-Analysen zur Aufklärung der Deletionsregion von Patientin JP	76
4.4.1.1 Eingrenzung der Bruchpunktregion mit YAC-Klonen (Patientin JP)	77
4.4.1.2 Eingrenzung der Bruchpunktregion mit ETS2 spezifischen Klonen (Patientin JP)	78
4.4.1.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion mit Einzelkopie FISH-Sonden (Patientin JP)	80
4.4.1.4 Mikrosatellitenanalysen der Patientin JP und der Eltern	83
4.4.2 FISH-Analyse der partiellen Monosomie 21 (Patient SR)	87
5 Diskussion	90
5.1 Vorteile von BAC-Klonen für die FISH	90
5.2 Chromosom 13 spezifische BACs	91
5.3 Chromosom 21 spezifische BACs	95
5.4 Chromosom 22 spezifische BACs	99
5.5 FISH-Analysen von Patienten mit einer Deletion in 22q11	102
5.6 Molekular zytogenetische Analysen der Patientin CMI mit einer partiellen Trisomie 21	103
5.6.1 Vergleiche der partiellen Trisomie 21 von CMI mit anderen Fällen	104
5.7 Molekular zytogenetische Analysen der Patienten JP und SR mit einer partiellen Monosomie 21	109

5.7.1 Vergleiche der partiellen Monosomien 21 von JP und SR mit anderen Fällen	110
5.8 Haplotypen Analysen der partiellen Trisomie 21 (CMI) und der partiellen Monosomien 21 (JP)	116
5.9 Schlußbemerkungen	119
6 Literaturverzeichnis	120
7 Anhang	134

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden regionspezifische BAC-Klone (bacterial artificial chromosome) für die Chromosomen 13, 21 und 22 etabliert. Die BAC-Klone wurden isoliert, um sie in der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) als DNA-Sonden zur Detektion von numerischen Chromosomenaberrationen (Trisomie 13 und 21) einzusetzen. Außerdem wurden BAC-Klone für den Nachweis von strukturellen Chromosomenaberrationen (DiGeorge-/Velokardiofaziales-Syndrom und '13q- Syndrom') etabliert.

Es wurde eine BAC-Bank mit der Methode der PCR unter Verwendung von Mikrosatellitenmarkern, STS Markern und eigens generierten Primern durchmustert. Die Regionspezifität der isolierten BACs wurde mit FISH-Analysen, Restriktionsanalysen und mit BAC-Endsequenzierungen bestätigt. Die Anwendbarkeit der generierten DNA-Sonden wurde an Blutlymphozyten, Nabelschnurblut und Amnionzellen gezeigt. Die DNA-Sonden der Mikrodeletionsregion 22q11 ließen sich an Patientenmaterial auf ihre Spezifität hin testen, indem sie bereits dokumentierte Deletionen verifizierten.

Im weiteren wurden molekular zytogenetische Analysen zur Charakterisierung einer partiellen Trisomie 21 (CMI) und zwei partiellen Monosomien 21 (JP, SR) durchgeführt. Bei der partiellen Trisomie 21 mit dem Karyotyp 47,XX,der(21),t(16;21)(q23.2;q22.11)mat und einem milden Down-Syndrom Phänotyp zeigte sich, dass die trisome Region 21q11-q22.11 eine Größe von ca. 19 Mb hat. Der Translokationsbruchpunkt wurde innerhalb eines 80 kb großen Intervalls zwischen den Markern D21S1682 und D21S390 in 21q22.11 kartiert.

Die zwei Fälle von *de novo* entstandenen, reinen partiellen Monosomien 21, deren Deletionen zytogenetisch sichtbar waren, wiesen einen milden Phänotyp auf. Bei der Patientin JP (46,XX,del(21)(q22.2-qter)pat) ließ sich der Deletionsbruchpunkt mit Einzelkopie FISH-Sonden bis auf ein Intervall von 5,2 kb im Gen ETS2 (V-ETS avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2) kartieren und die Deletionsgröße betrug ca. 7,5 Mb.

In dem anderen Fall (SR, 46,XY,del(21)(q22.2q22.3)) handelte es sich um eine interstitielle Deletion mit einer Größe von 5 bis 7,5 Mb. Der proximale Bruchpunkt wurde in einem ca. 410 kb großen Intervall zwischen D21S159 und D21S346 lokalisiert und der distale Bruchpunkt befindet sich in 21q22.3 in einem Bereich von ca. 2,5 Mb proximal vom Telomer.

2 Einleitung

2.1 Chromosomenaberrationen

Bei den Chromosomenaberrationen unterscheidet man prinzipiell die numerischen, die eine veränderte Chromosomenzahl beschreiben, von den strukturellen Veränderungen, die veränderte Chromosomensegmente beinhalten. Unterschieden wird zudem die konstitutionelle von der somatischen Aberration. Als konstitutionell bezeichnet man eine chromosomale Veränderung, wenn sie in der Keimzelle oder deren Vorläufern auftritt, und somit weitervererbt werden kann. Treten die Veränderungen in somatischen Zellen auf, so können Apoptose, funktionell veränderte Zellpopulationen oder maligne Entartungen die Folge sein. Diese Veränderungen werden allerdings nicht an die Nachkommen weiter gegeben.

2.1.1 Numerische Chromosomenaberrationen

Die numerischen Chromosomenaberrationen umfassen die veränderte Anzahl einzelner Chromosomen (Aneuploidie), hier unterscheidet man die Hyperploidie (überzählige Chromosomen) von den Hypoploidien (verringerte Chromosomenzahl). Ist der gesamte haploide Chromosomensatz vervielfältigt so wird dies als Polyploidie bezeichnet.

Die häufigste Ursache für numerische Chromosomenaberrationen ist das Nichtauseinanderweichen (Nondisjunction) zweier homologer Chromosomen in der ersten oder zweiten meiotischen Teilung. Die daraus entstehenden aneuploiden Gameten bilden nach der Befruchtung aneuploide Zygoten. Findet eine Fehlverteilung in der 1. meiotischen Teilung statt, so resultieren daraus disome (zwei homologe Chromatiden) bzw. monosome Gameten. Bei einem Nondisjunction in der 2. meiotischen Teilung entstehen zwei normale Gameten, ein disomer (zwei Schwesterchromatiden) und ein monosomer Gamet. Nach der Befruchtung aneuploider Gameten mit einem normalen Gameten entstehen daraus trisome bzw. monosome Zygoten (Murken, 1996; Buselmaier, 1999).

Im Unterschied dazu führen Chromosomenveränderungen nach der Befruchtung zu einem Mosaik in den Somazellen. Je später, die Fehlverteilungen in der Embryonalentwicklung erfolgen, um so geringer ist der Anteil aneuploider Zelllinien. Weiterhin wurde auch der Mechanismus einer postzygotischen Korrektur von numerischen Aberrationen beobachtet. Bei einer trisom angelegten Zygote kann es postmeiotisch zu einem Chromosomenverlust kommen, der dann zu diploiden Zelllinien führen kann.

Es wurde gezeigt, dass die Häufigkeit meiotischer Nondisjunction mit zunehmendem Alter der Mutter vermehrt auftreten (Hook, 1983). Ein altersabhängiger Effekt konnte bei Männern bisher nur für das Klinefelter-Syndrom (47,XXY) nachgewiesen werden.

Die Chromosomenaberrationen, die Autosomen betreffend, bewirken multiple Fehlbildungen, kraniofaziale Dysmorphien, schwere geistige und motorische Entwicklungsstörungen.

2.1.2 Strukturelle Chromosomenaberrationen

Bei den strukturellen Aberrationen unterteilt man in intrachromosomale und interchromosomale Umbauten. Bleibt die Gesamtmenge des genetischen Materials im wesentlichen unverändert, spricht man von einer balancierten Chromosomenaberration und es zeigen sich meist keine phänotypischen Auswirkungen. Allerdings haben die Träger solcher balancierten Chromosomenaberrationen ein erhöhtes Risiko für Nachkommen mit einem unbalancierten Chromosomensatz. Bei solchen strukturellen Aberrationen wurden auch Deletionen durch die Chromosomenumbauten und Chromosomenbrüche beobachtet, die zu einem unbalancierten Karyotyp führen und ein Verlust von genetischen Material darstellen. Solche unbalancierten strukturellen Aberrationen zeigen häufig phänotypische Auswirkungen und die Träger haben häufig keine Nachkommen.

Wichtige Strukturveränderungen sind Translokation, Inversion, Deletion, Insertion, Duplikation, Ringchromosom und Isochromosom. Terminale und interstitielle Deletionen, im Größenbereich von 1-40 Mb, sind häufig mit Entwicklungsdefekten assoziiert. Ein Beispiel ist die Mikrodeletionsregion in 22q11, in der Deletion, mit einer Größe bis 3 Mb, zum DiGeorge-Syndrom (DGS) bzw. zum Velokardiofazialen-Syndrom (VCFS) führen können und diese mit einer Häufigkeit von 1:4000 auftreten (Murken,1996; Buselmaier, 1999).

2.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die biologische Forschung wurde durch die *in situ* Hybridisierung (ISH) einen erheblichen Schritt nach vorn gebracht, denn durch die Kombination der Zytogenetik und der molekulargenetischen Techniken gelang es Nukleinsäuresequenzen innerhalb von Zellen darzustellen, ohne diese in ihrer Morphologie zu verändern. Die Technik beruht auf der Interaktion von markierter einzelsträngiger DNA oder RNA mit der komplementären und einzelsträngigen Zielsequenz, diese können Metaphasechromosomen, Interphasekerne oder mRNA sein, die auf einem Objektträger fixiert sind (*in situ*) (Gall and Pardue, 1969; John et al., 1969).

Anfänglich wurden radioaktiv markierte Proben verwendet, deren Nachteil in dem zeitlichen Aufwand der Signaldetektion und einem sehr starken Hintergrund bestanden (Luke et al., 1997).

Pinkel et al. führte 1986 die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ein, die nicht-radioaktiv markierte DNA-Sonden verwendete. Eine Möglichkeit besteht in dem Einbau von nicht-fluoreszierenden Molekülen wie Biotin oder Digoxigenin in die DNA. Die Detektion erfolgt dann durch eine Kaskade von fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Bauman et al., 1980; Lichter et al., 1992).

Eine Möglichkeit genomische DNA oder große, klonierte Vektor-DNA zu markieren ist die Nicktranslation, hier werden über die Enzyme DNaseI und DNA-PolymeraseI z.B. Haptene (Biotin/Digoxigenin) in die DNA eingebaut (Rigby et al., 1977) auf ähnliche Weise können auch fluoreszenzmarkierte dNTPs in die DNA eingebaut werden (Wiegant et al., 1991).

Die Methode der PCR (Polymerase chain reaction, Saiki et al., 1985, 1988) eröffnete die Möglichkeit genomische DNA, sortierte Chromosomen oder Fragmente einer Mikrodissektion wie auch BAC-/YAC-Klone innerhalb kurzer Zeit zu markieren. Es werden Nukleotide, gekoppelt mit einem Fluorophor, in die DNA eingebaut. Kleine Mengen DNA können zuvor amplifiziert werden, um anschließend ausreichend DNA zur Verfügung zu haben. Die Amplifikation humaner DNA aus somatischen Hybrid-Zelllinien oder die Amplifikation von YAC-Klonen kann über die Alu-PCR oder IRS-PCR (interspersed repetitive sequence PCR) erfolgen (Lengauer et al., 1992). Eine andere Möglichkeit der Markierung und Amplifikation besteht mit der DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed PCR), die degenerierte Oligonukleotide für die Amplifikation verwendet (Telenius et al., 1992).

Die Methode der FISH etablierte sich als Technik sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Diagnostik (Gosden et al., 1991; Adinolfi and Crolla, 1994; Nath et al., 1995).

FISH-Sonden werden in der Forschung z.B. zur Lokalisation von Genen und Genomorganisation verwendet. Die FISH ermöglicht an Metaphasechromosomen eine direkte Zuordnung von spezifischen DNA Sequenzen innerhalb eines Chromosoms und ermöglichte so auch die Kartierung von Genen und ergänzte die physikalische Karten des Genoms (Gingerich et al., 1993). In der klinischen prä- und postnatalen molekularen Zytogenetik werden FISH-Sonden zur Analyse von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen, aber auch in der Tumorzytogenetik, zur Identifikation von Mikrodeletionen oder Mikroduplikationen eingesetzt.

In der klinischen Diagnostik wird die FISH wegen ihres besseren Auflösungsvermögens gegenüber den herkömmlichen Bandierungen der Chromosomen eingesetzt (Caspersson et al., 1970; ISCN, 1995). Zytogenetische Analysen können bei einer Auflösung von 400 bis 550 Banden keine Rearrangements mit einer Größe unter 5 Mb aufklären, und bei größeren Fragmenten können nicht unterscheidbare Banden eine Aufklärung erschweren (Knight and Flint, 2000). FISH-Analysen mit chromosomenspezifischen Proben werden im Gegensatz zur klassischen Bandierungsanalyse von Metaphasechromosomen auch erfolgreich an Interphasekernen durchgeführt (Cremer et al., 1988; Cremer et al., 1990; Jauch et al., 1990).

Neben den FISH-Analysen an Metaphasechromosomen wird die FISH an Interphasekernen mit einer zehnfach höheren Auflösung für einige Applikationen favorisiert (Trask et al., 1991). An Metaphasen können z.B. Kartierungen von Genen nur mit einer Auflösung von ~3 Mb vorgenommen werden (Lichter et al., 1990), die aber durch die Anordnung von zwei verschiedenfarbigen Proben mit einem Abstand von 1-1,5 Mb erhöht werden kann (Lawrence et al., 1990; Trask et al., 1993). Es ist möglich in der Interphase FISH-Sonden mit einem Abstand von mehr als 100 kb als zwei Signale zu erkennen. Dies ist wichtig bei der Analyse von zwei unterschiedlichen FISH-Sonden, die sich auf dem gleichen Chromosomenabschnitt befinden (Trask et al., 1989).

Es ist möglich mit der Interphase FISH durch die verbesserte Auflösung Duplikationen bis ~1 Mb zu detektieren, was an Metaphasen nicht gegeben ist (Lupski et al., 1991). Dagegen ist die Interphase FISH bei großen Inversionen (>2 Mb) nur bedingt einsetzbar, denn die Signale können nicht ohne Distanzmessungen von Translokationen unterschieden werden (Lawrence et al., 1990; Trask et al., 1993; Trask et al., 1991). In der Präimplantations Diagnostik kommen Subtelomer FISH-Sonden oder bruchpunktüberspannende FISH-Sonden zum Einsatz (Knight and Flint, 2000; Munne et al., 2000). Mit diesen Proben ist es möglich Translokationen als auch Inversionen an Polkörperchen und frühen Embryonen zu bestimmen (Iwarsson et al., 2000; Fung et al., 2001; Escudero et al., 2001).

Die Anwendung von chromosomenspezifischen FISH-Sonden macht es möglich z.B. in der pränatalen Diagnostik Aneuploidien an Interphase-Zellkernen aus Amniozentesen oder Chorionzottenbiopsien zu bestimmen. Hauptsächlich werden numerischen Aberrationen der Chromosomen 18, X und Y mit Zentromerproben nachgewiesen. Zentromerproben werden nicht für die Detektion der Chromosomen 13 und 21 verwendet, da es aufgrund von homologen Sequenzen der Zentromere zu Kreuzhybridisierungen in der FISH kommt; das

gleiche gilt auch für die Zentromere der Chromosomen 14 und 22 (Jorgensen et al., 1987; Jorgensen et al., 1988; McDermid et al., 1986). Die Aneuploidien der Chromosomen 13 und 21 werden deshalb mit locusspezifischen Proben detektiert. Der sog. FISH-Schnelltest ermöglicht ein Ergebnis innerhalb von 6-8 Stunden, hingegen verwendet man für die konventionelle Langzeitkultur 7-12 Tage. In klinischen Studien konnte die zuverlässige Anwendung des FISH-Schnelltests für die in ihrer Gesamtheit am häufigsten (80-95%) auftretenden Aneuploidien der Chromosomen 13, 18, 21, X und Y gezeigt werden (Eiben et al., 1999; Morris et al., 1999; Pergament et al., 2000).

Deletionen und besonders Mikrodeletionen lassen sich in der Interphase-FISH mit qualitativ hochwertigen und effizienten Proben durch das Fehlen eines Signals nachweisen. Der Nachweis wird erleichtert, wenn eine zusätzliche FISH-Sonde für die Hybridisierungseffizienz auf dem gleichen Chromosom eingesetzt wird (Lux et al., 1990; Roa et al., 1993). Zur präzisen Aufklärung von Deletionen ist es erforderlich locusspezifische FISH-Sonden zu verwenden. Die Generierung dieser Sonden erfolgt mit Hilfe von, in Vektoren inklonierten, genomischen DNA-Fragmenten. Die weitaus größten genomischen DNA-Fragmente von einigen hundert kb bis zu 2 Mb können in Yeast Artificial Chromosomes (YACs) enthalten sein (Burke et al., 1987). YACs sind bedingt durch ihren hohen Chimaritäts Grad hauptsächlich für die erste Annäherung an Bruchpunkte gut einsetzbar (Burke and Olson, 1991; Schlessinger et al., 1991). Man verwendet z.B. für Bruchpunktanalysen besser kleinere genomische Fragmente, die sich aber durch einen geringeren Chimarismus in der Sequenz auszeichnen. Die auf *E.coli*-Phagen basierenden Cosmide enthalten DNA mit einer Größe von 30-44 kb (Collins and Hohn, 1978), P1 derived Artificial Chromosomes (PACs) besitzen eine durchschnittliche Insertgröße von 130-150 kb (Ioannou et al., 1994) und Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) tragen Inserts mit einer Größe von 100-300 kb (Shizuya et al., 1992). Vielfach werden BACs verwendet, da sie bei ausreichender Kapazität (~300 kb DNA) stabiler als YACs sind und zudem einen sehr geringen Grad an Chimarismus aufweisen (Kim et al., 1996). Mikrodeletionen nachzuweisen sollte auch mit der neu entwickelten single-copy-FISH (scFISH) möglich sein. Diese Technik verwendet DNA Proben mit einer Größe von 2 kb bis 10 kb, die nach computerunterstützter Sequenzanalyse selektiert werden. Diese Proben enthalten keine Repeats und werden mit der PCR-Methode amplifiziert. Die Anwendbarkeit konnte bereits für die Mikrodeletionssyndrome Prader-Willi-/Angelman-Syndrom (15q11.2), DiGeorge-Syndrom (22q11.2) und Monosomie 1p36 nachgewiesen werden (Rogan et al., 2001).

2.3 Numerische und strukturelle Aberrationen des Chromosoms 13

2.3.1 Trisomie 13

Erstmals wurde die Trisomie 13 im Jahr 1960 von Patau beschrieben. Trisomie 13 ist die dritthäufigste Trisomie (1:5000 Neugeborene) neben Trisomie 18 und 21. Von den betroffenen Kindern sterben 98% vor der Geburt (Jacobs et al., 1987) und von den Neugeborenen werden nur 10% älter als ein Jahr. Es wird in 80% der Fälle eine freie Trisomie 13 festgestellt, dabei sind 85% der Trisomien mütterlicher Herkunft. Kinder mit dem Patau-Syndrom zeigen häufig Mißbildungen wie Holoprosenzephalie, Mikrozephalie, Anophthalmie bzw. Mikrophthalmie, Hypertelorismus, Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte, Polydaktylie, urogenitale Fehlbildungen und auch Herzfehler sind zu beobachten.

2.3.2 13q- Syndrom

Das '13q- Syndrom', auch Orbeli-Syndrom genannt (Allderice et al., 1969; Orbeli et al., 1971), zeigt sich in Deletionen des langen Arms von Chromosom 13, dabei ist die Ausprägung des Phänotyps abhängig von der deletierten Chromosomenbande. Allgemein treten Retinoblastom, mentale und Wachstumsretardierung, Mißbildungen des Gehirns, Herzdefekte, Veränderungen der distalen Gliedmaßen und auch Fehlbildungen des Urogenitaltrakts auf (Jones, 1997).

Von Brown et al. (1993) wurde das 13q- Syndrom in drei Gruppen zusammengefasst. Die Gruppe 1 umfasst proximale Deletionen, die 13q32 nicht umschließen. Bei Deletionen von 13q13-q31 treten häufig moderate mentale Retardierung und Defizite des Wachstums betreffend auf. Es werden keine weiteren bedeutenden Deformationen beobachtet. In der Gruppe 2 sind distale Deletionen mit Beteiligung von 13q32 zusammengefasst. Die Bande 13q32 scheint für die Ausprägung des Phänotyps entscheidend zu sein, denn bei Deletionen treten die meisten der syndromtypischen Merkmale auf. Brown et al. (1998) zeigten, dass Deletionen einer 1-Mb großen Region das Gen ZIC2 (Zic family member 2, odd-paired homolog, Drosophila) betreffen und diese mit Holoprosenzephalie assoziiert wurde. In der Gruppe 3 sind distale Deletionen, die 13q32 wiederum nicht einschließen, eingeteilt. Deletionen von 13q33-qter sind diese häufig mit schweren mentalen Retardierungen, aber ohne größere Fehlbildungen oder Wachstumsretardierungen verbunden. Es konnte von Hecht und Hecht (1987) dargestellt werden, dass Deletionen einer Region meist schwerere Fehlbildungen verursachen als Duplikationen der gleichen Region. Segmentale Aneuploidien, die mit klinischen Syndromen assoziiert sind, werden z.B. von Ledbetter und Ballabio (1995) oder Budarf und Emanuel (1997) zusammen gefasst.

2.4 Numerische und strukturelle Aberrationen des Chromosoms 21

2.4.1 Trisomie 21

Das Krankheitsbild wurde 1866 erstmalig von Langdon Down beschrieben und Lejeune konnte 1959 die Trisomie 21 als erste Chromosomenaberration beschreiben (Down, 1866; Lejeune et al., 1959). Das Down-Syndrom ist eine der häufigsten Ursachen für mentale Retardierungen und tritt mit einer Frequenz von 1:700 Lebendgeborenen auf (Penrose and Smith, 1966). Mit zunehmendem Alter der Mutter steigt die Wahrscheinlichkeit für ein Kind mit Down-Syndrom; mit 30 Jahren besteht eine Wahrscheinlichkeit von 1:100 und erhöht sich im Alter von 40 Jahren auf 1:110 (Hook, 1982; Hook et al., 1983).

Neben den freien Trisomien (95% der Fälle) kommt es auch zu Robertsonschen Translokationen $t(14;21)$ und $t(21;21)$ (Hook, 1982; Thuline, 1982). Trisomie 21, mit einem ganzen zusätzlichem Chromosom 21, ist überwiegend durch Fehler in der mütterlichen Meiose verursacht und nur zu 5% in der Spermatogenese. Die Fehlverteilungen finden maternal hauptsächlich in der Meiose I statt und zu 20-24% in der Meiose II und in Fällen der paternalen Nondisjunction entstehen diese hauptsächlich in der Meiose II (Antonarakis et al., 1991; Antonarakis et al., 1992). Trisomie 21, die aufgrund einer Translokation $t(14;21)$ vorliegt, entsteht in den maternalen Keimzellen *de novo* (Petersen et al., 1991; Shaffer et al., 1992), hingegen haben Translokationstrisomien $t(21;21)$ zu gleichen Teilen einen maternalen bzw. paternalen Ursprung (Grasso et al., 1989; Antonarakis et al., 1990; Shaffer et al., 1992).

Der Phänotyp der Trisomie 21 ist umfangreich und wurde von Jackson et al. (1976) mit 25 Merkmalen klassifiziert, wobei die phänotypische Ausprägung variabel ist (Tabelle 2-1). Nach Jackson haben Personen mit fünf oder sechs Merkmalen eine 23%ige Wahrscheinlichkeit für das Down-Syndrom, bei sieben bis neun Zeichen besteht eine Wahrscheinlichkeit von 60% und mit zehn bis zwölf Merkmalen eine Wahrscheinlichkeit von 84% für das Down-Syndrom.

Im Zusammenhang mit Genotyp-Phänotyp Korrelationen konnte ein als Down-Syndrom kritische Region (DSCR) bezeichnete Region molekulargenetisch in 21q22 zwischen den Marker D21S17 und ETS2 ausgemacht werden (Epstein, 1990; Rahmani et al., 1989; McCormick et al., 1989; Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1994). Bei einem dreifachen Vorliegen dieser Region treten charakteristische phänotypische Merkmale des Down Syndroms auf. Allerdings befinden sich auch außerhalb dieser Region Bereiche, die mit Merkmalen der Trisomie 21 korrelieren (McCormick et al., 1989; Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1994).

Tabelle 2-1 Phänotyp Merkmale des Down Syndroms

Von Jackson et al. (1976) beschriebenen 25 Symptome des Down Syndroms. Die 10 Symptome, die für die Diagnostik von Kindern unter zwei Jahren zur Bestimmung des Down-Syndroms herangezogen werden, sind hervorgehoben.

Brachycephalie	Einfaltung der Ohrmuschel
lateral ansteigende Lidachsen	kurzer Hals
Epikanthus	Cutis laxa
Blepharitis, Konjunktivitis	kurze, breite Hände
Brushfield Flecken	Brachydaktylie V
Nystagmus	Klinodaktylie V
flache Nasenwurzel	Vierfingerfurche
ständig geöffneter Mund	Sandalenlücke
anormale Zähne	kongenitaler Herzfehler
herausragende Zunge	Herzgeräusch
gefurchte Zunge	Überstreckbarkeit der Gelenke
hoher Gaumen	Muskelhypotonie
schmaler Gaumen	

2.4.2 Monosomie 21 und partielle Monosomie 21

Es konnten verschiedene phänotypische Varianten zwischen einer vollständigen und einer partiellen Monosomie 21 beobachtet werden. Dabei ist der Phänotyp bei partiellen Monosomien von Größe und Lage der Deletion abhängig. In der Beurteilung von vollständigen Monosomien 21 besteht die Schwierigkeit, dass kleine Fragmente des Chromosoms 21 auf andere transloziert sein können (Schinzel, 1984). Jedoch wies Huret et al. (1995) darauf hin, dass charakteristischen Eigenschaften einer vollständigen Monosomie sich nicht wesentlich ändern, sollte eine Translokation aufgrund geringer Größe nicht detektiert worden sein. In Abhängigkeit von dem deletierten Segment konnte festgestellt werden, dass die phänotypische Ausprägung der partiellen Monosomien heterogener war, als die der vollständigen Monosomien 21. Einige Merkmale jedoch treten bei beiden häufig auf, wie intrauterine und postnatale Wachstumsretardierung, nach unten gerichtete Lidspalten, tiefsitzende Ohren, Symptome ähnlich der Gelenkversteifung (Arthrogryposis), Hypertonie, Herzdefekte und mentale Retardierungen (Chettouh et al., 1995).

Genotyp-Phänotyp Korrelationen zeigten, dass Deletionen in der Region 21q21-q22.1 mit zehn von den 25 für die Monosomie 21 charakteristischen Merkmalen assoziiert sind (Chettouh et al., 1995). Folgende Auffälligkeiten konnten beobachtet werden: sechs faziale Anomalien, Symptome ähnlich der Gelenkversteifung (Arthrogryposis), transversale Handflächenfalte, Hypertonie und mentale Retardierung. Zu den fazialen Besonderheiten gehören ein kurzer Hals, tiefe Haarlinie, große Nase, Hypertelorismus, große Ohren und ein hoch gewölbter Gaumen.

2.5 Strukturelle Aberrationen des Chromosoms 22

2.5.1 Mikrodeletions Syndrome DGS/VCFS

Mikrodeletionen in 22q11.2 führen zu einer breiten Varianz von Phänotypen wie dem DiGeorge Syndrom (DGS), Shprintzen- bzw. Velokardiofaziales-Syndrom (VCFS) oder dem Takao-Syndrom (conotruncal anomaly face syndrome) und auch zu weiteren isolierten Defekten z.B. des aortalen Ausflußtrakts oder der Fallot-Tetralogie. Studien haben gezeigt, dass Deletionen in Chromosom 22q11.2 beim DGS/VCFS mit einer hohen Frequenz von 1:4000 Lebendgeburten auftreten, und zum großen Teil mütterlichen Ursprungs sind (Burn and Goodship, 1996; Demczuk et al., 1995).

Die meisten Patienten tragen eine 3 Mb große Deletion (~90%) und ein geringer Anteil eine 1,5 Mb Deletion (~7%). Außerdem konnte bei der Entstehung der Deletionen keine Abhängigkeit von maternalen oder paternalen Chromosomen festgestellt werden, somit wurde ein genomisches Imprinting ausgeschlossen (Carlson et al., 1997; Morrow et al., 1995).

Die molekularen Ursachen der Deletionen für DGS/VCFS sind nach vollständiger Sequenzierung der Region in 22q11.2 aufgeklärt worden. Danach ließen sich vier low-copy-repeats (LCRs) innerhalb der 3 Mb großen und typischerweise deletierten Region (typically deleted region, TDR) lokalisieren. Die in den LCRs enthaltenen Module waren untereinander ähnlich verteilt und hatten eine 98%ige Sequenzidentität (Shaikh et al. 2000).

Durch die invertierten und direkt orientierten Segmente in den LCRs kommt es zu interchromosomalen als auch zu intrachromosomalen homologen Rekombinationen in der Meiose. Interchromosomale Fehlpaarung zwischen homologen Chromosomen 22 werden durch die direkte Orientierung der LCRs zueinander vermittelt (Miose I). Intrachromosomale Rekombinationen finden zwischen duplizierten Modulen der LCRs statt. Die Module sind invers orientiert und bilden ein Stem-Loop-Intermediat aus, die im Loop befindliche DNA wird deletiert (Emanuel und Shaikh, 2001; Baumer et al., 1998; Edelman et al., 1999 b)

Das DiGeorge Syndrom (DGS; DiGeorge, 1965) wird mit Hypokalzämie, deren Ursache eine Hypoplasie der Nebenschilddrüsen ist, Hypoplasie des Thymus und Entwicklungsstörungen des Aortenbogen in Verbindung gebracht. Es ist ein Entwicklungsfelddefekt der 3. und 4. Schlundtasche, dabei ist die Störung der Migration von Neuralleistenzellen in die Schlundregion in der Pathogenese und Embryogenese dieses Krankheitsbildes ein zentraler Prozess (Kirby and Waldo, 1995).

Das DiGeorge Syndrom tritt meist sporadisch auf und entsteht als eine *de novo* Deletion. In einigen Familien konnte allerdings auch ein variabler Phänotyp bei einer autosomal dominanten Vererbung beobachtet werden (Wilson et al., 1991). Bereits 1981 vermuteten De la Chapelle et al. (1981) eine Deletion im Chromosom 22 als eine Ursache für DGS, schließlich konnte Driscoll et al. (1992) auf molekularer Ebene die Deletion nachweisen.

Im Jahr 1978 wurde von Shprintzen et al. ein Syndrom beschrieben, dessen Merkmale mit Gaumenspalten, Herzanomalien, ein typisches Gesicht, milde bis mäßige Entwicklungshemmung und Lernbehinderungen zusammengefasst wurden (velocardiofacial syndrome, VCFS). Die Gesichtsanomalien sind z.B. eine prominente breitrückige Nase, dysplastische Ohren und Mikrogenie (Wraith et al., 1985).

Von Driscoll et al. konnte 1992 nachgewiesen werden, dass eine interstitielle Deletion in 22q11 ähnlich der im DGS vorhanden war. Durch diese Studie konnte auch eine autosomal dominante Vererbung der Deletion bestätigt werden. Nach Analysen von somatischen Hamster-Mensch Hybridzelllinien konnten Edelman et al. (1999 a) nachweisen, dass die Bruchpunkte innerhalb ähnlicher low copy repeats (LCR) lokalisiert sind.

Ein ähnliches Spektrum klinischer Veränderungen wie bei DGS/VCFS trat bei Haploinsuffizienzen von Deletionen in Chromosom 10p (DGS2 locus) auf. Treten Deletionen in der proximalen Region auf, so sind diese mit Herzfehlern und T-Zelldefizienzen verbunden (Daw et al., 1996). Ist die distal gelegene Region hemizygot, so kommt es zu Hypoparathyreoidismus, Taubheit und Nierendysplasie (Lichter et al., 2000).

Beim Takao-Syndrom treten kardiovaskuläre Veränderungen in den Vordergrund der klinischen Diagnostik (Kinouchi et al., 1976; Takao et al., 1980; Shimizu et al., 1984). Bei diesem Syndrom wurde eine Übereinstimmung mit dem DGS/VCFS festgestellt, denn auch bei diesem Syndrom ist eine Deletion in 22q11 festzustellen (Burn et al., 1993; Matsuoka et al., 1994).

Von Wilson et al. (1993) wurde das Akronym CATCH22 vorgeschlagen für die Zusammenfassung der verschiedenen Syndrome, die mit der gleichen Deletion einhergehen. Das Akronym CATCH22 (OMIM 188400) wurde als Oberbegriff für die klinisch unterschiedlichen Phänotypen aufgrund einer Mikrodeletion 22q11.2. vorgeschlagen. Der Begriff CATCH setzt sich zusammen aus: cardiac defects (Herzfehler, komplexe Ausflusstraktfehlbildungen), abnormal facies (Gesichtsdysmorphien) thymic hypo-/aplasia (Thymushypo-/aplasie) cleft palate (Gaumenspalte) hypocalcaemia (Hypokalzämie als Folge von Unterfunktion der Nebenschilddrüse). Die Nomenklatur wurde von Burn 1999

dahingehend bemängelt, dass der Begriff CATCH22 mit negativen Assoziationen einhergeht, und es besser wäre von einem CATCH-Phänotyp zu sprechen, wenn man die Herzveränderungen, T-Zelldefizienz, Gaumenspalten und Hypokalzämie zusammen fassen wolle. Die beim DGS/VCFS vererbten Merkmale zeigen eine variable Expressivität und Penetranz. Zu den bisher beschriebenen Merkmalen haben Betroffene Lernschwierigkeiten und Verhaltensstörungen (Swillen et al., 1999)

2.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es DNA-Sonden zu etablieren, die in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Detektion von numerischen und strukturellen Aberrationen der Chromosomen 13, 21 und 22 eingesetzt werden können. Die DNA-Sonden sollen mit der Methode der PCR aus einer BAC-Bank identifiziert werden, indem mit regionspezifischen Primern eine BAC-Bank durchmustert wird. Gezielt sollen STS, Mikrosatellitenmarker und selbst generierte Primer eingesetzt werden, die z.B. in der '13q- Syndrom' Region, in der Down-Syndrom Region und in dem Bereich der 22q11-Deletionsregion lokalisieren. Die selektierten BAC-Klone sollten in ihrer Eigenschaft so beschaffen sein, dass sie als FISH-Sonden an Metaphasechromosomen und an Interphasekernen distinkte Signale zeigen. Die BACs sollen an Patientenmaterial auf ihre Anwendung hinsichtlich der Aufklärung struktureller und numerischer Chromosomenaberrationen geprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Humane BAC-Bank

Die in dieser Arbeit etablierten BACs stammen aus der 'Down-to-the-well human BAC DNA'-Bank von Incyte Genomics (Palo Alto, USA). Die BAC-Bank enthält partiell mit *Hind*II geschnittene und in den Vektor pBeloBAC11 einklonierte humane DNA (Kim et al. 1996, Shizuya et al. 1992). In der Bibliothek befinden sich BACs mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 150 kb und das menschliche Genom wird 3,9fach abgedeckt.

3.1.1.1 DNA-Klone anderer Institute

Tabelle 3-1 Chromosom 21 spezifische BACs und Cosmide

Accession-No.	Bezeichnung	Vektor	Herkunft
AF241725	RP11-780G18	pBACe3.6	IMB, Jena
AF240628	RP11-292N6	pBACe3.6	IMB, Jena
AP000253	pS552	pAd10-SacBII	MPI f. molek. Genetik, Berlin
AP000466	pR140B9	pBACe3.6	MPI f. molek. Genetik, Berlin
AF064858	28F9	BAC Library	MPI f. molek. Genetik, Berlin
AF017257	1151N9	BAC Library	MPI f. molek. Genetik, Berlin
AP001040	Q109A8 (LLNLc116A1528)	cosmid, Lawrist 16	RZPD, Berlin
AP001042	Q12C7 (LLNLc116F143)	cosmid, Lawrist 16	RZPD, Berlin

RPCI human BAC library 11

Vektor: pBACe3.6

Mittlere Insertgröße: 174 kb

Restriktionsenzym: EcoRI

Antibiotikaresistenz: Chloramphenicol

Bezogen vom: Institut für molekulare Biotechnologie (IMB), Jena

Lawrence Livermore human chromosome 21 cosmid Library (LL21NCO2-Q)

Vektor: Lawrist 16

Mittlere Insertgröße: 32-47 kb

Restriktionsenzym: MboI

Antibiotikaresistenz: Kanamycin

Bezogen vom: Ressourcenzentrum des deutschen Humangenomprojektes (RZPD), Berlin

CMP21 P1 Library

Vektor: pAd10-SacBII Vektor

Mittlere Insertgröße: 70-95 kb

Restriktionsenzym: BamHI

Antibiotikaresistenz: Kanamycin

Bezogen vom: Max-Planck-Institut für molekulare Genetik (MPI f. molekul. Genetik), Berlin

3.1.1.2 Zentromer-Proben und WCP21

Vom Institut für Genetik, Universität Bari, Italien wurden die Zentromer-Proben der Chromosomen X/Y und die Probe für das Whole Chromosome Paint des Chromosom 21 (WCP21) bezogen. Die Zentromer Proben sind in Vektoren inkloniert (Rocchi et al., 1990; Archidiacono et al., 1995) und das WCP21 stammt von sortierten Chromosomen und lag als DOP-Produkt vor.

Tabelle 3-2 Zentromer-Proben (X, Y) und WCP21

	Bezeichnung	Insert (kb)	Restriktionsenzym	Vektor
Chromosom X	pDMX1	2,0	<i>Pst</i> I	pBluescript
Chromosom Y	pLAY5.5	5,5	<i>Hind</i> III	pBluescript
gesamtes Chromosom 21	WCP21	DOP		

3.1.2 Humane YAC-Bank

Für die Kartierung von Bruchpunkten wurden auch YAC-Klone verwendet. Es handelt sich um CEPH-Mega-YACs, die aus einer männlichen, humanen Lymphoblastoid-Zelllinie erstellt wurden (Albertsen et al., 1990). Mit dieser Bank wird das menschliche Genom achtfach abgedeckt und die durchschnittliche Insertgröße beträgt etwa 1 Mb (Chumakov et al., 1992, 1995). Die Lokalisation innerhalb der Chromosomen wurde mit ihren Mikrosatellitenmarkern (Dib et al., 1996) ermittelt.

Tabelle 3-3 YACs der Chromosomen 21 und 16

YAC	Marker	Größe
Chromosom 21		
745c11	D21S230	1550
848g1	D21S265	1430
898b9	WI-8007	200
752d12	D21S1915	970
850c6	D21S310, SOD1	595
718f1	D21S261	420
690f12	D21S261, D21S262	250, 720
901e1	D21S1898	1390
807b1	D21S1910	1700

YAC	Marker	Größe
Chromosom 21		
925e01	D21S1921	1320
893d4	D21S259	1220
662d2	D21S1255	880
767b3	D21S259	720
767d6	D21S168	2000
773a5	D21S268	785
821h8	D21S1893	1730
265h12	D21S266	630
886g8	D21S1887, D21S266	650
Chromosom 16		
756h3 (16q)	WI3181, D16S402	1310

3.1.3 Oligonukleotide

Name	SEQUENZ (5' → 3')	Produkt- länge (bp)	Temp (°C)
Chromosom 21: Primer zur Durchmusterung der BAC-Bank			
D21S168-for	ATGCAATGTTATGTAGGCTG	112	60
D21S168-rev	CGGCATCACAGTCTGATAAA		
D21S259-for	AGAATGTGGTCTCACAAAGCC	116	55
D21S259-rev	AGGGAATGTCAATGAAAACC		
D21S266-for	GGGGACATTGAGTCATCACA	169	60
D21S266-rev	AGGCAAATGAAGACCTGAAC		
D21S3-for	TGCTTTGTTC ACATGAGGTC AGG	770	60
D21S3-rev	AATTGAACCT AGGGCGTTTC TAC		
D21S270-for	GAAATGTTTTAATAAATGGTGGTTA	200	60
D21S270-rev	ACAAAGTTATGGTCAAGGGG		
D21S15-for	CGTGCTTTCA AGCAGTCAC	193	57
D21S15-rev	GCACAGTGTT AAGATCTGC		
D21S53-for	TGTGTGGCCT TGGGCAAGGT CCC	145	57
D21S53-rev	TGTTAGGCAT GCGGTCCGCC AGG		
D21S23-for	CACTAGCAGT ATATGAGAGT TCC	897	60
D21S23-rev	AAACCGTATG AGATAACACT ATG		
D21S1414-for	GGCACCCAGTAAAAAATTACT	291	58
D21S1414-rev	CTGTCTGTCTGTCTGTCTATC		
D21S1412-for	CGGAGGTTGCAGTGAGTT	305	58
D21S1412-rev	GGGAAGGCTATGGAGGAGA		
D21S268-for	CAACAGAGTGAGACAGGCTC	213	60
D21S268-rev	TTCCAGGAACCACTACACTG		
D21S266-for	GGGGACATTGAGTCATCACA	169	55
D21S266-rev	AGGCAAATGAAGACCTGAAC		
D21S394-for	GGAGCCGGTTCTTCGAAGG	71	58
D21S394-rev	GGAGCCGGTTCTTCGAAGG		
SHGC51949-for	AGTATGCTTTTTCTGGTGTCTTG	191	64
SHGC51949-rev	TTCTCAAACACGCAACTAAACTG		
JoCon5-for	AGGCTGAGAGCTGGGGTCTGGG	699	68
JoCon5-rev	TCTCAGAGGGGGTCTCTGGCTC		
L2R-for	AAACTAGGCTAGGTGGTGTGCA	302	66
L2R-rev	CGTGCCTCAGCCTCCTAGGTA		

Name	SEQUENZ (5' → 3')	Produkt- länge (bp)	Temp (°C)
Chromosom 13: Primer zur Durchmusterung der BAC-Bank			
D13S159-for	GCTGTGACTTTTAGGCCAAA	176	55
D13S159-rev	TGTGATGTCTACAACCTCCAG		
SGC34538-for	CTTAATGGTGAAACTTTGCTTTG	125	55
SGC34538-rev	TTAAAGGTTGCCTAAACTAATGTGT		
D13S280-for	CCCTGAATAACTTTATGTGCC	138	64
D13S280-rev	GGCAAATTTGGGAAACTATC		
SGC32863-for	CAGGAACAATTGGCTTCTTTG	131	55
SGC32863-rev	AGGTCTTTGTTGATGAAGAGTTTAA		
D13S174-for	GACGACTAACCTCAAGTGCG	188	62
D13S174-rev	TGAAGGCAGAAGTAAAACCATTATC		
SGC32558-for	TGGATAGTGGATGAAAACATGC	133	62
SGC32558-rev	TCCTCCCGATTATTGCGTAT		
SGC31753-for	AATTTGCATCAATTTGATACATCG	102	62
SGC31753-rev	GACCGCCATGAGCATGAA		
D13S281-for	ACTGCCATGCAGTGCTTC	238	64
D13S281-rev	AGGACTGACCAAGGAAATAGA		
D13S265-for	GTCTGCCAATTACATTGCAT	151	55
D13S265-rev	GCACCATTTTCCCCTTATAT		
D13S1283-for	AAGTTCACAGTTTTTTAGAGAAACA	152	55
D13S1283-rev	AGGTTAGGTGAGGGTTGTCT		
D13S164-for	TAATCAAACCCTGGCTGAG	214	55
D13S164-rev	CACAGTGAGTAGAGTCATCAAAG		
Chromosom 22: Primer zur Durchmusterung der BAC-Bank			
22TelA-for	GGTAGGATGAAACCAGCCCCTG	327	68
22TelA-rev	GGGATGCCTCCTTCATGCAGCC		
22-42-for	GGCACCATGGGCAAGCGGGAGC	700	64
22-42-rev	AGGCTCCGGGTGGATGCGCACG		
DGS-b cB-for	ACTGCAGCAGGGACAGCCTCTG	739	66
DGS-b cB-rev	TGAGCAAGGCGGTGACCGAGTG		
DGS-b cC-for	TGGCAGGTGAGTGGCTGTGTTC	800	64
DGS-b cC-rev	TGGGCAGTGCAGGGGCTCAGAC		
DGS-2-AB-for	CAGCTGACTCCACACAGCAGGC	700	68
DGS-2-AB-rev	CATCTCACCTGAACTGCTGTCC		
DGS-5-AB-for	GAGGACAGGGTCATGTCCCACC	700	68
DGS-5-AB-rev	CGAGCAGCTGGGCACGCAGG		
Marker der Haplotypenanalyse			
D21S167-for	TCCTTCCATGTACTCTGCA	156-160	55
D21S167-rev	TGCCCTGAAGCACATGTGT		
D21S259-for	AGAATGTGGTCTCACAAAGCC	116-131	55
D21S259-rev	AGGGAATGTCAATGAAAACC		
D21S261-for	AAAACACCTTACCTAAAACAGCA	296-304	60
D21S261-rev	AGATGATGGTGAGTCCTGAG		
D21S262-for	TCTATGAGACAGGGCCAC	142-152	58
D21S262-rev	TCTATGAGACAGGGCCAC		
D21S266-for	GGGGACATTGAGTCATCACA	153-173	55
D21S266-rev	AGGCAAATGAAGACCTGAAC		
D21S267-for	ATGGATCTGGATTTCTATCTTC	175-203	60
D21S267-rev	CCTCCAACCTGGGTGA		
D21S268-for	GGGAGGCTGAAGCAGG	226-250	60
D21S268-rev	CCCCGCTGGCAGTGTA		
D21S270-for	GAAATGTTTTAATAAATGGTGGTTA		

Name	SEQUENZ (5' → 3')	Produkt- länge (bp)	Temp (°C)
D21S270-rev	ACAAAGTTATGGTCAAGGGG	199-223	55
D21S1411-for	ATGATGAATGCATAGATGGATG	275-319	58
D21S1411-rev	AATGTGTGTCCTTCCAGGC		
D21S1437-for	ATGTACATGTGTCTGGGAAGG	127-144	60
D21S1437-rev	TTCTCTACATATTTACTGCCAACA		
D21S1440-for	GAGTTTGAAAATAAAGTGTCTGC	157-175	55
D21S1440-rev	CCCCACCCCTTTTAGTTTTA		
D21S1446-for	ATGTACGATACGTAATACTTGACAA	195-240	58
D21S1446-rev	GTCCCAAAGGACCTGCTC		
D21S1252-for	TCTGTCTTTGTCTCACTATCTG	231-251	58
D21S1252-rev	GCAATGCTCTGTGGCT		
D21S1255-for	AGCTCTTTATTTTGCCACATAG	112-126	58-60
D21S1255-rev	CTGCATGTTGCCTGG		
D21S1260-for	TCCAAGGGGTTTCATCC	200-214	52
D21S1260-rev	CCCAAGGCACTGTTCC		
D21S1809-for	TACCCAAGGTGACAGACACC	208	58-64
D21S1809-rev	GAGCAGGTTGTCCTACCTCA		
D21S1843-for	TCTTGACCAGGCTGCCTC	176-177	60-64
D21S1843-rev	CGACATGCTCGCTCCTTT		
D21S1888-for	AGGCAGGAGAATCACTTGAA	262-287	53
D21S1888-rev	AGAAAGACATTCCATCGCT		
D21S1889-for	TATGTGTGTTTGCATGTATGTGT	250-276	60-64
D21S1889-rev	GCTTGGGCTGAAATCAGTAG		
D21S1891-for	GTGACAGAGCGAGACTCCAT	98-112	55-56
D21S1891-rev	AAATTGGAACCCTTGGATG		
D21S1893-for	GTATGCACACCACACGG	111-119	55-58
D21S1893-rev	TAACAAAATCCGCCACG		
D21S1956-for	AAAAGAATGAATGCCTCAGTATCC	133	52
D21S1956-rev	CTGCTTCGTGTATCCTTAAATGC		
D21S2052-for	GCACCCCTTTATACTTGGGTG	121-153	58
D21S2052-rev	TAGTACTCTACCATCCATCTATCCC		
D21S2055-for	AACAGAACCAATAGGCTATCTATC	119-199	58
D21S2055-rev	TACAGTAAATCACTTGGTAGGAGA		
APPivs1-for	GCCCATCAAGATGCTACTGAAGC	219-257	60
APPivs1-rev	GTTTACATTCCTCTCTGCCTC		
WI-9128-for	TGAAAATGTCCAGGAAAGTGG	103-104	58
WI-9128-rev	ATTAGCTGTGCCGTTGCTG		
Primer zur Amplifikation der Einzelkopie FISH-Sonden in ETS2			
Ex1-Rep1-for	CCGGTACTTCCTCCAGAGACTG	2163	52
Ex1-Rep1-rev	GTCCTAAATCCTGAGTCCTCCACAC		
Ex3-Ex5-for	CGAGTCTGTTTTAAGGACTGACTG	2266	62
Ex3-Ex5-rev	GACTCACTTGAGTGGCATTGAG		
Ex8-1rep-for	TACCCTAAGGAATAAGCACCTGAG	1294	60-62
Ex8-1rep-rev	CCCATGCCAGGCTGTCCTAC		
1rep-Ex10-for	GCAGACAGCTATCGGTGCTCAC	2612	60-62
1rep-Ex10-rev	TGACATGGTTGTTTCCTTCC		
Primer der DOP-PCR			
DOP-Primer	CCGACTCGAGNNNNNATGTGG	100-3000	37-40

3.1.4 DNA-Längenstandard:

DNA-Marker 100bp-Leiter (MBBL, Bielefeld): 100 bis 1.000 bp

100 bp DNA-ladder, equimolar (Roth, Karlsruhe): 100 bis 1.000 bp

GeneRuler100bp DNA Ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot): 100 bis 3.000 bp

Ladder Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot): 100 bis 10.000 bp

Low Range PFG Marker (New England Biolabs, Frankfurt a. Main): 0,13 bis 194,0 kb

Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, Frankfurt a. Main): 48,5 bis 727,5 kb

3.1.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsenzyme	Gibco BRL, Eggenstein
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	Promega, Madison WI, USA
Taq DNA-Polymerase in HotStarMastermix	Qiagen, Hilden
DNA-Polymerase I (10 U/µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Roth, Karlsruhe
Pepsin	Serva, Heidelberg

3.1.6 Reagenzien und Antikörper für den Fluoreszenznachweis

	verwendete Konzentration	Hersteller
DAPI	1 µg/ml	Serva, Heidelberg
SpectrumGreen dUTP	0,5 mM	Vysis, Bergisch-Gladbach
SpectrumRed dUTP	0,5 mM	Vysis, Bergisch-Gladbach
Biotin-16-dUTP Lösung	0,5 mM Biotin-11-dUTP/ dUTP (1:3) in 1x TE, pH 7,9	Roche Diagnostics, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP Lösung	0,5 mM Digoxigenin-11-dUTP/ dUTP (1:3) in 1x TE, pH 7,9	Roche Diagnostics, Mannheim

Antikörper der Biotin Detektion	Konzentration	Hersteller
Fluorescein-Avidin D	10-20 µg/ml	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Biotynilated anti-Avidin D	2-5 µg/ml	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Antikörper der Digoxigenin Detektion:		
Cy3 conjugated IgG Fraction monoclonal Mouse anti Digoxigenin	0,5 mg	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA
Cy3 conjugated Affini Pure Rabbit anti Mouse IgG (H+L)	0,5 mg	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA

3.1.7 Verwendete käufliche Systeme (Kit):

Bezeichnung	eingesetzt für	Hersteller
QIAquick Gel Extraction Kit	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR Produkten	Qiagen, Hilden
Nucleobond AX	Plasmid-DNA Aufreinigung	Macherey-Nagel, Düren
BioPrime Kit	DNA Markierung mit Biotin	Gibco BRL, Eggenstein

3.1.8 Chromosom 22 Probenmaterial

Als Probenmaterial wurden kultivierte Lymphozyten auf Objektträgern fixiert zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Verdachtsdiagnose	Herfunft
22 Pat-1 und 22 Pat-2	Catch22 positiv	Dr. Tönnies, Virchow Klinikum Berlin, Institut für Humangenetik, Berlin
22-Pat-3 bis 22-Pat-8, 22-Pat-11, 22-Pat-11	Velokardiofaziales-Syndrom	Dr. Barbi, Universitätsklinikum Ulm, Abt. Humangenetik, Ulm
22-Pat-9	DiGeorge-Syndrom	Dr. Barbi, Universitätsklinikum Ulm, Abt. Humangenetik, Ulm

3.1.9 Zelllinien

Zelltyp	Bezeichnung	Karyotyp	Herkunft der Zellen
Amnionzellen	L-R0048M	47,XY,+21	Dr. Piombo, Galliera Genetic Bank, Genova, Italy
Fibroblasten	N-P0047M	47,XY,+21	Dr. Piombo, Galliera Genetic Bank, Genova, Italy
Amnionzellen	Tri21, Ulm	47,XY,+21	Dr. Gläser, Universitätsklinikum Ulm, Abt. Humangenetik, Ulm

3.1.10 Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
RPMI1640 (GlutaMaxI)	GibcoBRL, Eggenstein
HamsF10 (GlutaMaxI)	GibcoBRL, Eggenstein
DMEM (mit 0,2 g Glucose)	GibcoBRL, Eggenstein
Chromosomen Medium 1A (Phytohämagglutinin 10 ml/L, Natrium-Heparin 50.000 units/L, Penicillin 100.000 units/L, Streptomycin 100.000 µg/L, 25% FBS)	GibcoBRL, Eggenstein
FCS	GibcoBRL, Eggenstein
FBS	GibcoBRL, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin (5000 IU/ml)	GibcoBRL, Eggenstein

Bezeichnung	Hersteller
Amphotericin B	Biochrom KG-Seromed, Berlin
Cell Culture freezing medium, DMSO mit Dulbecos modified eagle medium/FBS	GibcoBRL, Eggenstein
Colcemid (10 µg/ml)	GibcoBRL, Eggenstein
Trypsin-EDTA	PAA, Linz

3.1.11 Medienzusammensetzung

Bezeichnung	Kulturmedium und Zusätze für 100 ml Medium
L-R0048M	HamsF10 oder RPMI1640 + 15% FBS + 0,5 ml L-Glutamine + 2 ml Penicillin-Streptomycin
N-P0047M	HamsF10 oder RPMI1640 + 10% FCS 0,5 ml L-Glutamine + 2 ml Penicillin-Streptomycin
Tri21, Ulm	DMEM + 20% FCS, 1ml Penicillin-Streptomycin + 120 µl Amphotericin B

3.1.12 Verwendete Datenbanken:

Datenbank	Internetadresse
NCBI Browser	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/
PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
OMIM	www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
Gen-Cards	http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/
UC-Santa Cruz	http://genome.cse.ucsc.edu/
Webcutter	http://www.dedkem.gu.se/cutter/
BCM-Sequence Utilities	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/
Repeat Masker	http://repeatmasker.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker/
Resources for Molecular Cytogenetics, University of Bari	http://www.biologia.uniba.it/rmc/
GeneFisher	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/
Whitehead Institute for Biomedical Research	http://www.genome.wi.mit.edu/
CEPH QUICKMAP-infoclone	http://www.cephb.fr/cgi-bin/http_infoclone/
Marshfield Clinic	http://research.marshfieldclinic.org/genetics/

3.2 Methoden:

3.2.1 Kultivierung von Bakterienzellen

Zur Vermehrung von bakteriellen Plasmiden erfolgte die Kultivierung bei 37°C für 12 bis 16 Std in LB-Medium (pH 7,0).

LB-Medium (1000 ml):

10 g Bacto Tryptone
5 g Bacto Yeast Extract
10 g NaCl

LB-Agar-Platten: + 15 g Agar

Selektionsmedien:

BAC	Choloramphenicol (12,5 µg/ml)
Cosmid	Kanamycin (30-50 µg/ml)
pBlueskript	Ampicillin (70-100 µg/ml)

3.2.2 Glycerinkulturen

Bakterien wurden dauerhaft als Glycerin-Kultur gelagert. Dafür wurden zuerst 200 µl einer 100%igen Glycerinlösung in ein Eppendorfgefäß und anschließend 800 µl Bakterien-suspension hinzugegeben. Nach dem Durchmischen wurden die Glycerinkulturen erst für 30 min in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -70°C gelagert.

3.2.3 Kultivierung von Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilbank durchgeführt, und die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 7,5%.

3.2.3.1 Subkultivierung von Zellen

Zellen anderer Institute wurden in 25 ml Zellkulturflaschen versandt und nach dem Erhalt wurde das Medium bis auf 5 ml abgehoben. Nach 12 bis 16 Stunden Inkubation wurde die Zelldichte mit einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Bedeckten die Zellen 80 bis 100% des Bodens der Zellkulturflasche, so wurden sie im Verhältnis 1:2 bis 1:4, je nach Wachstumsverhalten geteilt.

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen, dies dient der Entfernung von Trypsininhibitoren und der Destabilisierung von Ca²⁺-abhängigen

Zelladhäsionen. Die Zellen wurden mit 100 µl angewärmten Trypsin-EDTA überschichtet und für max. 10 min im 37°C Brutschrank inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde in alle 2 bis 4 min das Ablösen der Zellen mit einem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Nach dem Ablösen der Zellen wurden 5 ml Medium hinzugegeben. Durch mehrfaches Pipettieren wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei RT mit 1200 rpm (Zentrifuge 5810, Eppendorf) pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Weiterhin wurde für ein optimales Zellwachstum je nach Zelldichte alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel vorgenommen.

3.2.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen wurden dauerhaft in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert und so vor Kontaminationen und Variabilität durch Subkultivierung bewahrt.

Zellen, die zu 75-80% konfluent den Boden einer 25 ml Zellkulturflasche bedeckten wurden für die Kryokonservierung eingesetzt. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit angewärmten Trypsin-EDTA behandelt. Nach dem Inhibieren des Trypsins durch Zugabe von Medium wurden die Zellen komplett von der Zellkulturschale gelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Für 10 min wurde mit 1200 rpm/min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem Freezing-Medium versetzt und in ein Kryogefäß überführt. Für die kontinuierliche Temperaturabsenkung wurde ein ummanteltes Gefäß, in dessen Zwischenraum sich Isopropanol befindet, verwendet und ü.N. in einer -80°C Truhe gelagert. Am folgenden Tag wurde das Kryogefäß in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt.

3.2.3.3 Auftauen von Zellen

Das Kryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Die Zell-Suspension wurde in ein mit 5 ml frischem Medium gefülltem 15 ml Zentrifugengefäß gegeben und für 10 min bei RT mit 1000 rpm pelletiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet in 2 ml Medium resuspendiert und in 25 ml Zellkulturflaschen, gefüllt mit Medium, verteilt.

3.2.4 Chromosomenpräparation aus peripherem Blut

Für die Lokalisation der BAC-Klone an den entsprechenden Chromosomen mussten Chromosomenpräparate hergestellt werden, dies geschieht am schnellsten durch die Gewinnung von teilungsfähigen Lymphozyten aus peripherem Blut. Für die FISH-Analysen an aberrantem Material wurden die in der Zellkultur vermehrten Amnionzellen oder Fibroblasten, wie die Blutzellen auch, mit Colcemid und Hypotonie behandelt. Im weiteren wird nur die Aufarbeitung von Blutzellen näher erläutert, da die anderen Zellen in gleicher Weise aufgearbeitet wurden.

Es wurden 5 ml Blut intravenös mit Heparin oder Natrium-Citrat enthaltenen Monovetten verarbeitet. Frisch entnommenes Blut sedimentierte für 30 min bei RT bis sich zwei Phasen ausgebildet hatten. In der unteren Phase befinden sich die Erythrozyten und in der oberen Phase das Plasma, während die Lymphozyten eine Zwischenschicht bilden. Durch vorsichtiges Aufmischen wurden die Lymphozyten etwas verwirbelt und es wurden mit einer 2 ml Spritze (Braun, Melsungen) und einer 0,9x40 mm Kanüle (Braun, Melsungen) 2 ml entnommen. Von diesen 2 ml wurden jeweils 20 Tropfen (ca. 440 μ l) in eine Zellkulturflasche mit 10 ml Chromosomenmedium 1A gegeben. In dem Medium befindet sich Phytohämagglutinin, ein pflanzliches Polysaccharid, das die Teilung der Lymphozyten stimuliert. Die Zellen wurden 80 bis 92 Std bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die Zellteilung wurde unterbrochen indem 1,5 Std vor dem Ernten der Zellen 50 μ l Colcemid dem Medium zugegeben wurde. Colcemid ist ein Spindelgift, dass die Ausbildung der Spindelfasern in der Metaphase unterbindet und somit die Verteilung der homologen Chromosomen auf die Tochterzellen verhindert. Während der Colcemid-Inkubationszeit wurde die hypotone Lösung aus 0,4% KCl hergestellt und auf 37°C erwärmt, außerdem wurde die Fixierlösung aus drei Teilen Methanol und einem Teil Eisessig (Fixativ) hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Nach der Inkubation folgte die Zellernte und die Zellen wurden für 10 min mit 1200 rpm bei RT pelletiert. Der Überstand wurde bis auf 1,5 ml abgenommen und dem Pellet langsam mit 5 ml der 0,4% KCl-Lösung (37°C) versetzt. Nach 10 min Inkubationszeit bei 37°C wurde tropfenweise Fixativ (-20°C) hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Es wurde mit -20°C Fixativ bis auf 10 ml aufgefüllt und 10 min mit 1200 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 2 ml verworfen und zu dem aufgeschüttelten Pellet wurden 5 ml -20°C Fixativ gegeben und erneut 10 min mit 1200 rpm bei RT zentrifugiert, diesen Schritt wiederholte man noch ein- bis zweimal. Für eine bessere Fixierung wurde nach der letzten Zentrifugation 5 ml -20°C Fixativ hinzugegeben und ü.N. bei -20°C gelagert.

Am Folgetag wurde für 10 min mit 1000 rpm bei RT zentrifugiert und erneut mit frisch hergestelltem -20°C Fixativ inkubiert. Nach dem Pelletieren wurde der Überstand bis auf 1,5 ml abgenommen und von dem resuspendierten Pellet wurde probeweise auf einen Objektträger aufgetropft. Die Objektträger wurden vorbereitet, indem sie mindestens 24 Std in 70%igem Ethanol lagerten und vor dem Gebrauch mit ddH₂O gespült wurden. Nach einer positiven lichtmikroskopischen Beurteilung der vorhandenen Metaphasen wurde die restliche Suspension aufgebracht. Die Objektträger trockneten ü.N. bei RT und wurden anschließend mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 85% und 100%) entwässert und bei -20°C gelagert.

3.2.5 May-Grünwald/ Giemsa-Färbung

Die May-Grünwald-Giemsa-Färbung ist z.B. geeignet, um sich eine Übersicht über ein Chromosomenpräparat zu verschaffen bzw. Blutaustriebe zu beurteilen. Zellkerne erscheinen rötlich-violett und das Zytoplasma der lymphoiden Zellen ist lichtblau und Erythrozyten sind rosa angefärbt.

Die Objektträger wurden für 6 min mit einer May-Grünwald-Lösung überschichtet und dann für 3 min in einer Küvette mit 1x PBS gestellt. In dieser Zeit wurden 40 ml einer 1:20 mit ddH₂O verdünnten Giemsa-Lösung hergestellt und filtriert. Die Objektträger wurden für 13 min mit der Giemsa-Lösung gefärbt und anschließend spült man 1 min mit ddH₂O. Luftgetrocknete Objektträger konnten dann mit einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt werden.

3.2.6 DNA-Präparationsmethoden

3.2.6.1 Alkalische Lyse

Diese von Birnboim und Doly (1979) vorgestellte Methode eignet sich auch für endA⁻ Bakterienstämme und die erhaltene DNA hat eine relativ hohe Reinheit.

Von einer ü.N.-Kultur wurden für 'high copy' Plasmide 5 ml Kultur und von 'low copy' Plasmiden 8 ml Kultur 5 min bei 4°C mit 4.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 300 μl eiskalter Lösung 1 resuspendiert, mit dem enthaltenen EDTA wurden die Zellwände aufgebrochen. Nach Zugabe von 300 μl frisch angesetzter Lösung 2 wurde 5 bis 9 mal invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Durch den

höheren pH-Wert denaturiert chromosomale DNA und durch das enthaltene SDS wurden die an die DNA assoziierten Proteine und Polysaccharide abgelöst. Von der eiskalten Lösung 3 wurden 300 µl zugegeben und 5 bis 9 mal invertiert, hier wurden die chromosomale DNA und die Proteine mit Kaliumacetat gefällt. Nach 5 minütiger Lagerung auf Eis und einer Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand (ca. 700 µl) in ein neues Gefäß überführt. Dazu kam 1 Volumen Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1), das die restlichen in Lösung befindlichen Proteine beseitigte. Nach 10 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde die obere, wäßrige Phase, die die DNA enthält, in ein neues Gefäß gegeben und 1 Volumen Isopropanol dazu pipettiert. Pelletiert wurde durch 15 minütiges zentrifugieren bei 13.000 rpm und danach wurde das DNA-Pellet mit 1 ml -20°C kalten 70%igen Ethanol gewaschen. Nach einer abschließenden Zentrifugation wurde das Pellet luftgetrocknet und in 30-50 µl Lösung (10 mM TrisCl pH 8,0; 10 µg/ml RNaseA) resuspendiert.

- Lösung 1 50 mM Glucose
 25 mM Tris-HCl pH 8,0
 10 mM EDTA pH 8,0
- Lösung 2 0,2 N NaOH
 1% SDS
- Lösung 3 3 M Kaliumacetat pH 4,8

3.2.6.2 Plasmid-Maxipräparation (Macherey-Nagel, Düren)

Zur Isolierung hochreiner Plasmid-DNA wurde ein spezielles Aufreinigungs-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Anstelle einer Phenol/Chlorophorm-Extraktion erfolgt die Aufreinigung mit einer Kombination aus alkalischer Lyse und Säulen-Anionenaustausch-Chromatographie, an deren Matrix DNA binden und vorhandene Proteine leicht abgewaschen werden können.

Je nach Kulturvolumen und zu erwartender DNA-Menge wählt man Säulen unterschiedlicher Kapazität:

Säulenbezeichnung	Kapazität (µg DNA)
AX 20	20
AX 100	100
AX 500	500

Die Aufarbeitung erfolgte nach dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers und im weiteren werden die Mengenangaben für Aufreinigung von low-copy Plasmiden (BAC-DNA) angegeben.

Für die Kultivierung wurden 250 ml vorgewärmtes LB-Selektionsmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 12-16 Stunden üN in einem 37°C-Schüttler inkubiert. Die Bakterienkultur wurde für 15 min bei 6.000 x g (ca. 6.000 rpm Sorvall GSA -Rotor) und 4°C zentrifugiert. Im weiteren Verlauf der Präparation wurden alle Zentrifugationen bei 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde komplett verworfen und die Pellets in 24 ml eiskaltem Puffer S1 resuspendiert. Durch die Zugabe von 24 ml Puffer S2 (RT) erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien, um den Puffer komplett zu verteilen wurde 6-8 mal invertiert. Nach maximal 5 min bei RT wurden 24 ml von dem eiskaltem Puffer S3 hinzugegeben und sofort 6-8 mal invertiert, gefolgt von einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis. Das Bakterienlysat wurde von den vorhandenen Zelltrümmern befreit, indem man die Bakteriensuspension durch einen mit ddH₂O anfeuchteten Faltenfilter filtriert. Ein klares Filtrat wurde weiterverarbeitet und im anderen Fall erfolgte eine erneute Filtration. Während der Filtration wurde die Säule mit 6 ml Puffer N2 äquilibriert. Mit dem klaren Bakterienlysat wurde die Säule beladen, wobei das durchgelaufene Lysat in einem 50 ml Gefäß aufgefangen und erneut auf die Säule gegeben wurde. Mit diesem Schritt konnte die DNA-Ausbeute erheblich gesteigert werden. Durch Zugabe des Puffer N3 (3 mal 12 ml) auf die Säule wurden Proteine und RNA entfernt. Die Plasmid-DNA wurde mit 2 mal 7 ml Puffer N5 (50°C) eluiert, dann mit 2x 5 ml Isopropanol gefällt und für 30 min bei 15.000 x g (13.000 rpm SS34 Sorvall-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml -20°C kalten 70%igen Ethanol gewaschen bevor es nach Lufttrocknung in 50 bis 200 µl H₂O oder 10 mM TrisCl pH 8,0 aufgenommen wurde. Die Reinheit der DNA wurde mittels UV-Absorptionsspektrometrie bestimmt und es folgte eine Restriktionsspaltung und Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der Intaktheit der DNA.

Puffer S1	50 mM TrisCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A pH 8,0
Puffer S2	200 mM NaOH 1% SDS (w/v)
Puffer S3	2,80 M Kaliumacetat pH 5,1

Puffer N1	100 mM Tris/H ₃ PO ₄ 15% Ethanol 400 mM KCl pH 6,3
Puffer N2	100 mM Tris/ H ₃ PO ₄ 15% Ethanol 900 mM KCl pH 6,3 0,15% Triton X-100 (w/v)
Puffer N3	100 mM Tris/H ₃ PO ₄ 15% Ethanol 1150 mM KCl pH 6,3
Puffer N5	100 mM Tris/H ₃ PO ₄ 15% Ethanol 1000 mM KCl pH 6,3

3.2.7 Konzentrationsbestimmung isolierter Nukleinsäuren

Die Menge isolierter DNA wurde photometrisch bestimmt. Die DNA-Lösung wurde 1:100 in 10 mM Tris-Cl pH 8,0 verdünnt und mit einer Wellenlänge von 260 nm in einem UV-Photometer gemessen. Misst man eine Extinktion von 1 bei 260 nm so entspricht das einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, wenn die Schichtdicke der Küvette 1 cm beträgt (Sambrook et al., 2001).

Danach berechnet sich die Konzentration wie folgt:

$$\text{DNA}_{\text{konz.}} = 50 \times \text{gemessene Absorption} \times \text{Verdünnungsfaktor} (\mu\text{g/ml})$$

Um die Reinheit der DNA zu bestimmen, wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt und ein Quotienten der OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ gebildet. Beträgt der Wert 1,8 bis 2,0 so handelt es sich um sehr reine DNA, liegt der Wert allerdings unter 1,8 so kann man von Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Phenol ausgehen.

3.2.8 DNA Aufreinigung aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit

Für die Isolation der DNA aus Agarosegelen wurde die low-melting-Agarose verwendet, deren Vorteil ein niedriger Schmelzpunkt ist. Die DNA ließ sich leichter als bei den anderen aus der Agarose-Matrix lösen. Nach der DNA-Auftrennung in einem Agarosegel und

Anfärben mit Ethidiumbromid wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein EppendorfgefäÙ überführt. Das Gewicht wurde bestimmt und entsprechend 3 Volumen Puffer QG hinzugegeben. Es folgte eine 10 minütige Inkubation in einem 50°C Thermoschüttler und gelegentliches Mischen diente der Auflösung des Gelstücks. Um eine optimale Bindung der DNA an die QIAquick-Membran zu erreichen, sollte der pH-Wert $\leq 7,5$ betragen. Optisch konnte man an der gelben Farbe des Puffer QG den optimalen pH-Wert ablesen und bei Abweichungen mussten 10 μ l 3 M NaAc pH 5,0 hinzugegeben werden. Für Fragmente ab einer Größe von 4 kb wurde die Ausbeute durch Zugabe eines Gelvolumens Isopropanol (1 μ l/mg) erhöht. Die Suspension wurde auf eine Säule (QIAquick spin column) appliziert. Durch 1 minütiges Zentrifugieren mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde die DNA an die Säule gebunden und der Durchfluß wurde wie auch in den folgenden Waschschritten verworfen. Agarosereste wurden durch Zugabe von 500 μ l Puffer QG und 1minütiger Zentrifugation entfernt. Es folgte ein Waschschriff mit 750 μ l Puffer PE und eine weitere Zentrifugation um Waschpufferrückstände zu vermeiden. Die Säule wurde in ein vorbereitetes EppendorfgefäÙ überführt und die DNA mit 35 μ l Elutionspuffer (10 mM TrisCl pH 8,5) eluiert. Die DNA-Ausbeute wurde mit einem 1%igem Agarosegel überprüft. Die Zusammensetzung der Puffer QG und PE ist nicht bekannt.

3.2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die für die Markierung eingesetzt wurden mussten von Nukleotiden, Salzen, Primern und Polymerase gereinigt werden. Für diese wurde das QiaQuick PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Im wesentlichen ähnelt dieses Verfahren dem vorhin beschriebenen aus Agarosegelen. Im Unterschied wird hier das PCR-Produkt mit dem fünffachen Volumen Puffer PB gemischt und auf die Säulen gegeben. Weitere Wasch- und Elutionsschritte unterscheiden sich nicht.

3.2.10 Restriktionsspaltung

Restriktionsanalysen wurden für die DNA-Klone erstellt, um ein sog. Fingerprint zu erhalten und die Intaktheit der DNA zu überprüfen. Zudem erfolgten für die BAC-Klone Restriktionsspaltungen mit *NotI*, um das DNA-Insert aus dem Vektor zu isolieren und anschließend mit der Methode der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) die Insertgröße zu bestimmen.

Für optimale Reaktionsbedingungen der Enzyme wurden die mitgelieferten 10x Reaktionspuffer verwendet und die Reaktion fand bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur statt. Bei Reaktionen mit zwei oder mehr Enzymen pro Spaltung wurde der Puffer ausgewählt, der eine maximale Aktivität für möglichst alle Enzyme ermöglichte. In der Regel wurden pro µg DNA 10 Units Enzym eingesetzt, dabei variierten die Reaktionsvolumina je nach DNA-Menge zwischen 20 µl und 100 µl. Die Reaktionszeit betrug in Abhängigkeit von der zu spaltenden DNA-Menge 2 bis 16 Std und die Fragmente wurden dann mit einem 0,8-1%igen oder einer PFGE analysiert.

3.2.11 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

3.2.11.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele wurden für die Auftrennung von PCR-Produkten, gespaltener DNA und aufgereinigten DNA-Fragmenten verwendet.

Für die Gele wurde Agarose in 1x TBE als Standardpuffer verwendet. Die Agarose-Konzentration hing im wesentlichen von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente ab. Für Fragmente bis 3 kb wurden 2%ige Gele (Gelträger 8 x 12 cm) und für Fragmente ab 3 kb 0,8 oder 1%ige Gele (Gelträger 12 x 18 cm) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Probenpuffer versetzt und für jede Auftrennung wurde ein geeigneter Längenstandard mitgeführt. Die angelegte Spannung betrug 10 V/cm und eine Laufzeit von 40 min (2%ige Gele) bzw. 3 Std (0,8 oder 1%ige Gele) wurde entsprechend eingehalten. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht wurden die aufgetrennten DNA-Banden sichtbargemacht und dokumentiert. Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt, das in die DNA interkaliert und durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm zur Fluoreszenz angeregt wird. Die Gelbanden wurden mit einem UV-Transilluminator (Intas UV-Systeme) sichtbargemacht und die Dokumentation erfolgte mit einer digital Kamera (CCD Kamera KP-16a, Hitachi) in Kombination mit einem Fotodrucker (Mitsubishi photo printer P500). Alternativ wurde auch eine Polaroid-Kamera CU-5, Rotlichtfilter und Positiv-Negativ-Film 667-Polaroid verwendet.

1x TBE	89 mM Tris
	89 mM Borsäure
	2 mM EDTA
	pH 8,3

6x DNA-Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylen Cyanol FF 30% Glycerin in ddH ₂ O
Ethidiumbromid-Färbebad	1 µg/ml EtBr in 1x TBE

3.2.11.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (Schwartz and Cantor, 1984) dient der Auftrennung sehr großer DNA-Moleküle (ab 20 kb) und wurde für die Größenbestimmung der BACs eingesetzt. Im Gegensatz zur Agarose-Gelelektrophorese werden bei der PFGE zwei elektrische Felder im Winkel von 120° zueinander angelegt und im Wechsel (in Pulsen) eingeschaltet. Es wurde das Gerät CHEF-DR 3 von der Firma Biorad (München) eingesetzt und mit dem Programm 'Chef Mapper' konnten die Bedingungen für die Auftrennung ermittelt werden. Für die Analyse von *NotI* gespaltener BAC-DNA wurden folgende Einstellungen am Gerät vorgenommen:

Fragmentgröße: 3 kb bis 250 kb

Laufzeit: 8 Std 18 min

Initial Switch Time: 0,16 s

Final Switch Time: 21,8 s

Gradient: 6,0 V/cm

Winkel: 120°

Temperatur: 14°C

Für das Gel wurde 1%ige FastLane Agarose (Biozym, Hess.-Oldendorf) in 0,5x TBE benötigt und als Laufpuffer diente ebenfalls 0,5x TBE. Die fertigen Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert.

3.2.11.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse der polymorpher Marker erfolgte mit nicht-denaturierender nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese, da hier kleine Basenpaardifferenzen (5-20 bp) zwischen Allelen aufgetrennt und sichtbar gemacht werden konnten.

Die Auftrennung erfolgte mit 8%igen Polyacrylamidgelen in einer Vorrichtung mit einer Trennstrecke von 13 cm. Der Gelträger bestand aus zwei gereinigten Glasplatten (15 cm x 13

cm), die durch Abstandhalter getrennt, mit einem Gummischlauch abgedichtet und Metallklammern fixiert wurden. Vor dem Gießen des Gels wurde die Kammer lotrecht aufgestellt und der Kamm für die Geltaschen zwischen die Glasplatten eingesetzt.

In einem 50 ml Gefäß wurde das 8%ige Gel vorbereitet:

	15 ml	1x TBE
	8 ml	30% Acrylamid-Bisacrylamid
	7 ml	ddH ₂ O
Katalysator	30 µl	TEMED
Starter	150 µl	10% APS

Es wurde durch Invertieren gemischt, mit einer Glaspipette die Lösung luftblasenfrei in den Gelträger gegeben und der Kamm positioniert. Aufrechtstehend polymerisierte das Gel und wurde dann in die Vorrichtung eingespannt. In die Laufpufferdepots wurden insgesamt 700 ml 0,5x TBE gegeben und Luftblasen zwischen den Glasplatten beseitigt. Die mit 1/6 Volumen Probenpuffer versetzten DNA-Proben wurden zusammen mit einem entsprechenden Längenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 2,5 Std bei einer angelegten Spannung von 120 V. Die Dokumentation erfolgte wie bei der Agarose-Gelelektrophorese beschrieben.

3.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Saiki et al. (1985, 1988) entwickelte Methode (polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht die enzymatische Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei flankierenden Oligonukleotid-Primern. Die Primer lagern sich nach Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA an die Einzelstränge an. An die freien 3'-OH-Enden der Primer heftet die DNA-Polymerase freie Nukleotide. Auf diese Weise wird ein komplementärer DNA-Strang erzeugt. Die entstandenen DNA-Syntheseprodukte werden dann bei 94°C denaturiert. Darauf folgt ein neuer Zyklus aus Anlagerung, Synthese und Denaturierung. Für das Aufschmelzen und die spezifische Anlagerung werden hohe Temperaturen benötigt, deshalb verwendet man für die Reaktionen die hitzestabile *Taq*-Polymerase. Diese Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und hat ein Temperatur-Optimum von 72°C.

Die Anlagerung der Oligonukleotide (Annealing) findet bei einer spezifischen Temperatur statt. Als Anhaltspunkt zur Berechnung kann die Schmelztemperatur (T_m) dienen. Bei dieser Temperatur dissoziieren gerade die korrekt gepaarten Primer-Template-Hybride.

Man kann den T_m -Wert nach der 2 + 4-Regel abschätzen: $T_m = (4x [G+C]) + (2x [A+T])^\circ\text{C}$

Die Anzahl der G und C Nukleotide [G+C] und die der A und T Nukleotide [A+T] innerhalb der Primersequenz fließen nach dieser Formel in die Berechnung ein. Die optimale Anlagerungstemperatur sollte dann mit 2°C bis 4°C unterhalb der Schmelztemperatur zwischen 55°C und 65°C liegen.

3.2.12.1 Standard-PCR

Für die Standard-PCR wurde der HotStar-Taq Master Mix (QIAGEN) verwendet. Es wurden mit dieser Polymerase weniger bis kein Hintergrund oder unspezifische Amplifikationsprodukte beobachtet. Der Vorteil besteht in der rekombinanten 94-kDa Taq-DNA-Polymerase, die bei normalen Temperaturen inaktiv und erst durch eine Denaturierung für 15 min bei 95°C aktiviert wird.

Ein 15 μl PCR-Ansatz für den HotStar-Taq Master Mix Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 0,5 μl DNA-Template (100 ng/ μl)
- 0,3 μl Primer A (50 pmol/ μl)
- 0,3 μl Primer B (50 pmol/ μl)
- 7,5 μl HotStar-Taq Master Mix
- 6,4 μl ddH₂O

HotStar-Taq Master Mix (2x konzentriert)

- HotStar-Taq DNA Polymerase
- PCR-Puffer mit 3 mM MgCl₂, Tris-HCl, (NH₄)₂SO₄
- 400 μM je dNTP

Alle Komponenten wurden zusammen pipettiert, dabei wurde auch immer eine Negativkontrolle (Ansatz ohne DNA) mitgeführt. Die PCR-Reaktion lief dann nach

folgendem Temperaturprofil ab, für Fragmente bis 600 bp wurden 30 s und darüber 1 min für jeden Schritt im Zyklus veranschlagt.

Temperatur	Zeit
95°C	15 min
92°C	30 s – 1 min
53-68°C	30 s – 1 min 35 Zyklen
72°C	30 s – 1 min
72°C	10 min
10°C	Hold

3.2.12.2 PCR für das Durchmustern einer BAC-Bibliothek

Die PCR wurde mit einem kleinen Volumen durchgeführt, um die DNA-Ressourcen der Bank zu schonen. Als Vorgehensweise für das Identifizieren der BAC-Klone wurde das ‘Down to the well’-Verfahren angewandt.

Die PCR-Ansätze für das Durchsuchen der BAC-Bibliothek mit HotStar-Taq Master Mix wurden im Gegensatz zur Standard-PCR in der DNA-Menge verändert. Für den ‘upper-pool-screen’ wurden 0,2 µl DNA und für die ‘plate pool-screen’/ ‘down to the well’-Ansätze wurden 0,5 µl DNA eingesetzt.

3.2.12.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur schnellen Auffindung rekombinanter Klone verwendet. Es wurde der Standard-PCR Ansatz als Grundlage verwendet, jedoch um die DNA Menge mit Wasser aufgefüllt. Von der LB-Agarplatte wurde der Klon vorsichtig mit einer 10µl-Pipettenspitze abgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass der Agar zur Vermeidung von Kontaminationen nicht berührt wurde. Mit der Spitze wurde die Bakterienkolonie in das PCR-Gefäß überführt und anschließend auf einer Agarplatte mit gekennzeichneten Flächen ausgestrichen. Man hat nach Inkubation der Platte im 37°C-Schrank den Vorteil die einzelne Kolonie aus der Kolonie-PCR vorliegen zu haben. Die PCR wurde unter den oben angegebenen Standard-PCR Bedingungen durchgeführt.

3.2.12.4 Halb-quantitative PCR

Diese Methode wurde für die halb-quantitative Bestimmung von DNA-Konzentrationen verschiedener Allele benutzt. In der Duplex-PCR wurden zwei Primerpaare von zwei Loci im gleichen PCR-Ansatz verwendet. Der PCR-Ansatz entsprach der Standard-PCR jedoch wurden insgesamt nur 25 Zyklen durchgeführt. Für die Analyse wurden von 15 µl Gesamtvolumen 8 µl mit Probenpuffer versetzt und in einem 8%igen Polyacrylamidgel erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente.

3.2.12.5 Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR (DOP-PCR)

Die DOP-PCR erlaubt über degenerierte Primer (5'-3': CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G) die Vermehrung von DNA, da sich die Primer statistisch verteilt an die DNA anlagern und die Amplifikation der gesamten DNA vermitteln (Telenius et. al. 1992). Man bedient sich einer Voramplifikation (Pre-DOP) und durch weitere Amplifikationen erhöht man die Ausbeute auch bei geringer DNA-Ausgangsmengen.

PCR-Ansatz Pre-DOP mit einem Gesamtvolumen von 5 µl:

0,5 µl	10x Taq-Puffer A
1,2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,5 µl	DOP-Primer (25 pmol/µl)
0,5 µl	dNTP (2,5 mM)
0,5 µl	Taq Polymerase (5 U/µl, Promega)
2,7 µl	ddH ₂ O bei BAC-DNA
0,0 µl	ddH ₂ O bei YAC-DNA
	ca. 100 ng/µl DNA-Template
1 µl	BAC-DNA (alkalische Lyse 1:10 verdünnt)
2,3 µl	YAC-DNA (DOP-Produkte)

Taq-Puffer A (Promega):

50 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
100 mM	NaCl
0,1 mM	EDTA
1 mM	DTT
50%	Glyzerin
1%	Triton X-100

PCR-Reaktion der Pre-DOP:

Temperatur	Zeit
94°C	2 min
94°C	1 min
37°C	1 min 8 Zyklen
72°C	3 min
72°C	10 min
10°C	Hold

Die DNA der Pre-DOP wird anschließend für weitere Reaktionen eingesetzt. Mittels eines Agarose Gels wird die Fragmentgröße und amplifizierte Menge abgeschätzt. Für weitere Amplifikationen verwendet man 2 bis 8 µl DNA aus der 1. DOP-PCR.

PCR-Ansatz 1. DOP:

5 µl	10x Taq-Puffer A
5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	DOP-Primer (25 pmol/µl)
5 µl	dNTP (2,5 mM)
0,5 µl	Taq Polymerase (5 U/µl, Promega)
28 µl	ddH ₂ O
5 µl	DNA-Template aus Pre-DOP

PCR-Reaktion der 1. DOP:

Temperatur	Zeit
94°C	3 min
94°C	1 min
40°C	1 min 35 Zyklen
72°C	3 min
72°C	10 min
10°C	Hold

3.2.13 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden an Metaphase Chromosomen und Interphasekernen, die auf Objektträger fixiert waren, hybridisiert .

3.2.13.1 Markierung der DNA-Sonden durch DOP-PCR

Der Einbau der fluoreszenz markierten Nukleotide erfolgte wie bei der DNA-Amplifikation mit der DOP-PCR. Hierbei ist ein bestimmtes Verhältnis von markierten dUTPs und unmarkierten dTTPs entscheidend. Würde man nur markierte dUTPs der Taq-Polymerase zum Einbau anbieten, so würde es zu sterischen Behinderungen zwischen den fluoreszenz markierten dUTPs kommen und eine effektive Markierung der DNA würde verhindert.

PCR-Ansatz für die Markierung mittels DOP-PCR:

- 5 µl 10x Taq-Puffer A
- 4 µl 25 mM MgCl₂
- 10 µl 25 pmol/µl DOP-Primer
- 3,75 µl 2 mM dATP, dGTP, dCTP
- 1 µl 1 mM dTTP
- 0,5 µl 0,5 mM Fluoro dUTP
- 0,5 µl 5 U/µl Taq Polymerase
- 5 – 8 µl DNA-Template aus 1. DOP-PCR
- 29,75 – 26,75 µl ddH₂O

Die PCR-Reaktion wurde wie bei der DOP-PCR angegeben durchgeführt. Zur Überprüfung der Fragmentgrößen wurden 4 µl des Reaktionsansatzes auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.

3.2.13.2 Markierung der DNA-Sonden durch Nick-Translation

Die bei der Nick-Translation eingesetzte DNaseI-Konzentration wurde für jede DNA-Sonde durch eine DNaseI-Titration optimiert. Es wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:4000, 1:6000, 1:10.000, 1:15.000) der DNaseI (10 U/µl) hergestellt und bei 15°C für 60 min inkubiert.

- 1 µg DNA
- 2,5 µl 10x Nick-Translations Puffer
- 2,5 µl DNaseI
- mit ddH₂O auf 25 µl Gesamtvolumen auffüllen

10x Nick-Translations Puffer

- 0,5 M Tris-HCl pH 7,9
- 50 mM MgCl₂
- 0,5 mg/ml BSA

Die Reaktion wurde abgestoppt mit 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und erhitzt für 10 min auf 65°C. Mit einem 2%igen Agarosegel wurden die Fragmentgrößen kontrolliert. Für die Nick-Translation wurde die DNaseI-Konzentration eingesetzt, die die Fragmente in der Größe zwischen 100 bp und 600 bp erzeugte.

Ansatz Nicktranslation:

- 5 µl 10x Nick-Translations Puffer
- 0,5 µl 100 mM DTT
- 5 µl 0,5 mM Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP)
- 5 µl 0,5 mM Bio-16-dUTP/dUTP (1:3) bzw. Dig-11-dUTP/dUTP (1:3)
- 5 µl DNaseI (ermittelte Konzentration)
- 2,5 µl DNA-PolymeraseI (10 U/µl)
- 2 µg DNA
- mit ddH₂O auf 50 µl Gesamtvolumen auffüllen

Nach 60 min wurde die Reaktion wie oben beschrieben abgestoppt und 4 µl des Reaktionsansatzes auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.

3.2.13.3 Markierung der DNA-Sondern durch BioPrime (LifeTechnologies)

Bei diesem System erfolgt die Markierung der DNA mit Biotin-14-dCTP unter Verwendung von random-Primern (Oktamer) und dem Klenow-Fragment der DNA-PolymeraseI.

- 5-20 µl 100 ng DNA
- 20 µl 2,5x random-Primer (eiskalt)
- Denaturierung 5 min in kochendem Wasser, das Gefäß auf Eis überführen und die weitem Komponenten hinzugeben.
- 5 µl 10x d NTP Mix
- bis zu einem Volumen von 49 µl mit ddH₂O auffüllen, mischen
- 1 µl Klenow-Fragment hinzugeben, mischen, 15-30 s zentrifugieren
- Inkubation 60 min bei 37°C, Reaktion mit 5 µl Stop-Puffer beenden.

2,5x random-Primer

125 mM Tris-HCl (pH 6,8)

12,5 mM MgCl₂

25 mM 2-Mercaptoethanol

750 µg/ml random-Primer

10x dNTP Mix

1 mM Biotin-14-dCTP

1 mM dCTP

2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

1 mM Na₂EDTA**Klenow-Fragment (40 U/µl) in**50 mM K₃PO₄ (pH 7,0)

100 mM KCl

1 mM DTT

50% Glyzerin

Stop-Puffer

0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0)**3.2.13.4 Aufarbeitung der markierten DNA-Sonden**

Für eine Hybridisierung wurden humane DNA-Sonden eingesetzt, die vielfach repetitive Sequenzen enthält. Diese wurden supprimiert, indem man der markierten Sonde sog. Kompetitions-DNA zusetzte, die sich vor der eigentlichen Hybridisierung an die entsprechenden Sequenzen der Sonde anlagerte. Zur Absättigung unspezifischer Sequenzen wurde Heringssperm-DNA eingesetzt und die hochrepetitiven Sequenzen mit Cot1-DNA abgesättigt (Lichter et al., 1988; Pinkel et al. 1988).

Es wurden zwischen 100 ng und 500 ng markierte DNA mit 15 µl Hering DNA (9,7 µg/µl) und 10 µl Cot1-DNA (1µg/µl) copräzipitiert. Zu dem Gesamtvolumen wurde die 2,5 fache Menge 100% Ethanol und 1/60 Volumen 3 M NaAc (pH 5,2) hinzugegeben und danach erfolgte eine Fällung bei -70°C für 30 min oder bei -20°C ü.N.. Es wurde für 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, anschließend der Überstand abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Für eine 18x18 große Hybridisierungsfläche wurde das Pellet in 7,5 µl

deionisiertem Formamid 15 min unter Schütteln bei 42°C resuspendiert danach wurden 7,5 µl (20% Dextransulfat, 4x SSC) hinzugegeben und erneut unter Schütteln bei 37°C vermischt. Es folgte dann die Denaturierung für 10 min bei 75°C und ein 'Preannealing' bei 37°C für 30 bis 60 min. Die so vorbereiteten Sonden ließen sich auf die vorbereiteten Objektträger pipettieren.

3.2.13.5 Vorbehandlung und Denaturierung der Chromosomenpräparate

Parallel zur Sondenvorbereitung wurden die Objektträger zuerst in einer Küvette mit 2x SSC (RT) äquilibriert. Auf den Objektträger wurden 200 µl RNaseA (200 µg/ml) in 2x SSC gegeben und mit einem 24x50 mm Deckglas abgedeckt. Es wurde für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Präparate 3x 5 min mit 2x SSC gewaschen.

Zur Denaturierung von Proteinen folgte eine Pepsin-Behandlung in einer Küvette gefüllt mit 25 µl Pepsin (10%ig) in 50 ml 0,01 M HCl (pH 2,3) und die Inkubation erfolgt für 10 min bei 37°C. Danach wurde mit 1x PBS (2x 5 min) und mit 1x PBS/50 mM MgCl₂ (1x 5 min) jeweils bei RT gewaschen. Die Chromosomenpräparate wurden je 3 min bei RT mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 85% und 100%) dehydriert.

Nach dem Lufttrocknen wurden die Objektträger mit 200 µl Denaturierungslösung (70% deionisiertes Formamid, 2x SSC) überschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und für 1 min bei 85°C im Ofen inkubiert. Im Anschluss wurde erneut je 3 min mit einer -20°C kalten aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 85% und 100%) dehydriert und die Präparate anschließend luftgetrocknet.

RNaseA 20 mg/ml

10 mM Tris-Cl pH 7,5

15 mM NaCl

15 min kochen, Aliquots bei -20°C lagern

10% Pepsin

100 mg/ml in H₂O

PBS Kalzium/Magnesium frei (pH 7,3)

0,14 M NaCl

2,7 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

1,4 mM KH₂PO₄

20x SSC (pH 7,0)

3 M NaCl

0,3 M C₆H₅O₇Na₃

3.2.13.6 Hybridisierung

Auf die vorbereiteten Objektträger wurden die markierten und aufgearbeiteten DNA-Sonden auf entsprechend markierte Hybridisierungsfelder aufgetragen und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Die Ränder der Deckgläser wurden mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C.

3.2.13.7 Waschen der hybridisierten Chromosomenpräparate

Nach der Hybridisierung wurden nicht gebundene bzw. unspezifisch gebundene DNA-Sonden entfernt, indem verschiedene Waschschrte mit steigender Stringenz durchgeführt wurden.

Das Fixogum wurde vorsichtig abgelöst und die Chromosomenpräparate nach folgenden Bedingungen gewaschen:

Temperatur	Waschlösung	Zeit
42°C	2x SSC	3x 5 min
42°C	0,4x SSC	3x 5 min
60°C	0,1x SSC	2x 5 min

Die Waschlösungen waren für die indirekt und direkt markierten Sonden gleich, jedoch wurde bei der direkten Markierung nach dem Waschen eine Gegenfärbung mit DAPI angeschlossen.

3.2.13.8 Detektion der Biotin bzw. Digoxigenin markierter DNA-Sonden

Für die weiteren Schritte wurde der Objektträger äquilibriert (4x SSC; 0,1% Tween 20). Im weiteren Verlauf konnten unspezifische Bindungsstellen die folgenden Antikörperreaktionen stören, deshalb wurde mit einer Blocking-Lösung (3% BSA (filtriert); 0,1% Tween 20; 4x SSC) bei 37°C für 60 min inkubiert.

Die Antikörper wurden in getrennten Ansätzen mit Antikörper-Lösung (1% BSA; 0,1% Tween 20; 4x SSC) verdünnt. Davon wurden je 100 µl auf den Objektträger aufgetragen und gemischt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 200 µl ergab.

	Verdünnungen	
	Antikörper gegen Biotin	Antikörper gegen Digoxigenin
1. Antikörper	Fluorescein anti-Avidin (1:200)	Cy3 anti-Dig (1:200)
2. Antikörper	Biotyniliertes anti-Avidin (1:300)	Cy3 anti-Mouse (1:300)
3. Antikörper	Fluorescein anti-Avidin (1:200)	

Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach der Inkubationszeit wurde der Objektträger 3x 5 min bei 42°C mit der Antikörper-Waschlösung (4x SSC; 0,1% Tween 20) gewaschen. Die Gegenfärbung folgte anschließend mit DAPI.

3.2.13.9 Gegenfärbung der DNA

Für die Gegenfärbung wurden die Objektträger für 20 bis 40 s in einer Küvette mit 1µg/ml DAPI in 50 ml 2x SSC belassen. Überschüssiges DAPI wurde mit deionisiertem H₂O entfernt und für ca. 15 min lässt man die Objektträger im Dunklen trocknen. Zur Konservierung der FISH-Signale deckt man den Objektträger mit einem Antifade-Medium ein.

3.2.13.10 Fluoreszenzmikroskopie und Dokumentation

Für die Auswertung der Hybridisierungen stand ein Auflichtfluoreszenz-Mikroskop von der Firma Olympus zur Verfügung. Die Filterkombination der Anregungsfilter bzw. Sperrfilter war für DAPI 360/40 bzw. 460/50, die Kombination für FITC war 475/30 bzw. 530/40 und für Cy3 545/30 bzw. 610/75. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Charged Coupled Devised (CCD) Kamera (ORCAI; Hamamatsu, Herrsching) und der Aufnahmesoftware ISIS-Imaging System (Metasystems, Altlußheim).

3.3 Fallbeschreibungen

3.3.1 Patientin CMI (partielle Trisomie 21)

Die klinischen Befunde dieser Patientin wurden von Prof. Kennerknecht und Dr. Lemcke am Institut für Humangenetik, Universität Münster erstellt.

Die Patientin CMI wurde als zweites Kind einer 31-jährigen Mutter und eines 33-jährigen Vaters geboren. Die Eltern waren gesund und nicht miteinander verwandt. Die 11 Jahre alte Tochter war nachweislich gesund. In der Familie waren bisher keine Erkrankungen bekannt. Über den Verlauf der Schwangerschaft und der Geburt lagen keine Daten vor, es war nur bekannt, dass eine frühere Schwangerschaft durch einen Abort beendet wurde.

Für eine Chromosomenanalyse wurde die Patientin im Alter von einem Monat an das Institut für Humangenetik in Münster überwiesen. Die Patientin wurde nach einem auffälligen Karyogramm hinsichtlich einer Trisomie 21 nach der sog. Jackson Liste (Jackson et al., 1976) beurteilt. Danach waren von 25 Merkmalen fünf vorhanden und zu diesen gehörten die Brachyzehalie, ein permanent geöffneter Mund, eine flache Nasenwurzel, ein kurzer Hals und kurze, breite Hände. Und zwei Merkmale (Brushfield Flecken, kurzer 5. Finger) waren in ihrer Beurteilung fraglich. Insgesamt wären das maximal sieben Merkmale, die als Kriterium zur Beurteilung von einem Down Syndrom heranzuziehen wären.

3.3.2 Patientin JP (partielle Monosomie 21)

Die klinischen Befunde dieser Patientin wurden von Prof. Kennerknecht und Dr. Lemcke, Institut für Humangenetik, Universität Münster erstellt.

Die Patientin JP wurde als erstes Kind einer 23-jährigen Mutter und eines 24-jährigen Vaters geboren. Beide Eltern waren gesund und nicht miteinander verwandt. Bei den beiden jüngeren Geschwistern der Patientin konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Bis auf einen Cousin väterlicherseits mit Down Syndrom war die Familiengeschichte unauffällig. JP wurde 1988 nach einer normalen Schwangerschaft in der 35. Woche geboren. Im Säuglingsalter trank sie schlecht und es wurden Verzögerungen in der motorischen und mentalen Entwicklung festgestellt. JP konnte erst im Alter von 2 Jahren laufen und die sprachliche Entwicklung war im Gegensatz zu altersgleichen Kindern verzögert. In früher Kindheit wurde linksseitig eine Gehörgangstresie festgestellt und sie zeigte beidseitige Ohranhängsel. Im Jahr 1995 traten erstmalig Krampfanfälle im Sinne von Absencen auf. JP besuchte eine Schule für Lernbehinderte und ihr IQ wurde mit 73 bestimmt.

Im Jahr 2001 wurde die Patientin wegen der Entwicklungsverzögerung vorstellig. Im Alter von 12 Jahren wies sie einen schlanken und marfanoiden Habitus auf, bei einer Körperhöhe von 142,6 cm (10er-Perzentile) und einem Gewicht von 24,7 kg (<3er-Percentile) (Abbildung 3-1 A). Im Alter von 11 5/12 Jahren wurde bei JP ein Skeletalter von 10 Jahren (Atlasmethode nach Greulich-Pyle) bestimmt.

Verschiedene Dysmorphien des Schädels waren erkennbar: ein dreieckiges Gesicht mit einer breiten Stirn, große und tiefsitzende Ohren mit dysplastische Ohrmuscheln und einem weiten Augenabstand (Hypertelorismus). Es fanden sich nach unten geneigte Lidspalten, eine konvexe Nase, dünne Lippen, Zahnfehlstellungen und ein schmales Kinn (Abbildung 3-1 B).

Sie hatte proximal ansetzende Daumen, an beiden Händen zeigte der II. Finger eine Schiefstellung (Klinodaktylie) und die distalen Fingerglieder (Phalangen) der Finger I. und II. schienen verkürzt (Abbildung 3-1 C). Ihre Füße besaßen ausgeprägte Knochen am Innenrand (Normvariante) (Abbildung 3-1 D).

JP wies eine rechtsseitige, mittelgradige Schwerhörigkeit auf, sie war kurzsichtig und zeigte einen unsicheren Gang. Die Haut erschien im Ganzen durchscheinend und dünn. Klinische Untersuchungen des Herzen, Schilddrüse, Lunge, Gastrointestinaltrakt und Genitalien waren unauffällig, als auch neurologische Untersuchungen, Röntgenaufnahmen des Gehirns und metabolische Tests.

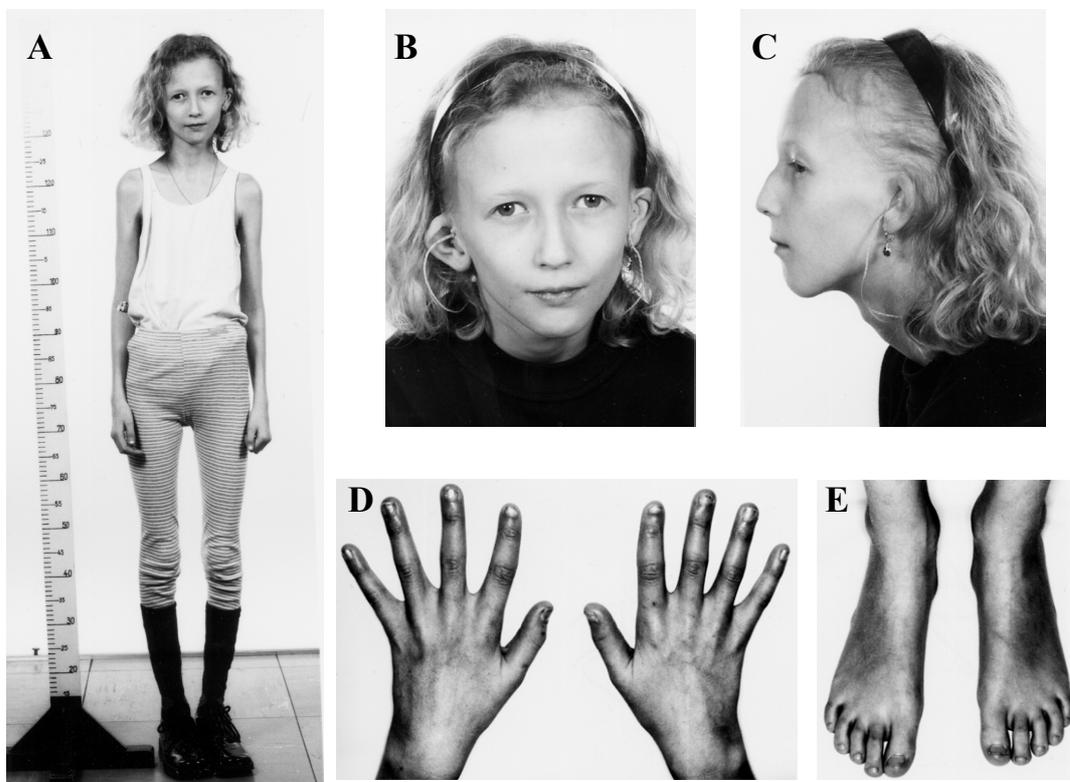


Abbildung 3-1 Aufnahmen der Patientin JP

- A)** In der Abbildung ist der marfanoiden Habitus erkennen von JP erkennbar.
B) Die Frontalaufnahme zeigt das dreieckige Gesicht mit einer breiten Stirn, die nach unten gerichteten Lidspalten, einen weiten Augenabstand, die schmalen Lippen und ein schmales Kinn.
C) Das Profil zeigt die konvexe Form der Nase und die tiefansetzenden Ohren mit dysplastischen Ohrmuscheln.
D) Die Hände zeigen proximal ansetzende Daumen, beidseitige eine Klinodaktylie der II. Finger und die distal verkürzten Phalangen der Finger I. und II.
E) Ein ausgeprägte Knochen am Innenrand der Füße (Normvariante) ist schwer erkennbar.

3.3.3 Patient SR (partielle Monosomie 21)

Die klinischen Befunde des Patienten wurden von Dr. Prager und Dr. Junge, Gemeinschaftspraxis für Humangenetik und medizinische Genetik, Dresden erstellt.

Der Patient SR ist das zweite Kind einer 27-jährigen Mutter und eines 30-jährigen Vaters. Die Eltern sind gesund und nicht miteinander verwandt. Die ältere Schwester entwickelt sich altersgerecht. In der Familie des Vaters zeigten mehrere Angehörige (seine Geschwister und deren Kinder) eine Sprachentwicklungsverzögerung. Ein Halbbruder der Mutter verstarb wenige Tage nach der Geburt, die Ursache ist unklar. Die weitere Familiengeschichte ist unauffällig.

SR wurde 1991 nach unauffälliger Schwangerschaft und einem vorzeitigem Blasensprung in der 40. SSW eutroph geboren; Geburtsmaße: 51 cm (55. Perzentile); 2850 g (20. Perzentile). Icterus neonatorum sonst ungestörte postnatale Adaptation. Im Säuglingsalter und im weiteren Verlauf war die Nahrungsaufnahme normal.

Im Alter von 1,5 Jahren wurde eine hochgradige circumskripte Aortenisthmusstenose ohne ausgeprägte Kollateralkreisläufe diagnostiziert. Sämtliche Kopf-Hals-Gefäße gingen aus einem Stamm ab (Normvariante). Die Aortenisthmusstenose wurde 1995 operativ korrigiert.

SR konnte mit 15 Monaten frei laufen, wies aber im Kleinkindalter eine Hypertonie der unteren Extremitäten und eine Rumpfhypotonie auf. Bis auf eine Koordinationsstörung war die motorische Entwicklung im weiteren Verlauf altersgerecht. Im Jahr 1999 traten erstmalig Krampfanfälle auf. Unter Ospolot (Sultiam) ist er anfallsfrei. Im EEG fanden sich Hinweise auf eine leichte parieto-occipitale Erregbarkeitssteigerung.

Die sprachliche Entwicklung war deutlich verzögert (multiple Dyslalie und Dysgrammatismus). SR zeigte eine mäßige mentale Retardierung. Er besuchte zunächst die Sprachheilschule und anschließend eine Schule für geistig Behinderte. Besondere Probleme traten im abstraktiven Bereich und im Durchsetzungsvermögen in der Gruppe auf.

Verschiedene faziale Dysmorphien waren erkennbar: großer Hirnschädel, breite hohe Stirn, dreieckiges Gesicht, Mikrogenie, prominentes Kinn, lange gebogene Wimpern, Lidspalten nach außen unten leicht abfallend, eingesunkene Nasenwurzel, kleine Nase, gerader Nasenrücken, relativ großer Mund, schmale Oberlippe, kurzes Philtrum und große tiefangesetzte Ohren.

Die Körpergröße lag bei normaler Wachstumsrate im Bereich der 25. Perzentile. Der Junge hatte einen schlanken, normal proportionierten Körperbau, schmale Hände und Füße. Die

Extremitäten waren frei beweglich mit Überstreckbarkeit der großen Gelenke. Das Hör- und Sehvermögen war unauffällig. Klinische Untersuchungen der Schilddrüse, Lunge, Leber, Milz, Gastrointestinaltrakt und Genitalien waren unauffällig, auch die metabolischen Tests lagen im Normbereich.

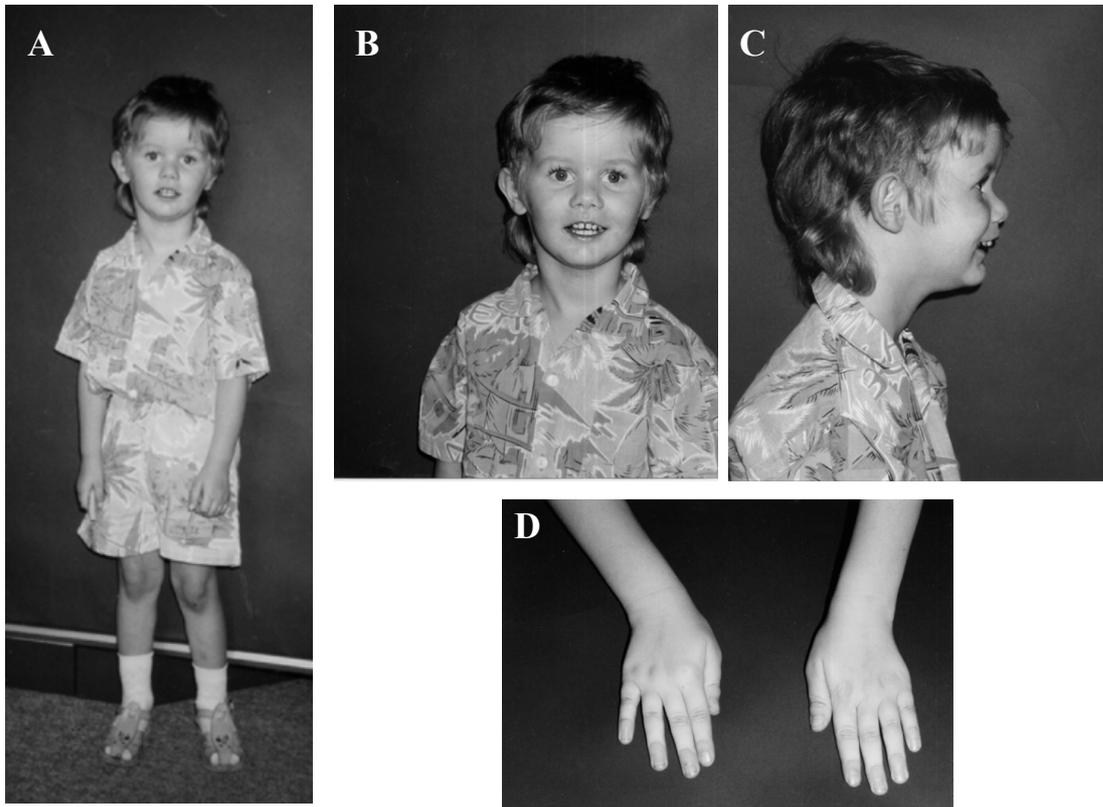


Abbildung 3-2 Aufnahmen des Patienten SR im Alter von 5 Jahren

A) Schlanker und normal proportionierten Körperbau des Patienten SR.

B) Die Portraitaufnahme von SR lässt den großen Hirnschädel, eine breite hohe Stirn, ein dreieckiges Gesicht, lange gebogene Wimpern, nach außen unten leicht abfallende Lidspalten, großer Mund, schmale Oberlippe und ein kurzes Philtrum erkennen.

C) In der seitlichen Aufnahme sind Mikrogenie, prominentes Kinn, eingesunkene Nasenwurzel, kleine Nase, gerader Nasenrücken, und große tiefangesetzte Ohren erkennbar.

D) Die Aufnahme zeigt die schmalen Hände.

Die Aufnahmen wurden von Dr. Prager/Dr. Junge zur Verfügung gestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung von BAC-Klonen für die Chromosomen 13, 21 und 22

Zum Nachweis von strukturellen und numerischen Chromosomenveränderungen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurden regionspezifische DNA-Sonden etabliert. Es wurde ein DNA-Sondenkollektiv für den Nachweis der häufig auftretenden autosomalen Trisomien 13 und 21 erstellt. Zusätzlich wurden für die strukturellen Veränderungen des '13q-Syndrom' und die Mikrodeletionsregion 22q11 DNA-Sonden etabliert. Dazu wurden Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) etabliert, die eine durchschnittlichen Insertgröße von ca. 150 kb aufweisen. Die BACs erwiesen sich für die FISH geeignet, denn sie zeigten in den Hybridisierungen distinkte und chromosomenspezifische Signale an Metaphaseplatten als auch in Interphasekernen. Für die Identifizierung regionspezifischer BAC-Klone wurde eine BAC-Bank (Incyte Genomics) mittels PCR durchmustert.

4.1.1 Chromosom 13 spezifische BACs

Für das Chromosom 13 wurden zwölf STS Marker für das Durchmustern der BAC-Bank verwendet und es konnten insgesamt 13 BACs isoliert werden. Dabei kartiert ein BAC zu der zentromernahen Bande 13q12 und die restlichen 12 BAC-Klone in die Region 13q31-33 (Tabelle 4-1).

Für das Chromosom 13 war es von Interesse DNA-Sonden zu etablieren, die einerseits den proximalen Bereich 13q14 und andererseits den distalen Bereich 13q31-q33 detektieren.

Der Bereich 13q14 wurde ausgewählt, da sich FISH-Sonden dieser Region als zuverlässig in der Diagnostik für die Darstellung von Chromosom 13 Trisomien gezeigt haben (z.B. Fa. Vysis, Fa. Oncor). Aus der Region 13q14 wurde der Marker (D13S164) ausgewählt, dieser befindet sich ca. 40 kb proximal vom Gen *RBI* (Retinoblastoma). Überraschenderweise zeigte der mit diesem Marker isolierte BAC-Klon (16313I) Signale in der Bande 13q31-32 und nicht in 13q14 (Tabelle 4-1). Auch die weitere Sequenzierung der BAC-Enden gab keine Information über die Lokalisation innerhalb von 13q31-32. Eines der sequenzierten BAC-Enden zeigte 84% Sequenzidentität zu dem Klon RP11-683L23, der in dem kurzen Arm von Chromosom 18 kartiert (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-1 Chromosom 13 spezifische BACs

Die BAC-Klone sind vom Zentromer zum Telomer angeordnet und zudem ist die dazugehörige Bande in der ersten Spalte angegeben. Die für die Durchmusterung der BAC-Bank verwendeten Marker sind in Spalte drei aufgeführt. Die Marker in Klammern weisen darauf hin, dass diese für die Durchmusterung verwendet wurden, sich aber nicht an DNA der isolierten BAC-Klone bestätigen ließen. In Spalte vier sind die BAC-Größen nach der BAC-Endsequenzierung in kb angegeben, ein (*) bedeutet, dass nicht beide BAC-Enden sequenziert werden konnten, und die Größe nach einer Restriktions-spaltung mit *NotI* und anschließenden Auftrennung mit der Pulsfeldgelelektrophorese bestimmt wurde.

chromosomale Bande	Bezeichnung	Marker	Größe (kb)
13q12.1	17382P	WI-12381 (SGC31753)	114
13q31.1	10567H	D13S1283	149
13q31.2	03308N	D13S265	119
13q31-32	16313I	(D13S164)	120*
13q32.1	10358B	D13S281	150*
13q32.1	11308P	D13S281	137
13q32.2	01348G	D13S159	196
13q32.3	04382H	SGC31753	100*
13q32.3	11321B	SGC32863	126
13q32.3	04324E	SGC34538	150*
13q33.1	15377K	D13S174	135
13q33.1	04503O	SGC32558	150*
13q33.1	11341A	D13S280	150*

Für den Bereich 13q31-33 wurden insgesamt 11 BACs mit Markern identifiziert, die innerhalb der '13q- Syndrom' Region lokalisiert sind (Tabelle 4-1). Es ließen sich innerhalb der Bande 13q31.1 das BAC 10567H (D13S1283) und in 13q31.2 das BAC 03308N (D13S265) isolieren. Die Sequenzierungen der BAC-Enden bestätigten die Marker und die Lokalisation der BACs innerhalb der genomischen Contigs (Tabelle 4-2).

Die BACs 10358B/11308P (D13S281) und 01348G (D13S159) befinden sich proximal zu der kritischen Region für Holoprosenzephalie (HPE), die von dem proximalen Marker D13S136 flankiert wird (Tabelle 4-1, Abbildung 4-1). Distal zu D13S136 wurden die Marker SGC31753 und SGC32863 (BAC 11321B) für die Durchmusterung eingesetzt. Es gelang mit dem STS SGC31753 die beiden BACs 17382P und 04382H zu identifizieren. Für BAC 17382P zeigte die FISH Signale in 13q12, aber keine Signale in 13q32. Ebenfalls zeigte die Sequenzierung der BAC-Enden, dass der Klon dem Contig AL1388699 bzw. AL136439 in 13q12 zuzuordnen war (Tabelle 4-2). Die BAC-Klone 04382H und 11321B zeigten FISH-Signal in 13q32 und darüber hinaus bestätigen die Sequenzierungen die Lokalisation innerhalb der genomischen Contigs (Tabelle 4-2).

Distal zu der HPE Deletionsregion wurden vier weitere BAC-Klone 04324E (SGC34538), 15377K (D13S174), 04503O (SGC32558) und 11341A (D13S280) etabliert (Tabelle 4-1). Das BAC 04324E konnte nicht sequenziert werden und die Position innerhalb der Bande konnte nur mit FISH- und PCR-Analysen bestätigt werden. Die übrigen drei BACs wurden anhand der Endsequenzen innerhalb der genomischen Contigs angeordnet (Tabelle 4-2, Abbildung 4-1).

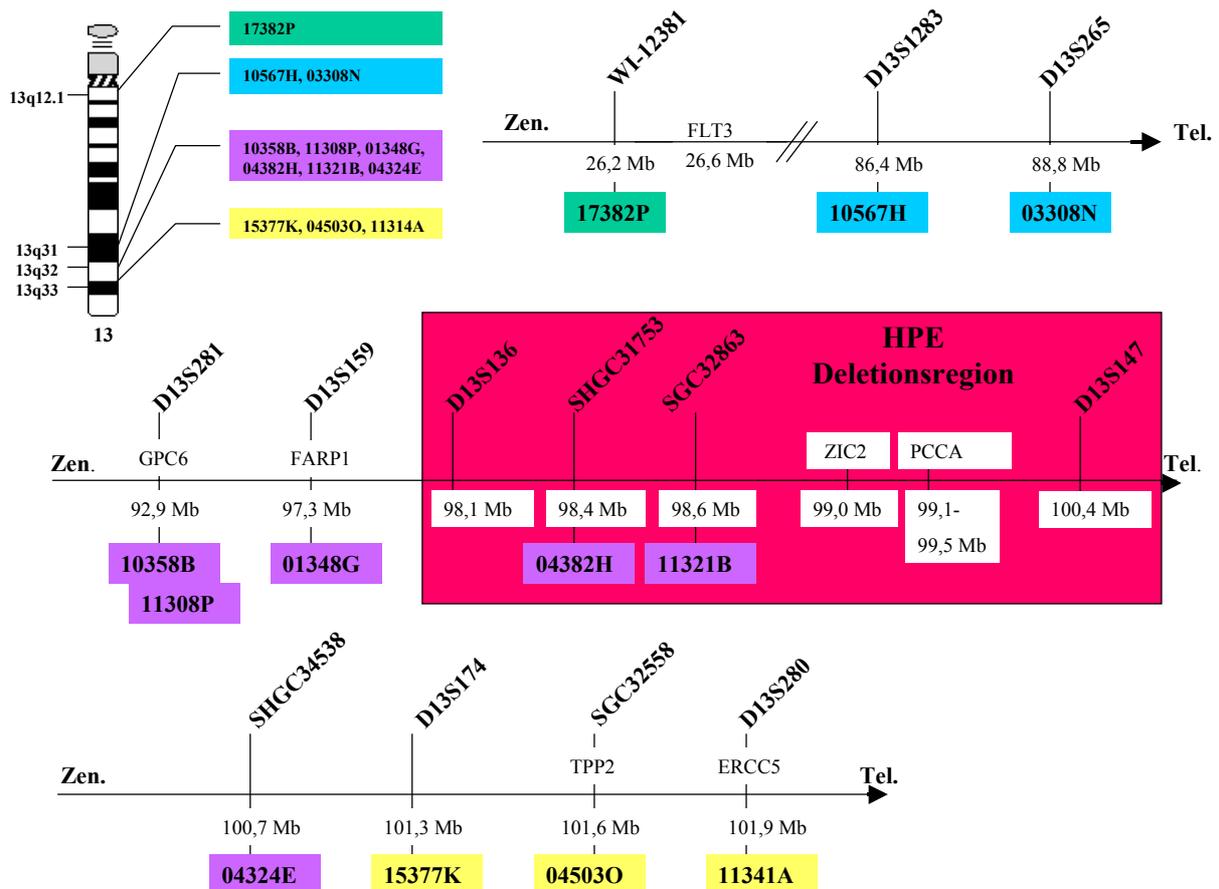


Abbildung 4-1 Übersicht der BACs des Chromosom 13

In der linken oberen Ecke ist die Position der BAC-Klone anhand eines Idiogramms (550 Banden) dargestellt und in der Abbildung befindet sich rechts zusätzlich eine detaillierte Darstellung mit der Positionen der BAC-Klone. Die BACs sind farblich den chromosomalen Banden zugeordnet und die Anordnung vom Zentromer zum Telomer erfolgt in der vergrößerten Darstellung von links nach rechts. STS Marker und Gene werden mit den ungefähren Positionen in Mb angegeben und die Holoprosenzephalie (HPE) Deletionsregion ist rot unterlegt. FLT3 (FMS related Tyrosine Kinase 3); GPC6 (glypican 6); FARP1 (FERM, ARHGEF and pleckstrin domain-containing protein 1); ZIC2 (zic family member 2, odd-paired homolog, *Drosophila*); PCCA (propionyl coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide); TPP2 (tripeptidyl peptidase II); ERCC5 (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency)

Tabelle 4-2 Ergebnisse der Sequenzanalysen der BAC-Endsequenzen für BAC-Klone, die zu Chromosom 13 kartieren

Ergebnisse der Vergleiche der BAC-Endsequenzen mit den genomischen Contigs nach der Analyse durch 'nr-Blast'. Für jedes der sequenzierten BAC-Enden, das mit einem genomischen Klon identisch ist, ist neben der Datenbankadresse die Bezeichnung des Klons angegeben. Das zentromernahe BAC-Ende ist mit 'zen' und das telomernahe BAC-Ende mit 'tel' bezeichnet. In der letzten Spalte ist angeführt, wieviele Basenpaare der BAC-Sequenz mit dem genomischen Klon identisch sind.

BAC		Homologie zu genomischem Klon		
		Datenbank Adresse	Bezeichnung	Identität
17382P	zen	gi 11120988 emb AL138699	Human DNA sequence from clone RP11-400I20 on chromosome 13 Contains part of the LNX (ligand of numb-protein X) gene, ESTs and GSSs	529/530 (99%)
	tel	gi 12666202 emb AL136439	Human DNA sequence from clone RP11-87C7 on chromosome 13q21.2-22.1	319/321 (99%)
16313I	zen	gi 21218123 dbj AP001005	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 18p clone:RP11-683L23	168/198 (84%)
10567H	zen	gi 15864959 emb AL162576	Human DNA sequence from clone RP11-568F20 on chromosome 13	451/466 (96%)
	tel	gi 13751441 emb AL360267	Human DNA sequence from clone RP11-342C20 on chromosome 13	484/485 (99%)
03308N	zen	gi 11225688 emb AL158067	Human DNA sequence from clone RP11-86C3 on chromosome 13 Contains STSs and GSSs	490/508 (96%),
	tel	gi 11876041 emb AL355821	Human DNA sequence from clone RP11-51A2 on chromosome 13	739/743 (99%)
10358B	zen	gi 10443406 emb AL162455	Human DNA sequence from clone RP11-62D23 on chromosome 13. Contains an exon of the GPC6 gene for glypican 6, ESTs, STSs and GSSs	498/501 (99%)
	tel	gi 12584723 emb AL356598	Human DNA sequence from clone RP11-750K17 on chromosome 13	454/457 (99%)
11308P	zen	gi 10443406 emb AL162455	Human DNA sequence from clone RP11-62D23 on chromosome 13. Contains an exon of the GPC6 gene for glypican 6, ESTs, STSs and GSSs	449/449 (100%)
	tel	gi 12584723 emb AL356598	Human DNA sequence from clone RP11-750K17 on chromosome 13	361/361 (100%)
01348G	zen	gi 11414653 emb AL445223.6	Human DNA sequence from clone RP11-573N10 on chromosome 13 Contains STSs and GSSs	588/593 (99%)
	tel	gi 18655955 emb AL137249.29	Human DNA sequence from clone RP11-111L24 on chromosome 13q31.3-32.3	259/259 (100%)
04382H	rev	gi 13160177 emb AL139035.27	Human DNA sequence from clone RP11-214F16 on chromosome 13	596/604 (98%)
11321B	zen	gi 13160177 emb AL139035	Human DNA sequence from clone RP11-214F16 on chromosome 13	228/230 (99%)
	tel	gi 14018287 emb AL445184	Human DNA sequence from clone RP11-279D17 on chromosome 13	580/584 (99%)
15377K	zen	gi 13606073 emb AL161899	Human DNA sequence from clone RP11-418I10 on chromosome 13	489/503 (97%)
	tel	gi 14041748 emb AL356263	Human DNA sequence from clone RP11-811P12 on chromosome 13	537/538 (99%)
04503O	tel	gi 14018251 emb AL158063	Human DNA sequence from clone RP11-29B2 on chromosome 13	453/465 (97%)
11341A	tel	gi 11121387 emb AL161771	Human DNA sequence from clone RP11-11L8 on chromosome 13 Contains the SLC10A2 (solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 2)) gene, an EST, an STS and GSS	614/624 (98%)

4.1.1.1 Anwendungsbeispiel für Chromosom 13 spezifische BACs

Neben den invasiv gewonnenen Zellen sollten die FISH-Sonden auch in der nicht invasiven Diagnostik zur Detektion sortierter, kindlicher Zellen aus mütterlichem Blut eingesetzt werden. Es standen zu diesem Zeitpunkt keine sortierten, kindlichen Zellen zur Verfügung. Als Testsystem wurden Blutausstriche von Nabelschnurblut männlicher Neugeborener verwendet. Die Unterscheidung von mütterlichen und kindlichen Zellen erfolgte in diesem Fall über die Gonosomen. Für den Nachweis von kindlichen Zellen wurden X und Y Zentromerproben verwendet. Beispielhaft wird eine Hybridisierung mit einem Chromosom 13 BAC (01348G) und der X-Zentromer Probe (pDMX1) angeführt (Abbildung 4-2). Die Hybridisierung mit der Chromosom 13 spezifischen FISH-Sonde wies zwei Signale in den mütterlichen und kindlichen Zellen auf und deutete darauf hin, dass keine Aneuploidie für das Chromosom 13 vorlag. Deutlich waren die kindlichen, männlichen Zellen mit nur einem roten Signal für das X-Chromosom von den mütterlichen zu unterscheiden (zwei Signale).

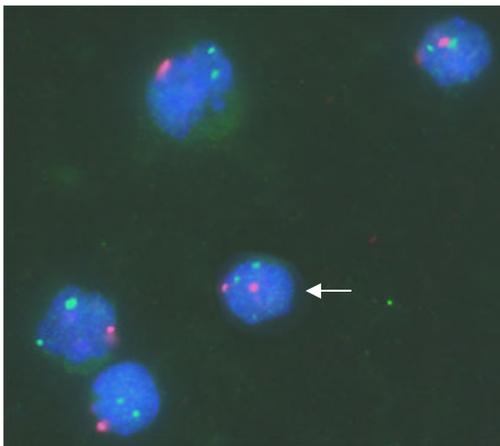


Abbildung 4-2 Hybridisierung Nabelschnurblut mit Chromosom 13 und X-Zentromer Probe

Eine Nabelschnurblutprobe (46,XY) wurde mit der Chromosom 13 spezifischen FISH-Sonde (BAC 01348G = grün) hybridisiert. Es zeigen sich zwei distinkte Signale in den Interphase. Mit der X-Zentromer Probe (pDMX1 = rot) ergeben sich gut sichtbare Signale. Zwei Signale detektieren die mütterlichen Zellen (Pfeil) und ein Signal die kindlichen Zellen.

4.1.2 Chromosom 21 spezifische BACs

Für das Chromosom 21 wurden nach dem Durchmusterern der BAC Bank mit acht Markern insgesamt zehn für das Chromosom 21 spezifische BACs isoliert (Tabelle 4-3).

Diese BAC-Klone wurden mittels PCR auf die Anwesenheit der Marker, die für die Durchmusterung verwendet wurden, analysiert. Durch FISH-Analysen wurden die zehn BAC-Klone den zytogenetischen Banden zugeordnet, und schließlich ließen sich die BACs

nach den Sequenzierungen der BAC-Enden innerhalb der physikalischer Karte von Chromosom 21 lokalisieren (Hattori et al., 2000).

Mit D21S55 und D21S259 ließen sich trotz optimierter PCR-Bedingungen keine BACs isolieren. Für die vier Marker (D21S15, D21S270, D21S3 und D21S53) wurden bei der Durchmusterung der BAC-Bank anhand schwacher PCR-Signale zehn BACs isoliert. Für diese zehn BAC-Klone wurden in den FISH-Analysen keine Signale auf Chromosom 21 erhalten.

Tabelle 4-3 Chromosom 21 spezifische BACs

Die BACs sind in Spalte 2 mit ihren Nummern vom Zentromer zum Telomer mit ihren Bandenpositionen (Spalte 1) angeordnet. Die Marker, die zur Durchmusterung der BAC-Bank verwendet wurden, sind in Spalte drei aufgeführt. In Spalte vier sind die BAC-Größen nach der BAC-Endsequenzierung in kb angegeben, ein (*) bedeutet, dass nicht beide BAC-Enden sequenziert werden konnten, und die Größe nach einer Restriktionsspaltung mit *NotI* und anschließenden Auftrennung mit der Pulsfeldgelelektrophorese bestimmt wurde.

chromosomale Bande	Bezeichnung	Marker	Größe (kb)
21q21.1	06355L	D21S1414	128
21q22.13	09381C	D21S394	167
21q22.13	10337F	D21S394	170
21q22.13	01357L	SHGC51949	128
21q22.2	11531C	D12S1412	85*
21q22.2	02324L	D21S168	115
21q22.2	12486I	D21S168	91
21q22.2	03384B	D21S23	221
21q22.3	10293M	D21S266	126
21q22.3	20303J	JoCon5	181

Für die zentromernahe Bande 21q21.1 konnte BAC 06355L (D21S1414) identifiziert werden (Tabelle 4-3, Tabelle 4-4). Die zytogenetische Zuordnung des BAC-Klons wurde mittels FISH-Analysen bestätigt und nach der Sequenzierung der BAC-Enden ließ sich der Klon innerhalb der physikalischen Karte 6,2 Mb vom Zentromer entfernt lokalisieren. Damit eignet sich dieser BAC-Klon in Kombination mit anderen DNA-Sonden für den Nachweis von Trisomien.

Um FISH-Sonden in der Down-Syndrom kritischen Region zu etablieren, wurden in 21q22.13 in der Region des DYRK1A Gens (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A) insgesamt drei BACs angereichert. Mit dem Marker D21S394 wurden die BACs 09381C und 10337F etabliert (Tabelle 4-3). Nach den Sequenzierungen der BAC-Enden

zeigte sich, dass diese beiden BAC-Klone tatsächlich in ihren Sequenzen teilweise überlappen und sich über eine Gesamtlänge von 172 kb erstrecken (Tabelle 4-4). Die weitgehende Sequenzgleichheit ließ sich auch nach einer Restriktionsspaltung mit *Hind*III anhand der sehr ähnlichen Fragmentgrößen darstellen (Abbildung 4-3). Ergänzend zu diesen BAC-Klonen bestätigten Sequenzierungen der BAC-Enden, dass BAC 01357L ca. 40 kb distal zu 09381C bzw. 10337F positioniert ist.

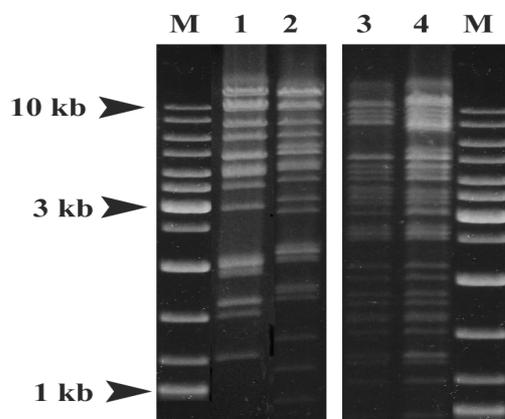


Abbildung 4-3 Restriktionsspaltung von überlappenden BACs des Chromosom 21

Auftrennung der DNA-Fragmente von BAC 12486I (Spur 1), 02324L (Spur 2), 10337F (Spur 3) und 09381C (Spur 4) in einem 1% Agarosegel nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Hind*III. Spur 1 und 2 zeigen teilweise Übereinstimmungen in den Fragmentmustern, sowie Spur 3 und 4. Die Spaltmuster der BACs 12486I/ 02324L und der BACs 10337F/ 09381C sind weitgehend identisch, da es sich um überlappende Klone handelt.

(1): 12486I, (2): 02324L, (3): 10337F, (4): 09381C, M: Ladder Mix

Der Bereich D21S3 bis PFKL (21q22.2-q22.3) wird mit den angeborenen Herzkrankheiten beim Down-Syndrom (congenital heart disease = CHD) in Verbindung gebracht und es wurden insgesamt sechs BAC-Klone innerhalb dieser Region lokalisiert.

Innerhalb der chromosomalen Bande 21q22.2 konnten insgesamt vier BACs etabliert werden (Tabelle 4-3). Einer dieser BAC-Klone (11531C) zeigte nach der Endsequenzierung, dass dieser Sequenzen des WRB (tryptophan-rich basic protein alternativ congenital heart disease 5 gene, CHD5) Gens enthält (Tabelle 4-4). Mit dem weiter distal kartierenden Marker D21S168 wurde der BAC 02324L etabliert. Die BAC-Endsequenzen von 02324L wurden für die Generierung von neuen PCR-Primern verwendet. Es wurde anschließend das BAC 12486I

identifiziert, das nach Restriktionsspaltung mit *HindIII* ein ähnliches Fragmentmuster wie BAC-Klon 02324L zeigte (Abbildung 4-3). Mit der Sequenzierung der BAC-Enden ließ sich feststellen, dass die BACs 02324L und 12486I über 88 kb sequenzgleich waren (Tabelle 4-4) und Teile von SH3BGR (SH3-binding domain and glutamic acid-rich protein) überspannen. Es ergab sich eine Gesamtlänge für die beiden BAC-Klone von 118 kb, die somit nur um 3 kb größer war als der einzelne BAC 02324L. Ein weiterer BAC-Klon, der zu der Bande 21q22.2 kartiert ist 03384B (D21S23). Die Sequenzierung der BAC-Enden zeigte, dass das zentromer-nahe BAC-Ende 100% Identität zu PAC 171F15 aufweist und das telomern-nahe Ende 99%ige Identität zu PAC 21L13, die beide innerhalb der Genregion von DSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule) lokalisiert sind (Tabelle 4-4).

Innerhalb der Bande 21q22.3 wurden die beiden BAC-Klone 10293M (D21S266) und 20303J (D21S1912) etabliert werden. Die Endsequenzierung des BAC 10293M (Tabelle 4-4) zeigte, dass große Bereiche des Gens MX2 (human interferon-regulated resistance GTP-binding protein MXB) in dem BAC-Insert enthalten waren.

Die Auswahl eines telomern-ahen BACs wurde von Jomuna V. Choudhuri (Technische Fakultät, Universität Bielefeld) unterstützt. Innerhalb einer Region, mit einer Distanz von ca. 2,6 Mb zum Telomer wurden repeatarme Regionen mit der Software *REPuter* (Kurtz et al., 2000) ausgewählt. Innerhalb dieser Regionen wurden mit dem Programm *GeneFisher* (Giegerich et al., 1996) Primer generiert. Mit dem Primerpaar JoCon5 war es möglich BAC 20303J zu isolieren. Dieser BAC ließ sich nach der Sequenzierung der BAC-Enden innerhalb der Genregion von TMEM1 (transmembrane protein1 alias: epilepsy holoprosencephaly candidate-1 protein) lokalisieren. In der Abbildung 4-4 werden alle spezifischen BACs des Chromosom 21 zusammen gefasst.

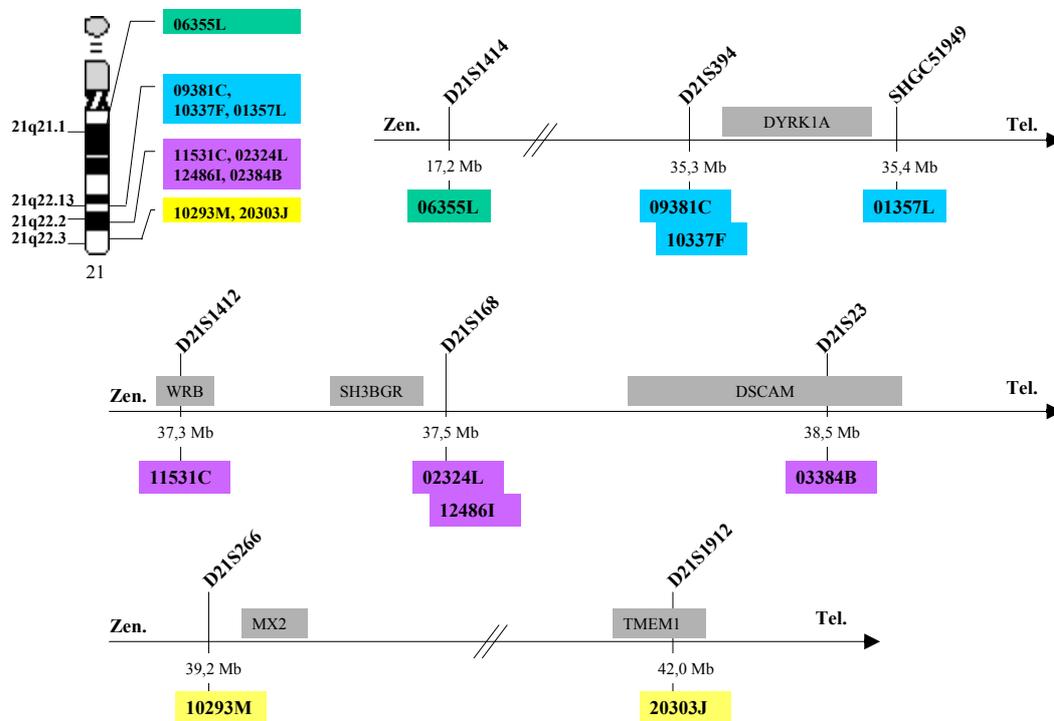


Abbildung 4-4 Übersicht der BACs des Chromosom 21

In der linken oberen Ecke wird die Lokalisation der BACs schematisch dargestellt. Die BACs der verschiedenen chromosomalen Banden sind farbig unterlegt. Die Anordnung vom Zentromer zum Telomer erfolgt in der vergrößerten Darstellung von links nach rechts. STS Marker werden mit der ungefähren Positionen in der physikalischen Karte (Mb) angegeben und Gene sind grau unterlegt. DYRK1A (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A); WRB (tryptophan-rich basic protein alternativ congenital heart disease 5 gene, CHD5); SH3BGR (SH3-binding domain and glutamic acid-rich protein); DSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule); MX2 (human interferon-regulated resistance GTP-binding protein MXB); TMEM1 (transmembrane protein1 alias: epilepsy holoprosencephaly candidate-1 protein)

Tabelle 4-4 Ergebnisse der Sequenzanalysen der BAC-Endsequenzen für BAC-Klone, die zu Chromosom 21 kartieren

Ergebnisse der Vergleiche der BAC-Endsequenzen mit den genomischen Contigs nach der Analyse durch 'nr-Blast'. Für jedes der sequenzierten BAC-Enden, das mit einem genomischen Klon identisch ist, ist neben der Datenbankadresse die Bezeichnung des Klons angegeben. Das zentromernahe BAC-Ende ist mit 'zen' und das telomernahe BAC-Ende mit 'tel' bezeichnet. In der letzten Spalte ist die Sequenzidentität der BAC-Endsequenzen mit den genomischen Klonen angeführt.

BAC		Homologie zu genomischem Klon		
		Datenbank Adresse	Bezeichnung	Identität
06355L	zen	gi 7262567 dbj AP000431	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q21.1-q21.2, clone:B28M9, LL56-APP region	247/248 (99%)
	tel	gi 6177852 dbj AP000433	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q21.1-q21.2 clone:B67B5, LL56-APP region	318/325 (97%)
09381C	zen	gi 12539450 dbj AP001412	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q22.2, LB7T-ERG region, clone:D10	542/542 (100%)
	tel	gi 7262543 dbj AP001428	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q22.2, clone:T1091, LB7T-ERG region	666/675 (98%)
10337F	zen	gi 12539450 dbj AP001412	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q22.2, LB7T-ERG region, clone:D10	629/630 (99%)
	tel	gi 7262543 dbj AP001428	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q22.2, clone:T1091, LB7T-ERG region	627/636 (98%)
01357L	zen	gi 7262528 dbj AP001413	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q22.2, clone:D26, LB7T-ERG region	554/557 (99%)
	tel	gi 7262529 dbj AP001414	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q22.2, clone:D30, LB7T-ERG region	653/663 (98%)
11531C	tel	gi 4210988 gb AF121781	Homo sapiens chromosome 21q22.3 PAC 1031P17, complete sequence, containing part of SH3BGR gene and an unknown gene	418/421 (99%),
02324L	zen	gi 4210988 gb AF121781	Homo sapiens chromosome 21q22.3 PAC 1031P17, complete sequence, containing part of SH3BGR gene and an unknown gene	361/364 (99%)
	tel	gi 18958624 gb AF064860	Homo sapiens chromosome 21 clone PAC 70I24 map 21q22.3	302/302 (100%)
12486I	zen	gi 4210988 gb AF121781	Homo sapiens chromosome 21q22.3 PAC 1031P17, complete sequence, containing part of SH3BGR gene and an unknown gene	510/511 (99%)
	tel	gi 18958624 gb AF064860	Homo sapiens chromosome 21 clone PAC 70I24 map 21q22.3	581/581 (100%)
03384B	zen	gi 2829108 gb AF042090	Homo sapiens chromosome 21q22.3 PAC 171F15	460/460 (100%)
	tel	gi 3171159 gb AF064864	Homo sapiens chromosome 21q22.3 PAC 21L13	445/449 (99%)
10293M	zen	gi 21538705 emb AL773578	Homo sapiens chromosome 21 from PAC RPCI-1 265B9 map 21q22.2,D21S349-MX1	721/725 (99%)
	tel	gi 21538704 emb AL773577	Homo sapiens chromosome 21 from cosmid LLNLc116 14C10 map 21q22.2,D21S349-MX1	350/350 (100%)
20303J	zen	gi 2244605 dbj AB001523	Homo sapiens gene for TMEM1 and PWP2, complete and partial cds	645/646 (99%)
	tel	gi 6693608 dbj AP001058	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21, clone:D9G11, MX1-D21S171 region	648/654 (99%)

4.1.2.1 Anwendungsbeispiel Chromosom 21 spezifische BACs

Zur Verstärkung der Signalintensität wurde für das Chromosom 21 innerhalb der DYRK1A-Genregion ein BAC-Contig etabliert. Das Contig besteht aus den drei BACs 09381C, 10337F und 01357L, diese BACs wurden als Sondenscocktail mit Digoxigenin markiert. Die Hybridisierung an kultivierten Lymphozyten mit normalem Karyotyp (46,XY) führte zu distinkten und in der Intensität stärkeren Signalen in der Interphase und in der Metaphase (Abbildung 4-5 A, B). Eine Kohybridisierung mit Biotin markierter DNA der BACs 02324L und 10293M erzeugte gut sichtbare Signale in der Interphase (Abbildung 4-5 A).

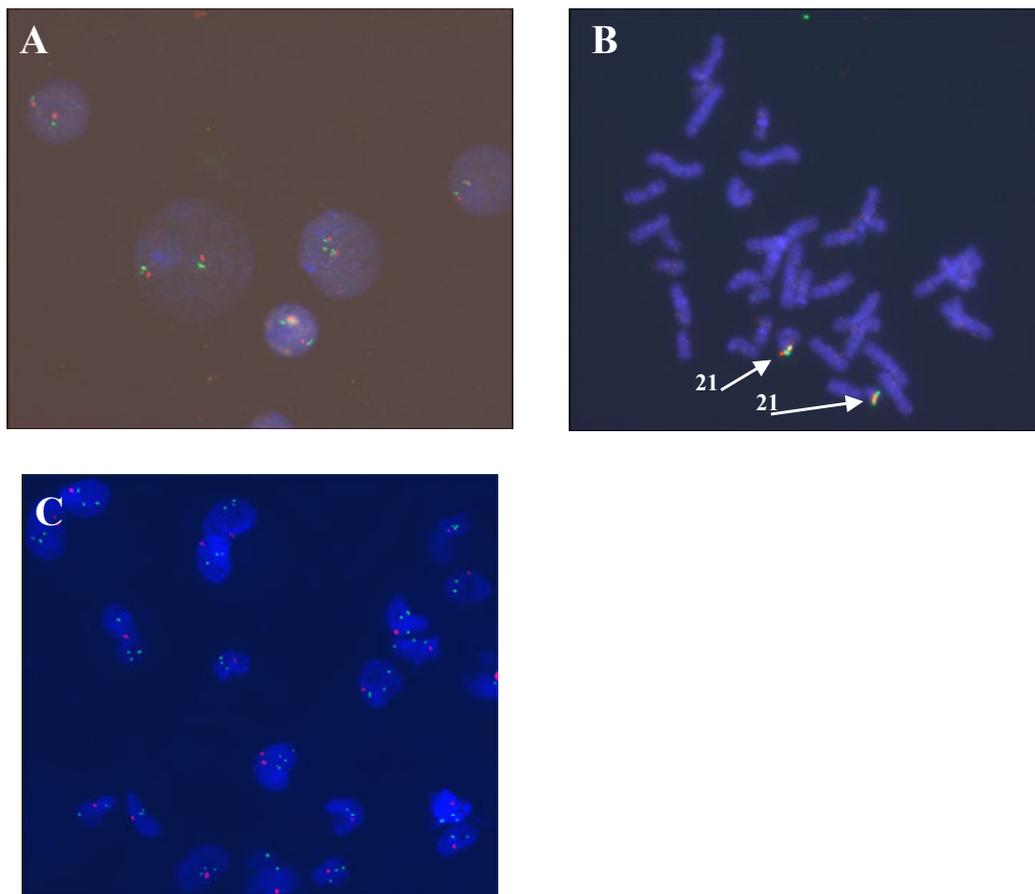


Abbildung 4-5 FISH an Interphasekernen und Metaphasen aus Lymphozyten mit normalem Karyotyp (46,XY) und an Amnionzellen mit einer Trisomie 21 (47,XY,+21)

A) Hybridisierung eines indirekt markierten Sondenscocktail von Chromosom 21 an normalen Interphasekernen. Die roten Signale ergeben sich aus der Kombination der BACs 09381C, 10337F und 01357L der DYRK1A-Genregion. Die DNA-Kombination, die zu grünen Signalen führt, setzt sich aus den BACs 02324L und 10293M zusammen. Beide Sondenkombinationen zeigen zwei Signale für die beiden normalen Chromosomen 21.

B) Der in A) beschriebene Sondenscocktail zeigt auch an normalen Metaphaseplatten distinkte Signale. Pfeile weisen auf die Chromosomen 21.

C) Hybridisierung trisomer Amnionzellen (47,XY,+21) mit der Chromosom 21 spezifischen FISH-Sonde (BAC 10293M = grün) und mit der Zentromerprobe des Y-Chromosoms (pLAY5.5 = rot). Es sind deutlich drei Signale für das dreimal vorhandene Chromosom 21 und ein Signal für das Y-Chromosom zu erkennen.

Die FISH an invasiv gewonnenen kindlichen Zellen z.B. aus Amniozentesen oder Chorionbiopsien sollte, mit den von mir entwickelten FISH-Proben, möglich sein. Beispielhaft wurden kultivierte Amnionzellen mit dem Karyotyp 47,XY,+21 verwendet. Der BAC 10293M ist spezifisch für das Chromosom 21 und wies drei Signale in den Interphasekernen auf, hingegen wurde für die Y-spezifische alpha-Satelliten FISH-Sonde nur ein Signal detektiert. Es gelang mit der Sondenkombination aus BAC 10293M (Chromosom 21) und dem Plasmid pLAY5.5 (Y-Chromosom) die Trisomie 21 und das männliche Geschlecht nachzuweisen (Abbildung 4-5 C).

4.1.3 Chromosom 22 spezifische BACs

Chromosom 22 wurde im Hinblick auf die Mikrodeletionsregion in 22q11 nach verwendbaren BACs durchsucht. Ich habe mich dabei auf eine Region beschränkt, die als typische deletierte Region (TDR) für das DiGeorge-/Velokardiofaziales-Syndrom (DGS/VCFS) bekannt ist. Die Auswahl der für die Durchmusterung der BAC-Bank verwendeten Primer wurde von Jomuna V. Choudhuri unterstützt. Sie hatte die Sequenzen zwischen den low-copy-repeats (LCRs) auf repeatfreie Bereiche mit der *REPuter* Software untersucht und in diesen wurden unter Verwendung des Programms *GeneFisher* die Primer generiert.

Tabelle 4-5 Chromosom 22 spezifische BACs

Die BACs sind in Spalte 2 mit ihren Nummern vom Zentromer zum Telomer zusammen mit ihren Bandenpositionen (Spalte 1) angeordnet. Die Marker, die zur Durchmusterung der BAC-Bank verwendet wurden, sind in Spalte drei aufgeführt. In Spalte vier sind die BAC-Größen nach der BAC-Endsequenzierung in kb angegeben

chromosomale Bande	BAC Bezeichnung	Marker	Größe (kb)
22q11.2	11416E	DGS-2-AB/ DGS-5-AB	43
22q11.2	17441E	DGS-2-AB	269
22q11.2	12464F	DGS-b cC	196
22q11.2	12336I	DGS-b cB	142
22q13.3	02416N	TelA	226
22q13.3	22489F	22-42	56

Innerhalb der Sequenz zwischen den LCRs A bis B wurden die BACs 11416E und 17441E nach erfolgter BAC-Endsequenzierung und Vergleichen mit den genomischen Sequenzen angeordnet (Tabelle 4-5). Die BAC-Endsequenzierungen zeigten, dass beide BACs einen 28 kb großen Abschnitt gleicher genomischer Sequenz tragen (Tabelle 4-6). Zusammen decken diese BACs einen genomischen Bereich von 284 kb ab. BAC 17441E umschließt CLTCL1

(clathrin, heavy polypeptide-like 1) und HIRA (histone cell cycle regulation defective, *S. cerevisiae*, homolog of A) (Abbildung 4-6).

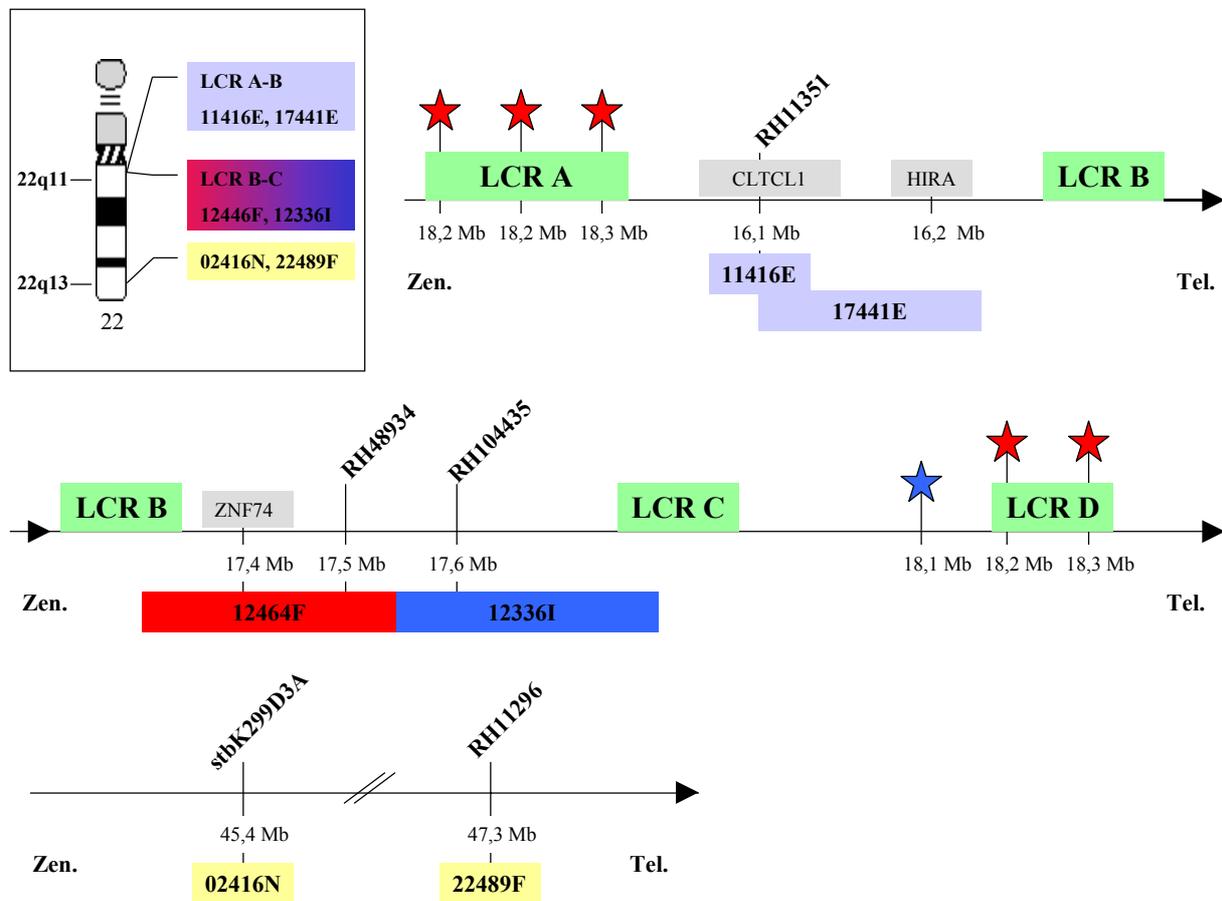


Abbildung 4-6 Übersicht der BACs vom Chromosom 22

In der linken oberen Ecke wird die zytogenetische Lokalisation der sechs BAC-Klone des Chromosoms 22 dargestellt. In der vergrößerten Darstellung ist die Anordnung vom Zentromer zum Telomer hin, von links nach rechts. Marker und Gene (grau) werden mit der ungefähren Position (Mb) innerhalb der physikalischen Karte angegeben. Die Anwesenheit von repetitiven Sequenzen der low-copy-repeats (LCR) A bis D sind grün gekennzeichnet. Die BACs zwischen den LCR A und B überlagern sich und decken die Gene CLTCL1 und HIRA ab. Die BACs 12464F und 12336I befinden sich zwischen den LCRs B und C. Je ein BAC-Ende von 12464F bzw. 12336I decken Sequenzen in dem LCR B bzw. LCR C ab. Die Sequenzidentitäten der BAC-Enden zu verschiedenen LCRs sind mit farbigen Sternen gekennzeichnet.

CLTCL1 (Clathrin, heavy polypeptide-like 1); HIRA (Histone cell cycle regulation defective, *S. cerevisiae*, homolog of, A); ZNF74 (Zinc finger protein 74)

Im Bereich zwischen den Repeats B und C sind die BACs 12464F und 12336I lokalisiert (Tabelle 4-5). Beide BACs decken zusammen einen Bereich von 338 kb ab. Die Sequenzierung der BAC-Enden ergab, dass BAC 12464F mit Teilen des LCR B identisch ist und auch identisch mit Bereichen der LCRs A und D. Das telomerwärts gerichtete Ende des

BAC 12336I war zu 97% identisch mit einem Element aus dem LCR C und auch zu 97% mit einem Sequenzbereich des PAC Klon p_n5 proximal zu LCR D (Tabelle 4-6, Abbildung 4-6).

Als Hybridisierungskontrollen wurden in der Nähe des Telomers die BACs 02416N (TelA) und 22489F (22-42) etabliert. Die BAC-Endsequenzierungen bestätigten eine Distanz von ca. 2,5 Mb des BAC 02416N zum Telomer und BAC 22489F war nur ca. 50 kb vom Telomer entfernt (Tabelle 4-6). In der Abbildung 4-6 sind sämtliche BAC-Klone des Chromosom 22 schematisch dargestellt.

Tabelle 4-6 Ergebnisse der Sequenzanalysen der BAC-Endsequenzen für BAC-Klone, die zu Chromosom 22 kartieren

Ergebnisse der Vergleiche der BAC-Endsequenzen mit den genomischen Contigs nach der Analyse durch 'nr-Blast'. Für jedes der sequenzierten BAC-Enden, das mit einem genomischen Klon identisch ist, ist neben der Datenbankadresse die Bezeichnung des Klons angegeben. Das zentromernahe BAC-Ende ist mit 'zen' und das telomernahe BAC-Ende mit 'tel' bezeichnet und Buchstaben A bis D bezeichnen die LCRs innerhalb der TDR. In der letzten Spalte ist angeführt, wieviele Basenpaare der BAC-Sequenz mit dem genomischen Klon identisch sind.

BAC		Homologie zu genomischem Klon		
		Datenbank Adresse	genomischer Klon	Identität
11416E	zen	gi 7122563 gb AC000072	Homo sapiens Chromosome 22q11.2 Cosmid Clone 15a10 In DGCR Region	483/483 (100%)
	tel	gi 7124533 gb AC000081	Homo sapiens Chromosome 22q11.2 Cosmid Clone 59c10 In DGCR Region	636/636 (100%)
17441E	zen	gi 7122563 gb AC000072	Homo sapiens Chromosome 22q11.2 Cosmid Clone 15a10 In DGCR Region	447/462 (96%),
	tel	gi 7124755 gb AC000087	Homo sapiens Chromosome 22q11.2 Cosmid Clone 83c5 In DGCR Region	562/568 (98%)
12464F	zen A	gi 22450601 gb AC008079	Homo sapiens chromosome 22q11 clone bac519d21	385/388 (99%)
	zen A	gi 11142035 gb AC008132	Homo sapiens chromosome 22q11 clone pac995o6	387/388 (99%)
	zen A	gi 24137491 gb AC008103	Homo sapiens chromosome 22q12 clone pac699j1	383/388 (98%)
	zen B	gi 7712132 gb AC024070	Homo sapiens chromosome 22q11 clone chk89	386/388 (99%)
	zen B	gi 9625348 gb AC074203	Homo sapiens chromosome 22q11 clone cos4	388/388 (100%)
	zen D	gi 5931536 dbj AP000550	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 22q11.2, BCRL2 region, clone: KB1592A4	387/388 (99%)
	zen D	gi 7958973 gb AC008018	Homo sapiens chromosome 22q11 clone b379n11	387/388 (99%)
	tel	gi 4581183 gb AC004033	Homo sapiens Chromosome 22q11.2 PAC Clone p_m11 In BCRL2-GGT Region,	438/440 (99%)
12336I	zen	gi 4581183 gb AC004033	Homo sapiens Chromosome 22q11.2 PAC Clone p_m11 In BCRL2-GGT Region	484/484 (100%)
	tel C	gi 6456174 gb AC007050	Homo sapiens chromosome 22q11 clone bac32	310/319 (97%)
	rev	gi 7958980 gb AC002472	Homo sapiens Chromosome 22q11.2 PAC Clone p_n5 In BCRL2-GGT Region	310/319 (97%)

BAC	Homologie zu genomischem Klon			
		Datenbank Adresse	genomischer Klon	Identität
02416N	zen	gi 2956679 emb AL008720	Human DNA sequence from clone CTA-343C1 on chromosome 22 Contains a putative novel gene, ESTs, STSs and GSSs	277/277 (100%)
	tel	gi 6002334 emb AL096853	Human DNA sequence from clone CITF22-96H12 on chromosome 22 Contains the first coding exon of a novel gene, STSs and a putative CpG island	456/458 (99%)
22489F	zen	gi 5804920 emb AL096767	Human DNA sequence from clone 579N16 on chromosome 22. Contains the 3' part of the gene for KIAA0685, the SBF1 gene for SET binding factor 1	305/305 (100%)
	tel	gi 5804920 emb AL096767	Human DNA sequence from clone 579N16 on chromosome 22. Contains the 3' part of the gene for KIAA0685, the SBF1 gene for SET binding factor 1	458/469 (97%)

4.1.3.1 Anwendungsbeispiel Chromosom 22 BACs

Ziel war es die Robustheit der Chromosom 22 spezifischen Sondenkombination (BAC 11416E und 17441E) für den Routineeinsatz so weit wie möglich zu optimieren. Die FISH-Sonden sollten spezifische und distinkte Signale in Interphasekernen zeigen. Diese Qualitätsmerkmale sollten auch vorhanden sein, wenn die Objektträger nicht vorbehandelt werden und nur ein Waschschriff nach der Hybridisierung erfolgt.

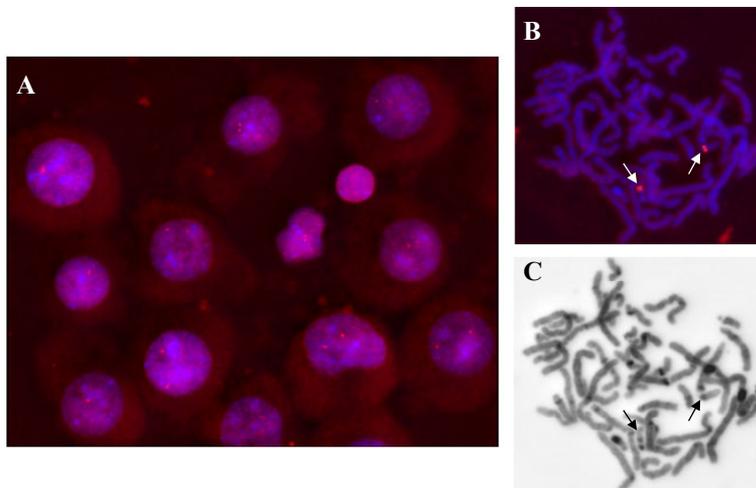


Abbildung 4-7 Hybridisierung der Chromosom 22 spezifischen BACs 11416E und 17441E

A) Die Hybridisierung der Sondenkombination von BAC 11416E/17441E zeigt an normalen Interphasekernen (46,XY) zwei Signale (rot). Die beiden Signale weisen darauf hin, dass der Bereich 22q11 vorhanden ist.

B) Die BACs 11416E/17441E (rot) zeigen distinkte Signale an den Chromosomen 22q11 (Pfeil).

C) DAPI-Invertierung der Metaphase in B).

Direkt markierte Sonden DNA von BAC 11416E und 17441E wurde in einer Menge von 500 ng/15 µl Hybridisierungslösung an unbehandelten Objektträgern eingesetzt. Wie in Abbildung 4-7 gezeigt, sind für die Sondenkombination distinkte Signale in Interphasekernen und an Metaphasechromosomen zu erkennen.

4.2 Nachweis von Deletion in 22q11 an Patientenmaterial

Mit den von mir etablierten BACs sollte es möglich sein Mikrodeletionen im Bereich 22q11 zu detektieren, und gleichzeitig mit einer telomerischen FISH-Sonde die Chromosomen 22 zu identifizieren.

Als Hybridisierungskontrolle in der Nähe des Telomers stand das BAC 22489F zur Verfügung. Dieser BAC-Klon war zwar Chromosom 22 spezifisch, aber die Signalintensitäten waren zu schwach. Im Gegensatz dazu konnte BAC 02416N zuverlässig in der Hybridisierung eingesetzt werden. Es bestand für mich die Möglichkeit, die etablierten FISH-Sonden an Probenmaterial (aufgearbeitete Lymphozyten) von Patienten mit einer Mikrodeletion in 22q11 zu testen (Tabelle 4-7). Bei allen Proben waren bereits kommerziell erhältliche FISH-Sonden zum Nachweis der Deletion in 22q11 eingesetzt worden.

Tabelle 4-7 Hybridisierungsergebnisse der Chromosom 22 Präparate

Die Hybridisierungen erfolgten an kultivierten Lymphozyten von Patienten (Spalte 1) mit den BAC-Klonen 11416E und 17441E (LCR A-B) und den BAC-Klonen 12464F und 12336I (LCR B-C) der Bande 22q11. Außerdem wurde ein telomerischer BAC (02416N) in der Hybridisierung eingesetzt. X: Hybridisierung nicht gelungen, +: Deletion auf dem der(22) nachgewiesen, ±: schwaches Signal auf der(22), tel.: Telomersonde auf dem normalen und dem derivativen Chromosom 22 nachgewiesen.

Bezeichnung	11416E	17441E	12464F	12336I	02416N
22-Pat-1	+	+	±	±	tel.
22-Pat-2	+	+	±	+	tel.
22-Pat-3	x	x	±	x	tel.
22-Pat-4	+	+	±	±	tel.
22-Pat-5	+	+	±	+	tel.
22-Pat-6	+	+	±	±	tel.
22-Pat-7	+	+	±	±	tel.
22-Pat-8	+	+	±	+	tel.
22-Pat-9	+	+	±	+	tel.
22-Pat-10	+	+	±	+	tel.
22-Pat-11	x	x	±	+	tel.

Die vorhandenen Objektträger wurden mit den BACs 11416E, 17441E, 12464F und 12336I aus der 22q11 Region und dem telomerischen BAC 02416N hybridisiert. Die FISH-Sonde 02416N zeigte bei allen Patienten auf dem normalen und dem derivativen Chromosom 22 ein eindeutiges Signal am Telomer.

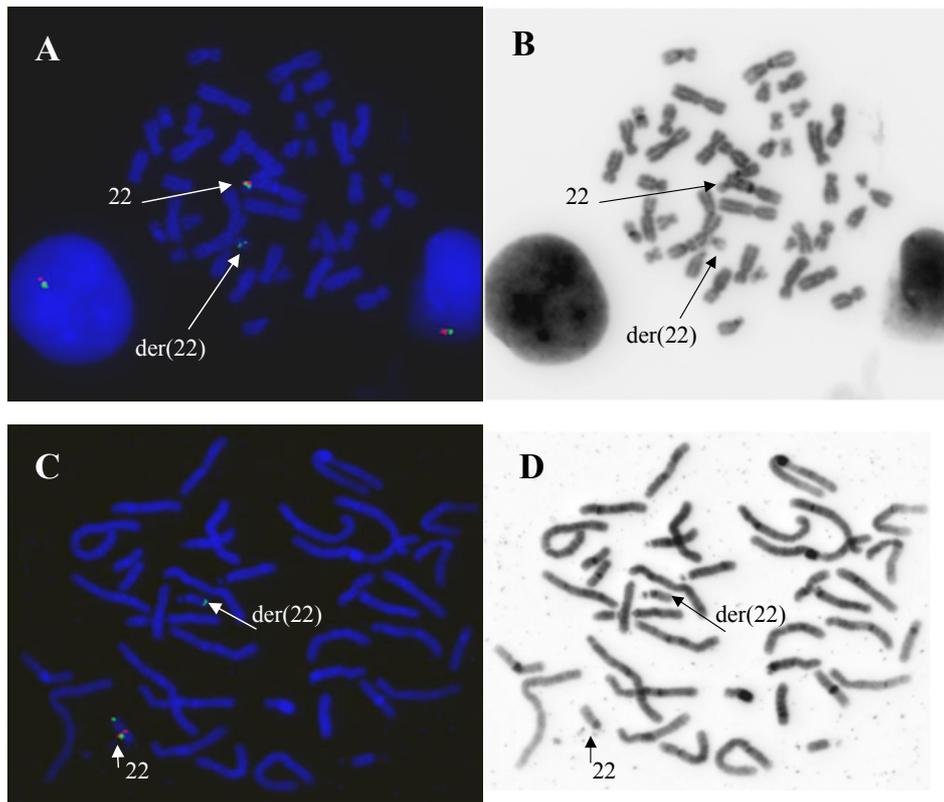


Abbildung 4-8 Nachweis von Mikrodeletionen mit Chromosom 22q11 spezifischen FISH-Sonden

A) Die Ergebnisse der Hybridisierungen an Zellen des Patienten 22-Pat-9 mit den FISH-Sonden 11416E und 12464F. BAC 11416E (rot) zeigt ein Signal auf dem normalen Chromosom 22, aber kein Signal auf dem der(22) und das FISH-Ergebnis bestätigt damit die Deletion in 22q11. BAC 12464F (grün) zeigt ein Signal auf dem normalen Chromosom 22 und ein in der Intensität gemindertes Signal auf dem der(22). Das zeigt, dass eine Deletion in 22q11 vorliegt, aber der BAC durch repetitive Elemente innerhalb der BAC-Sequenzen mit noch vorhandenen Sequenzen hybridisiert.

B) DAPI-Invertierung der Metaphase in A.

C) Die Probe des Patient 22 Pat-2 wurde mit den BACs 12336I (rot), 17441E (grün) und das telomerische BAC 02416N (grün) hybridisiert. Das BAC 02416N zeigt Signale am Telomer des normalen Chromosom 22 und am Telomer des der(22). BAC 12336I (rot) und BAC 17441E (grün) zeigen auf dem normalen Chromosomen 22 Signale in 22q11, jedoch keine Signale auf dem der(22). Damit bestätigt sich die Deletion in 22q11 auf dem der(22).

D) DAPI-Invertierung der Metaphase in C.

Beide BACs 11416E und 17441E, die in der Region zwischen den LCRs A und B kartieren (Abbildung 4-6), wiesen in allen Fällen nur auf dem normalen Chromosom 22 ein Signal auf. Wohingegen auf dem derivativen Chromosom und kein weiteres Signal zu erkennen war und zeigten somit die Deletion in 22q11 (Abbildung 4-8).

Das BAC 12464F wies in allen Fällen ein Signal auf dem normalen Chromosom 22 auf, jedoch konnte auch auf dem derivativen Chromosom 22 ein Signal von geminderter Intensität beobachtet werden. Es ist möglich, dass BAC 12464F trotz einer Deletion in 22q11, aufgrund der vorhandenen Sequenzidentitäten zu LCR A und D, an die Chromosomen hybridisiert (Abschnitt 0).

BAC 12336I zeigte jeweils ein distinktes Signal an den normalen Chromosomen 22. In sechs von 11 Fällen führte die Hybridisierung des BAC 12336I zu keinem Signal auf dem derivativen Chromosom 22. Bei den anderen Deletionsfällen wurde ein gemindertetes Signal auf dem der(22) registriert (Abbildung 4-8). Somit wurden mit diesen BAC-Klonen Signale erhalten obwohl eine Deletion auf 22q11 bei diesen Fällen vorhanden ist. In der Tabelle 4-7 sind die Ergebnisse zusammen gefasst.

4.3 Charakterisierung des Bruchpunktintervalls einer partiellen Trisomie des Chromosoms 21 (CMI)

Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war es, strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen, die mit einem veränderten Phänotyp assoziiert sind, mit Hilfe der FISH genau zu charakterisieren. Darunter war die Patientin CMI mit einer partiellen Trisomie 21, die am Institut für Humangenetik der Universität Münster klinisch (s. Material u. Methoden) und zytogenetisch untersucht wurde (Abbildung 4-9).

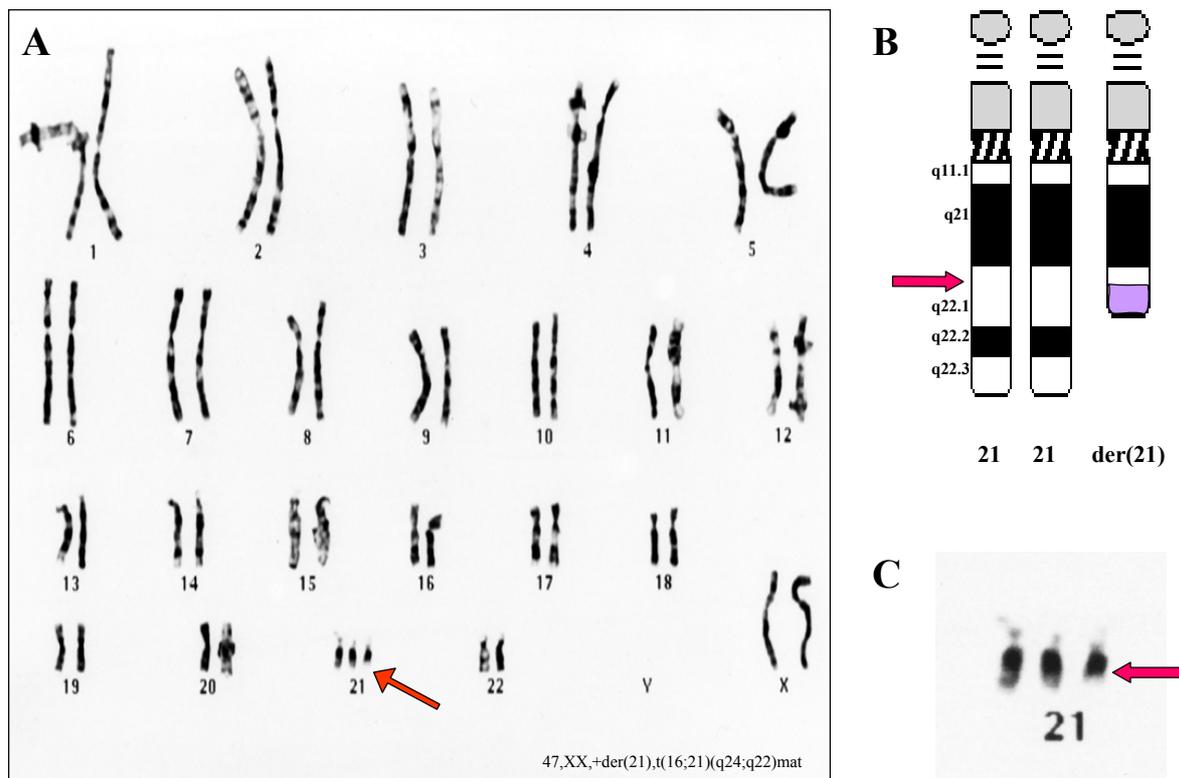


Abbildung 4-9 Karyogramm von der Patientin CMI mit einer partiellen Trisomie 21

- A)** Karyogramm der Patientin CMI, der Pfeil zeigt auf das derivative Chromosom 21 (der(21)).
- B)** Partielles Idiogramm (550 Banden) mit den beiden normalen Chromosomen (links) und dem derivativen Chromosom 21 rechts außen. Die Bruchstelle in der Bande 21q22.1 (Pfeil) wurde in dieser Arbeit molekular zytogenetisch charakterisiert. Die Telomerregion 16q24 des der(21) ist in blau markiert.
- C)** Partielles Karyogramm mit den beiden normalen Chromosomen (links) und dem der(21) rechts. Der Pfeil zeigt auf das der(21).

Die Chromosomenanalyse des Vaters wies, bei einem Bandenniveau von 410-480 Banden pro haploidem Genom, einen regelrechten männlichen Chromosomensatz (46,XY) auf. Die Untersuchung der mütterlichen Chromosomen ergab einen weiblichen Chromosomensatz mit einer reziproken Translokation. In die Translokation waren der lange Arm des Chromosom 16 und des Chromosom 21 involviert und es wurde der Karyotyp: 46,XX,t(16;21)(q24;q22) bestimmt. Bei CMI wurde ein unbalancierter Chromosomensatz mit der Karyotypformel 47,XX,+der(21),t(16;21)(q24;q22)mat festgestellt (Abbildung 4-9). Es ist anzunehmen, dass nach einer 3:1 Fehlverteilung in der mütterlichen Meiose anscheinend das derivative Chromosom 21 von der Mutter an CMI vererbt wurde.

4.3.1.1 Ergebnisse der Hybridisierungen mit FISH-Sonden der Banden 21q21.1-q21.3 (Patientin CMI)

Zur Charakterisierung des der(21) und zur Einengung der Bruchpunktregion wurden im ersten Schritt YAC-Klone ausgewählt, die in einem Abstand von 1-3 Mb über die Bande 21q21.1-q22.3 verteilt sind. Der Vorteil dieser Klone ist, dass sie genomische DNA bis zu einer Größe von 2 Mb abdecken. Mit diesen Klonen war es möglich den Bruchpunkt grob zu kartieren. Eine detailliertere Kartierung erfolgte im weiteren mit kleineren genomischen Fragmenten, die z.B. in BACs enthalten sind.

In der chromosomalen Bande 21q21.1 kartierte der dem Zentromer am nächsten gelegene BAC 06355L (D21S1414/ 17,5 Mb) und etwas distaler die Klone RP11-292N6 (D21S1970/ 18,4 Mb) und RP11-780G18 (RH121329/ 19,7 Mb). Weitere Hybridisierungen erfolgten aus dem Bereich 21q21.2-q21.3 mit den YACs 745c11 (D21S230/ 22,4 Mb), 848g1 (D21S265/ 23,4 Mb) und YAC 898b9 (WI-8007/ 24,7 Mb). Die angeführten YAC und BAC-Klone zeigten Signale auf den normalen Chromosomen 21 und auf dem derivativen Chromosom 21 und kartierten somit proximal zu dem Bruchpunkt (Tabelle 4-8, Abbildung 4-10).

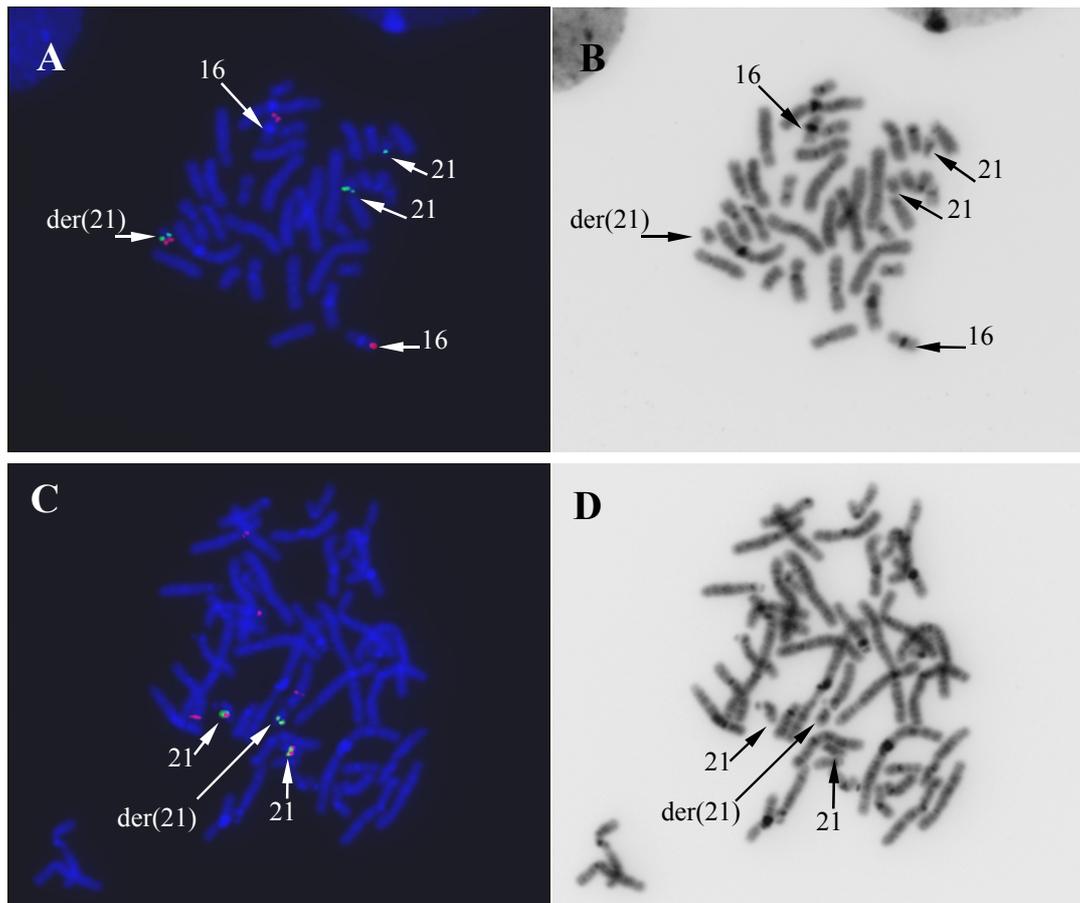


Abbildung 4-10 Nachweis der Chromosom 16 spezifischen DNA-Sequenzen an Metaphasen der Patientin (CMI) und Eingrenzung der Bruchpunktregion mit FISH-Sonden der Banden 21q21.3 bzw. 21q22.12

A) Das YAC 756h3 (16q23) zeigt auf den beiden normalen Chromosomen 16 und auf dem der(21) spezifische rote Signale und kartiert distal zu dem Bruchpunkt. BAC 06355L (grün) zeigt distinkte Signale auf den beiden normalen Chromosomen 21 und dem der(21) und kartiert somit proximal zum Bruchpunkt.

B) DAPI-Invertierung der Metaphase in A.

C) YAC 898b9 (grün), kartiert zu der Bande 21q21.3, und zeigt Signale auf den beiden normalen Chromosomen und dem der(21) und kartiert somit proximal. YAC 807b1 (rot), kartiert zu der Bande 21q22.12, und zeigt Signale auf den beiden normalen Chromosomen 21, aber kein Signal auf dem der(21). Dieses kartiert distal zu dem Bruchpunkt. Zusätzliche rote Signale auf 10q26 und 15q15 zeigen eine Kreuzhybridisierung für YAC 807b01, die auch an normalen Metaphasen auftrat.

D) DAPI-Invertierung der Metaphase in C.

Die Pfeile zeigen auf die beschriebenen Chromosomen 16, 21 und das der(21).

4.3.1.2 Ergebnisse der Hybridisierungen mit FISH-Sonden der Banden 21q22.11-q22.12 (Patientin CMI)

Es wurden YACs, der Chromosomenbanden 21q22.11-q22.12 hybridisiert. Insgesamt wurden sieben YAC-Klone ausgewählt, die mit ihren STS-Markern in Abständen von einem bis drei Mb innerhalb 21q22.11-q22.12 kartieren. Im folgenden wurden die YACs 752d12 (D21S1915/ 25,6 Mb), 850c6 (D21S310, SOD1/ 28,4-29,6 Mb), 718f1 (D21S261/ 29,8 Mb),

690f12 (D21S261, D21S262/ 29,8-30,3 Mb), 901e1 (D21S1898/ 31,1 Mb), 807b1 (D21S1910/ 31,5 Mb) und 925e01 (D21S1921/ 32,9 Mb) verwendet. Dabei zeigten sich mit den beiden YAC-Klonen, 752d12 und 850c6, jeweils Signale auf den beiden normalen Chromosomen 21 und dem der(21) an den Metaphasen der Patientin. Somit kartieren diese YAC-Klone proximal zum Bruchpunkt. Im Gegensatz dazu zeigten die YAC-Klone 718f1, 690f12, 901e1, 807b1 und 925e01 jeweils Signale auf den beiden normalen Chromosomen 21. Es wurden keine FISH-Signale mit diesen Klonen auf dem derivativen Chromosom 21 erhalten und somit kartieren diese YACs distal zum Bruchpunkt (Tabelle 4-8, Abbildung 4-11 C). Der YAC-Klon 807b1 zeigte zusätzliche Hybridisierungssignale auf 10q26 und 15q15 und ist chimär. Dieser Chimärismus wurde bereits vom MPI für molekulare Genetik (Berlin) beschrieben (<http://www.mpimg-berlin-dahlem.mpg.de>). Das YAC 850c6 (D21S310, SOD1) flankiert die proximale Seite des Bruchpunkts und die beiden YACs 690f12 und 718f1 (D21S261, D21S262) die distale Seite des Bruchpunkts. Der Bruchpunkt befindet sich zwischen dem Gen SOD1 und dem Marker D21S261 in einem Bereich von ca. 220 kb (Abbildung 4-11 C).

Für eine weitere Einengung des Bruchpunktes wurden im weiteren BACs und Cosmid-Klone, mit Insertgrößen von 20 kb bis 120 kb, eingesetzt. Der P1-Klon pS552, der eine Größe von 22,3 kb aufweist, umfasst das erste und zweite Exon des SOD1 Gens. Dieser zeigte Signale auf den normalen und dem derivativen Chromosom 21. Außerdem wurden Kreuzhybridisierungen mit dem Zentromer von Chromosom 18 bzw. X nachgewiesen, die auch an normalen Metaphasen auftraten. BAC pR140B9, der eine Größe von 119,5 kb aufweist, trägt den STS D21S1682 (Tabelle 4-8). Dieser Klon zeigte mittels FISH auf den beiden normalen Chromosomen 21 und auf dem der(21) Signale (Abbildung 4-11 B). Die Klone pS552/pR140B9 sind proximal zum Bruchpunkt lokalisiert. Der Bruchpunkt wurde in ein Intervall von 80 kb kartiert. Proximal flankiert der Marker D21S1682 von BAC pR140B9 den Bruchpunkt in der Bande 21q22.11 und distal wird die Region von dem Marker D21S390 von YAC 690f12 flankiert.

4.3.1.3 Ergebnisse der FISH-Analysen von 21q22.13-q22.3 (Patientin CMI)

Die Regionen 21q22.13 einschließlich 21q22.2-q22.3 wurden mit YACs und den etablierten BAC Klonen hybridisiert. Die Klone waren zum einen in der Down Syndrom kritischen Region lokalisiert und zum anderen deckten sie den Telomerbereich ab. Durch diese Kombination sollten interstitielle Deletionen oder Duplikationen dieser Region ausgeschlossen werden.

Die Hybridisierungen wurden mit folgenden YACs durchgeführt: 893d4 (D21S259/ 36,3 Mb), 662d2 (D21S1255/ 36,3 Mb), 767b3 (D21S259/ 36,3 Mb), 767d6 (D21S168/ 37,5 Mb), 773a5 (D21S268/ 37,1 Mb), 821h8 (D21S1893/ 37,9 Mb), 265h12 (D21S266/ 39,2 Mb) und 886g8 (D21S1887, D21S266/ 38,784, 39,254 Mb). Es wurden an normalen Metaphasechromosomen Kreuzhybridisierungen der YACs 662d2 (5p14), 767d6 (2q24-31/6p24-23) und 821h8 (4q24-26/9ptel) nachgewiesen. Zudem wurde eine vom MPI für molekulare Genetik in Berlin bereits beschriebenen Kreuzhybridisierungen für YAC 767b3 (6p23) an normalen Metaphasechromosomen bestätigt.

Die Hybridisierungen an Metaphasechromosomen von CMI zeigten für alle YACs nur Signale auf den beiden normalen Chromosomen 21 und nicht auf dem der(21), somit kartierten diese Klone distal zum Bruchpunkt (Tabelle 4-8, Abbildung 4-11 A).

Die BACs 09381C und 10337F (D21S394/ 35,3 Mb) und 01357L (SHGC51949/ 35,4 Mb) aus der Down Syndrom kritischen Region wiesen nur Signale auf den beiden normalen Chromosomen 21 auf und kartierten somit distal. Alle weiteren BACs, 11531C (D21S1412/ ca. 37,3 Mb), 03384B (D21S23/ 38,5 Mb), 10293M (D21S266/ 39,2 Mb) und 20303J (D21S1912/ 42,0 Mb) der Bande 21q22.2-q22.3 zeigten nur Signale auf den normalen Chromosomen 21 und kartierten ebenfalls distal zum Bruchpunkt (Tabelle 4-8, Abbildung 4-11 A).

4.3.1.4 Ergebnisse der Hybridisierungen an mütterlichen Chromosomen mit einer reziproken Translokation t(16;21)(q24;q22)

In der zytogenetischen Chromosomenanalyse wurde für die Mutter eine balancierte reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 16 und 21 ermittelt. Es ergibt sich daraus ein normales Chromosom 16 und ein derivatives Chromosom 16, an dessen Telomer anstelle der Bande 16q24-qter ein telomerisches Fragment vom Chromosom 21 vorhanden ist. Außerdem findet sich ein normales Chromosom 21 und derivatives Chromosom 21, dem die Banden 21q22-q22.3 fehlen und stattdessen ein telomerisches Fragment vom Chromosom 16 vorhanden ist.

Die Bestätigung der translozierten Bereiche erfolgte mit FISH-Analysen und dafür wurden insgesamt 17 Klone von 21q21.1-q22.3 eingesetzt (Tabelle 4-8). FISH-Sonden, die Signale dem normalen und dem derivativen Chromosom 21 zeigten, kartierten proximal zum Bruchpunkt. Die Klone, die distal zum Bruchpunkt kartierten, wiesen Signale auf dem normalen Chromosom 21 und dem derivativen Chromosom 16 auf.

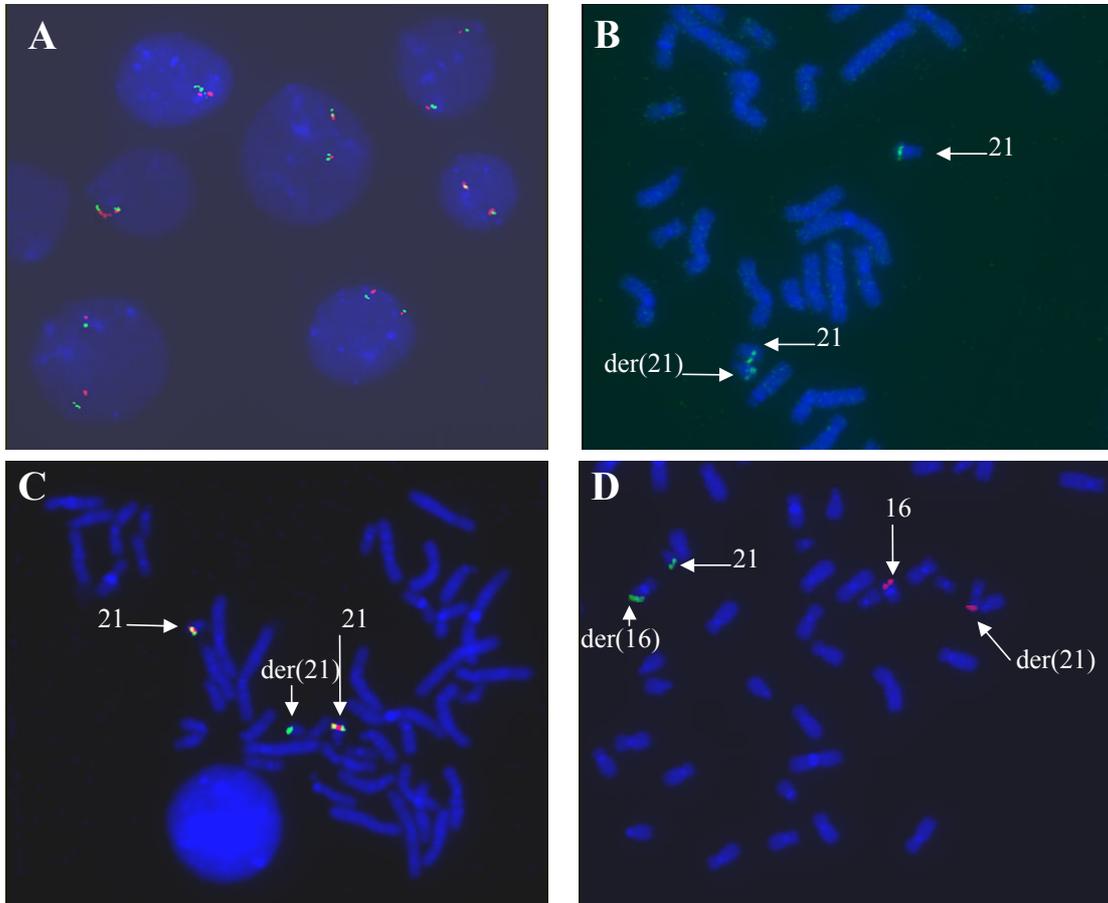


Abbildung 4-11 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 21q22.11 an Metaphasen der Patientin CMI und der Mutter mit einer reziproken Translokation $t(16;21)(q24;q22)$

A) YAC 893d4 (21q22.13-22.2, rot) und das BAC 11531C (21q22.3, grün) zeigen jeweils zwei Signale in der Interphase und kartieren somit distal zum Bruchpunkt.

B) BAC pR140B9 (grün) zeigt Signale auf beiden normalen Chromosomen 21 und dem der(21) und kartiert proximal zum Bruchpunkt.

C) YAC 850c6 (grün) zeigt auf beiden normalen Chromosomen 21 und dem derivativen Chromosomen 21 FISH-Signale, und ist somit proximal zum Bruchpunkt lokalisiert. Im Unterschied dazu zeigt YAC 690f12 Signale (rot) auf den beiden normalen Chromosomen 21, aber kein Signal auf dem der(21). Dieses YAC kartiert somit distal zum Bruchpunkt.

D) Die Hybridisierung an Metaphasen der Mutter zeigt für das Chromosom 16q23.2 spezifische YAC 756h3 rote Signale auf dem normalen Chromosom 16 und dem der(21). Wohingegen YAC 886g8 (grün) der Bande 21q22.3 Signale auf dem normalen Chromosom 21 und auf dem der(16) zeigt. Dies zeigt die reziproke Translokation der Chromosomen 16q23.2 bzw. 21q22.11.

Die Pfeile zeigen auf die beschriebenen Chromosomen 16, der(16), 21 und der(21).

4.3.1.5 Ergebnisse der FISH-Analysen mit einem Chromosom 16q23.2 spezifischen YAC (Patientin CMI, Mutter)

Für den Nachweis des translozierten Segments vom Chromosom 16 wurde YAC 756h3 (WI3181/ 73,4 Mb; D16S402/ 74,1 Mb) der Band 16q23.2 eingesetzt. Die FISH-Ergebnisse mit diesem Klon zeigten an den Metaphasen der Patientin CMI Signale auf den beiden normalen Chromosomen 16 und ein Signal auf dem der(21) (Abbildung 4-10 A, B). Damit bestätigte sich die Anwesenheit des translozierten Segments von Chromosom 16 an dem derivativen Chromosom 21. Es ist daher davon auszugehen, dass das der(21) mütterlicher Herkunft ist. Die FISH-Ergebnisse für diesen Klon zeigten an mütterlichen Chromosomen Signale auf dem normalen Chromosom 16 und auf dem derivativen Chromosom 21 (Abbildung 4-11 D). Somit kartiert das YAC distal zum Bruchpunkt in 16q23.2. Dieses Ergebnis betätigt den Befund der Chromosomenanalyse.

Tabelle 4-8 FISH-Ergebnisse, der Klone, die zur Charakterisierung der Bruchpunktregion in 21q22.11 führten

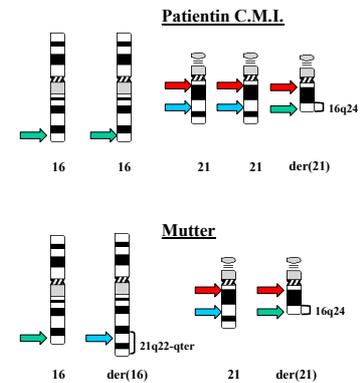
Die Bezeichnungen der Klone sind in Spalte zwei vom Zentromer zum Telomer hin angeordnet (zytogenetische Banden in der 1. Spalte). Klone, die proximal zum Bruchpunkt kartieren, sind in rot markiert. Mit diesen Klonen wurden in den FISH-Analysen Signale auf den normalen Chromosomen 21 und auf dem der(21) bei der partiellen Trisomie von CMI erhalten. Bei der Mutter, die eine balancierte Translokation zeigt, wurden Signale auf dem normalen Chromosom 21 und dem der(21) erhalten, proximal zum Bruchpunkt.

Klone, die distal zum Bruchpunkt kartieren, sind in blau markiert. Mit diesen Klonen wurden bei der partiellen Trisomie Signale auf den beiden normalen Chromosomen 21 erhalten, jedoch keine auf dem der(21). Bei der Mutter, die eine balancierte Translokation zeigt, wurden Signale auf dem normalen Chromosom 21 und dem der(16) erhalten, distal zum Bruchpunkt.

YAC-Klon 756h3 (16q23.2) zeigte Signale auf Chromosom 16 und dem der(21) bei der partiellen Trisomie, und bestätigte die Anwesenheit des 16q-Segments auf dem der(21). Dieses YAC kartiert distal zum Bruchpunkt in 16q23.2 bei der Mutter mit einer balancierten Translokation, und zeigt Signale auf Chromosom 16 und der(21).

Schematische Darstellung der Signalmuster bei der partiellen Trisomie 21 von CMI und der balancierten Translokation t(16;21)(q23.2;q22.11) der Mutter.

21q	Klon	Patientin CMI	Mutter	
21.1	BAC 06355L	21, 21, der(21)	21, der(21)	proximal
	RP11-292N6	21, 21, der(21)	21, der(21)	proximal
	RP11-780G18		21, der(21)	proximal
	YAC 745c11		21, der(21)	proximal
	YAC 848g1		21, der(21)	proximal
	YAC 898b9	21, 21, der(21)	21, der(21)	proximal
22.11	YAC 752d12		21, der(21)	proximal
	YAC 850c6	21, 21, der(21)		proximal
	pS552	21, 21, der(21)		proximal
	pR140B9	21, 21, der(21)		proximal
	YAC 718f1	21, 21		distal
	YAC 690f12	21, 21		distal
22.12	YAC 807b1	21, 21		distal
	YAC 925e01	21, 21	21, der(16)	distal
22.13	BAC 09381C	21, 21	21, der(16)	distal
	BAC 10337F	21, 21		distal
22.2	BAC 01357L	21, 21	21, der(16)	distal
	YAC 893d4	21, 21	21, der(16)	distal
	YAC 662d2	21, 21	21, der(16)	distal
	YAC 767b3	21, 21		distal
	YAC 767d6	21, 21	21, der(16)	distal
	YAC 773a5	21, 21		distal
	BAC 11531C	21, 21		distal
	YAC 821h8	21, 21		distal
22.3	BAC 03384B	21, 21		distal
	BAC 10293M	21, 21		distal
	YAC 265h12	21, 21	21, der(16)	distal
16q-23.2	YAC 886g8	21, 21	21, der(16)	distal
	BAC 20303J	21, 21	21, der(16)	distal
16q-23.2	756h3 (16q)	16, 16, der(21)	16, der(21)	



4.3.2 Molekulargenetische Analysen der Patientin CMI und deren Eltern

Ziel war es mit der Mikrosatellitenanalyse die FISH-Ergebnisse im Hinblick auf die Einengung des Bruchpunktes zu bestätigen. Die PCR wurde an DNA aus Lymphozyten durchgeführt. Es wurden für die Analyse zwei nicht polymorphe Marker (D21S1809, D21S1843) verwendet, die übrigen 20 Mikrosatellitenmarker sind polymorph. Die Angaben zu den Größen der PCR-Produkte finden sich im Teil Material und Methoden (3.1.3). Die Wahrscheinlichkeiten, dass die polymorphen Marker heterozygot vorliegen, erstreckte sich von 0,49 bis 0,88 (Tabelle 4-9). Nach einer halbquantitativen PCR (25 Zyklen) erfolgte die Auswertung der Allelverteilungen anhand der Polymorphismen, dabei wurde das kleinste Allel mit 1 und das größte Allel mit 4 bezeichnet.

Wie beispielhaft in Abbildung 4.12 A dargestellt, zeigten sich in der Analyse der Marker D21S1437 und D21S2052 drei Allele bei CMI. Der D21S1437 weist für die Mutter zwei polymorphe Allele (1,2) auf und bei dem Vater einen homozygoten Zustand des Allels (2,2). Bei der Patientin ergab sich daraus eine polymorphe Allelverteilung (1,2,2), wobei das Allel mit dem kleineren PCR-Produkt (1) in der Intensität der Bande schwächer war als das größere Allel (2). Diese vermehrte Intensität der Bande ließ auf eine doppelte Dosis des Allels (2) schließen. Der Mikrosatellit D21S2052 lag heterozygot sowohl bei der Mutter (2,3) als auch beim Vater (1,2) vor. Für CMI ergaben sich daraus drei Allele mit unterschiedlichen Größen (1,2,3).

In der (Abbildung 4.12 B) war für D21S1888 bei den Eltern und CMI kein sichtbarer Längenpolymorphismus erkennbar, jedoch ließ die PCR-Bande von CMI eine stärkere Intensität erkennen. Der Marker APPivs1 konnte trotz einiger störender Artefakte die dreifach vorhandenen Allele bei CMI (2,3,3) darstellen. Dabei war jeweils ein heterozygoter Zustand in der Allelverteilung der Mutter (2,3) und des Vaters (1,3) zu erkennen (Tabelle 4-9).

Diese Ergebnisse lassen für CMI jeweils die dreifache Dosis der entsprechenden Loci erkennen und deuten somit auf die Lokalisation proximal zum Bruchpunkt hin. Mit diesen Analysen konnten die Resultate der FISH bestätigt werden, die eine partielle Trisomie der Region vom p-Arm bis 21q22.11 aufwies.

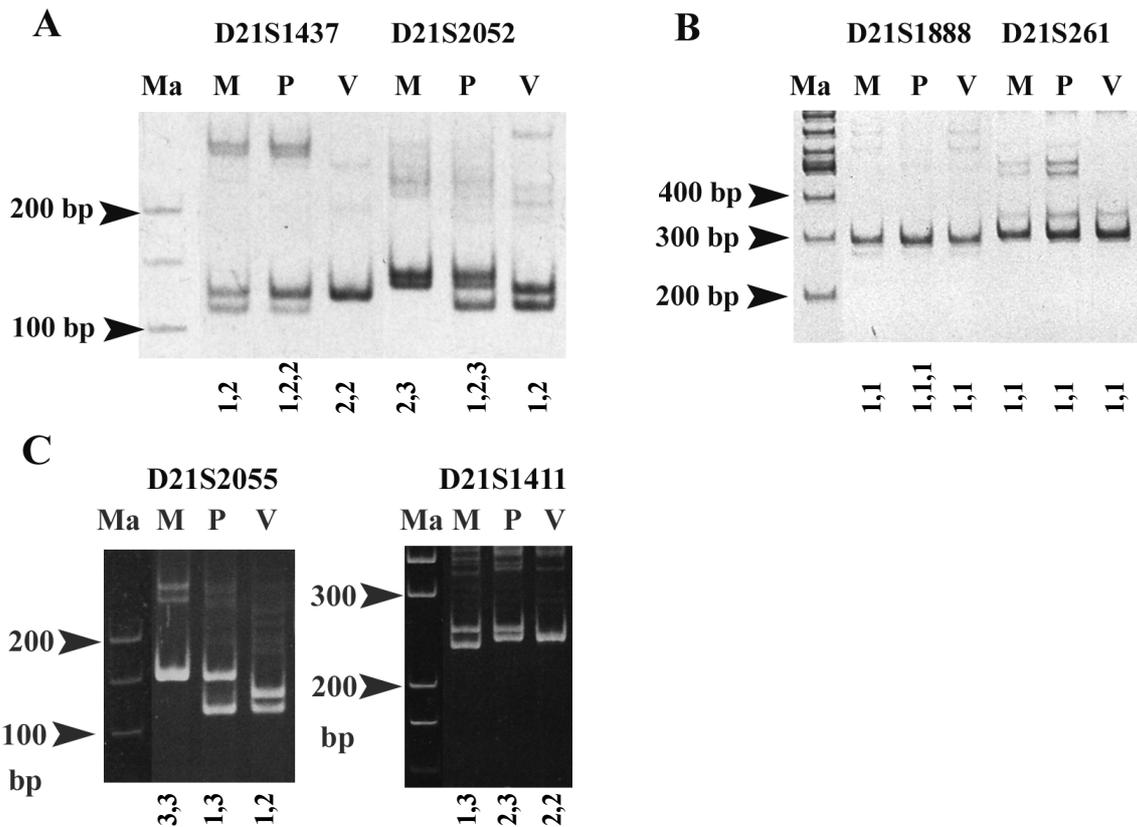


Abbildung 4-12 Allelverteilung von CMI und ihren Eltern anhand von Mikrosatellitenmarkern proximal bzw. distal zum Bruchpunkt.

A) Für D21S1437 (127-144 bp) sind zwei PCR-Produkte mit der mütterlichen DNA (1,2) sichtbar und zeigen eine heterozygote Allelverteilung. Der Vater weist ein PCR Produkt von einer Größe auf, dessen Bande intensiver gefärbt ist, als die gleich große Bande der Mutter, dies deutet auf einen homozygoten Zustand (2,2) hin. Die PCR-Produkte der Patientin sind in der gleichen Größe der mütterlichen Allele, jedoch ist die obere Bande intensiver gefärbt, das auf insgesamt zwei gleiche Allele hindeutet (2,2). Daraus ergibt sich für D21S1437 die Allelverteilung (1,2,2) für die Patientin. Die PCR-Produkte des D21S2052 (121-153 bp) sind mit je zwei verschieden großen Produkten bei der Mutter (2,3) und dem Vater (1,2) sichtbar. Die Amplifikation der Patienten DNA ergab drei Fragmente mit unterschiedlichen Größen (1,2,3). Ma: DNA-Marker 100bp-Leiter

B) Der Marker D21S1888 (262-287 bp) weist für alle die gleiche Größe auf und lässt für die Patientin eine stärkere Signalintensität in der Bande erkennen. Im Fall von D21S261 (296-304 bp) sind die Banden von gleicher Größe und Intensität. Ma: 100bp DNA-Leiter plus

C) Der D21S2055 (119-199 bp) zeigt ein PCR-Fragment mit doppelter Intensität bei der Mutter und zwei PCR-Fragmente beim Vater. Für D21S1411 (275-319 bp) ist es genau umgekehrt. Bei der Patientin treten insgesamt zwei unterschiedlich große PCR-Produkte für D21S2055 bzw. D21S1411 auf. Ma: DNA-Marker 100bp-Leiter

Die Beurteilung der Allelverteilungen erfolgte anhand der Längenpolymorphismen bzw. der Signalintensitäten, dabei wurde das kleinste Allel mit 1 und das Größte mit 3 bezeichnet.

M: Mutter, P: Patientin, V: Vater

Die beiden Marker D21S261 und D21S262 haben eine Heterozygotenrate von 0,54 bzw. 0,65, aber beide Eltern wiesen im Gelbild jeweils die gleichen Allelgrößen auf (Abbildung 4.12 B). Ein ungefähres Abschätzen der Signalintensitäten führte zu dem Ergebnis, dass bei der Patientin die gleiche Signalintensität vorlag wie bei den Eltern und somit nur zwei Allele vorhanden waren (Tabelle 4-9). Damit war die Lokalisation der Marker distal zum Bruchpunkt anzunehmen und bestätigte damit den mit der FISH eingegrenzten Bruchpunkt.

Bei den Markern D21S1440, D21S1809, D21S1843 und D21S266 wurden keine polymorphen Allele detektiert und die Signalintensitäten der Banden im Gel waren für alle gleich (Tabelle 4-9). Diese Marker waren hinsichtlich ihrer Allelverteilung nicht informativ, allerdings kann anhand der gleich starken Banden im Polyacrylamidgel die Lokalisation distal zum Bruchpunkt angenommen werden.

Für D21S267 war die Mutter heterozygot (1,2) und der Vater homozygot (2,2). Ähnlich war es für D21S1898 hier war die Mutter homozygot (2,2) und der Vater heterozygot (1,2). Bei beiden Markern wurde von beiden Eltern jeweils das Allel (2) vererbt, die bei CMI zu einem homozygoten Zustand führten (Tabelle 4-9). Im Fall der Marker D21S259 und D21S167 waren beide Eltern für unterschiedliche Allelgrößen homozygot und das Kind wies einen heterozygoten Zustand auf (Tabelle 4-9).

Der Marker D21S270 und D21S2055 war bei der Mutter homozygot (2,2 bzw. 3,3) und dem Vater heterozygot (1,3 bzw. 1,2). Die Marker D21S1411 und D21S1446 wiesen dagegen bei der Mutter einen heterozygoten Zustand auf (1,3 bzw. 1,2) und der Vater war für diese Loci homozygot (2,2 bzw. 2,2). Insgesamt ergab sich für CMI, dass sie für die Marker D21S270, D21S2055, D21S1411 und D21S1446 heterozygot war und jeweils ein Allel von der Mutter bzw. vom Vater vererbt bekommen hatte (Tabelle 4-9, Abbildung 4.12 C). Durch diese Allelverteilung konnte klar die Lokalisation distal zum Bruchpunkt bestimmt werden.

Mit den Markern D21S1252 und D21S1255 wurde bei den Eltern und der Patientin der gleiche Allelstatus mit (1,2) bestimmt. Im weiteren ließ D21S268 insgesamt vier unterschiedlich polymorphe Allele bei den Eltern erkennen, und in der Patientin fand sich ein heterozygoter Zustand wieder. Der Marker D21S1893 war bei beiden Eltern mit den gleichen heterozygoten Allelen vertreten (1,2) und an die Tochter jeweils nur das Allel (1)

vererbt wurde und es entstand ein homozygoter Zustand für diesen Locus. Mit diesen Ergebnissen ließ sich klar nachweisen, dass nur zwei Allele bei CMI vorhanden sind und diese Bereiche distal zum Bruchpunkt kartieren.

Tabelle 4-9 Allelverteilung von CMI und den Eltern nach PCR-Analysen

Die analysierten Marker sind vom Zentromer zum Telomer des Chromosom 21 aufgelistet. Die Allelverteilung wurde anhand der Agarosegel- oder Polyacrylamidgel-Bilder beurteilt. Die vorhandenen Allele sind durchnummeriert, dabei wird das kleinste Allel mit 1 und das Größte mit 4 bezeichnet. Deutlich wird der Bereich, der dreifach in der Patientin repräsentiert ist in rot hervorgehoben.

Marker	Heterozygotie	Mutter	Patientin	Vater
D21S1437	0,78	1,2	1,2,2	2,2
D21S2052	0,77	2,3	1,2,3	1,2
APPivs1	0,69	2,3	2,3,3	1,3
D21S1888	0,86	1,1	1,1,1	1,1
D21S261	0,54	1,1	1,1	1,1
D21S262	0,65	1,1	1,1	1,1
D21S267	0,87	1,2	2,2	2,2
D21S270	0,85	2,2	1,2	1,3
D21S1440	0,70	1,1	1,1	1,1
D21S259	0,79	1,1	1,2	2,2
D21S1252	0,80	1,2	1,2	1,2
D21S167	0,56	2,2	1,2	1,1
D21S1255	0,80	1,2	1,2	1,2
D21S1809	---	1,1	1,1	1,1
D21S1843	---	1,1	1,1	1,1
D21S268	0,86	1,4	1,3	2,3
D21S2055	0,88	3,3	1,3	1,2
D21S1893	0,76	1,2	1,1	1,2
D21S1898	0,76	2,2	2,2	1,2
D21S266	0,60	1,1	1,1	1,1
D21S1411	0,49	1,3	2,3	2,2
D21S1446	0,73	1,2	1,2	2,2

4.4 Bruchpunktanalysen in zwei Fällen partieller Monosomie 21

Das Ziel war die Charakterisierung von Bruchpunkten in zwei Fällen partieller Monosomie 21 mittels FISH und ergänzenden molekular genetischen Analysen. Beide Patienten (JP und SR) wiesen eine zytogenetisch sichtbare Deletion im Bereich 21q22-q22.3 auf und bei beiden wurde ein milder Phänotyp beobachtet.

4.4.1 FISH-Analysen zur Aufklärung der Deletionsregion von Patientin JP

Am Institut für Humangenetik der Universität Münster wurde die Patientin JP klinisch (s. Material u. Methoden) und zytogenetisch untersucht (Abbildung 4-13).



Das Karyogramm wurde von Prof. Kennerknecht/ Dr. Lemcke zur Verfügung gestellt (Institut f. Humangenetik, Münster).

Abbildung 4-13 Karyogramm Patientin JP

- A) Karyogramm der Patientin JP, der Pfeil zeigt auf das derivative Chromosom 21, der(21).
 B) Partielles Idiogramm (550 Banden) mit dem normalen Chromosomen 21 (rechts) und dem der(21) links. Am normalen Chromosom ist die Bruchpunktregion mit einem Pfeil angedeutet.
 C) Partielles Karyogramm mit dem normalen Chromosom 21 (rechts) und dem der(21) links. Der Pfeil zeigt auf das der(21).

Bei beiden Eltern wurde jeweils ein normaler Karyotyp 46,XX bzw. 46,XY ermittelt. Die Deletion bei JP ist somit ein *de novo* Ereignis. Für die Tochter konnte eine zytogenetisch sichtbare Deletion an einem Chromosom 21 festgestellt werden und ihr Karyotyp wurde mit 46,XX,del(21)(q22) charakterisiert (Abbildung 4-13 A). Weiterhin wurden am Institut für Humangenetik (Münster) molekular zytogenetische Analysen durchgeführt. Mit der FISH-Sonde LSI13/21 (Fa. Vysis) aus dem Bereich 21q22.13-21q22.2 wurden Signale auf dem normalen und dem derivativen Chromosom 21 detektiert. Eine FISH-Sonde aus der Telomerregion (Fa. Oncor) detektierte nur ein Signal auf dem normalen Chromosom 21.

4.4.1.1 Eingrenzung der Bruchpunktregion mit YAC-Klonen (Patientin JP)

Zur weiteren Einengung des Deletionsbruchpunktes bei JP wurden im ersten Schritt YAC-Klone, die durchschnittlich 1-2 Mb genomische DNA tragen, an Chromosomen der Patientin kartiert. Die Klone wurden entsprechend ihrer Lokalisation zu der vermuteten Bruchpunktregion ausgewählt (Tabelle 4-10).

Für die Hybridisierungen wurden YACs der Bande 21q22-q22.3 verwendet: 925e01 (D21S1921/ 32,9 Mb), 893d4 (D21S259/ 36,3 Mb), 662d2 (D21S1255/ 36,3 Mb), 767b3 (D21S259/ 36,3 Mb), 767d6 (D21S168/ 37,5 Mb), 773a5 (D21S268/ 37,1 Mb), 821h8 (D21S1893/ 37,9 Mb), 265h12 (D21S266/ 39,2 Mb) und 886g8 (D21S1887, D21S266/ 38,7; 39,2 Mb). Die YACs 925e1, 893d4, 662d2 und 767b3 zeigten Signale auf dem normalen und dem derivativen Chromosom 21 und kartieren proximal zum Bruchpunkt (Tabelle 4-10).

Im Gegensatz dazu waren die Signale für die YAC-Klone 767d6 und 773a5 in der Hybridisierung nur auf dem normalen Chromosom 21 und nicht auf dem derivativen Chromosom 21 zu detektieren, demnach befinden sich diese YACs distal zum Bruchpunkt. Die noch weiter distal liegenden YACs 821h8, 886g8 und 265h12 in 21q22.3 zeigten Signale auf dem normalen Chromosom, aber keine Signale auf dem der(21) und wiesen somit den Bereich distal zum Bruchpunkt aus (Tabelle 4-10). Der proximal flankierende YAC 767b3 (D21S259) und der distal flankierende YAC 767d6 (D21S168) zeigten, dass der Bruchpunkt in einem Intervall von ca. 1,2 Mb kartiert. Zu den beschriebenen Chromosom 21 spezifischen Signalen wurden Kreuzhybridisierungen für YAC 662d2 (5p14), 767b3 (6p23), 767d6 (2q24-q31/ 6p24-23) und 821h8 (4q24-q26) sichtbar, diese Kreuzhybridisierungen zeigten sich allerdings auch an normalen Metaphasen.

Neben den YACs wurden die von mir etablierten BAC-Klone (06355L, 09381C, 10337F, 01357L, 11531C, 02324L, 12486I, 03384B, 10293M und 20303J) hybridisiert, um die Verwendbarkeit der Klone zur Aufklärung einer partiellen Monosomie 21 zu testen. Die BACs 06355L, 09381C, 10337F und 01357L zeigten Signale auf dem normalen Chromosom und dem derivativen Chromosom 21 und kartieren somit proximal zum Bruchpunkt. Die übrigen sechs BACs konnten nur ein Signal auf dem normalen Chromosom 21 hervorbringen und markierten den distalen Bereich zum Bruchpunkt (Tabelle 4-10). Die Differenz zwischen dem proximal begrenzenden BAC 01357L und dem distal begrenzenden BAC 11531C beträgt ca. 1,74 Mb und ist damit größer als das mit den YACs bestimmte Intervall von 1,2 Mb.

4.4.1.2 Eingrenzung der Bruchpunktregion mit ETS2 spezifischen Klonen (Patientin JP)

Zur weiteren Charakterisierung der Bruchpunktregion schienen Klone um ETS2 (V-ETS avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2) geeignet zu sein, da sich in dieser Region eine Bruchpunktregion für natürliche chromosomale Rekombinationen und eine Region für inter-chromosomale Duplikationen befinden (Hattori et al., 2000). Das BAC 28F9 (D21S156) mit einer Größe von 194 kb ist distal von ETS2 lokalisiert. BAC 28F9 wies ein Signal auf dem normalen Chromosom 21 und kein Signal auf dem der(21) auf, damit befindet sich dieser BAC-Klon distal zum Bruchpunkt (Abbildung 4-14).

Die weitere Einengung des Bruchpunktes erfolgte mit BAC 1151N9 (101 kb), das die genomische Sequenz von ETS2 beinhaltet (17629 bp). Dieses BAC zeigte ein Signal auf dem normalen Chromosom 21 und ein in der Intensität gemindertes Signal auf dem der(21) (Abbildung 4-14). BAC 1151N9 überspannte den Bruchpunkt und durch dieses Ergebnis konnte der Bruchpunkt innerhalb einer ca. 100 kb großen Region zwischen ETS2 und BAC 28F9 kartiert werden.

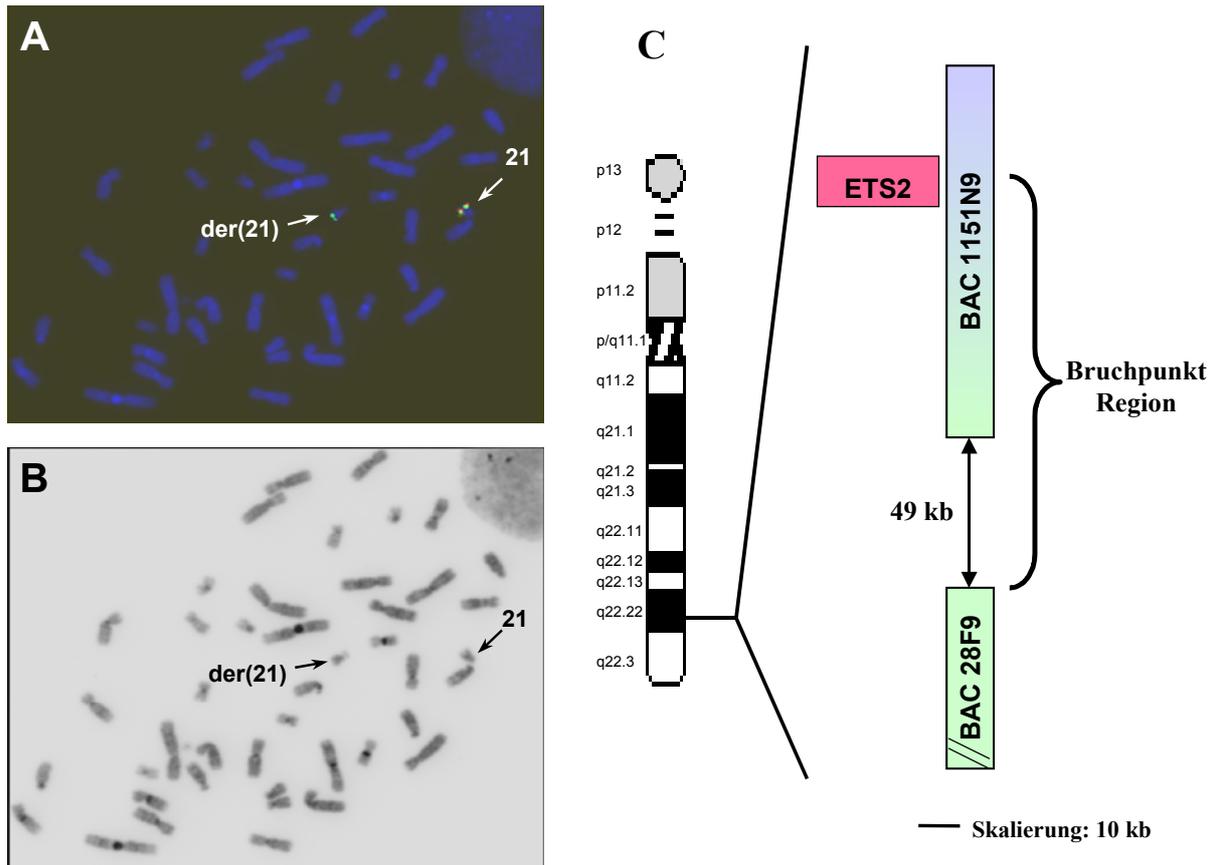


Abbildung 4-14 Hybridisierung der BACs 1151N9 und 28F9 an Metaphasechromosomen von JP

A) Das BAC 1151N9 (grün) zeigt ein starkes Signal auf dem normalen Chromosom 21. Ein weniger intensives Signal auf der derivativen Chromosom 21 zeigt an, dass dieses BAC den Bruchpunkt überspannt. BAC 28F9 (rot) zeigt nur ein Signal auf dem normalen Chromosom 21 und befindet sich somit distal zum Bruchpunkt.

B) DAPI-Invertierung der Metaphase in A.

C) Idiogramm von Chromosom 21 und schematische Darstellung der Bruchpunktregion. Das Gen ETS2 ist proportional zum BAC 1151N9 und BAC 28F9 dargestellt. Für BAC 1151N9 wird durch die zweifarbige Darstellung signalisiert, dass dieser Klon den Bruchpunkt überspannt und teilweise deletiert ist. Der distal zum Bruchpunkt befindliche BAC 28F9 ist vollständig deletiert und in grün dargestellt.

Pfeile zeigen auf die beschriebenen Chromosomen 21 und der(21). ETS2 (v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2)

Die Bruchpunktregion konnte bis auf 100 kb eingengt werden und mit den Cosmiden Q109A8 (45 kb) und Q12C7 (38 kb) sollte geklärt werden ob ETS2 (insgesamt 10 Exons) deletiert war. Das Cosmid Q109A8 umfasst den 5'UTR von ETS2 und erstreckt sich bis zum Exon 8, wohingegen Q12C7 20,3 kb distal zum 3'UTR von ETS2 kartiert. Mit dem Q109A8 zeigte sich ein Signal auf dem normalen und dem derivativen Chromosom 21, damit befindet sich Q109A8 proximal zum Bruchpunkt. Das Cosmid Q12C7 wurde in der Hybridisierung nur auf dem normalen Chromosom 21 nachgewiesen und befand sich distal zum Bruchpunkt

(Tabelle 4-10). Das Bruchpunktintervall wurde mit den Cosmiden Q109A8 und Q12C7 auf ca. 22 kb eingengt, aber damit konnte nicht geklärt werden, ob der Bruchpunkt im ETS2 Gen oder distal davon lokalisiert war (Abbildung 4-15).

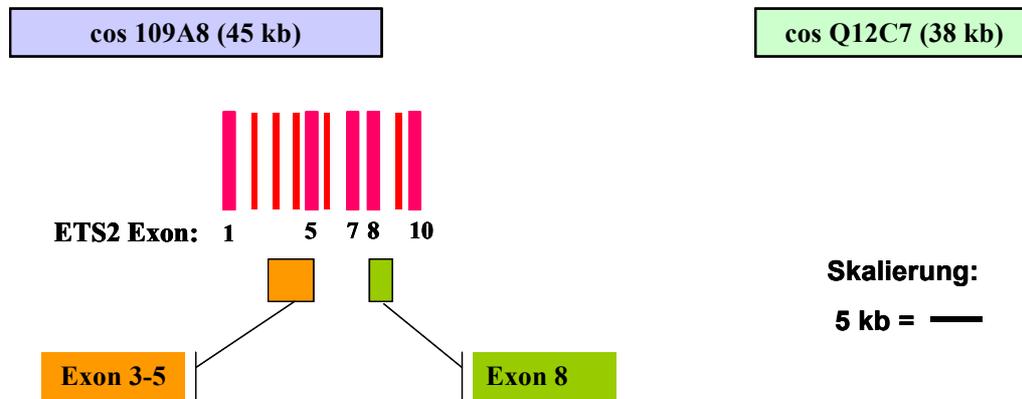


Abbildung 4-15 Übersicht der ETS2 Genregion mit hybridisierten Cosmiden und generierten ETS2 Einzelkopie FISH-Sonden

Das Cosmid 109A8 zeigte in der Hybridisierung auf dem normalen und dem derivativen Chromosom 21 Signale und das Cosmid Q12C7 nur auf dem normalen Chromosom 21. Die Exonverteilung von ETS2 ist proportional mit roten Balken schematisch dargestellt. Die Einzelkopie FISH-Sonden der Exons 3-5 (orange) bzw. Exon 8 (grün) sind auch proportional zu ETS2 und den Cosmiden dargestellt.

4.4.1.3 Eingrenzung der Bruchpunktregion mit Einzelkopie FISH-Sonden (Patientin JP)

In Anbetracht der Tatsache, dass kein weiteren geeigneten FISH-Sonden zur Verfügung standen, wurden single-copy FISH Sonden (scFISH) (Rogan et. al., 2001) erstellt. Dabei erfolgt im ersten Schritt eine computergestützte Analyse auf repeatfreie Bereiche innerhalb einer genomischen Sequenz, anschließend werden Primer zur Amplifikation der repeatfreien Sequenz verwendet. Rogan et al. (2001) stellten heraus, dass DNA-Proben einer Größe von 2 kb bereits zuverlässig detektierbare Signale hervorgebracht werden können.

Für die Suche nach geeigneten DNA-Fragmenten wurde eine genomische Region 23110 bp, die das Gen ETS2 umfasste, mit dem Programm *RepeatMasker* auf den Anteil an repetitiver DNA überprüft. Der GC-Gehalt der Sequenz wurde mit 45,95% bestimmt und von dem Programm wurden 4113 bp (17,8%) als Repeats erkannt und maskiert (siehe Anhang). Der Anteil, der in der Sequenz verteilten repetitiven Elemente, betrug insgesamt 14,47% und setzte sich aus 6,41% SINEs (short interspersed elements), 2,5% LINEs (long interspersed elements) und 5,56% MER (medium reiteration frequency) zusammen. Die anderen Repeats waren zu 1,98% einfache Repeats und zu 1,08% Repeats mit geringer Komplexität. Es zeigten sich repeatfreie Bereiche um Exon 1 (2270 bp), distal zu Exon 2 (1546 bp), Exon 3 bis 5 (2386 bp), Exon 8 (1349 bp) und Exon 9 bis 10 (2720 bp). Innerhalb der Region distal, zu

Exon 5 bis einschließlich Exon 7, lagen repeatfreie Sequenzen mit einer durchschnittlichen Größe von maximal 400 bis 500 bp vor.

Innerhalb der repeatfreien Fragmente von Exon 3 bis 5, Exon 8 und Exon 9 bis 10 sollten mittels PCR Einzelkopie FISH-Sonden amplifiziert werden. Für die Bereiche von Exon 1 bis distal von Exon 2 konnten keine geeigneten PCR Fragmente amplifiziert werden, allerdings ließen sich Exon 3 bis 5, Exon 8 und Exon 9 bis 10 amplifizieren. Die Hybridisierung der Einzelkopie FISH-Sonden an normalen Metaphasen ließ spezifische Signale für Exon 3 bis 5 auf den normalen Chromosomen 21 erkennen, zusätzlich kam es zu Kreuzhybridisierungen an 18ptel und 18qtel. Die 1,2 kb große FISH-Sonde von Exon 8 zeigte spezifische Signale auf den normalen Chromosomen 21. Nicht auswertbar war die Hybridisierung mit der Einzelkopie FISH-Sonden von Exon 9 bis Exon 10, da diese trotz stringenter Waschbedingungen starke Hintergrundsignale aufwiesen. Für die Hybridisierung der Metaphasen von JP wurden schließlich direkt markierte Einzelkopie FISH-Sonden der Exons 3 bis 5 und die des Exon 8 von ETS2 eingesetzt (Abbildung 4-15).

Wie in Abbildung 4-16 dargestellt wurde mit der Sonde, die Exon 3-5 des ETS2 Gens umfasste, Signale auf dem normalen als auch auf dem derivativen Chromosom 21 detektiert. Mit dieser FISH-Sonde kam es zu Kreuzhybridisierungen an 18ptel und 18qtel, die allerdings auch bei Hybridisierungen an normalen Metaphasen aufgetreten waren, und somit keinen Einfluss auf die Beurteilung des Ergebnisses hatten. Die andere Einzelkopie FISH-Sonde umfasste Exon 8 des ETS2 Gens und zeigte nur Signale auf dem normalen Chromosom 21 (Abbildung 4-16). Mit diesem Ergebnis wurde der Bruchpunkt zwischen der proximalen Exon 3-5 Einzelkopie FISH-Sonde und der distalen Exon 8 Einzelkopie FISH-Sonde in einem Intervall von ca. 5,2 kb kartiert.

Die Deletion der Patientin JP erstreckt sich somit vom proximalen Teil der Bande 21q22.2 über die gesamte Bande 21q22.3 bis zum Telomer und hat eine Größe von etwa 7,5 Mb. Zum Ausschluß von Translokationen, von Chromosom 21 Material auf andere Chromosomen, wurde ein chromosome 21 paint (WCP21) markiert und an Metaphasen der partiellen Monosomie hybridisiert. Mit dem chromosome 21 paint wurden die beiden Chromosomen 21 markiert, das normale und das der(21). Zusätzlich traten Signale an den p-Armen der akrozentrischen Chromosomen auf. Diese zusätzlichen Signale wurden als Kreuzhybridisierung interpretiert, da sie von dem Hersteller (Resource for molecular cytogenetics, Universität Bari, Italien) auch schon an normalen Metaphasen dargestellt wurden. Es wurden keine zusätzlichen Signale auf anderen Chromosomen gefunden. Somit wurde eine

Translokation von Chromosom 21 Material auf andere Chromosomen ausgeschlossen. Ergänzend zu den zytogenetischen Befunden der Eltern wurden auch FISH-Analysen an Chromosomen der Eltern vorgenommen, um die entstandene Deletion von JP als *de novo* zu bestätigen. Die Hybridisierungen wiesen jeweils auf beiden Chromosomen 21 eindeutige Signale auf (Tabelle 4-10).

Tabelle 4-10 Ergebnisse der FISH-Analysen der Patientin JP und deren Eltern

Die Bezeichnungen der Klone sind in Spalte zwei vom Zentromer zum Telomer hin angeordnet (zytogenetische Banden in der 1. Spalte). Klone, die proximal zum Bruchpunkt kartieren sind rot markiert. Mit diesen Klonen wurden in den FISH-Analysen Signale auf den normalen Chromosomen 21 und auf dem der(21) bei der partiellen Monosomie erhalten. Das BAC 1151N9 (rosa) zeigte ein Signal auf dem normalen und ein in der Intensität gemindertes Signal auf dem derivativen Chromosom 21, damit überspannt dieser BAC-Klon den Bruchpunkt.

Klone, die distal zum Bruchpunkt kartieren, sind in grün markiert. Mit diesen Klonen wurden in den FISH-Analysen bei der partiellen Monosomie Signale auf dem normalen Chromosom 21 erhalten, jedoch keine auf dem derivativen Chromosom 21. Die Hybridisierungen an Metaphasen der Eltern zeigten Signale an beiden normalen Chromosomen 21.

21q	Klon Bezeichnung	Patientin JP der(21)	Mutter	Vater
21.1	BAC 06355L	proximal		
22.12	YAC 925e01	proximal		
22.13	BAC 09381C	proximal		
	BAC 10337F	proximal		
	BAC 01357L	proximal		
	YAC 893d4	proximal	21, 21	21, 21
22.2	YAC 662d2	proximal	21, 21	21, 21
	YAC 767b3	proximal		21, 21
	Cos Q109A8	proximal		
	Einzelkopie FISH-Sonde Exon 3-5 ETS2	proximal		
	BAC1151N9	überlappend		
	Einzelkopie FISH-Sonde Exon 8 ETS2	distal		
	cos Q12C7	distal		
	BAC 28F9	distal	21, 21	21, 21
	YAC 767d6	distal	21, 21	
	YAC 773a5	distal		
	BAC 11531C	distal		
	BAC 02324L	distal	21, 21	21, 21
	BAC 12486I	distal		
	YAC 821h8	distal		
BAC 03384B	distal		21, 21	
22.3	YAC 886g8	distal		
	BAC 10293M	distal		
	YAC 265h12	distal		
	BAC 20303J	distal	21, 21	

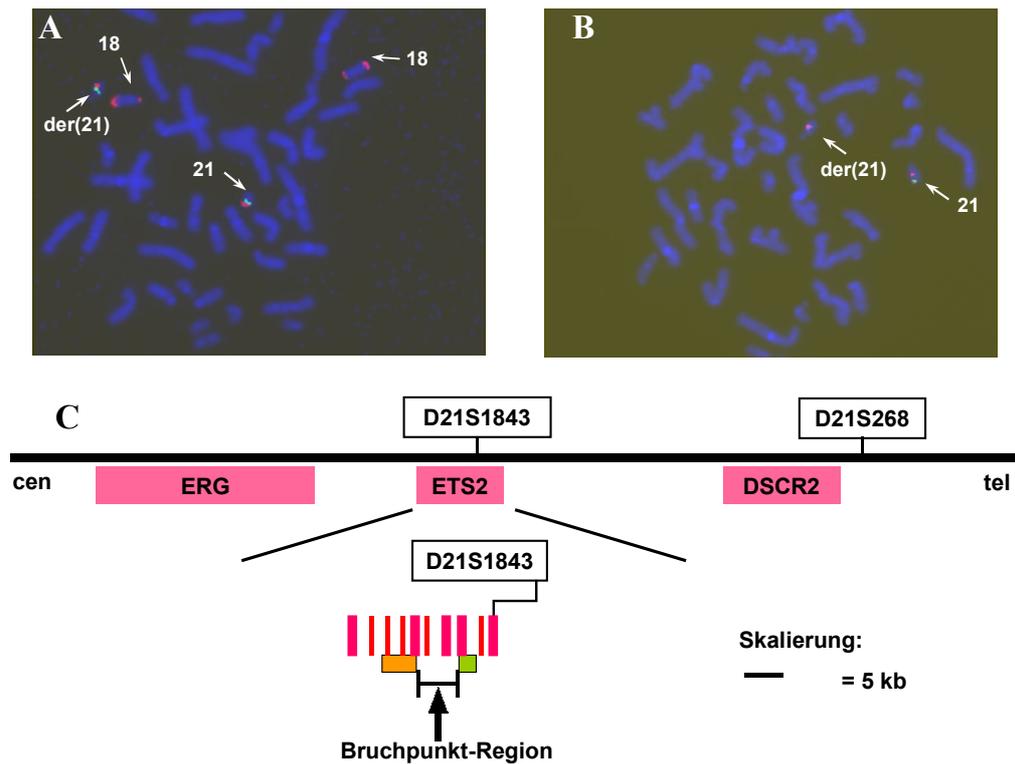


Abbildung 4-16 Kartierung der Bruchpunktregion von JP mit Einzelkopie FISH-Sonden innerhalb des ETS2 Gens in 21q22.2

A) Die Hybridisierung mit BAC 06355L (grün) lässt deutlich ein Signal auf dem normalen und dem derivativen Chromosom 21 erkennen. Auch die Exon 3-5 Sonde (rot), zeigt Signale auf dem normalen und dem der(21). Damit kartieren beide Sonden proximal zum Bruchpunkt. Die Exon 3-5 Sonde weist zusätzliche Hybridisierungsstellen an 18ptel und 18qtel auf.

B) Nach einer Hybridisierung mit BAC 06355L (rot) zeigt sich auf dem normalen und dem derivativen Chromosom 21 ein Signal. Mit der Exon 8 Sonde wurde nur ein Signal auf dem normalen Chromosom sichtbar und kein Signal auf dem derivativen Chromosom 21 detektiert. Damit liegt die Exon 8 Sonde distal zum Bruchpunkt.

C) Schematische Darstellung der Bruchpunkt Region im ETS2 Gen. Die ETS2 Exons 1 bis 10 sind als rote vertikale Linien von links nach rechts dargestellt. Der Bruchpunkt befindet sich innerhalb einer Region von 5,2 kb zwischen den Sonden Exon 3-5 (orange) und Exon 8 (grün).

Die Pfeile zeigen auf die Chromosomen 18, 21 und der(21). ERG (V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene like (avian)), ETS2 (V-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2), DSCR2 (Down syndrome critical region gene 2); cen=Zentomer, tel=Telomer

4.4.1.4 Mikrosatellitenanalysen der Patientin JP und der Eltern

Das Ziel war es mit der Mikrosatellitenanalyse, die Herkunft des derivativen Chromosom 21 von Patientin JP zu klären. Die PCR wurde mit DNA aus Lymphozyten durchgeführt. Es wurden für die Analyse folgende Marker verwendet: fünf nicht polymorphe STS Marker (D21S1809, D21S1956, WI-9128, D21S1843) und die Mikrosatellitenmarker (D21S1437, D21S2052, D21S267, D21S1440, D21S1255, D21S1891, D21S268, D21S2055, D21S266, D21S1260, D21S1411, D21S1446), die möglichen Allelgrößen finden sich im Teil Material und Methoden. Die Wahrscheinlichkeiten, dass die polymorphen Marker heterozygot

vorliegen, erstreckte sich von 0,49 bis 0,88 (Tabelle 4-11). Nach einer halbquantitativen PCR (25 Zyklen) erfolgte die Auswertung der Allelverteilungen anhand der im Gel sichtbaren Polymorphismen. Dabei wurde das kleinste Allel mit 1 und das größte Allel mit 4 bezeichnet.

Wie in Abbildung 4-17 A dargestellt, zeigen sich in der Analyse der Marker D21S1437 (127-144 bp) und D21S1440 (157-175 bp) zwei Allele bei JP. Der Marker D21S1437 wies bei der Mutter eine Bande im Gel auf, deren vermehrte Intensität der Bande ließ auf eine doppelte Dosis des Allels schließen (2,2). Damit wäre die Mutter für diesen Locus homozygot. Die gleiche Intensität der Gelbande war beim Vater zu beobachten, jedoch war das PCR-Produkt kleiner. Daraus ließ sich schließen, dass der Vater für dieses Allel homozygot war (1,1). Der Marker D21S1440 wies bei der Mutter einen homozygoten Zustand mit der Allelverteilung (1,1) auf und der Vater war auch homozygot für diesen Locus (2,2). Bei der Patientin JP wurden bei beiden Markern D21S1437 und D21S1440 zwei Banden im Gel sichtbar, deren unterschiedliche Größen jeweils einem Allel der Eltern entsprach (1,2).

Mit dem Marker D21S2052 konnten PCR-Produkte mit jeweils zwei unterschiedlichen Größen detektiert werden (1,2), die bei den Eltern und JP vorhanden waren. Mit D21S267 ließ sich ein homozygoter Allelstatus bei der Mutter (2,2) und ein heterozygoter beim Vater (1,3) darstellen. Von diesen Allelen wurden (2,3) an JP vererbt. Im Fall von D21S1255, der eine Heterozygotenrate von 0,80 aufweist, wurden bei allen die gleiche Allelgröße detektiert. Die dazugehörigen Banden wiesen im Gel die gleichen Intensitäten auf (Abbildung 4-17 C). Mit diesem Ergebnis ließ sich der Allelstatus bei den Eltern und JP mit (1,1) bestimmen. Der nicht polymorphe Marker D21S1809 zeigte die gleichen homozygoten Allele mit der gleichen Bandenintensität wie D21S1255 (Tabelle 4-11).

Insgesamt wurden für die getesteten Marker D21S1437, D21S2052, D21S267 und D21S1440, D21S1255 und D21S1809 bei der Patientin JP jeweils zwei unterschiedlich große PCR-Produkte oder gleichgroße PCR-Produkte mit gleicher Bandenintensität ermittelt. Dies zeigte, dass jeweils zwei Allele bei JP vorhanden sind (Tabelle 4-11). Mit diesem Ergebnis wird deutlich, dass sich die getesteten Marker proximal zum Bruchpunkt befinden. Zudem wurden damit die FISH-Ergebnisse bestätigt, die ebenfalls Bereiche proximal von ETS2 als nicht deletiert auswiesen.

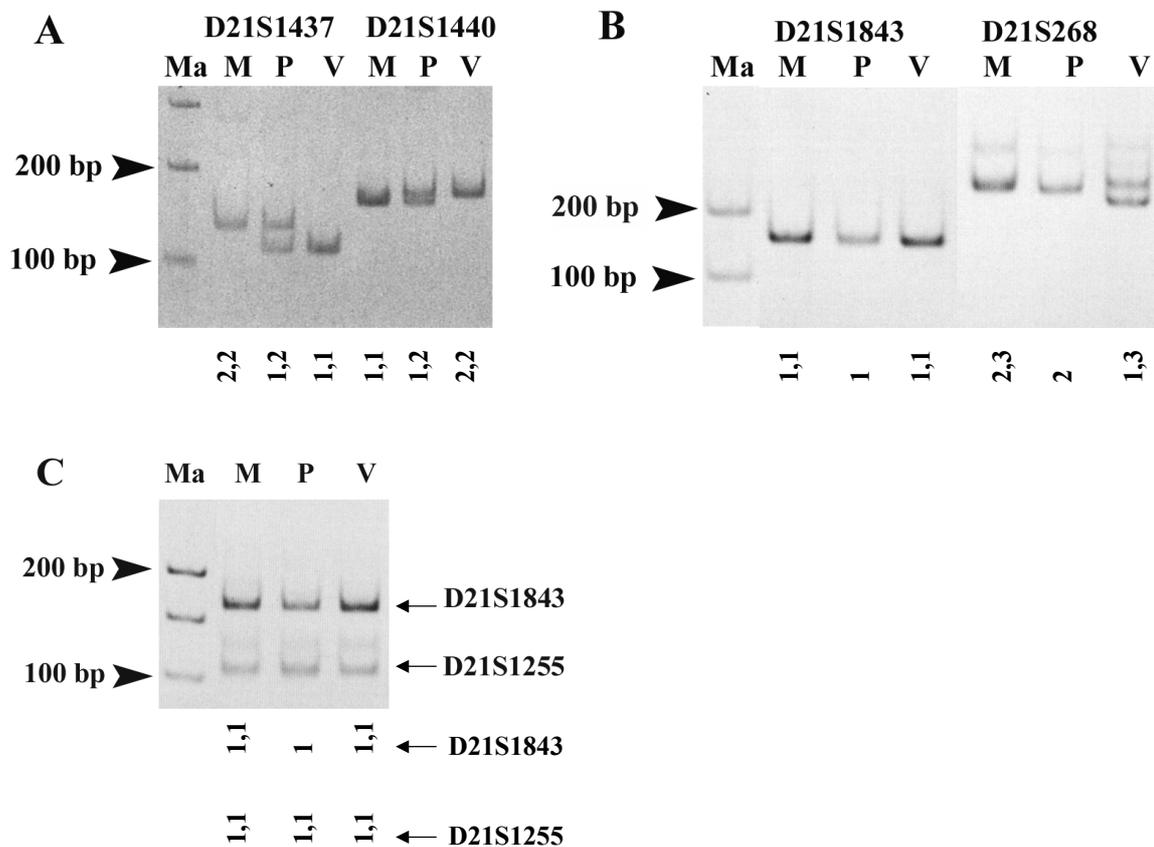


Abbildung 4-17 Analyse von PCR-Produkten und Darstellung der Allelverteilung in der Patientin JP und den Eltern

A) Der D21S1437 (127-144 bp) zeigt eine Bande mit starker Intensität bei der Mutter bzw. beim Vater, deren Größen unterschiedlich sind. Bei der Patientin sind zwei Banden mit unterschiedlicher Größe und im Vergleich zu den elterlichen Banden schwächeren Intensität vorhanden. Ein ähnliches PCR-Ergebnis ist mit D21S1440 (157-175 bp) zu beobachten. Dies macht deutlich, dass die Eltern jeweils homozygot sind und die Patientin heterozygot für den Locus ist. Ma: 100 bp Ladder plus
B) Der Marker D21S1843 (176 bp) im Exon 10 von ETS2 zeigt für alle die gleiche Allelgröße, jedoch wurde bei der Patientin eine verminderte Signalintensität festgestellt. D21S268 (226-250 bp) repräsentiert den deletierten Bereich distal zu ETS2. Die Eltern sind für dieses Allel heterozygot und bei der Patientin ist nur ein Allel vorhanden, das von der Mutter stammt. Ma: 100 bp Ladder plus
C) Duplex PCR-Analysen mit den Markern D21S1843/D21S1255 (108 bp) zeigt bei allen die gleiche Allelgröße. Die Intensität der Bande bei der Patientin unterscheidet sich in dem proximalen Marker (D21S1255) nicht, hingegen ist eine geminderte Intensität der Bande für den Marker D21S1843 (distal zum Bruchpunkt) zu erkennen. Ma: DNA-Marker 100bp-Leiter
 M: Mutter, P: Patientin (JP), V: Vater. Die Beurteilung der Allelverteilungen erfolgte anhand der Längenpolymorphismen bzw. der Signalintensitäten, dabei wurde das kleinste Allel mit 1 und das größte Allel mit 3 bezeichnet.

Im Genbereich von ETS2 befindet sich in den Introns, zwischen Exon 8 bis 9 und zwischen Exon 9 bis 10, die STS Marker D21S1956 bzw. WI-9128. In dem Exon 10 ist der STS D21S1843 lokalisiert. Bei den Eltern und JP wurden gleich große Banden im Gel sichtbar, jedoch konnten eindeutig für D21S1956 und D21S1843 bei JP schwächere Intensitäten in der Gelbande detektiert werden (Abbildung 4-17 B, C). Daraus ergab sich für die Eltern eine homozygote Allelverteilung (1,1) und für JP ein hemizygoter Zustand (1).

Der Vergleich der Signalintensitäten erfolgte auch nach einer Duplex PCR-Analyse für die Marker D21S1255 und D21S1843. Wie in Abbildung 4-17 C zu sehen ist, zeigt der Marker D21S1255, der sich proximal zum Bruchpunkt befindet, bei allen Beteiligten die gleiche Bandenstärke. Im Vergleich dazu ist mit dem D21S1843 für JP eine verminderte Signalintensität zu erkennen. Die verminderte Intensität der Banden im Gel war bei WI-9128 und D21S1891 nicht so deutlich zu erkennen.

Insgesamt weisen die Resultate darauf hin, dass sich diese Marker distal zum Bruchpunkt befinden (Tabelle 4-11). Durch diese Analysen wurde das FISH-Ergebnis bestärkt, und der Deletionsbruchpunkt erneut in die ETS2-Region kartiert.

Mit den Markern D21S268, D21S2055, D21S266, D21S1260, D21S1411 und D21S1446 wurde der Bereich distal zu ETS2 analysiert. Beispielfhaft sieht man in Abbildung 4-17 B, dass der Marker D21S268 zwei Allele mit einem geringen Größenunterschied bei der Mutter sichtbar sind (2,3), Der Vater wies für diesen Locus zwei unterschiedlich große Allele auf (1,3). Die Bande, die im Gel bei JP detektiert wurde, wies die gleiche Größe wie das Allel (2) der Mutter auf. Es war keine Bande in der Größe eines Allels des Vaters zu erkennen. Auch die übrigen Marker zeigten, dass jeweils ein Allel von der Mutter, aber keines vom Vater bei JP im Gel vorhanden war (Tabelle 4-8).

Die Mikrosatellitenanalyse verschaffte Klarheit über die Herkunft des der(21). Zum einen wurden die FISH-Ergebnisse für eine Deletion im ETS2 Gen bestätigt und zum anderen war es möglich ein väterliches Chromosom 21 als das derivative Chromosom zu identifizieren. Der Karyotyp wurde mit 46,XX,del(21)(q22.2-qter)pat abschließend für JP bestimmt.

Tabelle 4-11 Allelverteilung nach PCR-Analysen von JP und ihren Eltern

Die für den Alleltest verwendeten Marker sind vom Zentromer zum Telomer des Chromosom 21 angeordnet. Die Allelverteilung wurde anhand der Agarosegel oder Polyacrylamid Bilder beurteilt. Die vorhandenen Allele sind durchnummeriert, dabei wird das kleinste Allel mit 1 und das größte mit 4 bezeichnet. Der bei Patientin deletierte Bereich wird durch die grüne Kolorierung hervorgehoben.

Marker	Heterozygotie	Mutter	Kind	Vater
D21S1437	0,78	2,2	1,2	1,1
D21S2052	0,77	1,2	1,2	1,2
D21S267	0,87	2,2	2,3	1,3
D21S1440	0,70	1,1	1,2	2,2
D21S1255	0,80	1,1	1,1	1,1
D21S1809	---	1,1	1,1	1,1
D21S1956	---	1,1	1	1,1
WI-9128	---	1,1	1,(1)	1,1
D21S1843	---	1,1	1	1,1
D21S1891	0,74	1,1	1,(1)	1,1
D21S268	0,86	2,3	2	1,3
D21S2055	0,88	1,1	1	2,2
D21S266	0,60	1,3	1	2,2
D21S1260	0,75	2,2	2	1,3
D21S1411	0,49	3,4	3	1,2
D21S1446	0,73	2,2	2	1,1

4.4.2 FISH-Analyse der partiellen Monosomie 21 (Patient SR)

In der Gemeinschaftspraxis Dr. Prager/ Dr. Junge (Dresden) wurde der Patient SR klinisch (s. Material u. Methoden) und zytogenetisch untersucht. Die Chromosomenanalysen der Eltern zeigten jeweils ein normaler geschlechtsspezifischer Karyotyp (46,XX bzw. 46,XY). Dies wies auf eine *de novo* entstandene Deletion beim Patienten SR hin. Beim Patienten konnte eine zytogenetisch sichtbare Deletion des einen Chromosom 21 festgestellt werden. Die Bruchpunkte wurden in 21q22 festgelegt (46,XY,del(21)(q22q22)), wobei eine interstitielle Deletion vermutet wurde. Molekular zytogenetisch wurde der Bereich der Deletion mit FISH-Sonden bereits zum Teil von Dr. Prager/Dr. Junge eingegrenzt. Es zeigten sich Signale auf dem normalen und dem derivativen Chromosomen mit den FISH-Sonden wie der bandspezifische Probe für 21q21 (Fa. Biovation), LSI AML1/ETO (Locus AML1, Fa. Vysis), Quint-essential 21 specific DNA-Probe (Locus D21S55 in 21q22.2, Fa. Oncor) und TelVysion 21q (Fa. Vysis). Mittels CGH (Comparative Genomic Hybridization) wurde der deletierte Bereich auf 21q22.1~2→21qter festgelegt. Die durchgeführten FISH-Analysen mit regionspezifischen Sonden des Chromosom 21 und die CGH-Analysen ließen vermuten, dass eine ähnlich große Deletion wie in der Patientin JP vorlag.

Aufgrund der beschränkten Anzahl an Objektträgern wurden in 21q21.1 das BAC 06355L und acht FISH-Sonden in 21q22-q22.3 ausgewählt. Für die Hybridisierungen wurden YACs der Bande 21q22-q22.3 verwendet: 893d4 (D21S259/ 36,3 Mb), 662d2 (D21S1255/ 36,3 Mb), 821h8 (D21S1893/ 37,9 Mb), 265h12 (D21S266/ 39,2 Mb) und 886g8 (D21S1887, D21S266/ 38,784; 39,254 Mb). Ergänzend hierzu wurden das BAC 1151N9 (genomische Sequenz ETS2), BAC 28F9 (D21S156) und BAC 20303J (D21S1912) ausgewählt (Tabelle 4-12).

Tabelle 4-12 Ergebnisse der FISH-Analysen des Patienten SR

Die Klone sind vom Zentromer zum Telomer angeordnet und in der ersten Spalte ist die chromosomale Bande angegeben. Der Bereich proximal zur Deletionsregion auf dem der(21) ist in rot gekennzeichnet und der deletierte, distale Bereich ist mit blau unterlegt.

21q	Klon Bezeichnung	Patient SR der(21)
21.1	BAC 06355L	proximal
22.2	YAC 893d4	proximal
	YAC 662d2	proximal
	BAC1151N9	proximal
	BAC 28F9	proximal
	YAC 821h8	distal
22.3	YAC 886g8	distal
	YAC 265h12	distal
	BAC 20303J	distal

Mit den YACs 893d4 und 662d2 wurden bei SR Signale auf dem normalen und dem derivativen Chromosom 21 ermittelt, und deren Position wurde proximal zum Bruchpunkt bestimmt. Auch die BAC-Klone 06355L, 1151N9 und 28F9 wiesen distinkte Signale an dem normalen und dem derivativen Chromosom 21 auf, damit wurde die Position proximal zum Bruchpunkt bestimmt (Abbildung 4-18).

Im distalen Bereich der Bande 21q22.2 zeigte der YAC 821h8 nur ein Signal auf dem normalen Chromosom 21 und keines auf dem der(21), damit war YAC 821h8 distal zum Bruchpunkt lokalisiert. Anhand dieses Ergebnisses wurde der Bruchpunkt in einem Intervall von ca. 410 kb zwischen das proximale BAC 28F9 (D21S159) und das distal befindliche YAC 821h8 (D21S346-D21S1893) in 21q22.2 kartiert. Weiter distal befinden sich die YAC-Klone 265h12 und 886g8 in 21q22.3 und BAC 20303J ist ca. 2.5 Mb entfernt vom Telomer positioniert. Mit diesen FISH-Sonden wurde jeweils ein Signal auf dem normalen aber nicht auf dem derivativen Chromosom 21 detektiert (Abbildung 4-18). Mit diesen Ergebnissen ließ sich der distale Bruchpunkt in 21q22.3 in einem ca. 2,5 Mb großen Intervall zwischen BAC 20303J und der Telomersonde (Fa. Vysis) kartieren.

Durch diese Hybridisierungsergebnisse wird die Größe der interstitiellen Deletion von SR mit 5 Mb bis 7,5 Mb bestimmt und bestätigen die interstitielle Deletion 21q22.2-q22.3. Zudem ist der Bruchpunkt ca. 300 kb distal von ETS2, dem Bruchpunktintervall von JP, lokalisiert.

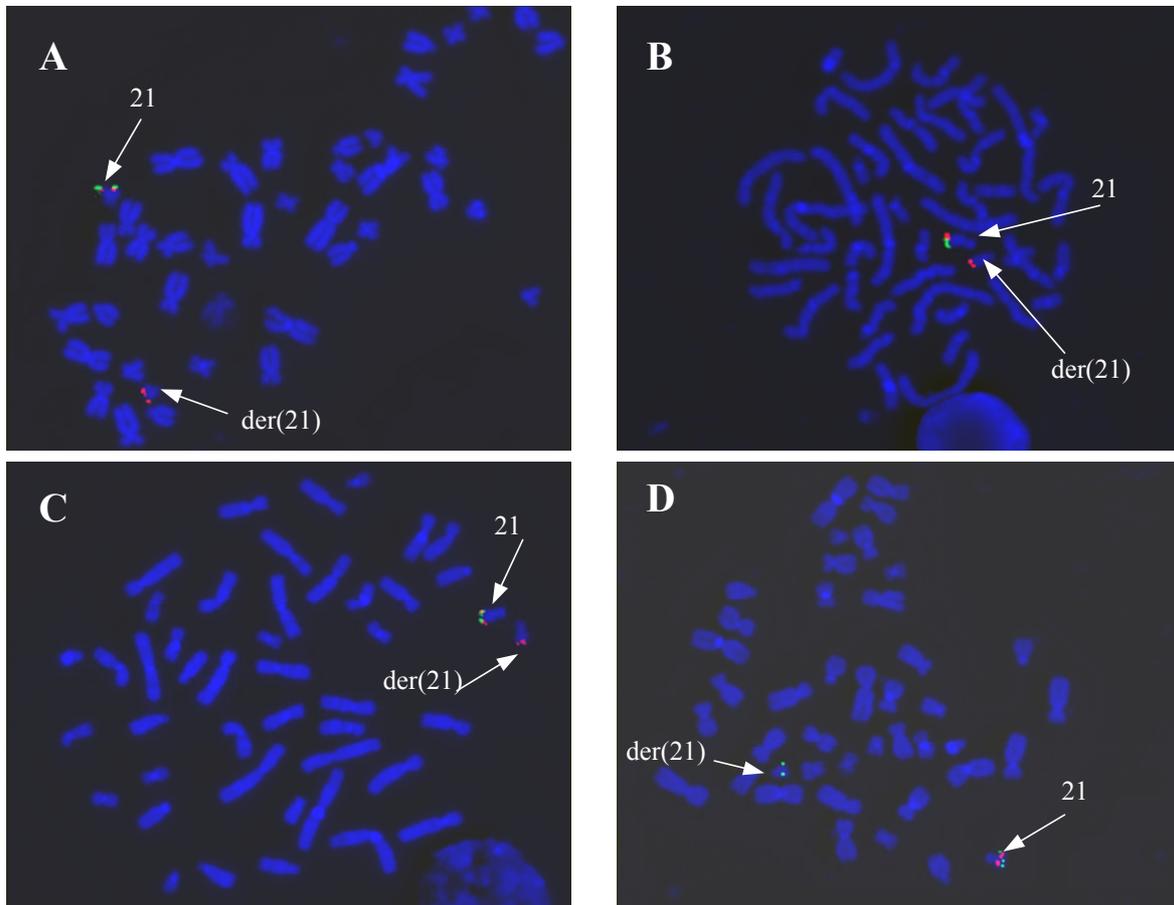


Abbildung 4-18 Ergebnisse der Hybridisierungen mit FISH-Sonden aus 21q22-q22.3 an Metaphasechromosomen von SR

A) YAC 662d2 (rot) zeigt Signale auf dem normalen Chromosom und dem der(21) und kartiert somit proximal zum Bruchpunkt. Hingegen zeigt YAC 821h8 (grün) nur Signale auf dem normalen Chromosom 21 und keines auf dem der(21). Damit kartiert dieses YAC distal zum Bruchpunkt.

B) BAC 1151N9 (rot) weist Signale auf dem normalen und dem der(21) auf, hingegen werden für YAC 265h12 (grün) nur auf dem normalen Chromosom 21 Signale sichtbar. BAC 1151N9 ist proximal und YAC 265h12 distal zum Bruchpunkt lokalisiert.

C) BAC 28F9 (rot) zeigt Signale auf dem normalen und dem derivativen Chromosom 21, damit ist dieses BAC proximal zum Bruchpunkt lokalisiert. YAC 886g8 (grün) zeigt Signale auf dem normalen Chromosom 21 und keine auf dem der(21) und kartiert somit distal zum Bruchpunkt.

D) BAC 1151N9 (grün) weist Signale auf dem normalen Chromosom und dem der(21) auf. Damit kartiert dieses BAC proximal zum Bruchpunkt. Im Gegensatz dazu zeigt BAC 20303J (rot) nur Signale auf dem normalen Chromosom 21 und ist distal zum Bruchpunkt lokalisiert.

Pfeile zeigen auf die beschriebenen Chromosomen 21 und der(21)

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden regionspezifische BAC-Klone für die Chromosomen 13, 21 und 22 etabliert. Mit diesen DNA-Sonden sollte es möglich sein numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen mittels FISH-Analysen nachzuweisen. Dabei wurden FISH-Sonden generiert, die die numerischen Aberrationen Trisomie 13 und Trisomie 21 detektieren, sowie strukturelle Aberrationen des Chromosom 22q11 mit den Mikrodeletionssyndromen DGS/VCFS und das '13q- Syndrom'. Weiterhin wurden mittels molekular zytogenetischen und molekularen Analysen eine partielle Trisomie und zwei partielle Monosomien des Chromosom 21 charakterisiert.

5.1 Vorteile von BAC-Klonen für die FISH

Für die FISH ist es von Bedeutung, dass Sonden mit einer hohen Spezifität, reproduzierbar und mit einer hohen Effizienz in der Hybridisierung eingesetzt werden können. Eine Möglichkeit dieses zu erreichen, besteht in der Auswahl regionspezifischer BACs. Die Vorteile von BACs sind, dass genomische DNA mit einer Größe von 100-300 kb als Insert kloniert sein kann. Außerdem weisen BAC-Klone auch nach mehreren Generationen in Kultur (~100) immer noch eine stabile DNA-Struktur auf und zeigen keine Deletionen oder Chimärismus auf (Shizuya et al., 1992).

Im Vergleich dazu zeigt sich bei der Verwendung von YACs, die im Unterschied zu BACs wesentlich größere DNA-Inserts (2 Mb) tragen können, ein hoher Grad an Instabilität und Chimärismus. Man bezeichnet ein Konstrukt als chimär, wenn zwei oder mehrere DNA-Fragmente in einem Vektor vorhanden sind (Burke and Olson, 1991; Green et al., 1991). Die Entstehung solcher chimären Klone erfolgt entweder durch die Koligation *in vitro* oder durch Rekombination zweier DNA-Fragmente, die in dieselbe Hefezelle aufgenommen wurden. Alternativ kann auch durch eine Kotransformation verschiedener YACs in eine Hefezelle ein Chimärismus verursacht werden (Kouprina et al., 1994; Manaco and Larin, 1994; Schlessinger, 1990). Die Verwendung von BACs hat den Vorteil, dass chimäre Klone nur mit einer Frequenz von 3,5 % auftreten, bei YACs hingegen nach Kotransformationen zu 10% chimär vorliegen können (Shizuya et al., 1992; Schlessinger, 1990). Der verwendete BAC-Vektor basiert auf dem *E.coli* F-Faktor, dessen Gene *parA* und *parB* ausschließen, dass zwei Vektoren in einer Zelle anzutreffen sind, zudem wird darauf die Stabilität dieses Systems begründet (Kim et al., 1992; Shizuya et al., 1992; Iannou et al., 1994).

Neben der Stabilität und der sehr geringen Chimärität von BACs war es von Vorteil, dass diese sich problemlos aufarbeiten ließen. Auch Sequenzierungen der BAC-Enden waren möglich. Damit konnten die etablierten BACs nicht nur anhand ihrer PCR-Marker lokalisiert werden, sondern auch nach einer BAC-Endsequenzierung zu den genomischen Sequenzcontigs angeordnet werden. Durch eine Blast-Analyse ließen sich die Sequenzidentitäten der BAC-Enden zu den genomischen Einzelklonen bestimmen. Es zeigte sich, dass die Sequenzen zwischen 96% und 100% Identität zu den genomischen Klonen aufwiesen. Durch die Lokalisation der BAC-Enden zu den genomischen Contigs gelang eine weitere unabhängige Größenbestimmung, die auch mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese ermittelt wurde. Im folgenden werden die Lokalisationen der BACs in Bezug auf die Genregionen und ihrer Bedeutung in der Diagnostik betrachtet.

5.2 Chromosom 13 spezifische BACs

In der pränatalen Diagnostik werden für den Nachweis von Trisomie 21 und Trisomie 13 locusspezifische FISH-Sonden eingesetzt. Trisomie 13 ist eine der häufigsten Ursachen für eine hohe intrauterine Sterblichkeit von ungeborenen Kindern. In Anlehnung an die in der pränatalen Diagnostik verwendeten FISH-Sonden sollten die von mir etablierten FISH-Sonden auch in die Genregion (13q14.2) kartieren.

Da die Trisomie 13 zum überwiegenden Teil als freie Trisomie auftritt, können Sonden, die über das gesamte Chromosom verteilt sind, effektiv für die Diagnostik eingesetzt werden. Zudem wurde der Fokus auch auf die '13q- Syndrom' Region gelegt. Deletionen in der Region 13q31-q33 sind mit schweren Mißbildungen assoziiert wie z.B. Holoprosenzephalie und mentale Retardierung. Die Auswahl der spezifischen BACs begründete sich auf die vorhandenen STS und Mikrosatellitenmarkern innerhalb der Bande 13q14.2 und der 13q31-q33. Insgesamt wurden 12 PCR-Primerpaare für die Durchmusterung der BAC-Bank verwendet. Es wurden 13 BACs identifiziert, die sich stabil in Kultur zeigten und für FISH-Analysen geeignet sind (Abbildung 5-1).

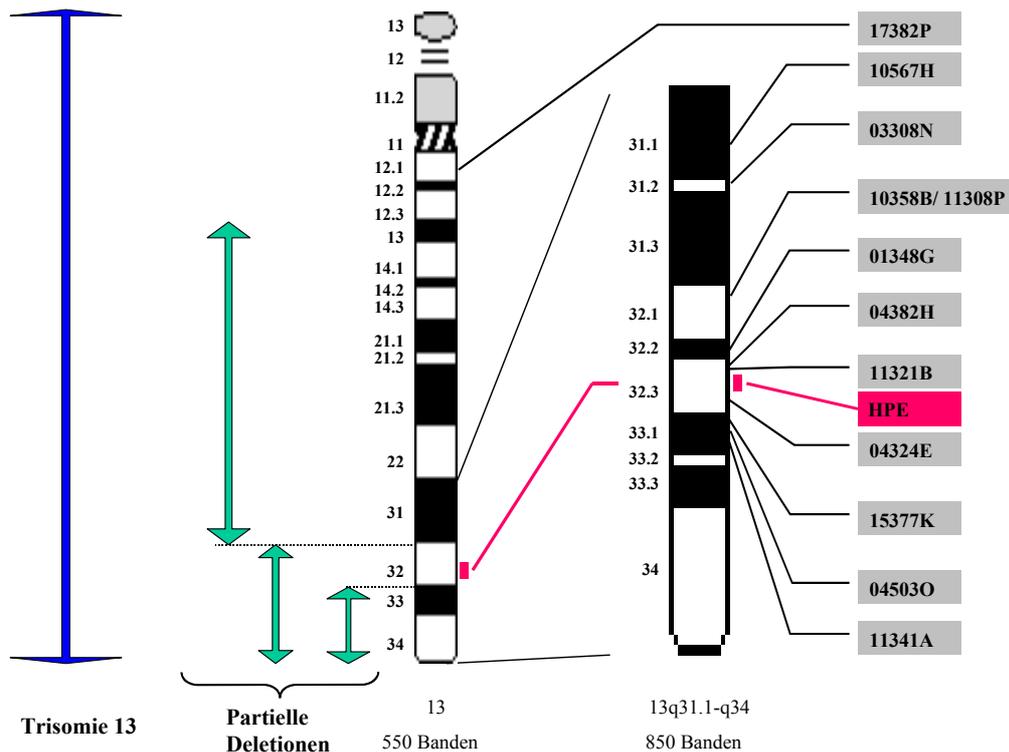


Abbildung 5-1 Übersicht über die Lokalisation der etablierten BACs von Chromosom 13

In der linken Hälfte sind an einem Idiogramm (550 Banden) der häufig trisome Bereich (blau) dargestellt und in grün die von Brown et al. (1993) beschriebenen partiellen Deletionen, die zu unterschiedlichen Ausprägungen im '13q- Syndrom' führen. In rot wird die Deletionsregion, die ursächlich in der Holoprosenzephalie (HPE) involviert ist, dargestellt. An dem Ausschnitt des Idiogramms 13q31.1-q34 mit einer Auflösung von 850 Banden, sind die etablierten BACs in Relation zur chromosomalen Lokalisation dargestellt.

Die verwendete Strategie zur Identifizierung der BACs zeigte sich erfolgreich, da mit den 12 ausgewählten Markern insgesamt 13 regionspezifische BACs identifiziert werden konnten. Die anschließende Kolonie-PCR, durchgeführt an den individuellen Einzel-BAC-Kolonien, zeigte sich als eine effiziente, reproduzierbare und zeitsparende Methode zum Nachweis von STS-Markern und führte zur Identifizierung von sogenannten positiven FISH-Sonden für das Chromosom 13. Für weitere 15 BACs wurden ambivalente PCR-Ergebnisse beim Durchmustern der BAC-Bank erhalten. Die anschließenden Kolonie-PCR- und FISH-Analysen erlaubten keine Zuordnung zu Chromosom 13. Diese Klone wurden folglich als negative Klone bezeichnet.

Beispielhaft soll hier das Ergebnis für D13S164 dargestellt werden. Dieser Marker wurde ausgewählt, da sich dieser ca. 40 kb proximal zum RB1 Gen (Retinoblastoma) befindet. In dieser Region kartieren auch die bereits kommerziell erhältlichen DNA-Sonden, die in einer Komposition mit anderen DNA-Sonden als Aneuploidie-Tests in der pränatalen

Routinediagnostik verwendet werden. Daneben wird diese Sonde auch zur Detektion von Retinoblastomen eingesetzt, da RB1, ein ca. 180 kb große Tumorsuppressorgen, die Zellteilung reguliert und Deletionen z.B. mit Retinoblastomen assoziiert wurden (Horowitz, 1993; Friend et al., 1986).

Mit dem Marker D13S164 wurden insgesamt sechs BACs identifiziert, von denen fünf anschließend in der Kolonie-PCR negativ waren und auch nicht an Chromosom 13 hybridisierten. BAC-Klon 16313I wurde mit der Kolonie-PCR als positiver Klon bestätigt. Jedoch zeigte der Klon überraschenderweise nur Signale in einer distalen Region 13q31-q32. Die Diskrepanz zwischen dem positiven PCR- und dem negativen FISH-Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass der BAC-Klon chimär ist. Die DNA-Sequenzen von 13q14 könnten kleiner als 3-5 kb sein und somit mit der FISH nicht nachweisbar sein. Der Vergleich der End-Sequenzen des BACs mit dem genomischen Contig ergab eine 84%ige Identität von BAC 16313I mit einem Klon auf Chromosom 18p.

Eine weitere Besonderheit ergab sich für BAC 17382P, der mit dem Marker SGC31753 der Bande 13q32 nach dem Durchmustern der BAC-Bank detektiert wurde. In der Kolonie-PCR war allerdings nur eine sehr schwache Bande im Gelbild zu erkennen. Mit der Hybridisierung an normalen Metaphasen und die Sequenzierung der BAC-Enden ermöglichten die Zuordnung des Klons zu der Bande 13q12. Es zeigte sich, dass der Klon 17382P ca. 250 kb proximal zu FLT3 (FMS related Tyrosine Kinase 3) kartiert. Mutationen in Form von tandem Duplikationen in diesem Gen wurden mit der akuten myeloiden Leukämie im Mausmodell in Verbindung gebracht (Rosnet et al., 1991; Abu-Duhier et al., 2000). Die Diskrepanz von PCR-Ergebnissen für DNA-Pools und Kolonie-PCR könnte durch eine Kontamination der DNA-Pools erklärt werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass BAC 17382P locuspezifisch für die Region 13q12 ist und sich sehr gut für den Nachweis von freien Trisomien eignet. Außerdem kann diese DNA-Sonde in 13q12 als Kontrollsonde in einer Kohybridisierung zur Charakterisierung von Deletion des '13q- Syndrom' eingesetzt werden.

Die Bereiche 13q13-q34 sind bei Deletionen mit unterschiedlich schweren Fehlbildungen oder mentaler Retardierung korreliert (Brown et al., 1993). Mit den von mir etablierten BACs bestände die Möglichkeit Deletionen unterschiedlicher Größe zu charakterisieren. Bei Deletionen von 13q13-q31 können BAC 10567H und BAC 03308N, diese in der Bande 31q31 detektieren.

Treten Deletionen der distalen Abschnitte 13q32-q34 auf, so besteht die Möglichkeit diese mit insgesamt neun BACs zu charakterisieren. Die Bande 13q32 ist für die Ausprägung des 13q- Phänotyps entscheidend, denn bei Deletionen treten die meisten der syndromtypischen Merkmale auf.

In 13q32.1 befinden sich die überlappenden BACs 10358B und 11308P, die genomische Sequenz von GPC6 (glypican 6) tragen. GPC6 spielt möglicherweise eine Rolle in der Wachstumskontrolle und Differenzierung (Paine-Saunders et al., 1999; Veugelers et al., 1999).

In dem Bereich zwischen den Markern D13S136 und D13S147 liegt eine ca. 1 Mb große Region, in der Deletionen zu schweren kongenitalen Fehlbildungen führen. Hierzu gehören Holoprosenzephalie (HPE) und Anomalien der Finger wie z.B. fehlende Daumen (Brown et al., 1995; Brown et al., 1993). Anhand von transgenen Mäusen konnte eine Haploinsuffizienz des ZIC2 Gens (Zic family member 2, odd-paired homolog, Drosophila) als Ursache für HPE belegt werden (Brown et al., 1998). In dieser Region befinden sich die BACs 04382H und 11321B ca. 250 kb proximal zu ZIC2. Mit diesen BACs sollte es möglich sein Deletionen ausreichend gut zu detektieren. BAC 04324E wurde 1 Mb distal zu ZIC2 etabliert, dessen Enden sich jedoch nicht sequenzieren ließen. Dieser BAC-Klon war positiv für den Marker SHGC34538 und die FISH-Ergebnisse bestätigten die Position in 13q32.

In 13q33.1 befindet sich BAC 15377K (D13S174). Von Blouin et al. 1998 wurde der Marker D13S174 als ein möglicher Locus für Schizophrenie analysiert. Schizophrenie ist durch psychische Symptome gekennzeichnet, und wie auch bei der manischen Depression werden genetische Faktoren als Krankheitsursache angenommen (Andreasen, 1995).

Mit einem Abstand von ca. 200 kb distal ist BAC 04503O im Genbereich von TPP2 (tripeptidyl peptidase II) lokalisiert und distal davon BAC 11341A mit dem Marker D13S280 mit Teilen des Gens ERCC5 (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency). ERCC5 ist eine Einzelstrang spezifische DNA Endonuklease und Mutationen in ERCC5 führen zu fehlerhaften Reparaturen von UV-Schäden im Krankheitsverlauf von Xeroderma pigmentosum (Habraken et al., 1994; Nospikel and Clarkson, 1994).

Die Verteilung der BACs entlang der Banden 13q32-q33 sollten es ermöglichen, Deletionen von unterschiedliche Größe im '13q- Syndrom' zu detektieren. Da keine adäquaten Fälle vorlagen konnte diese Annahme nicht geprüft werden.

In der pränatalen Diagnostik werden FISH-Sonden der Chromosomen 13, 18 und 21 an invasiv gewonnenen Zellen zur Detektion von Trisomien eingesetzt. In einer Weiterentwicklung wird versucht kindliche Zellen aus mütterlichem Blut zu gewinnen, um an diesen Zellen die entsprechenden Diagnostiken durchzuführen. Für die Unterscheidung der mütterlichen von den kindlichen Zellen wurden bisher Schwangerschaften mit männlichen Kindern untersucht, da in diesen Fällen die kindlichen Zellen mit gonosomenspezifischen FISH-Sonden nachweisbar sind. Es standen für Testhybridisierungen keine sortierten kindlichen Zellen zur Verfügung, deshalb wurden Blutausstriche von Nabelschnurblut männlicher Neugeborener verwendet. An diesen Zellen ließen sich die Zentromerproben der Chromosomen X und Y etablieren und es wurde beispielhaft das indirekt markierte BAC 045030 des Chromosom 13 für den möglichen Nachweis einer Trisomie 13 verwendet. Mit diesem BAC war es möglich distinkte Signale in der Interphase zu erhalten. Die Qualität des Signals war dem des verwendeten alpha-Satelliten Signal von Chromosom X gleichwertig. Da die Hybridisierung mit indirekt markierten FISH-Sonden erfolgte, konnte das Signal in der Interphase mit fluoreszenz markierten Antikörpern verstärkt werden. Für den Einsatz in der Routinediagnostik wären allerdings direkt markierte FISH-Sonden vorzuziehen, da die Zeitersparnis zur Detektion der Signale erheblich ist. Für die direkt markierten FISH-Sonden sind nach der Hybridisierung nur 5-15 min dauernde Waschschriffe erforderlich, hingegen braucht die Detektion mit den Antikörpern zwischen 2,5 und 3,5 Std.

5.3 Chromosom 21 spezifische BACs

Die Etablierung qualitativ hochwertiger BAC-Klone für verschiedene Regionen des Chromosoms 21 waren die Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung von FISH-Analysen zum Nachweis von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen.

Für das Chromosom 21 wurden in 21q21.1, 21q22.13-q22.3 insgesamt zehn BACs etabliert, die eine hohe Spezifität für diese chromosomalen Regionen in der FISH aufwiesen (Abbildung 5-2). Weiterhin wurden durch Sequenzierungen der BAC-Enden zusätzliche Sequenzinformationen erhalten, die eine sichere Zuordnung der BACs zu den genomischen Contigs erlaubten (Hattori et al., 2000). Die sequenzierten Bereiche waren 96% bis 100% identisch mit den genomischen Contigs.

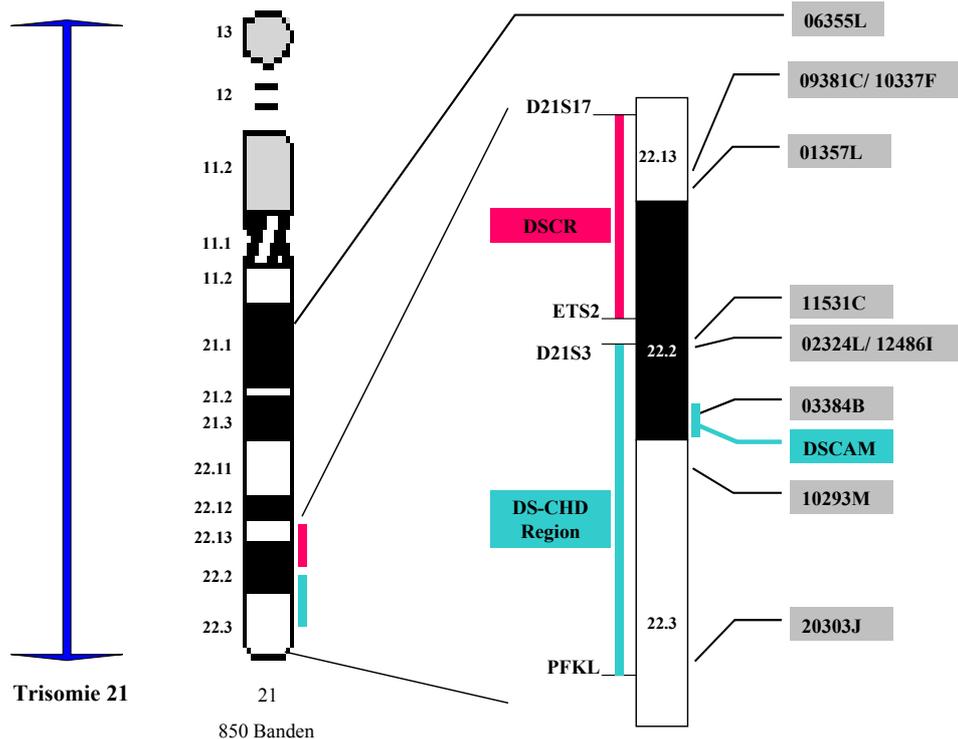


Abbildung 5-2 Übersicht über die Lokalisation der etablierten BACs von Chromosom 21

Im linken Teil der Abbildung findet sich ein Idiogramm des Chromosoms 21 (850 Banden), der blaue Balken deutet an, dass in 95% der Fälle das gesamte Chromosom in dreifacher Kopie vorliegt. Rechts ist ein Ausschnitt von 21q22.13-q22.3 mit den etablierten BACs dargestellt. Zwischen dem D21S17 und dem ETS2 Gen ist die Down-Syndrom kritische Region (DSCR) in rot und die Region, die nach Barlow et al. (2001) bei angeborenen Herzkrankheiten im Down-Syndrom involviert ist, wird als grüner Balken dargestellt. Das Gen DSCAM (Down-Syndrome cell adhesion molecule) wurde von Barlow als Kandidatengen für Herzerkrankungen kartiert. PFKL (phosphofructo-kinase liver type)

Die Auswahl der BACs erfolgte mit STS und Mikrosatellitenmarkern aus der für das Down-Syndrom kritischen Region und zudem wurde für eine weitere subtelomerische Region im Abstand von 2,5 Mb eigens generierte Primer verwendet. Diese Primer wurden innerhalb repeatarmer Regionen nach einer computergestützten Analyse mit 'REPuter' generiert (Kurtz et al., 2000).

Es zeigten sich Unterschiede in der Verwendung der verschiedenen PCR-Primer für das Durchmusterung der BAC-Bank. Die Primer der repeatarmen Regionen waren in der PCR stabiler als z.B. D21S55 und D21S259 innerhalb der Down-Syndrom kritischen Region. Für die beiden Primerpaare D21S55 und D21S259 war es trotz verschiedenen Optimierungen der PCR nicht möglich BACs zu isolieren. Im Unterschied dazu wurden für die Marker D21S15, D21S270, D21S3 und D21S53 anhand schwacher PCR-Signale insgesamt zehn BACs identifiziert. Jedoch wurde die Anwesenheit der STS-Marker für die individuellen BAC-Klone in der Kolonie-PCR nicht bestätigt und keiner der BACs zeigte in der FISH-Analyse Signale auf dem Chromosom 21. Die geringe Ausbeute an positiven DNA-Sonden läßt sich

zum einen mit der Komplexität der zu analysierenden PCR-Pools begründen, die dazu führen, dass ein Limit in der Detektierbarkeit der DNA erreicht wird. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass mit der PCR Methode für einige Marker kein Klon detektiert werden kann, die Rate liegt bei 8,6% für die verwendete BAC-Bank (Kim et al., 1996).

Schließlich wurden insgesamt zehn BACs für das Chromosom 21 isoliert, deren Lokalisation im weiteren dargestellt wird. In der chromosomalen Bande 21q21.1 kartiert BAC 06355L (D21S1414) und kann im Falle einer partiellen Monosomie 21 oder partiellen Trisomie 21 als Hybridisierungskontrolle der distal liegenden Bereiche dienen.

Weitere neun BACs kartieren zu den Banden 21q22.13-q22.3. Es wurde dargestellt, dass drei BACs (09381C, 10337F, 01357L) zwischen dem proximalen Marker D21S17 und dem distalen Marker ETS2 kartieren. Diese BACs befinden sich somit innerhalb der kritischen Region, die mit verschiedenen Down-Syndrom Charakteristika assoziiert ist und als Down-Syndrom kritische Region (Down's Syndrome critical region = DSCR) bezeichnet wird (Rhamani et al., 1989; McCormick et al., 1989; Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1994). Die BACs 09381C, 10337F und 01357L überspannen große Teile des DYRK1A Gens (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A). Dieses Gen ist ortholog zu dem *Minibrain (Mnb)* in *Drosophila* (Guimerá et al., 1996; Shindoh et al., 1996; Song et al., 1996). Mnb ist in der postembryonalen Neurogenese involviert (Tejedor et al., 1995), zudem konnte gezeigt werden, dass Mnb im DS-embryonalen Gehirn überexprimiert wird (Guimerá et al., 1999).

Im weiteren konnte ich sechs BACs in der Region zwischen dem Marker D21S3 und PFKL lokalisieren. Dieser Bereich wird mit den angeborenen Herzkrankheiten beim Down-Syndrom (congenital heart disease = CHD) in Verbindung gebracht (Barlow et al., 2001). Vorwiegend treten beim Down-Syndrom Atrioventrikuläre Septum Defekte (artioventricular septal defects = AVSD) auf (Ferencz et al., 1997). Im proximalen Bereich dieser Region befinden sich die BAC-Klone 11531C und die sich überschneidenden BACs 02324L und 12486I. Das BAC 11531C enthält die genomische Sequenz des Gens WRB, das für ein Tryptophan reiches Basisprotein codiert (alternative Bezeichnung: congenital heart disease 5 gene, CHD5) und unter anderem im erwachsenen Herzen, Gehirn und anderen Geweben, als auch im fetalen Gehirn exprimiert wird (Egeo et al., 1998). Die BACs 02324L und 12486I überspannen Teile von SH3BGR (SH3-binding domain and glutamic acid-rich protein), das für ein Glutaminsäure reiches Protein codiert mit einer SH3-Bindedomäne. Das Protein wird

differentiell im Herz und im Skelettmuskel exprimiert (Scartezzini et al., 1997). Weitere Analysen der BAC-Klone zeigten, dass BAC 03384B (D21S23) innerhalb der Genregion von DSCAM (Down-Syndrome cell adhesion molecule) lokalisiert ist. DSCAM ist eines der größten Gene und erstreckt sich über eine genomische Region von 840 kb und codiert für ein Zelladhäsions-Molekül. Es wird spezifisch und hoch exprimiert in fetalem und adultem Gehirn und gering in anderen Geweben (Yamakawa et al., 1998). Von Barlow et al. (2001) wird DSCAM als Kandidat für die CHD in DS angenommen. Daher war es von Vorteil einen BAC auch in diesem Bereich für diagnostische Zwecke etabliert zu haben.

Etwa 500 kb distal zum BAC 03384B befindet sich der BAC-Klon 10293M, der den Marker D21S266 trägt. BAC 10293M trägt einen Teil genomischer DNA des Gens MX2 (human interferon-regulated resistance GTP-binding protein MXB). Schließlich ist BAC 20303J ca. 2,5 Mb vom Telomer entfernt und noch innerhalb der von Barlow et al. (2001) beschriebenen CHD-Region. Dieser BAC-Klon trägt genomische Sequenz des Gen TMEM1 (transmembrane protein1 alias: epilepsy holoprosencephaly candidate-1 protein).

Alle aufgeführten für Chromosom 21 spezifischen BACs sind für die Analyse freier Trisomien, die in 95% der Down-Syndrom Patienten auftreten, einsetzbar. Besondere Bedeutung haben die BACs der Down-Syndrom kritischen Region. Speziell diese FISH-Sonden eignen sich auch für die Charakterisierung von partiellen Trisomien. Auch die BACs in der von Barlow et al. (2001) beschriebenen Region für angeborene Herzfehler haben diagnostisches Potential.

Das Sondenkollektiv wurde auch zum Nachweis freier Trisomien 21 in Amnionzellen (47,XY,+21) verwendet und zur Charakterisierung von partiellen Trisomien und Monosomien. Die BACs einzeln als FISH-Sonden eingesetzt, wiesen eindeutig drei Signale an Metaphasechromosomen als auch an Interphasekernen auf. Aus dem Sondenkollektiv wurden die drei benachbarten BACs der Down-Syndrom kritischen Region (09381C, 10337F, 01357L) als BAC-Pool hybridisiert und damit wurden verstärkte und gut erkennbare Signale in der Interphase nachweisen. Die Kombination dieser BACs eignet sich besonders gut für die Analyse in der Interphase, da mit den BACs ca. 300 kb genomische Sequenz für die Hybridisierung zur Verfügung stehen. Obwohl eine Lücke von ca. 40 kb zwischen den BACs 09381C/10337F und 01357L besteht, werden von dem BAC-Pool distinkte Signale in der Interphase erzeugt. Durch die enge Nachbarschaft der Klone (<100 kb) treten keine gesplitteten Signale auf (Trask et al., 1989).

Eine ähnliche Kombinationsmöglichkeit besteht für den proximalen Teil der CHD-Region mit den BACs 11531C und 02324L/12486I, die sich in einem Abstand von ca. 70 kb zueinander befinden.

Durch die Zusammenstellung spezifischer DNA-Sonden im sogenannten Sondenkollektiv war es möglich verschiedene Fragestellungen der pränatalen Diagnostik und postnatalen Diagnostik zu bearbeiten. Die DNA-Sondencocktails wurden zur Charakterisierung von freien Trisomien 21 und 13 in Amnionzellen sowie zum Nachweis von kindlichen Zellen und mütterlichen Zellen in Nabelschnurblut verwendet. Außerdem wurden die DNA-Sonden zur Charakterisierung von partiellen Monosomien und einer partiellen Trisomie verwendet.

5.4 Chromosom 22 spezifische BACs

Die BACs des Chromosom 22 sollen Mikrodeletionen in 22q11.2 im Zusammenhang mit dem DiGeorge-Syndrom bzw. Velokardiofaziales-Syndrom (DGS/VCFS) darstellen können. In dieser Region sind Chromosom 22 spezifische duplizierte Sequenzen (low copy repeats = LCRs) lokalisiert. In einem 3 Mb großen Bereich befinden sich die LCRs (A bis D), durch deren Rekombinationen Deletionen in Größe von 1,5 bzw. 3 Mb vermittelt werden (Edelmann et al., 1999a; Edelmann et al., 1999b; Shaikh et al., 2000). Es wurden vier BACs für die Detektion des DGS/VCFS in der typischen deletierten Region zwischen Marker D22S427 und D22S801 etabliert.

Die hier etablierten FISH-Sonden, zum Nachweis kryptischer Deletionen in 22q11.2, wurden nicht wie die BACs der Chromosomen 13 und 21 mit STS-Markern oder Mikrosatellitenmarkern isoliert, sondern mit speziell generierten Primern. Wegen des hohen Gehalts an Repeats bzw. sich wiederholenden Sequenzmotiven wurden mit der *REPuter* Software Bereiche ohne Wiederholungen für die Generierung von spezifischen PCR-Primern ausgewählt.

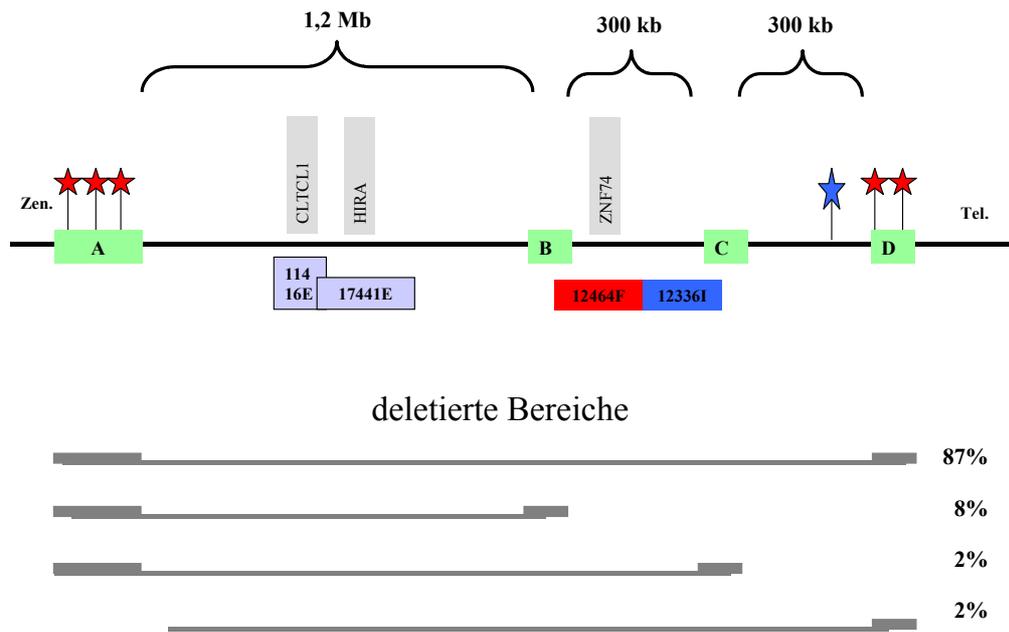


Abbildung 5-3 Übersicht der BAC-Lokalisationen innerhalb 22q11.2

Im oberen Bereich der Abbildung finden sich die low-copy-repeats (LCR: A bis D) innerhalb der typischen deletierten Region vom DGS/VCFS. Zwischen LCR A und B sind die BACs 11416E und 17441E positioniert. Die BACs 12464F (rot) und 12336I (blau) befinden sich zwischen LCR B und C, beide BACs sind mit einem Ende im LCR B bzw. C lokalisiert. Identische Sequenzmotive innerhalb weiterer LCRs sind mit farbigen Sternen gekennzeichnet. Im unteren Teil der Abbildung werden Deletionsregionen mit grauen Balken dargestellt und die dazu angegebenen Prozentzahlen weisen auf die Häufigkeit der Deletionen hin (nach Shaikh et al., 2000).

Der Bereich zwischen den LCRs A und B ist am häufigsten von Deletionen betroffen und deshalb sind die isolierten BACs 11416E und 17441E für die FISH-Analyse von großer Bedeutung (siehe auch Abschnitt 0). Aufgrund ihrer Position war festzustellen, dass die BACs keinen der LCRs umfassten sondern vielmehr in der Region von CLTCL1 (clathrin, heavy polypeptide-like 1) und HIRA (histone cell cycle regulation defective, *S. cerevisiae*, homolog of, A) positioniert sind (Sirotkin et al., 1996; Lamour et al., 1995; Roberts et al., 1997). Diese befinden sich 450 bzw. 300 kb proximal zu dem TBX1 (T-box 1) Gen, einem Transkriptionsfaktor, der an der Regulation in der Entwicklung beteiligt ist (Chieffo et al., 1997). Von Jerome und Papaioannou (2001) wurde gezeigt, dass Nullmutationen von TBX1 bei Mäusen mit ähnlichen Herzdefekten einhergehen wie sie auch beim DGS/VCFS zu finden sind. Zumal auch Mäuse mit einer 1,5 Mb großen Deletion, die homolog zu der DGS/VCFS ist, konotrunkale und parathyroide Defekte zeigten (Merscher et al., 2001).

Das Spektrum der vorhandenen Klone sollte durch BACs der Regionen LCR B-C und LCR C-D ergänzt werden. Es gelang nicht innerhalb der Region zwischen LCR C-D einen BAC zu isolieren. In dem Bereich LCR B-C konnten die BACs 12464F und 12336I mit einer Gesamtlänge von ca. 338 kb etabliert werden. Ein BAC-Ende von 12464F ist innerhalb des LCR B lokalisiert und weist zum Klon cHK89 eine 99%ige Identität und zum Klon cos4 eine 100%ige Sequenzidentität auf. Zwischen dem cHK89 und dem cos4 besteht möglicherweise Homologie in Bezug auf das NF1L Element, das auch ein Element in den LCRs A und D ist. NF1L beinhaltet eine AT-reiche Sequenz, die anscheinend bei einer balancierten Translokation t(17;22) beteiligt ist. Diese Translokation ist mit Neurofibromatose Typ 1 (NF1-like) assoziiert (Kehrer-Sawatzki et al., 1997). Die Homologie, der Sequenzen auf Chromosom 22 und 17, konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Vermutlich gelang es nicht aufgrund der unklonierbaren und instabilen Sequenz der Region einen, die Lücke überspannenden, Klon zu isolieren (Kurahashi et al., 2000). Sequenzvergleiche der BAC-Enden von 12464F zeigten im LCR A drei homologe Segmente mit einer Identität von 99% und im LCR D wurden zwei homologe Segmente mit einer Identität von 99% vorgefunden.

Nach der Sequenzierung der BAC-Enden zeigte sich für BAC 12336I, dass ein BAC-Ende im LCR C lokalisiert ist. Dieser LCR hat die wenigsten Repeatelemente im Vergleich zu den anderen LCRs. Eine weitere Homologie zu einem Element, das vor dem LCR D zu lokalisieren ist, bestand mit einer Identität von 97%.

Inwieweit sich die Homologien der einzelnen LCRs auf die Hybridisierungseffizienz der FISH-Analyse auswirken, wird in Abschnitt 0 im Zusammenhang mit den Hybridisierungsergebnissen an Patienten mit Mikrodeletionen in 22q11.2 diskutiert.

In der Routinediagnostik werden die Klone in 22q11 zusammen mit telomerwärts gelegenen FISH-Sonden in Kohybridisierungen eingesetzt. Die Kohybridisierung erleichtert bei einer Mikrodeletion die Interpretation der Signale in der Interphase. Bei Vorhandensein einer Mikrodeletion werden dann mit den Telomer-BACs Signale auf dem normalen und derivativen Chromosom 22 in der Interphase erwartet, hingegen wird entsprechend mit dem BAC aus 22q11 nur ein Signal in der Interphase erzeugt. Für die Integration meiner BACs am Telomer orientierte ich mich an den bisher vorhandenen FISH-Sonden. Die Etablierung der Sonden zur Kontrolle der Telomerregion führte zu zwei BACs, von denen einer ca. 2,5 Mb (02416N) und der andere (22489F) ca. 50 kb vom Telomer entfernt lokalisiert ist. Das BAC 02416N befindet sich in einem genarmen Bereich. Die für diesen BAC ermittelte Größe von 226 kb ermöglichte eine effiziente Markierung und zeigte distinkte Signale in den Hybridisierungen. Weiter distal befindet sich BAC 22489F, der Teile des SBF1 (set-binding

factor 1) Gens überspannt, allerdings wurde dieser wegen seiner geringen Hybridisierungseffizienz nicht weiter eingesetzt.

Die BACs 11416E und 17441E, die sich in dem am häufigsten deletierten Bereich zwischen den LCRs A und B befinden, wurden dahingehend optimiert, dass sie ohne Vorbereitung der Objektträger d.h. ohne RNaseA und Pepsin Behandlung distinkte Signale in der Interphase zuließen (siehe Abschnitt 4.1.3). Desweiteren konnten diese BACs bereits bestimmte Deletionen in 22q11 an einem Patientenkollektiv bestätigen.

5.5 FISH-Analysen von Patienten mit einer Deletion in 22q11

Die für Chromosom 22 optimierten FISH-Sonden konnten an Patientenmaterial getestet werden. Diese Patienten wiesen eine Mikrodeletion in 22q11 auf, deren Anwesenheit bereits mit kommerziellen FISH-Sonden nachgewiesen wurde.

In Anlehnung an kommerziell erhältliche FISH-Sonden (z.B. Fa. Vysis oder Fa. Oncor) wurde gezielt nach DNA-Klonen aus der Region zwischen den LCRs A und B gesucht. Mit den BACs 11416E und 17441E konnten spezifische FISH-Sonden generiert werden.

Für die beiden BAC-Klone (11416E, 17441E) wurden jeweils deutlich sichtbare Signale auf den Chromosomen 22q11 auf normalen Metaphasen und in Interphasen erhalten. Bei den Fällen wurden bei einer Zellzahl von 50 Zellen, dazu gehörten Metaphasen und Interphasekerne, jeweils nur Signale auf dem unveränderten Chromosom 22q11 erhalten, während das Signal auf dem derivativen Chromosom (der(22)) nicht vorhanden war. Zusätzlich wurde mit der Kohybridisierung des BACs (02416N) aus der Telomerregion in 22q13.3 eine Kontrolle über die individuellen FISH-Ergebnisse erhalten und ermöglichten dadurch eine weitaus sichere Interpretation hinsichtlich des der(22).

Im Gegensatz dazu waren FISH-Ergebnisse mit den beiden BACs, die zwischen den LCRs B und C lokalisiert sind, sehr ambivalent. BAC 12464F, dessen eine BAC-Ende mit Sequenzen des LCR B identisch ist, produzierte neben den Signalen auf normalen Chromosomen 22 auch Signale am derivativen Chromosom 22. Die FISH-Signale auf dem der(22) mit der Deletion in 22q11 waren bei den 11 Patienten mit Deletionen in 22q11 generell schwächer in ihrer Intensität im Vergleich zu den Signalen auf den normalen Chromosomen 22. Die schwächeren FISH-Signale könnten auf die Anwesenheit von Teilsequenzen des LCR A bzw. D zurückzuführen sein.

Ähnlich wie bei anderen Deletionssyndrom-Regionen vermutet man auch für die Region in 22q11, dass die verwandten flankierenden und eingestreuten Sequenzcluster eine erhöhte

Rekombinationsrate bewirken und somit auch Deletionsereignisse gehäuft auftreten können. Reduzierte Signale in der FISH-Analyse sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass nach der homologen Rekombination, die zur Deletion führte, Teile des LCR A bzw. D nicht deletiert wurden. Es wäre vorstellbar, dass Deletionen mit Bruchstellen in den unterschiedlichen Repeatclustern vorliegen, und die verbleibenden DNA-Fragmente des LCR A bzw. D könnten eine Hybridisierung des BAC 12464F ermöglichen, und zu einem weniger intensiven Signal führen. BAC 12336I konnte an Metaphasen von sechs der insgesamt 11 Patienten eine Deletion auf dem der(22) nachweisen, aber bei vier Patienten war ein schwaches Signal auf dem der(22) zu verzeichnen. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass bei vier Patienten die Deletion des LCR D nicht vollständig war, so dass noch Sequenzfragmente vorhanden waren, mit denen BAC 12336I hybridisieren konnte.

5.6 Molekular zytogenetische Analysen der Patientin CMI mit einer partiellen Trisomie 21

Die in dieser Arbeit durchgeführten molekular zytogenetischen Analysen zeigten, dass die Patientin CMI eine partielle Trisomie 21 mit dem Karyotyp 47,XX,der(21),t(16;21)(q23.2;q22.11)mat trägt. Damit wurde der zytogenetische Befund, der am Humangenetischen Institut in Münster erstellt wurde, bestätigt. Die konventionelle Chromosomenuntersuchung bei der Mutter ergab eine balancierte reziproke Translokation t(16;21)(q24;q22) und einen unauffälligen Phänotyp. Dabei war davon auszugehen, dass die Anwesenheit des zusätzlichen derivativen Chromosoms (der(21)) bei der Tochter anscheinend von der Mutter vererbt wurde. Die Entstehung dieser seltenen partiellen Trisomie 21, war anscheinend auf eine 3:1 Fehlverteilung in der mütterlichen Meiose zurückzuführen, bei der das Translokationschromosom der(21) zusammen mit einem normalen mütterlichen Chromosom 21 in eine Eizelle gelangte. Die Patientin CMI mit einem zusätzlichen der(21) wies von den 25 auf der Jackson-Liste aufgeführten Down-Syndrom Merkmalen nur fünf Merkmale auf (Jackson et al., 1976). Somit war das Mädchen besonders mild betroffen und erfüllte mit den fünf vorhandenen Down-Syndrom Merkmalen nur annähernd die diagnostischen Kriterien für Down-Syndrom. Da mindestens fünf der auf der Jackson-Liste aufgeführten diagnostischen Kriterien erfüllt sein sollten, um die Diagnose Down-Syndrom zu erteilen, handelt es sich bei dem Mädchen nicht um einen klassischen Down-Syndrom Fall. Damit war es von Interesse, die 21q-Region, die bei der partiellen Trisomie 21 vorhanden war, mit Hilfe der molekularen Zytogenetik näher zu charakterisieren.

Die Aufklärung der Bruchpunktregion in 21q22.11 erfolgte mit 19 YACs. Da diese große genomische Bereiche erfassen war es möglich eine schnelle Annäherung an den Bruchpunkt, im Zusammenhang mit der Deletion, zu erhalten (Burke and Olson, 1991; Schlessinger et al., 1991). Mit insgesamt 12 BACs erfolgte eine Feinkartierung der Bruchpunktregion und innerhalb der Down-Syndrom kritischen Region.

In den FISH-Analysen wurde durch die Anwesenheit von Signalen auf den normalen und dem derivativen Chromosom 21, die proximale trisome Region des Chromosoms 21 bei der Patientin mit einer partiellen Trisomie eindeutig nachgewiesen.

Der Bruchpunkt wurde innerhalb eines Intervalls von 80 kb, zwischen das proximale BAC pR140B9 (D21S1682) und das distale YAC 690f12 (D21S390) lokalisiert. Somit wurde eindeutig gezeigt, dass ca. 19 Mb des proximalen Teils von 21q trisom vorlag. Die Ergebnisse der zytogenetischen Analysen mit dem Bruchpunkt des der(21) in der Bande 21q22 wurden dahingehend bestätigt, dass die molekular zytogenetischen Analysen die Bande 21q22.11 bestimmten. Der distal zum Bruchpunkt befindliche Bereich 21q22.12-qter zeigte in den Hybridisierungen nur Signale auf den normalen Chromosomen 21, und es wurden keine weiteren Veränderungen detektiert.

Außerdem konnte das translozierte Fragment von Chromosom 16 mit dem YAC 756h3 eindeutig auf dem derivativen Chromosom 21 und auf den normalen Chromosomen 16 nachgewiesen werden. Das YAC 756h3 ist durch die Marker WI-3181 und D16S402 in der Bande 16q23.2 lokalisiert. Durch den Nachweis auf dem der(21) bei CMI konnte gezeigt werden, dass nicht nur, wie nach zytogenetischer Betrachtung anfänglich angenommen, 16q24-qter sondern 16q23.2-qter trisom vorlag.

Der Bruchpunkt in 21q22 bzw. 16q wurde bei der Mutter mit FISH-Sonden bestätigt. Insgesamt sieben FISH-Sonden wiesen den proximalen Bereich mit Signalen auf dem normalen und derivativen Chromosom 21 aus. Der Bereich distal zum Translokationsbruchpunkt wurde mit zehn FISH-Sonden, die auch bei CMI hybridisiert wurden, bestätigt. Eindeutig waren hier die Signale auf dem normalen Chromosom 21 und auf dem derivativen Chromosom 16 erkennbar. Mit YAC 756h3 wurde gezeigt, dass auch hier 16q23.2-qter auf dem derivativen Chromosom 21 vorhanden war, und dieses unverändert an CMI vererbt worden war.

5.6.1 Vergleiche der partiellen Trisomie 21 von CMI mit anderen Fällen

Bei den phänotypischen Betrachtungen fällt auf, dass die fünf Down-Syndrom Merkmale, die bei CMI auftreten, in verschiedenen Regionen des Chromosom 21 durch Delabar et al. (1993) kartiert wurden. In den Korrelationen zwischen Genotypen und Phänotypen bei Delabar et al.

(1993) wurde der Patient ML mit dem Karyotyp 47,XX,+der(21)t(15;21)(q26.2;q22.1)mat beschrieben (Sinet et al., 1976; Raoul et al., 1976). Der trisome Bereich erstreckt sich vom p-Arm bis zu dem Marker D21S54 und der Patient wurde, ohne Down-Syndrom Merkmale beschrieben, also mit einem normalen unauffälligen Phänotyp (Abbildung 5-4).

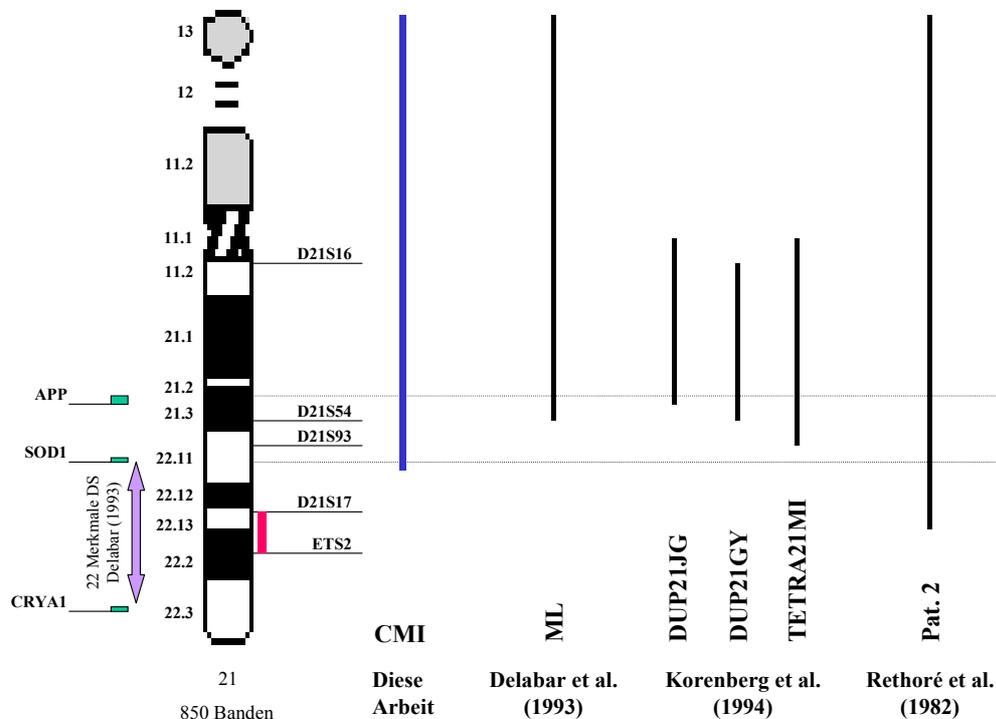


Abbildung 5-4 Bereiche partieller Trisomien von CMI und den im Text beschriebenen Patienten

An dem Idiogramm von Chromosom 21 sind auf der linken Seite die Gene APP, SOD1 und CRYA1 in grün und der Bereich, der von Delabar et al. (1993) mit 22 Down-Syndrom Charakteristika in Verbindung gebracht wurde, ist durch einen blauen Pfeil dargestellt. Rechts vom Idiogramm sind STS-Marker und die Down-Syndrom kritische Region (rot) gekennzeichnet. Die Bereiche, die bei den Patienten trisom vorlagen, sind durch vertikale Linien dargestellt. Neben dem in dieser Arbeit beschriebenen Fall CMI ist der von Delabar et al. (1993) beschriebene Patient ML mit keinem Merkmal für Down-Syndrom angeführt. Die von Korenberg et al. (1994) beschriebenen Patienten mit einer reinen partiellen Trisomie sind mit 5 bis 11 Down-Syndrom Merkmalen beschrieben. Der von Rethoré beschriebene Patient 2 trägt eine Translokation $t(16;21)(q22.3;q22.1)$ und zeigt Down-Syndrom Merkmale.

App (amyloid precursor protein), SOD1 (superoxide dismutase1), CRYA1 (crystallin, alpha-1 human alphaA-crystallin)

Im Unterschied dazu wurden die Patienten DUP21JG, DUP21GY und TETRA21MI mit reinen partiellen Trisomien beschrieben (Korenberg et al., 1994). Die dreifach vorhandenen Bereiche des Chromosom 21 erstrecken sich auf p-q21.2 (inkl. APP), q11.2-q21.3 (D21S16-D21S54) und p-q22.11 (inkl. D21S93) und waren damit alle kleiner als die vorgefundene Trisomie 21 der Patientin CMI (Abbildung 5-4). Im Gegensatz zu CMI weisen diese Patienten einen 5, 11 +2 und 10 Kennzeichen für Down-Syndrom der Jackson Liste auf. Besonders der Patient DUP21JG hat bei einer kleineren Duplikation auch 5 Zeichen für Down-Syndrom.

Diese sind Minderwuchs, Mikrozephalie, mongoloide Lidspalte, Hypotonie und Überstreckbarkeit der Gelenke. Die angegebenen Merkmale unterscheiden sich von denen in CMI, die bei einer größeren Duplikation fünf andere Merkmale aufweist (Tabelle 5-1). Das diese Patienten mit kleineren Deletionen andere oder mehr Merkmale für Down-Syndrom zeigen, weist darauf hin, dass einzelne Merkmale sich nicht nur einer chromosomalen Region zuordnen lassen.

Tabelle 5-1 Phänotypische Merkmale von CMI und drei Patienten von Korenberg (1994)

In der linken Spalte sind phänotypische Merkmale angeführt, die bei der Beurteilung der Patienten herangezogen wurden (Korenberg et al., 1994).

+: Merkmal vorhanden, -: Merkmal nicht vorhanden, ±: Merkmal geringfügig ausgeprägt, leeres Kästchen: keine Information vorhanden

	CMI	DUP21JG	DUP21GY	TETRA21MI
Minderwuchs	-	+	+	-
Mikrozephalie	-	+	+	+
Brachyzephalie	+	-	+	+
lateral ansteigende Lidachsen	-	+	+	+
Epikanthus	-	-	+	-
Brushfield Flecken	±	-	+	-
flache Nasenwurzel	+		+	-
ständig geöffneter Mund	+		+	+
gefurchte Zunge	-		+	-
hoher Gaumen	-		-	
Einfaltung der Ohrmuschel	-	-	-	-
kurzer Hals	+		+	+
kurze, breite Hände	+	-	-	+
Brachydaktylie V	±	-	-	+
Klinodaktylie V	-		+	-
Vierfingerfurche	-		-	+
Sandalenlücke	-		±	-
kongenitaler Herzfehler	-	-	-	-
Überstreckbarkeit der Gelenke	-	+	-	+
Muskelhypotonie	-	+	±	+

Neben den bisher erwähnten Patienten wird von Rethoré et al. (1982) eine familiäre Translokation t(16;21)(q22.3;q22.1) beschrieben. Die Patientin Nr.2 wies eine Trisomie 16q22.3-qter und eine Trisomie 21pter-q22.1 auf. Die phänotypischen Merkmale waren zum einen mit dem Down-Syndrom in Verbindung zu bringen wie z.B. lateral ansteigende Lidachsen, Strabismus, kurzer Hals und Vierfingerfurche und zum anderen mit einer Trisomie 16 wie z.B. hervortretende Stirn, deformierte Hände/Füße, Hypertelorismus und Kardiopathie. Bei den beschriebenen Merkmalen des Down-Syndrom von Patientin Nr.2 fällt im Vergleich zu CMI auf, dass nur der kurze Hals vorhanden ist. Im Unterschied dazu werden lateral ansteigende Lidachsen, kurzer Hals und Vierfingerfurche auch bei TETRA21MI beobachtet.

Weiterhin läßt sich feststellen, dass im Gegensatz zu Patientin Nr.2 bei CMI ein kleinerer Teil des Chromosom 16 (16q23.2-qter) trisom vorliegt. In der Literatur wurde eine ähnliche partielle Trisomie 16q23-qter mit einer Translokation $t(13;16)(p12;q23)$ beschrieben (Savary et al., 1991). Der Phänotyp war gekennzeichnet mit Hypotonie und Dysmorphien wie z.B. hohe Stirn, schmale Nase mit eingesunkener Nasenwurzel und Hypertelorismus. Demnach lassen die milden Zeichen für Down-Syndrom in der Patientin CMI darauf schließen, dass die partielle Trisomie 16 sich nicht im Phänotyp von CMI auswirkt.

Der Teil des Chromosom 21, der bei CMI in dreifacher Kopie vorliegt, enthält die Gene App (amyloid precursor protein) und SOD1 (superoxide dismutase1). Mutationen in App treten z.B. bei der autosomal dominant vererbten Alzheimer Erkrankung auf (Goate et al., 1991) aber auch Frameshift Mutationen in App können zur Alzheimer Erkrankung in Down-Syndrom Patienten führen (Van Leeuwen et al., 1998).

Das Gen SOD1 (Superoxide dismutase1) wies in Patienten mit Trisomie 21 eine 50% höhere intrazelluläre Aktivität auf. Die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Aktivität und den neurologischen Symptomen des Down-Syndroms vorläge, konnte allerdings bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (Lethem et al., 1997; de la Torre et al., 1996; Turrens, 2001). Mutationen in SOD1 sind bei der dominanten Form der Amyotrophischen Lateralsklerose zu finden (Rosen et al., 1993).

Durch die Kartierung von 24 Charakteristika des Down-Syndroms konnte das Gebiet von SOD1 bis CRYA1 mit insgesamt 22 Merkmalen in Verbindung gebracht werden (Delabar et al., 1993). In dieser Region befinden sich demnach drei (sicher diagnostiziert) und zwei (fragliche Merkmale) Charakteristika, die bei CMI zu finden sind, die mit dem Down-Syndrom Phänotyp assoziiert sind.

Im Bereich der Bande 21q22 wurden die Marker D21S17 und ETS2 als begrenzend für die Down-Syndrom kritische Region angesehen, DSCR (Rahmani et al., 1989; McCormick et al., 1989; Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1994). An der Ausprägung des Down-Syndroms könnten verschiedene Gene innerhalb der Region D21S17 bis ETS2 beteiligt sein. Für das Gen CBR1 (carbonyl reductase 1) wurde ein Gen-Dosis Effekt nachgewiesen der in der Pathologie des Down-Syndroms involviert sein könnte. CBR1 ist eine monomere NADPH-abhängige Oxidoreduktase, die eine Spezifität für Carbonyl Komponenten aufweist. Mit der vermehrten Anzahl von Chromosom 21 kommt es in Lymphoblasten zu einer Zunahme der aldo-keto-Reduktase Aktivität und einer Zunahme der Chinon-Reduktase Aktivität (Gonzalez et al., 1995; Lemieux et al., 1993).

Charakteristische kraniofazialen Merkmale und skeletalen Anomalien des Down-Syndroms könnten auf ein überexprimiertes Gen ETS2 (V-ETS avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2) zurückzuführen sein. ETS2 ist ein Proto-Onkogen und Transkriptionsfaktor. Während der Mausentwicklung wird es in neu entwickelndem Knorpel, in Vorläuferzellen der Schädel- und Wirbelentwicklung hoch exprimiert (Maroulakou et al., 1994). Transgene Mäuse, die ETS2 überexprimierten, entwickelten Veränderungen des Gehirnschädel, Gesichtschädel und des Halsskeletts (Sumarsono et al., 1996).

Mit dem Gen SIM2, einem Homolog zu dem *Drosophila* single-minded Gen, befindet sich ein weiterer Transkriptionsfaktor in der DSCR. Sim2 hat einen großen Einfluss in der Entwicklung des Nervensystems von Fliegen, und ist ein Kandidat für verschiedene dysmorphe Charakteristika (Gesicht und Schädel), abnorme Gehirnentwicklung und mentale Retardierung im Down-Syndrom (Chen et al., 1995; Dahmane et al., 1995; Muenke et al., 1995). Des weiteren befindet sich das Gen DYRK1A (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) in der DSCR, dieses ist homolog zu dem *Drosophila* minibrain (mnb) und dem Ratten Dyrk Gen. Das Gen könnte aufgrund der beobachteten Expressionsmuster an der abnormalen Neurogenese des Down-Syndroms beteiligt sein. Durch Versuche mit transgenen Mäuse wurde vermutet, dass mentale Retardierung und Lernbehinderungen beim Down-Syndrom mit DYRK1A assoziiert sein könnten. DYRK1A ist außerdem ein guter Kandidat, der einige pleiotrope Effekte vermitteln könnte (Altafaj et al., 2001; Chen and Antonarakis, 1997; Guimera et al., 1999; Smith et al., 1997; Song et al., 1997).

Die Wirkung einer dreifachen Dosis des Chromosoms 21 könnte ein Ungleichgewicht in der Genexpression verursachen. Dieses Ungleichgewicht könnte einen transaktivierenden Effekt ausüben, der sich in der geminderten Genexpression anderer Gene im Genom auswirken könnte (Birchler et al., 2001).

Im Fall von CMI wurde die Region D21S17 bis ETS2 durch die Hybridisierung mit YAC 925e1 und 893d4 und den BACs 09381C/ 10337F und 01357L vollständig erfasst. Die BACs 09381C/10337F und 01357L befinden sich in der Genregion von DYRK1A, das zu der mentalen Retardierung beim Down-Syndrom beitragen könnte. Diese FISH-Sonden der DSCR ließen nur Signale auf den normalen Chromosomen 21 bei CMI erkennen und schlossen somit eine Trisomie für diesen Bereich aus. Somit wurde bestätigt, dass dieser distale Anteil des Chromosom 21 mit der DSCR bei der Patientin CMI auf dem derivativen Chromosom 21 nicht vorhanden war. Damit wäre auch der mild Phänotyp der Patientin zu erklären.

Noch erwähnt werden sollte, dass es trotz der guten Korrelation zwischen einigen Genotypen und Phänotypen nicht eine einzige Region gibt, die ausschließlich für die Ausprägung der Merkmale des Down-Syndroms verantwortlich ist (Korenberg et al., 1994). Schließlich können Gene auch außerhalb der DSCR für die Merkmalsausbildung von fazialen Veränderungen, Mikrozephalie, Minderwuchs, Hypotonie, veränderte Dermatoglyphen und mentale Retardierung verantwortlich sein. Denn nach den Korrelationen von Delabar et al. (1993) hätte die Region von SOD1 bis CRYA1 in dreifacher Kopie vorliegen sollen, um drei der Merkmale von CMI auszubilden.

5.7 Molekular zytogenetische Analysen der Patienten JP und SR mit einer partiellen Monosomie 21

Die Patientin JP zeigte eine zytogenetisch sichtbare Deletion (21q22.2-qter) und einen besonders milden Phänotyp, und war somit als untypisch einzuordnen. Die Deletionsregion und der Deletionsbruchpunkt wurden mittels FISH-Analysen charakterisiert. Der Deletionsbruchpunkt in 21q22 wurde im ersten Schritt mit regionspezifischen YAC- und BAC-Klonen charakterisiert und anschließend mit single-copy Proben auf wenige kb eingengt. Die durchgeführten molekular zytogenetischen Analysen zeigten, dass der Deletionsbruchpunkt innerhalb eines 5,2 kb großen Intervalls im Gen ETS2 zwischen dem Exon 5 und Exon 8 kartiert. Die Deletion erstreckt sich somit vom proximalen Teil der Bande 21q22.2 über die gesamte Bande 21q22.3 bis zum Telomer und hat eine Größe von etwa 7,5 Mb. Durch die verwendeten FISH-Sonden und das Whole Chromosome 21 Paint (WCP21) wurden kryptische Translokationen von Chromosom 21 Material auf andere Chromosomen ausgeschlossen.

Eine weitere partielle Monosomie, Patient SR, mit einer großen zytogenetisch sichtbaren Deletion, die sich mit der Deletion von JP zytogenetisch überlappt, wurde ebenfalls molekular zytogenetisch charakterisiert. Darüber hinaus wurden Genotyp und Phänotyp Korrelationen der beiden Fälle und Vergleiche zu anderen in der Literatur beschriebenen partiellen Monosomien erstellt.

Der Patient SR zeigte in der zytogenetischen Analyse eine Deletion und der Karyotyp ließ sich mit 46,XY,del(21)(q22.1~2-qter) bestimmen. In der FISH-Analyse von SR zeigte der BAC 1151N9, der bei JP den Bruchpunkt überspannt, Signale auf dem normalen und dem derivativen Chromosom, und kartierte bei SR somit proximal zum Bruchpunkt. Mittels eines weiteren FISH-Sondenkollektivs konnte gezeigt werden, dass der Deletionsbruchpunkt

zwischen BAC 28F9 (D21S159) und YAC 821h8 (D21S346-D21S1893) lokalisiert ist. Somit wurde gezeigt, dass die Deletionsbruchpunkte der beiden partiellen Monosomien sich nicht überlappen, sondern heterogen sind. Der Deletionsbruchpunkt von SR kartiert überraschenderweise 300 kb distal zu dem Bruchpunkt von JP. Anhand der Position des BAC-Endes von 28F9 und dem proximalen Marker D21S346 von YAC 821h8 wurde das proximale Bruchpunktintervall mit ca. 410 kb bestimmt. Außerdem zeigten die FISH-Analysen, dass bei SR in der subtelomerischen Region von 21q weitere Sequenzen vorhanden sind. Der distale Bruchpunkt ist in 21q22.3 in einer 2,5 Mb großen Region zwischen dem BAC 20303J und der Telomersonde (Vysis) lokalisiert. Es handelt sich demnach um eine interstitielle Deletion mit $\text{del}(21)(\text{q}22.2\text{-q}22.3)$ mit einer Größe von 5 bis 7,5 Mb. Die Chromosomenanalysen der Eltern waren unauffällig und somit handelte es sich bei beiden um eine *de novo* entstandene reine partielle Monosomie 21.

5.7.1 Vergleiche der partiellen Monosomien 21 von JP und SR mit anderen Fällen

Um die ungewöhnlich milden Phänotypen der hier charakterisierten partiellen Monosomien 21 (JP und SR) zu erklären sind im weiteren Genotyp Phänotyp Korrelationen durch Vergleiche mit anderen in der Literatur beschriebenen partiellen Monosomien 21 ausgearbeitet. Partielle Monosomien des Chromosom 21, die aus Translokationen (Huret et al., 1995; Chettouh et al., 1995), Ringchromosomen (McGinniss et al., 1992), aus reinen partiellen Monosomien (Yamamoto et al., 1979; Theodoropoulos et al., 1995) oder auch aus Robertsonsche Translokationen (Laurent et al., 1973; Rethoré et al., 1973) resultieren, sind in der Ausprägung des '21q- Phänotyps', in Abhängigkeit von den deletierten Regionen, sehr variabel.

Um eine minimale Genregionen aufzuklären, die für die Pathogenese verschiedener Merkmale verantwortlich ist, ist es möglich von Patienten mit partiellen Monosomien 21 eine Genotyp-Phänotyp Korrelationen zu erstellen (Epstein, 1990). In Abhängigkeit von der Größe und Lage einer partiellen Deletion wurden verschiedene phänotypische Varianten in einer partiellen Monosomie 21 beobachtet. Fälle von Patienten mit Ringchromosomen 21, die kleinere oder ähnlich großen Deletionen wie JP/SR aufwiesen wurden von McGinniss et al. (1992) dokumentiert. Bei den Betroffenen wurden unterschiedliche Ausprägungen im Phänotyp aufgezeigt (Tabelle 5-2). Es wurden sieben klinisch normale Personen beschrieben, in deren Familien ein Ringchromosom 21 ($\text{r}(21)$) vererbt worden war. Diese wiesen Deletionen der Marker D21S112, COL6A1 und S100B auf und bei allen war der D21S42 vorhanden.

Tabelle 5-2 Phänotypische Merkmale JP, SR und Patienten 6-8 (McGinniss et al., 1992) und CGM-14 (Valero et al., 1999)

	Gesamt	Augen	Ohren	Nase	Mund	Extremitäten
JP	motorisch verzögert, leichte sprachliche Retardierung, leicht mental retardiert (MR) (IQ 73), Absenzen ab 7 Jahren, schlanker kleiner Körper, dreieckiges Gesicht, breite hohe Stirn	Hypertelorismus, Kurzsichtigkeit, nach unten gerichtete Lidspalten	tiefangesetzte Ohren, li. Gehörgangatresie, beids. Ohranhängsel, re. schwerhörig,		schmale Lippen, Zahnfehlstellungen, schmales Kinn	schmale Finger, Klinodaktylie II., beids. Phalangen I. + II. verkürzt, proximal ansetzende Daumen
SR	mäßig MR, Absenzen ab 7 Jahren, deutliche sprachliche Retardierung, schlanker kleiner Körper, großer Hirnschädel, dreieckiges Gesicht, breite hohe Stirn, Aortenisthmusstenose (operiert)	nach unten gerichtete Lidspalten	große Ohren, tiefangesetzte Ohren	eingesunkene Nasenwurzel, kleine Nase, gerader Nasenrücken	schmale Lippen, großer Mund Mikrogenie, kurzes Philtrum, prominentes Kinn	Kleinkindalter: Hypertonie untere Extremitäten u. Rumpfhypotonie, schmale Finger, Überstreckbarkeit d. Gelenke
6	mild MR, Mikrozephalie, kurzer Hals					
7	MR, Gesicht asymmetrisch	beids. Epikanthus-Falten, Strabismus, nach unten gerichtete Lidspalten	rechtes Ohr nach posterior gedreht	flache, schmale Nase		
8	MR, Mikrozephalie, Gesicht asymmetrisch	Hypertelorismus, Epikanthus-Falten	kleinen Ohren, beids. Ohranhängsel, Atresie des externen Gehörgangs		Makrosfoma, Mikrognathie	Agenesie FingerV
CGM14	Hypoplasie, EEG Anomalien, subkortikale Atrophie des Gehirns					

Für die vier voneinander unabhängige Fälle (Patienten 6-9) mit einem Ringchromosom, wurden Phänotypen beschrieben, deren Ausprägung von wenig dysmorph bzw. geringfügig mental retardiert bis stark dysmorph und moderat mental retardiert variierten (McGinniss et al., 1992). Die Patienten 6, 7 und 8 wiesen im Vergleich zu JP/SR kleinere Deletionen auf und Patient 9 zeigte eine größere Deletion. Ein weiterer beschriebener Patient war CGM-14, der auch ein Ringchromosom aufwies und dessen deletierte Region kleiner als die von JP/SR war (Valero et al., 1999) (Abbildung 5-5).

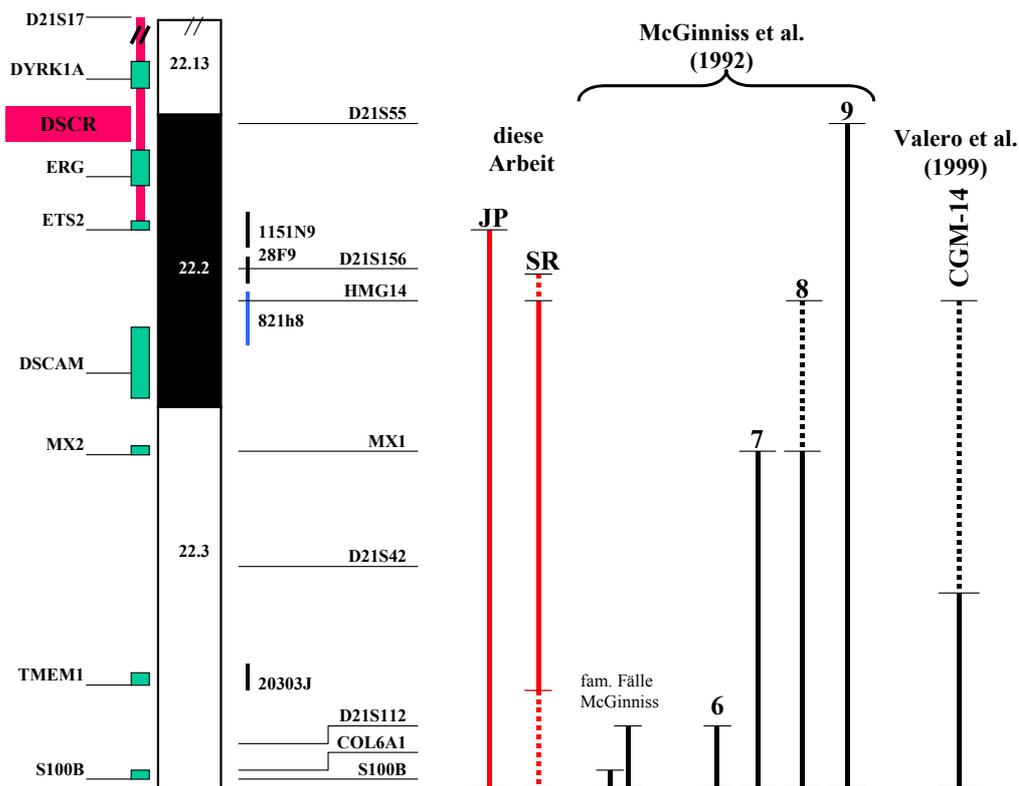


Abbildung 5-5 Deletionsgrößen von JP/SR im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Fällen mit Ringchromosom 21

In der linken Hälfte ist ein Ausschnitt eines Chromosom 21 Idiogramms mit ausgewählten Genen (grün) und der DSCR (rot) zwischen den begrenzenden Markern D21S17 und ETS2 dargestellt. Rechts von dem Idiogramm ist das BAC 1151N9 eingezeichnet, der das Bruchpunktintervall von JP überspannt und distal zu diesem sind BAC 28F9 und YAC 821h8 dargestellt, die das proximale Bruchpunktintervall von SR umschließen. BAC 20303J kartiert innerhalb der distalen deletierten Region von SR. Die Deletionen der Patienten mit Ringchromosom von McGinniss et al. (1992) und Valero et al. (1999) sind auch durch Balken dargestellt.

Bei allen beschriebenen Patienten wurden mentale Retardierungen vorgefunden. Es fällt auf, dass nur bei JP/SR Absenzen beschrieben wurden, wieweit die EEG Anomalien von CGM-14 mit den epileptischen Anfällen der Patienten JP und SR korrelieren ist nicht zu erkennen. Die

nach unten gerichtete Lidspalten wurden für JP/SR und auch Patient 7 beschrieben, dessen Deletion MX1-S100B umfasst. Allerdings tritt dieses Merkmal nicht nur mit Deletionen dieser Genregion auf, sondern konnte auch bei einem Patienten mit einer Deletion in 21q11.2-q21.2 beschrieben werden. Dieser Patient wies wenige Dysmorphiezeichen und eine normale Intelligenz auf (Korenberg et al., 1991a).

Die aufgetretenen Fehlbildungen, wie die Gesichtasymmetrie, Makrostoma, kleine Ohren und Ohranhängsel konnten auch von McGinniss et al. (1992) bei Patienten 7 und 8 beschrieben werden. Diese Fehlbildungen könnten auf Entwicklungsstörungen der Kiemenbögen zurückgeführt werden. Die dafür infrage kommenden Gene sind möglicherweise zwischen HMG14 und D21S112 lokalisiert (Bartsch et al., 1994). Sollte von Genen dieser Region nur das rezessive Allel nach einer Deletion vorliegen, so wäre es möglich, dass dieses Allel allein zur Ausprägung kommt. Durch ein verändertes Expressionslevel der einen Genkopie, im Gegensatz zur normalen doppelten Genkopie, könnte Einfluss auf die unterschiedlichen Entwicklungsstadien genommen werden (Valero et al., 1999). Da die Patientin JP auch einige Anzeichen der Gesichtasymmetrie und Veränderungen der Ohren aufweist, könnten diese Anzeichen, wie beschrieben, mit dem oben genannten in Verbindung gebracht werden. Auf der anderen Seite wurden diese Merkmale nicht bei S.P. beobachtet. Eventuell ist die Deletion von S.P. kleiner und das Gen wird nicht deletiert.

In der Deletionsregion befinden sich einige Gene, durch deren Verlust eventuell ein Bezug zu den phänotypischen Ausprägungen der beschriebenen Fälle hergestellt werden könnte. Die Gene WRB und SH3BGR dieser Region werden im erwachsenen Herzen, Gehirn und im Skelettmuskel exprimiert, sie könnten an der Ausprägung der Phänotypen mitwirken. Für das HMG14 (High mobility group protein 14) wurde eine 1,5 fach höhere Dosis in Embryonen von Trisomie 16 Mäusen festgestellt. Es wurde angenommen, dass HMG14 als ein an Nukleosomen bindendes Protein eine Rolle in der Entwicklung von Down-Syndrom spielt, in dem HMG14 eine bestimmte Funktion an transkriptionell aktiven Genen innerhalb der Chromatinstruktur einnimmt (Pash et al., 1990).

In der deletierten Region befindet sich das Gen DSCAM (Down-Syndrome cell adhesion molecule), das in dem sich entwickelndem Nervensystem hoch exprimiert wird und eventuell für einen Teil der mentalen Retardierungen und viszerale Anomalien im Down-Syndrom verantwortlich ist (Yamakawa et al., 1998). Weiterhin konnte es als Kandidat für ein Spektrum von Herzerkrankungen des Down-Syndroms (Down-Syndrome-congenital heart

disease, DS-CHD) identifiziert werden, da es in der Entwicklung des Herzen hoch exprimiert wird (Barlow et al., 2001). Es kann nur spekuliert werden, inwieweit die Entwicklung durch eine Deletion dieses Gens betroffen ist. Inwieweit die Aortenisthmusstenose von SR durch das Fehlen von DSCAM korreliert, ist nicht zu klären, zumal Patientin JP bei der gleichen Deletion keinen Herzfehler aufwies. Möglich wäre in dem Fall, dass unbekannte genetische oder epigenetische Faktoren an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt wären (Valero et al., 1999). In jedem Fall könnte ein vollständig deletiertes Gen DSCAM mit dem BAC 03384B nachgewiesen werden, und wäre als diagnostische FISH-Sonde für diesen Bereich gut geeignet.

Bei SR handelt es sich um eine interstitielle Deletion, deren mögliche distale Grenze der durch den BAC 20303J mit dem genomischer Sequenz von TMEM1 (Transmembrane protein-1, TMEM1) markiert wurde (Nagamine et al., 1997). Dieses BAC befindet sich ca. 205 kb distal von CSTB (cystain B), das mutiert eine progressive Myoklonusepilepsie (epilepsy, progressive myoclonus 1, EMP1) verursachen kann. Das sog. Unverricht-Lundborg-Syndrom ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung in deren Verlauf zwischen dem 6. und 15. Lebensjahr Epilepsie auftritt (Pennacchio et al., 1996). Sollte bei JP und SR ein rezessives Allel mit einer Mutation vorliegen, so wäre es möglich, dass dieses Allel für die beobachteten epileptischen Anfälle infrage käme.

Neben den beschriebenen Deletionen im Telomerbereich von JP und SR und der geringen Beteiligung an der Ausprägung des Monosomie 21 Phänotyps ist auch der Bereich 21q11.2-q21.3 nur gering an phänotypischen Merkmalen der Monosomie 21 involviert (Huret et al., 1995). Eine interstitielle Deletion von D21S16 bis D21S54 mit dem Karyotyp 46,XY,del(21)(q11-q21.2) war verbunden mit normaler Intelligenz und einem fast normalen Aussehen (Korenberg et al., 1991a; 1991b) oder auch Valero et al. (1999) SPG 46,XY,del(21)(q11q21) (Abbildung 5-6).

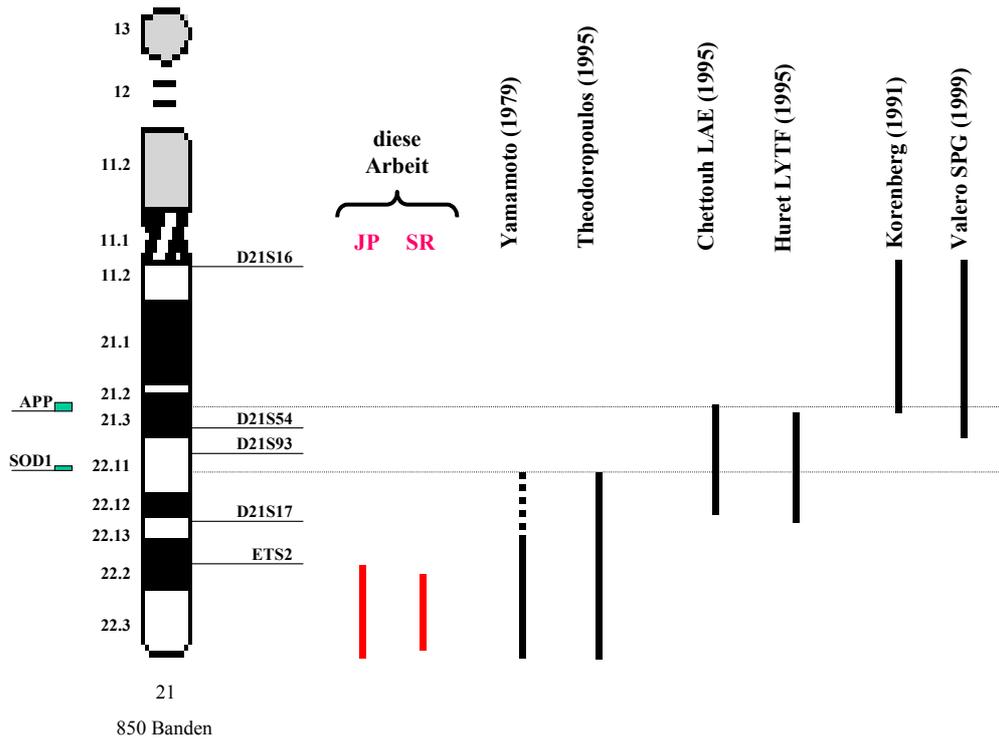


Abbildung 5-6 Übersicht der deletierten Bereiche von JP/SR und ausgewählte Fälle, die kein Ringchromosom 21 aufwiesen

Am Idiogramm sind die beiden Gene APP und SOD1 eingezeichnet, die eine Region flankieren, die mit zehn Merkmalen des Monosomie 21 Phänotyps korreliert wurde. Die deletierten Bereiche werden durch Balken dargestellt. Neben JP/SR mit milden Phänotypen finden sich die Fälle von Yamamoto et al. (1979; 46,XX,del(21)(q22.1 oder q22.2.-qter)) und Theodoropoulos et al. (1995; 46,XX,del(21)(q22)), deren Deletionen SOD1 nicht einschließen und die Patienten schwere mentale Retardierungen zeigten. Patienten mit interstitielle Deletionen, die große Bereiche zwischen SOD1 und APP umschließen und Merkmale des Monosomie 21 Phänotyps aufweisen wurden von Chettouh et al. (1995) Patient LAE 46,XX,-21,+del(21)(q11.2-q22.2) und von Huret et al. (1995) Patient LYFT 46,XX,del(21)(21q21.3-q22.12) beschrieben. Proximale interstitielle Deletionen mit wenigen Dysmorphiezeichen wurden von Korenberg et al. (1991) 46,XY,del(21)(q11-q21.2) und Valero et al. (1999) SPG 46,XY,del(21)(q11q21) beschrieben.

Proximal zu ETS2 aber nicht SOD1 einschließend finden sich partielle Deletionen, die von Yamamoto et al. (1979) und Theodoropoulos et al. (1995) beschrieben wurden. Bei diesen wurden die Karyotypen 46,XX,del(21)(q22.1 oder q22.2.-qter) und 46,XX,del(21)(q22) beschrieben. Diese wiesen multiple Fehlbildungen auf wie z.B. schwere mentale und physische Retardierung, Hypertonie und multiple Fehlbildungen wie z.B. Mikrophthalmie, Fehlbildungen des äußeren Ohres und Atrophie und Erschlaffung der Oberlidhaut. Anhand der beschriebenen Patienten mit schweren mentalen Retardierungen und im Vergleich mit JP/SR kann angenommen werden, dass Deletionen proximal zu ETS2 für die schwere mentale Retardierung des '21q- Syndroms' verantwortlich sind (Korenberg et al., 1990; McGinniss et al. 1992). Hier wäre von McGinniss et al. (1992) noch der am schwersten betroffene Patient 9 mit einem Ringchromosom zu erwähnen, dessen Deletion D21S55 bis S100B umfasste

(Abbildung 5-5). Der Marker D21S55 befindet sich ca. 1 Mb proximal zu ETS2, in dessen Genregion der Bruchpunkt von JP lokalisiert ist. Die Region, in der der Bruchpunkt von Patient 9 lokalisiert sein könnte erstreckt sich auf ca. 10 Mb zwischen D21S82 (proximal) und D21S55 (distal). Die auffälligen Merkmale des Patienten 9 waren die ausgeprägte Stirn, breite eingedrückte Nasenwurzel, Lippengaumenspalte, beidseitiger Hörverlust, kongenitaler Herzdefekt, idiopathische Thrombozytopenie und Klumpfuß. Die phänotypischen Anzeichen konnten nicht bei anderen r(21) Patienten beobachtet werden (McGinniss et al. 1992).

Typischere Übereinstimmungen mit den Merkmalen der Monosomie 21 traten bei Fällen mit partiellen Deletionen in 21q21-q22 auf wie z.B. von Chettouh et al. (1995) Patient LAE 46,XX,-21,+del(21)(q11.2-q22.2) und von Huret et al. (1995) Patient LYFT 46,XX,del(21)(21q21.3-q22.12). Diese zeigten demzufolge Deletionen in der Region APP-SOD1, die mit zehn von fünfundzwanzig Monosomie 21 Merkmalen signifikant korreliert wurde. Dieser Region wurden sechs faziale Anomalien, Symptome ähnlich der Gelenkversteifung (Arthrogryposis), Vierfingerfurche, Hypertonie und mentale Retardierung zugeschrieben. Zu den fazialen Besonderheiten gehören ein Kurzer Hals, tiefe Haarlinie, große Nase, Hypertelorismus, große Ohren und eine hoch gewölbter Gaumen (Chettouh et al., 1995).

Die umfassenden FISH-Analysen konnten den Deletionsbruchpunkt von JP aufklären und im Vergleich mit der ähnlich großen Deletion des Patienten SR und den anderen beschriebenen Fällen mit partieller Monosomie 21 läßt sich bestätigen, dass partielle Monosomien 21, wie von Huret et al. (1995) beschreiben, eine heterogene Gruppe bilden. Die Definition von Subregionen, die für verschiedene phänotypischen Merkmale entscheidend wären, scheint mit einigen Schwierigkeiten verbunden zu sein. Zum einen sind die Bruchpunkte in vielen Fällen nicht präzise kartiert und zum anderen wäre die Anzahl gut charakterisierter Fälle zu klein. Mit den in dieser Arbeit charakterisierten Fällen JP/SR ist anzunehmen, dass der Bereich distal zu ETS2 mit milden phänotypischen Ausprägungen assoziiert ist.

5.8 Haplotypen Analysen der partiellen Trisomie 21 (CMI) und der partiellen Monosomien 21 (JP)

Die chromosomalen Veränderungen der partiellen Trisomie als auch Monosomie 21 konnten mit der FISH-Methode bestimmt werden. Zusätzlich wurden für CMI und JP Haplotypen Analysen an DNA aus Blutlymphozyten durchgeführt. Dafür wurden polymorphe STR (short tandem repeats) bzw. Mikrosatellitenmarker verwendet, die eine Heterozygotierate von 0,49 bis 0,88 aufwiesen. Die Marker waren sowohl an genetischen Karten (McInnis et al., 1993) als auch an physikalischen Karten (Hattori et al., 2000) angeordnet.

Die Haplotypen Analysen der partiellen Trisomie 21 (CMI) ergaben für die proximalen Marker D21S1437, D21S2052, App und D21S1888 jeweils drei Allele in der Patientin. Die Eltern zeigten jeweils zwei Allele für diese Loci und es konnten je zwei mütterliche Allele und ein väterliches Allel in CMI nachgewiesen werden. Damit wurde die Trisomie dieser Region ergänzend zur FISH-Analyse bestätigt.

Distal zum Translokationsbruchpunkt schlossen sich im Abstand von 50 kb bzw. 550 kb die Marker D21S261 und D21S262 an. Hier konnten eindeutig nur zwei Allele bei CMI nachgewiesen werden. Auch alle weiteren Marker von D21S267 bis zum Telomer (D21S1446) waren bei CMI nur jeweils zwei Allele vorhanden. Außerdem konnte anhand der Allelverteilung festgestellt werden, dass CMI je ein Allel von der Mutter bzw. vom Vater erhalten hatte, und somit auch keine uniparentale Isodisomie vorlag. Wichtig war in diesem Zusammenhang, dass der Marker D21S1440 aus der DSCR auch nur zweimal vorhanden war. Damit konnte neben den FISH-Analysen bestätigt werden, dass kein Teil dieser Region trisom vorlag, und damit an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt war.

Es konnte somit bestätigt werden, dass es sich bei CMI um eine partielle Trisomie 21pter-q22.11 handelt. Mit dieser Methode wurden keine weiteren Veränderungen in Form von Deletionen vorgefunden.

Die Haplotypen Analyse der Patientin JP (partielle Monosomie 21) sollte zum einen die FISH-Ergebnisse bestätigen und zum anderen klären von welchem Elternteil das derivative Chromosom 21 stammte. Nach der FISH-Analyse konnte gezeigt werden, dass der Bruchpunkt in einem Bereich von 5,2 kb zwischen Exon 5 und Exon 8 des ETS2 Gens lokalisierte. Die Allelverteilung von JP wies für den Bereich vom Zentromer bis zu dem Marker D21S180 je ein Allel von der Mutter und eines vom Vater auf. Mit diesem Ergebnis konnte eine uniparentale Isodisomie für den proximalen Bereich ausgeschlossen werden.

Distal zu Exon 8 von ETS2 befinden sich die Marker D21S1956, WI-9128, D21S1843 und D21S1891, die nicht polymorph waren. Mit Vergleichen, zwischen den Signalintensitäten der Banden auf den Gelbildern, konnten Unterschiede in den Intensitäten festgestellt werden. Die Abschätzung für WI-9128 und D21S1891 konnte nicht ganz eindeutig eine geminderte Signalintensität zwischen der Bande von JP und den Eltern nachweisen. Allerdings waren die reproduzierbaren Ergebnisse für die Marker D21S1956 und D21S1843 eindeutig in der Signalintensität gemindert. Dieses Ergebnis bestätigte die Deletion der Bereiche distal zu Exon 8 von ETS2. Die Marker D21S268 bis D21S1446 befanden sich distal zu dem Deletionsbruchpunkt und mit den PCR-Ergebnissen konnte in JP nur noch ein mütterliches

Allel detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass das väterliche Chromosom 21 verändert ist. Beide Eltern wiesen sowohl einen normalen Karyotyp und normale Ergebnisse in der FISH-Analyse auf als auch keine Veränderungen bei der Beurteilung der Haplotypen. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei JP um eine *de novo* entstandene reine partielle Monosomie 21 handelt.

Für den Patienten SR standen keine Proben für molekulargenetische Analysen zur Verfügung. Hinweise auf eine *de novo* entstandene partielle Monosomie 21 wurden anhand der normalen Karyogramme der Eltern ermittelt (lagen mir nicht vor, pers. Mitteilung Dr. Prager).

Der milde Phänotyp der Patienten könnten aus einer kryptischen Translokation spezifischer DNA-Fragmente auf andere Chromosomen herrühren. Mit den FISH-Analysen verschiedener YAC-/BAC-Klone und einem Whole Chromosome Paint wurden allerdings keine Translokation von Chromosom 21 Segmenten auf ein anderes Chromosom nachgewiesen. Auf der anderen Seite können kleine Inversionen oder Insertionen nicht komplett ausgeschlossen werden. Eine weitere mögliche Erklärung für das Vorhandensein eines milden Phänotyps bei den hier vorgefundenen großen zytophysikalisch sichtbaren Deletionen könnte die Anwesenheit eines somatischen Mosaiks sein. Da hier als Untersuchungsmaterial nur peripheres Blut zur Verfügung stand, war es nicht möglich die partielle Monosomie in anderen Geweben nachzuweisen. Zum einen könnte ein sehr schwaches Mosaik in Blutzellen vorliegen, mit einigen wenigen unerkannten Zellen mit einem normalen Karyotyp, neben einem hohen Anteil an Zellen mit dem aberranten Karyotyp. Außerdem könnte ein Gewebsmosaik vorliegen, bei dem Zellen mit einem normalen Karyotyp in einem Gewebe z.B. Gewebsfibroblasten auftreten. Demnach wäre es möglich, dass nur in den Lymphozyten der veränderte Karyotyp mit dem der(21) präferentiell vorhanden wäre, und in den Hautfibroblasten ein Mosaik mit einem hohen Anteil 46,XX und einem sehr geringen Anteil 46,XX,del(21)(q22.2-qter) bestünde. Möglicherweise wäre in den Zellen der Hautfibroblasten postzygotisch während der Mitose das normale Chromosom dupliziert worden und das veränderte Chromosom 21 wäre verloren gegangen (kompensatorische Isodisomie). Bisher wurde in der Literatur diese Möglichkeit nicht beschrieben, sondern vielmehr einige Fälle mit einem aberranten Karyotyp, der in Blutzellen nach der Geburt vorgefunden wurde, und im späteren Verlauf einen vorwiegend normalen Karyotyp in den Blutzellen vorlag (Petersen et al., 1992, Bartsch et al., 1994). Der Chromosomensatz mit der Isodisomie brachte einen Selektionsvorteil und durch die hohe Proliferationsrate konnte dieser Chromosomensatz sich in

den Blutzellen durchsetzen. Im Gegensatz dazu wiesen die Fibroblasten dieser Patienten jeweils den veränderten Karyotyp auf.

5.9 Schlußbemerkungen

Abschließend ist festzustellen, dass die von mir etablierten BACs in der Analyse von strukturellen und numerischen Aberrationen der Chromosomen 13, 21 und 22 für Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen geeignet sind. Die BACs besitzen eine durchschnittliche Insertgröße von 150 kb und zudem war die enthaltene genomische DNA nicht chimär, was sich in Testhybridisierungen an normalen Chromosomen zeigte. Die BACs wiesen nur distinkte Signale auf den entsprechenden Chromosomen auf, was gegen einen Chimärismus des genomischen Inserts spricht. Es gelang die BACs innerhalb der '13q- Syndrom' Region, der Down-Syndrom kritischen Region und der Region für angeborene Herzkrankheiten im Down-Syndrom und in dem Bereich von Chromosom 22q11 in der DiGeorge-/Velokardiofaziales-Syndrom Deletionsregion zu positionieren. Gleichzeitig ist es möglich mit den gesamten BACs von Chromosomen 13 und 21 Aneuploidien dieser Chromosomen zu bestimmen. Die BACs waren in der FISH als Einzelsonden oder als Sondencocktail einzusetzen, in jedem Fall wurden distinkte FISH-Signale an Metaphasechromosomen und in Interphasekernen sichtbar. Es war außerdem möglich Mikrodeletionen des Chromosom 22q11 an Patientenmaterial zuverlässig zu detektieren. Außerdem gelang die Aufklärung einer partiellen Trisomie 21 und in zwei Fällen von partieller Monosomie 21 wurden die chromosomalen Bruchpunkte mit der FISH bestimmt. Zudem wurden mit Mikrosatellitenmarkern die Allelverteilungen und somit auch die Herkunft der derivativen Chromosomen bestimmt, und mit Einzelkopie FISH-Sonden wurde der Deletionsbruchpunkt einer partiellen Monosomie 21 bis auf 5,2 kb eingegrenzt.

6 Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier, F. M., Goodeve, A. C., Wilson, G. A., Gari, M. A., Peake, I. R., Rees, D. C., Vandenberghe, E. A., Winship, P. R., and Reilly, J. T. (2000). FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* **111**, 190-5.
- Adinolfi, M., and Crolla, J. (1994). Nonisotopic in situ hybridization. Clinical cytogenetics and gene mapping applications. *Adv Hum Genet* **22**, 187-255.
- Albertsen, H. M., Abderrahim, H., Cann, H. M., Dausset, J., Le Paslier, D., and Cohen, D. (1990). Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4256-60.
- Allderdice, P. W., Davis, J. G., Miller, O. J., Klinger, H. P., Warburton, D., Miller, D. A., Allen, F. H., Jr., Abrams, C. A., and McGilvray, E. (1969). The 13q-deletion syndrome. *Am J Hum Genet* **21**, 499-512.
- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Marti, E., Visa, J., Guimera, J., Oset, M., Gonzalez, J. R., Florez, J., Fillat, C., and Estivill, X. (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* **10**, 1915-23.
- Andreasen, N. C. (1995). Symptoms, signs and diagnosis of schizophrenia. *Lancet* **346**, 477-481.
- Antonarakis, S. E. (1991). Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N Engl J Med* **324**, 872-6.
- Antonarakis, S. E., Adelsberger, P.A., Petersen, M.B., Binkert, F., Schinzel, A.A. (1990). analysis of DNA polymorphism suggests that most de novo dup(21q) chromosomes in patients with Down syndrome are isochromosomes and not translocations. *Am J Hum Genet* **47**, 968-972.
- Antonarakis, S. E., Petersen, M. B., McInnis, M. G., Adelsberger, P. A., Schinzel, A. A., Binkert, F., Pangalos, C., Raoul, O., Slaugenhaupt, S. A., Hafez, M., and et al. (1992). The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* **50**, 544-50.
- Archidiacono, N., Antonacci, R., Marzella, R., Finelli, P., Lonoce, A., and Rocchi, M. (1995). Comparative mapping of human alphoid sequences in great apes using fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **25**, 477-84.
- Barlow, G. M., Chen, X. N., Shi, Z. Y., Lyons, G. E., Kurnit, D. M., Celle, L., Spinner, N. B., Zackai, E., Pettenati, M. J., Van Riper, A. J., Vekemans, M. J., Mjaatvedt, C. H., and Korenberg, J. R. (2001). Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet Med* **3**, 91-101.

- Bartsch, O., Petersen, M. B., Stuhlmann, I., Mau, G., Frantzen, M., Schwinger, E., Antonarakis, S. E., and Mikkelsen, M. (1994). "Compensatory" uniparental disomy of chromosome 21 in two cases. *J Med Genet* **31**, 534-40.
- 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**, 485-90.
- Baumer, A., Dutly, F., Balmer, D., Riegel, M., Tukel, T., Krajewska-Walasek, M., and Schinzel, A. A. (1998). High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11. 2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* **7**, 887-94.
- Birchler, J. A., Bhadra, U., Bhadra, M. P., and Auger, D. L. (2001). Dosage-dependent gene regulation in multicellular eukaryotes: implications for dosage compensation, aneuploid syndromes, and quantitative traits. *Dev Biol* **234**, 275-88.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513.
- Blouin, J. L., Dombroski, B. A., Nath, S. K., Lasseter, V. K., Wolyniec, P. S., Nestadt, G., Thornquist, M., Ullrich, G., McGrath, J., Kasch, L., Lamacz, M., Thomas, M. G., Gehrig, C., Radhakrishna, U., Snyder, S. E., Balk, K. G., Neufeld, K., Swartz, K. L., DeMarchi, N., Papadimitriou, G. N., Dikeos, D. G., Stefanis, C. N., Chakravarti, A., Childs, B., Pulver, A. E., and et al. (1998). Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. *Nat Genet* **20**, 70-3.
- Brown, S., Gersen, S., Anyane-Yeboa, K., and Warburton, D. (1993). Preliminary definition of a "critical region" of chromosome 13 in q32: report of 14 cases with 13q deletions and review of the literature. *Am J Med Genet* **45**, 52-9.
- Brown, S., Russo, J., Chitayat, D., and Warburton, D. (1995). The 13q- syndrome: the molecular definition of a critical deletion region in band 13q32. *Am J Hum Genet* **57**, 859-66.
- Brown, S. A., Warburton, D., Brown, L. Y., Yu, C. Y., Roeder, E. R., Stengel-Rutkowski, S., Hennekam, R. C., and Muenke, M. (1998). Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. *Nat Genet* **20**, 180-3.
- Burke, D. T., Carle, G. F., and Olson, M. V. (1987). Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**, 806-12.
- Burke, D. T., Olson, M.V. (1991). Preparation of clone libraries in yeast artificial-chromosome vectors. In "Methods in Enzymology: Guide to yeast genetics and molecular biology" (C. Guthrie, Fink, G.R., Ed.), Vol. 1, pp. 251-270.
- Burn, J. (1999). Closing time for CATCH22. *J Med Genet* **36**, 737-8.
- Burn, J., Goodship, J. (1996). Congenital heart disease. In "Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics" (D. L. Rimoin, Connor, J.M., Pyeritz, R.E., Ed.), Vol. 1, pp. 767-803. Churchill Livingstone, New York.

- 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**, 822-4.
- Buselmaier, W., Tariverdian, G. (1999). "Humangenetik." Springer, Berlin.
- 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**, 620-9.
- Caspersson, T., Zech, L., and Johansson, C. (1970). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* **60**, 315-9.
- Chen, H., and Antonarakis, S. E. (1997). Localisation of a human homologue of the *Drosophila mnb* and rat *Dyrk* genes to chromosome 21q22.2. *Hum Genet* **99**, 262-5.
- Chen, H., Chrast, R., Rossier, C., Gos, A., Antonarakis, S. E., Kudoh, J., Yamaki, A., Shindoh, N., Maeda, H., Minoshima, S., and et al. (1995). Single-minded and Down syndrome? *Nat Genet* **10**, 9-10.
- Chettouh, Z., Croquette, M. F., Delobel, B., Gilgenkrants, S., Leonard, C., Maunoury, C., Prieur, M., Rethore, M. O., Sinet, P. M., Chery, M., and et al. (1995). Molecular mapping of 21 features associated with partial monosomy 21: involvement of the APP-SOD1 region. *Am J Hum Genet* **57**, 62-71.
- 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**, 267-77.
- Chumakov, I., Rigault, P., Guillou, S., Ougen, P., Billaut, A., Guasconi, G., Gervy, P., LeGall, I., Soularue, P., Grinas, L., and et al. (1992). Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. *Nature* **359**, 380-7.
- Chumakov, I. M., Rigault, P., Le Gall, I., Bellanne-Chantelot, C., Billaut, A., Guillou, S., Soularue, P., Guasconi, G., Poullier, E., Gros, I., and et al. (1995). A YAC contig map of the human genome. *Nature* **377**, 175-297.
- Collins, J., and Hohn, B. (1978). Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage lambda heads. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4242-6.
- 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**, 235-46.
- Cremer, T., Popp, S., Emmerich, P., Lichter, P., and Cremer, C. (1990). Rapid metaphase and interphase detection of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by chromosomal suppression in situ hybridization. *Cytometry* **11**, 110-8.
- Dahmane, N., Charron, G., Lopes, C., Yaspo, M. L., Maunoury, C., Decorte, L., Sinet, P. M., Bloch, B., and Delabar, J. M. (1995). Down syndrome-critical region contains a gene

- homologous to *Drosophila sim* expressed during rat and human central nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9191-5.
- 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**, 458-60.
- De la Chapelle, A., Herva, R., Koivisto, M., and Aula, P. (1981). A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum Genet* **57**, 253-6.
- De la Torre, R., Casado, A., López-Fernández, E., Carrascosa, D., Ramirez, V., Sáez, J. (1996). Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experientia* **52**, 871-873.
- Delabar, J. M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J. L., Prieur, M., Noel, B., and Sinet, P. M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* **1**, 114-24.
- Demczuk, S., Levy, A., Aubry, M., Croquette, M. F., Philip, N., Prieur, M., Sauer, U., Bouvagnet, P., Rouleau, G. A., Thomas, G., and et al. (1995). Excess of deletions of maternal origin in the DiGeorge/velo-cardio-facial syndromes. A study of 22 new patients and review of the literature. *Hum Genet* **96**, 9-13.
- Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J., and Weissenbach, J. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **380**, 152-4.
- DiGeorge, A. M., and Harley, R. D. (1965). The association of aniridia, Wilms's tumor, and genital abnormalities. *Trans Am Ophthalmol Soc* **63**, 64-9.
- Down, J. L. H. (1866). Observation on an ethnic classification of idiots. *Clin Lecture Reports* **3**, 259-262.
- Driscoll, D. A., Spinner, N. B., Budarf, M. L., McDonald-McGinn, D. M., Zackai, E. H., Goldberg, R. B., Shprintzen, R. J., Saal, H. M., Zonana, J., Jones, M. C., and et al. (1992). Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* **44**, 261-8.
- 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**, 1076-86.
- 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**, 1157-67.
- Egeo, A., Mazzocco, M., Arrigo, P., Vidal-Taboada, J. M., Oliva, R., Pirola, B., Giglio, S., Rasore-Quartino, A., and Scartezzini, P. (1998). Identification and characterization of a new human gene encoding a small protein with high homology to the proline-rich region of the SH3BGR gene. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 302-6.

- Eiben, B., Trawicki, W., Hammans, W., Goebel, R., Pruggmayer, M., and Epplen, J. T. (1999). Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation of >3,000 cases. *Fetal Diagn Ther* **14**, 193-7.
- Emanuel, B. S., and Shaikh, T. H. (2001). Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet* **2**, 791-800.
- Epstein, C. J. (1990). The consequences of chromosome imbalance. *Am J Med Genet Suppl* **7**, 31-7.
- Escudero, T., Lee, M., Stevens, J., Sandalinas, M., and Munne, S. (2001). Preimplantation genetic diagnosis of pericentric inversions. *Prenat Diagn* **21**, 760-6.
- Fernecz, C., Loffredo, C.A., Correa-Villasenor, A., Wilson, P.D. (1997). "Perspectives in paediatric cardiology." Armonk, New York.
- Fisher, E., and Scambler, P. (1994). Human haploinsufficiency--one for sorrow, two for joy. *Nat Genet* **7**, 5-7.
- Flint, J., Wilkie, A. O., Buckle, V. J., Winter, R. M., Holland, A. J., and McDermid, H. E. (1995). The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* **9**, 132-40.
- Friend, S. H., Bernardis, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., and Dryja, T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**, 643-6.
- Fung, J., Munne, S., and Weier, H. U. (2001). Detection of chromosome translocation products in single interphase cell nuclei. *Methods Cell Biol* **64**, 97-114.
- 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**, 378-83.
- Giegerich, R., Meyer, F., Schleiermacher, C. (1996). GeneFisher-software support for the detection of postulated genes. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **4**, 68-77.
- Gingerich, J. C., Shadravan, F., Lowry, S.R. (1993). A fluorescence in situ hybridization map of human chromosome 21 consisting of thirty genetic and physical markers on the chromosome: localization of 137 additional YAC and cosmid clones with respect to this map. *Genomics* **17**, 98-105.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., and et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-6.
- Gonzalez, B., Sapra, A., Rivera, H., Kaplan, W.D., Yam, B., Forrest, G.L. (1995). Cloning and expression of the cDNA encoding rabbit liver carbonyl reductase. *Gene* **154**, 297-298.
- 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**, 100-4.
- Grasso, M., Giovannucci, M.L., Pierluigi, M., Tavellini, F., Perroni, L., Dagna-Bricarelli, F. (1989). Isochromosome, not translocation in trisomy 21q21q. *Hum Genet* **84**, 63-65.
- Green, E. D., Riethman, H. C., Dutchik, J. E., and Olson, M. V. (1991). Detection and characterization of chimeric yeast artificial-chromosome clones. *Genomics* **11**, 658-69.
- Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., and Pritchard, M. (1999). Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* **57**, 407-18.
- Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A. M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., and Pritchard, M. A. (1996). A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet* **5**, 1305-10.
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., and Prakash, S. (1994). Human xeroderma pigmentosum group G gene encodes a DNA endonuclease. *Nucleic Acids Res* **22**, 3312-6.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T. D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H. S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D. K., et al. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* **405**, 311-9.
- Hecht, F., Hecht, BK. (1987). Aneuploidie in humans: dimensions, demography and dangers of abnormal numbers of chromosomes. In "Aneuploidy, Part A: incidence and etiology" (B. K. Vig, Dandberg, A.A., Ed.), pp. 9-49. Liss, New York.
- Hook, E. (1982). Epidemiology of Down Syndrome. In "Down Syndrome. Advances in Biomedicine and the Behavioural Sciences" (S. M. Puschel, Rynders, J.E, Ed.), pp. 11. Ware Press, Cambridge.
- Hook, E. B. (1983). Down syndrome rates and relaxed selection at older maternal ages. *Am J Hum Genet* **35**, 1307-13.
- Horowitz, J. M. (1993). Regulation of transcription by the retinoblastoma protein. *Genes Chromosomes Cancer* **6**, 124-31.
- Huret, J. L., Leonard, C., Chery, M., Philippe, C., Schafei-Benaissa, E., Lefaure, G., Labrune, B., and Gilgenkrantz, S. (1995). Monosomy 21q: two cases of del(21q) and review of the literature. *Clin Genet* **48**, 140-7.
- Ioannou, P. A., Amemiya, C. T., Garnes, J., Kroisel, P. M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M. A., and de Jong, P. J. (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet* **6**, 84-9.
- ISCN. (1995). "ISCN 1995: An international system for human cytogenetic nomenclature." Karger, Basel.
- Iwarsson, E., Malmgren, H., Inzunza, J., Ahrlund-Richter, L., Sjoblom, P., Rosenlund, B., Fridstrom, M., Hovatta, O., Nordenskjold, M., and Blennow, E. (2000). Highly

- abnormal cleavage divisions in preimplantation embryos from translocation carriers. *Prenat Diagn* **20**, 1038-47.
- Jackson, J. F., North, E. R., 3rd, and Thomas, J. G. (1976). Clinical diagnosis of Down's syndrome. *Clin Genet* **9**, 483-7.
- Jacobs, P. A., Hassold, T. J., Henry, A., Pettay, D., and Takaesu, N. (1987). Trisomy 13 ascertained in a survey of spontaneous abortions. *J Med Genet* **24**, 721-4.
- 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**, 145-50.
- Jerome, L. A., and Papaioannou, V. E. (2001). DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet* **27**, 286-91.
- John, H. A., Birnstiel, M. L., and Jones, K. W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223**, 582-7.
- John, H. A., Birnstiel, M.L., Jones, K.W. (1969). RNA, DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223**, 582-587.
- Jones, K. L. (1997). "Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation." W.B. Saunders, Philadelphia.
- Jorgensen, A. L., Bostock, C. J., and Bak, A. L. (1987). Homologous subfamilies of human alphoid repetitive DNA on different nucleolus organizing chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1075-9.
- Jorgensen, A. L., Kolvraa, S., Jones, C., and Bak, A. L. (1988). A subfamily of alphoid repetitive DNA shared by the NOR-bearing human chromosomes 14 and 22. *Genomics* **3**, 100-9.
- Kehrer-Sawatzki, H., Haussler, J., Krone, W., Bode, H., Jenne, D. E., Mehnert, K. U., Tummers, U., and Assum, G. (1997). The second case of a t(17;22) in a family with neurofibromatosis type 1: sequence analysis of the breakpoint regions. *Hum Genet* **99**, 237-47.
- Kim, U. J., Birren, B. W., Slepak, T., Mancino, V., Boysen, C., Kang, H. L., Simon, M. I., and Shizuya, H. (1996). Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **34**, 213-8.
- Kim, U. J., Shizuya, H., de Jong, P. J., Birren, B., and Simon, M. I. (1992). Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res* **20**, 1083-5.
- Kinouchi, A. M., K.; Ando, M.; Takao, A. (1976). Facial appearance of patients with conotruncal abnormalities. *Pediat Jpn*, 84.
- Kirby, M. L., and Waldo, K. L. (1995). Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* **77**, 211-5.

- Knight, S. J., and Flint, J. (2000). Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* **37**, 401-9.
- Korenberg, J. R., Chen, X. N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., Disteche, C., and et al. (1994). Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4997-5001.
- Korenberg, J. R., Kalousek, D. K., Anneren, G., Pulst, S. M., Hall, J. G., Epstein, C. J., and Cox, D. R. (1991). Deletion of chromosome 21 and normal intelligence: molecular definition of the lesion. *Hum Genet* **87**, 112-8.
- Korenberg, J. R., Muenke, M. (1990). Partial monosomies of chromosome 21 and mental retardation: molecular definition of the region. *Am J Hum Genet* **47**, A31.
- Korenberg, J. R., Muenke, M. (1991). Partial monosomies of chromosome 21 and mental retardation: molecular definition of three regions. *Cytogenet Cell Genet* **58**, 2030.
- Kouprina, N., Eldarov, M., Moyzis, R., Resnick, M., and Larionov, V. (1994). A model system to assess the integrity of mammalian YACs during transformation and propagation in yeast. *Genomics* **21**, 7-17.
- Kurahashi, H., Shaikh, T. H., Hu, P., Roe, B. A., Emanuel, B. S., and Budarf, M. L. (2000). Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). *Hum Mol Genet* **9**, 1665-70.
- Kurtz, S., Ohlebusch, E., Schleiermacher, C., Stoye, J., and Giegerich, R. (2000). Computation and visualization of degenerate repeats in complete genomes. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **8**, 228-38.
- Lamour, V., Lecluse, Y., Desmaze, C., Spector, M., Bodescot, M., Aurias, A., Osley, M. A., and Lipinski, M. (1995). A human homolog of the *S. cerevisiae* HIR1 and HIR2 transcriptional repressors cloned from the DiGeorge syndrome critical region. *Hum Mol Genet* **4**, 791-9.
- Laurent, C., Dutrillaux, B., Biemont, C.L., Genoud, J., Bethenod, M. (1973). Translocation t(14q-;21q+) chez le père. Trisomie 14 et monosomie 21 partielles chez la fille. *Ann Genet* **16**, 281-284.
- 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**, 928-32.
- Ledbetter, D. H., Ballabio, A. (1995). Molecular cytogenetics of contiguous gene syndromes: mechanisms and consequences of gene dosage imbalance. In "The metabolic and molecular basis of inherited disease" (C. Scriver, Beaudet. A.L., Sly, W.S., Valle, D., Ed.), Vol. 7, pp. 811-839. McGraw-Hill, New York.
- Lejeune, J., Turpin, R., Gautier, M. (1959). Le mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann Génét* **1**, 41-49.
- Lemieux, N., Malfoy, B., Forrest, G.L. (1993). Human carbonyl reductase (CBR) localized to band 21q22.1 by high-resolution fluorescence in situ hybridization displays gene dosage effects in trisomy 21 cells. *Genomics* **15**, 169-172.

- Lengauer, C., Green, E. D., and Cremer, T. (1992). Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics* **13**, 826-8.
- Lethem, R., and Orrell, M. (1997). Antioxidants and dementia. *Lancet* **349**, 1189-90.
- Lichter, J. B., Wu, J., Miller, D., Goodfellow, P. J., and Kidd, K. K. (1992). A high-resolution meiotic mapping panel for the pericentromeric region of chromosome 10. *Genomics* **13**, 607-12.
- Lichter, P., Cremer, T. (1992). Chromosome analysis by non-isotopic in situ hybridization. In "Human Cytogenetics. A practical approach" (D. E. Rooney, Czepulkowski, B.H., Ed.), pp. 157-190. IR: press, Oxford, New York, Tokyo.
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., Ward, D.C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* **80**, 224-234.
- Lichter, 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**, 33-7.
- Lichter, P., Tang, C. J., Call, K., Hermanson, G., Evans, G. A., Housman, D., and Ward, D. C. (1990). High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* **247**, 64-9.
- Lindl, T. (2000). "Zell- und Gewebekultur." Spektrum Akad. Verl., Heidelberg.
- Luke, S., Belogolovikin, V. and Ladoulis, C.T. (1997). Fluorescence in situ hybridization. In "Analytical Morphology: Theory, Applications and Protocols" (J. Gu, Ed.), pp. 139-172. Eaton Publishing Natick, MA.
- 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., and et al. (1991). DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* **66**, 219-32.
- 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**, 736-9.
- Maroulakou, I. G., Papas, T. S., and Green, J. E. (1994). Differential expression of ets-1 and ets-2 proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene* **9**, 1551-65.
- Matsuoka, R. (1994). Confirmation that conotruncal anomaly face syndrome is associated with a deletion within 22q11.2. *Am J Hum Genet* **53**, 285-289.
- McCormick, M. K., Schinzel, A., Petersen, M. B., Stetten, G., Driscoll, D. J., Cantu, E. S., Tranebjaerg, L., Mikkelsen, M., Watkins, P. C., and Antonarakis, S. E. (1989). Molecular genetic approach to the characterization of the "Down syndrome region" of chromosome 21. *Genomics* **5**, 325-31.

- McDermid, H. E., Duncan, A. M., Higgins, M. J., Hamerton, J. L., Rector, E., Brasch, K. R., and White, B. N. (1986). Isolation and characterization of an alpha-satellite repeated sequence from human chromosome 22. *Chromosoma* **94**, 228-34.
- McGinniss, M. J., Kazazian, H. H., Jr., Stetten, G., Petersen, M. B., Boman, H., Engel, E., Greenberg, F., Hertz, J. M., Johnson, A., Laca, Z., and et al. (1992). Mechanisms of ring chromosome formation in 11 cases of human ring chromosome 21. *Am J Hum Genet* **50**, 15-28.
- McInnis, M. G., Chakravarti, A., Blaschak, J., Petersen, M. B., Sharma, V., Avramopoulos, D., Blouin, J. L., Konig, U., Brahe, C., Matisse, T. C., and et al. (1993). A linkage map of human chromosome 21:43 PCR markers at average intervals of 2.5 cM. *Genomics* **16**, 562-71.
- 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**, 619-29.
- Miller, O. J., Therman, E. (2001). "Human chromosomes." Springer, New York.
- Monaco, A. P., and Larin, Z. (1994). YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol* **12**, 280-6.
- Morris, A., Boyd, E., Dhanjal, S., Lowther, G.W., Aitken, D.A., Young, J., et al. (1999). Two years' prospective experience using fluorescence in situ hybridization on uncultured amniotic fluid cells for rapid prenatal diagnosis of common chromosomal aneuploidies. *Prenat Diagn* **19**, 546-551.
- Morrow, B., Goldberg, R., Carlson, C., Das Gupta, R., Sirotkin, H., Collins, J., Dunham, I., O'Donnell, H., Scambler, P., Shprintzen, R., and et al. (1995). Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet* **56**, 1391-403.
- Morton, N. E. (1991). Parameters of the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7474-6.
- Muenke, M., Bone, L. J., Mitchell, H. F., Hart, I., Walton, K., Hall-Johnson, K., Ippel, E. F., Dietz-Band, J., Kvaloy, K., Fan, C. M., and et al. (1995). Physical mapping of the holoprosencephaly critical region in 21q22.3, exclusion of SIM2 as a candidate gene for holoprosencephaly, and mapping of SIM2 to a region of chromosome 21 important for Down syndrome. *Am J Hum Genet* **57**, 1074-9.
- Munne, S., Sandalinas, M., Escudero, T., Fung, J., Gianaroli, L., and Cohen, J. (2000). Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* **73**, 1209-18.
- Murken, J. D. (1996). "Humangenetik." Enke, Stuttgart.
- Nagamine, K., Kudoh, J., Kawasaki, K., Minoshima, S., Asakawa, S., Ito, F., and Shimizu, N. (1997). Genomic organization and complete nucleotide sequence of the TMEM1 gene on human chromosome 21q22.3. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 185-90.

- Nath, J., Tucker, J. D., and Hando, J. C. (1995). Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men. *Chromosoma* **103**, 725-31.
- National, I., of, Mental, Health's, Genetics, Workgroup,. (1999). Report of the National Institute of Mental Health's Genetics Workshop. *Biol Psychiatry* **47**, 200-209.
- Nouspikel, T., and Clarkson, S. G. (1994). Mutations that disable the DNA repair gene XPG in a xeroderma pigmentosum group G patient. *Hum Mol Genet* **3**, 963-7.
- Orbeli, D. J., Lurie, I. W., and Goroshenko, J. L. (1971). The syndrome associated with the partial D-monosomy. Case report and review. *Humangenetik* **13**, 296-308.
- Paine-Saunders, S., Viviano, B. L., and Saunders, S. (1999). GPC6, a novel member of the glypican gene family, encodes a product structurally related to GPC4 and is colocalized with GPC5 on human chromosome 13. *Genomics* **57**, 455-8.
- Pardue, M. L., and Gall, J. G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **64**, 600-4.
- Pash, J., Popescu, N., Matocha, M., Rapoport, S., and Bustin, M. (1990). Chromosomal protein HMG-14 gene maps to the Down syndrome region of human chromosome 21 and is overexpressed in mouse trisomy 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3836-40.
- Patau, K., Smith, D.W., Therman, E. (1960). Multiple congenital anomaly caused by an extra chromosome. *Lancet* **1**, 790-793.
- Pennacchio, L. A., Lehesjoki, A. E., Stone, N. E., Willour, V. L., Virtaneva, K., Miao, J., D'Amato, E., Ramirez, L., Faham, M., Koskiniemi, M., Warrington, J. A., Norio, R., de la Chapelle, A., Cox, D. R., and Myers, R. M. (1996). Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science* **271**, 1731-4.
- Penrose, L. S. (1966a). Human chromosomes, normal and aberrant. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **164**, 311-9.
- Penrose, L. S., Smith, G.F. (1966b). "Downs anomal." Churchill, London.
- Pergament, E., Chen, P. X., Thangavelu, M., and Fiddler, M. (2000). The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* **20**, 215-20.
- Petersen, M. B., Adelsberger, P.A., Schinzel, A.A., Binkert, F. Hinkel, G.K., Antonarakis, S.E. (1991). Down syndrome due to de novo Robertsonian translocation t14;21: DNA polymorphism analysis suggests that the origin of extra 21q is maternal. *Am J Hum Genet* **49**, 529-536.
- Petersen, M. B., Bartsch, O., Adelsberger, P.A., Mikkelsen, M., Schwinger, E., Antonarakis, S.E. (1992). Uniparental isodisomy due to duplication of chromosome 21 occurring in somatic cells monosomic for chromosome 21. *Genomics* **13**, 269-274.
- Pinkel, D., Langedent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., Gray, J. (1988). Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9138-9142.

- Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2934-8.
- Pschyrembel. (1993). "Medizinisches Wörterbuch." Walter de Gruyter, Berlin.
- Rahmani, Z., Blouin, J. L., Creau-Goldberg, N., Watkins, P. C., Mattei, J. F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A., and et al. (1989). Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5958-62.
- Raoul, O., Carpentier, S., Dutrillaux, B., Mallet, R., and Lejeune, J. (1976). [Partial trisomy of chromosome 21 by maternal translocation t(15;21) (q26.2; q21)]. *Ann Genet* **19**, 187-90.
- Rethoré, M. O., Dutrillaux, B., Lejeune, J. (1973). Translocation 46,XX,t(15;21)(q13;q22.1) chez la mère de deux enfants atteints de trisomie 15 et de monosomie 21 partielles. *Ann Genet* **16**, 271-275.
- Rethoré, M. O., Lafourcade, J., Couturier, J., Harpey, J. P., Hamet, M., Engler, R., Alcindor, L. G., and Lejeune, J. (1982). [Increased activity of adenine phosphoribosyl transferase in a child trisomic for 16q22.2 to 16qter due to malsegregation of a t(16;21) (q22.2;q22;2)pat (author's transl)]. *Ann Genet* **25**, 36-42.
- Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* **113**, 237-51.
- 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 et al. (1993). Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* **5**, 189-94.
- Roberts, C., Daw, S. C., Halford, S., and Scambler, P. J. (1997). Cloning and developmental expression analysis of chick Hira (Chira), a candidate gene for DiGeorge syndrome. *Hum Mol Genet* **6**, 237-45.
- Rocchi, M., Baldini, A., Archidiacono, N., Lainwala, S., Miller, O. J., and Miller, D. A. (1990). Chromosome-specific subsets of human alphoid DNA identified by a chromosome 2-derived clone. *Genomics* **8**, 705-9.
- Rogan, P. K., Cazcarro, P. M., and Knoll, J. H. (2001). Sequence-based design of single-copy genomic DNA probes for fluorescence in situ hybridization. *Genome Res* **11**, 1086-94.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., and et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62.
- Rosnet, O., Mattei, M. G., Marchetto, S., and Birnbaum, D. (1991). Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics* **9**, 380-5.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). "Molecular cloning : a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Savary, J. B., Vasseur, F., Manouvrier, S., et al. (1991). Trisomy 16q23-qter arising from a maternal t(13;16)(p12;q23): case report and evidence of the reciprocal balanced maternal rearrangement by the Ag-NOR technique. *Hum Genet* **88**, 115-118.
- Scartezzini, P., Egeo, A., Colella, S., Fumagalli, P., Arrigo, P., Nizetic, D., Taramelli, R., and Rasore-Quartino, A. (1997). Cloning a new human gene from chromosome 21q22.3 encoding a glutamic acid-rich protein expressed in heart and skeletal muscle. *Hum Genet* **99**, 387-92.
- Schinzel, A. (1984). Catalogue of unbalanced chromoosome aberrations in man, pp. 681-707. deGryter, Berlin, New York.
- Schlessinger, D., Little, R. D., Freije, D., Abidi, F., Zucchi, I., Porta, G., Pilia, G., Nagaraja, R., Johnson, S. K., Yoon, J. Y., and et al. (1991). Yeast artificial chromosome-based genome mapping: some lessons from Xq24-q28. *Genomics* **11**, 783-93.
- Schwartz, D. C., Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75.
- Shaffer, L. G., Jackson-Cook, C.K., Stasiowski, B.A., Spence, J.E., Brown, J.A. (1992). Parental origin determination in 30 de novo Robertsonian translocations. *Am J Med Genet* **43**, 957-963.
- 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.
- Shimizu, T., Takao, A., Ando, M., Hirayama, A. (1984). Conotruncal face syndrome: its heterogeneity and association with thymus involution. In "Congenital Heart Disease: Causes and Processes" (J. J. Nora, Takao, A., Ed.), pp. 29-41. Futura Publishing, Mount Kisco, New York.
- Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minoshima, S., Shimizu, Y., and Shimizu, N. (1996). Cloning of a human homolog of the Drosophila minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 92-9.
- 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**, 8794-7.

- Sinet, P. M., Couturier, J., Dutrillaux, B., Poissonnier, M., Raoul, O., Rethore, M. O., Allard, D., Lejeune, J., and Jerome, H. (1976). [Trisomy 21 and superoxide dismutase-1 (IPO-A). Tentative localization of sub-band 21Q22.1]. *Exp Cell Res* **97**, 47-55.
- Sirotkin, H., Morrow, B., DasGupta, R., Goldberg, R., Patanjali, S. R., Shi, G., Cannizzaro, L., Shprintzen, R., Weissman, S. M., and Kucherlapati, R. (1996). Isolation of a new clathrin heavy chain gene with muscle-specific expression from the region commonly deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Hum Mol Genet* **5**, 617-24.
- Smith, D. J., Stevens, M. E., Sudanagunta, S. P., Bronson, R. T., Makhinson, M., Watabe, A. M., O'Dell, T. J., Fung, J., Weier, H. U., Cheng, J. F., and Rubin, E. M. (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat Genet* **16**, 28-36.
- Song, W. J., Sternberg, L. R., Kasten-Sportes, C., Keuren, M. L., Chung, S. H., Slack, A. C., Miller, D. E., Glover, T. W., Chiang, P. W., Lou, L., and Kurnit, D. M. (1996). Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region". *Genomics* **38**, 331-9.
- Sumarsono, S. H., Wilson, T. J., Tymms, M. J., Venter, D. J., Corrick, C. M., Kola, R., Lahoud, M. H., Papas, T. S., Seth, A., and Kola, I. (1996). Down's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets2 transgenic mice. *Nature* **379**, 534-7.
- Swillen, A., Devriendt, K., Legius, E., Prinzie, P., Vogels, A., Ghesquiere, P., and Fryns, J. P. (1999). The behavioural phenotype in velo-cardio-facial syndrome (VCFS): from infancy to adolescence. *Genet Couns* **10**, 79-88.
- Takao, A., Ando, M., Cho, K., Kinouchi, A., Murakami, Y. (1980). Etiologic categorization of common congenital heart disease. In "Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease" (R. Van Praagh, Takao, A., Ed.), pp. 253-269. Futura Publishing Company, Mount Kisco, New York.
- Tejedor, F., Zhu, X. R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K. F., and Pongs, O. (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. *Neuron* **14**, 287-301.
- Telenius, H., Pelmeur, A. H., Tunnacliffe, A., Carter, N. P., Behmel, A., Ferguson-Smith, M. A., Nordenskjold, M., Pfragner, R., and Ponder, B. A. (1992). Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* **4**, 257-63.
- Theodoropoulos, D. S., Cowan, J. M., Elias, E. R., and Cole, C. (1995). Physical findings in 21q22 deletion suggest critical region for 21q- phenotype in q22. *Am J Med Genet* **59**, 161-3.
- Thuline, H. C. (1982). Cytogenetics in Down Syndrome. In "Down Syndrome. Advances in Biomedicine and the Behavioral Sciences" (S. M. R. Pueschel, J.E., Ed.), pp. 133. Ware Prsss, Cambridge.

- Tkachuk, D. C., Westbrook, C.A., Andreeff, M., Donlon, T.A., Cleary, M.L., Suryanarayan, K., Homge, M., Redner, A., Gray, J., Pinkel, D. (1990). Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science* **250**, 559.
- 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**, 710-7.
- 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**, 767-75.
- Trask, B. J., Massa, H., Kenwrick, S., and Gitschier, J. (1991). Mapping of human chromosome Xq28 by two-color fluorescence in situ hybridization of DNA sequences to interphase cell nuclei. *Am J Hum Genet* **48**, 1-15.
- Turrens, J. F. (2001). Increased superoxide dismutase and Down's syndrome. *Med Hypotheses* **56**, 617-9.
- Valero, R., Marfany, G., Gil-Benso, R., Ibanez, M. A., Lopez-Pajares, I., Prieto, F., Rullan, G., Sarret, E., and Gonzalez-Duarte, R. (1999). Molecular characterisation of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. *J Med Genet* **36**, 694-9.
- Van Leeuwen, F. W., de Kleijn, D. P. V., van den Hurk, H. H., Neubauer, A., Sonnemans, M. A. F., Sluijs, J. A., Koycu, S., Ramdjielal, R. D. J., Salehi, A., Martens, G. J. M., et al. (1998). Frameshift mutants of beta-amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* **279**, 242-247.
- Veugelers, M., De Cat, B., Ceulemans, H., Bruystens, A. M., Coomans, C., Durr, J., Vermeesch, J., Marynen, P., and David, G. (1999). Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **274**, 26968-77.
- Wiegant, J., Ried, T., Nederlof, P. M., van der Ploeg, M., Tanke, H. J., and Raap, A. K. (1991). In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res* **19**, 3237-41.
- Wilson, D. I., Burn, J., Scambler, P., and Goodship, J. (1993). DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet* **30**, 852-6.
- Wilson, D. I., Cross, I. E., Goodship, J. A., Coulthard, S., Carey, A. H., Scambler, P. J., Bain, H. H., Hunter, A. S., Carter, P. E., and Burn, J. (1991). DiGeorge syndrome with isolated aortic coarctation and isolated ventricular septal defect in three sibs with a 22q11 deletion of maternal origin. *Br Heart J* **66**, 308-12.
- Wraith, J. E., Super, M., Watson, G. H., and Phillips, M. (1985). Velo-cardio-facial syndrome presenting as holoprosencephaly. *Clin Genet* **27**, 408-10.
- Yamakawa, K., Huot, Y. K., Haendelt, M. A., Hubert, R., Chen, X. N., Lyons, G. E., and Korenberg, J. R. (1998). DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Hum Mol Genet* **7**, 227-37.

Yamamoto, Y., Ogasawara, N., Gotoh, A., Komiya, H., Nakai, H., and Kuroki, Y. (1979). A case of 21q--syndrome with normal SOD-1 activity. *Hum Genet* **48**, 321-7.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	bacterial artificial chromosome, künstliches bakterielles Chromosom
Bast	Basic Local Allignment Search Tool
BCM	Baylor College of Medicine
Bio	Biotin
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
CEPH	Centre d'Etude du Polymorphisme Humain
cM	centi-Morgan
cm	Zentimeter
DAPI	4',6'Dianidine-2'-Phenylidole Dihydrochloride
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
Dig	Digoxigenin
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)
DOP-PCR	degenerated oligoprimed PCR
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-bis-(β-aminoethyl-) tetraacetat
et al	und andere
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiumbromid)
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
for	forward
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
kb	Kilo-Basen
l	Liter
LB	Luria-Bertani (Medium)
M	molar
Mb	Mega-Basen
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaAc	Natriumacetat
NCBI	National Center for Biology and Information
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
nr	non-redundant (genbank)
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAC	P1 Artificial Chromosome, künstliches P1-Chromosom
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pH	<i>pondus hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
q	langer Arm eines Chromosoms
rev	reverse
RNase	Ribonuklease
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecylsulphate, Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat
Std	Stunden
STS	sequence-tagged site
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tertamethylethylenediamide
ter	Ende eines Chromosoms
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit (Enzymeinheit)
ü. N.	über Nacht
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volumen
V	Volt
v/v	volume/volume (Volumen-Volumen-Verhältnis)
W	Watt
w/v	wight/volume (Gewicht-Volumen-Verhältnis)
YAC	yeast artificial chromosome
z.B.	zum Beispiel

Bezugsquellen für Chemikalien

BioWhittaker, Rockland, USA: Seakem Le Agarose, NuSive 3.1

Gibco BRL, Eggenstein: Agarose, Kanamycin, Sucrose, Agarose

Merck, Darmstadt: Natriumacetat, Essigsäure

Promega, Mannheim: H₂O (RNase, DNase frei), DTT

Roche Diagnostics, Mannheim: Cot1-DNA

Roth, Karlsruhe: Phenol, EDTA, NaCl, Ethanol, Methanol, Salzsäure, Acrylamid-Bisacrylamid

Serva, Heidelberg: Borsäure, Agar Agar, Lauroylsarcosine Na-Salt, Citrat, Peptone Yeast Extract, TEMED, KCl

Sigma-Aldrich, Taufkirchen: D-Glucose, Isoamylalkohol, Glycerin, Isopropanol, Tris, BSA, Ampicillin, Hering-DNA, APS, deionisiertes Formamid, NaCl, May-Grünwald-Lösung, Giemsa-Lösung, Chloramphenicol, Tween20, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, EtBr, MgCl₂, Dextransulfat

Bezugsquellen für Materialien und Geräte

Abimed, Langenfeld: automatische Pipetten

Biometra: Trio-Thermoblock (Thermocycler), F10-VC (temperierbares Wasserbad)

Engelbrecht, Edermünde: Objektträger, Deckgläser, Glasküvetten

Eppendorf, Göttingen: Thermomixer 5436, Zentrifuge 5414, Photometer, Zentrifuge 5810

FA Baker, Stanford, USA: SterilGurad (Sterilbank)

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel: GFL3033 (Schüttelinkubator)

Hereaus Christ, Osterode: Biofuge A

Janke & Kunkel, Staufen i.Br.: Vibrofix (Vortex), Ikamag RET (Magnetrührer mit Heizplatte)

Labotect, Göttingen: Inkubator

Marabu, Tamm: Fixogum

Memmert: Inkubator GTR0214

Satorius: 1402MP, universal (Feinwaage)

Sorvall: Zentrifuge

Techne: Thermocycler Progene und Genius

Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA: Antifade-Medium

BAC-Endsequenzen: Chromosom 13**BAC 17382P T7**

NNNNGCTTTATTAAAGTCTTTCCCTTATTCTGGATTGCAACTTCAACTTTTCAGATAGTATGGGTTCAGTG
TGCTGCCATTAATCCCCTCTGGCCTTCTGTTGCCACATGTCCTTTGTGGGATGTTACTGGAATGTT
AGGAACTATCATAAACTGTGCTTGCATCAGCCTTTTCAGTATTTTACATAGCTCAGAAATGAAATCTAA
CCAAACCCCAACAGTATATAACAATTACAATAACACTAACTGGACAGGAGAATGAGGAGGAGCCACAA
CACTTGCCACTAAGTCAGACCTCAGGGTGGTTGGAGTCACGTGGTCTCAGGTCCTTGTATTGTGCAGA
GGGGACAGAGCTATTGTTACGTTGAACTTTTATGTTAAATATGCACGAAGAAAAATTCAGGGTAACT
TGCAAAGTGAACAGAAACAGAGCTACAATTCGGTAGAAGAAAACATGAAGCACAGAGAGGCAGAGGAA
ATTAATATAGGGTGGAAAGAAAACATATAATAATCATCACACATACATGGACAACCCCTTGCA

BAC 17382P SP6

ACACGTCTCCACTTGTCTTTTACAAGTTAACTTTTTGTATGGTATCTTTTTCTATGTAGAAGTTTACT
ATTATTATGACATGGTTGAATCTGCCATTGTCTCATTACATAGCTTCTAGGTTTTGTGCCTGGCTGAGG
GAGGTTTCTACCTTATCCTTGCCAATATTATAAAAATATTATCCTGTATTTTCTCCTATAAGATTCAT
ATTTTGTATGTTTAGTTTTAATTTTCAGTATTACAGATGAAATAGTCAACTGTATCAGCATCACTTAC
TAAATAATCCACCCCTTCTCCACTAGTATGAACAATGACCTTTTTGCACACAGTTANNCGACACACAT
AT

BAC 10567H T7

GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGGCATGCAAGCTTATAACATAATGTCTATCA
CACCAAACCAATTGGCACACTCGGAGTTATCTGCCTGCTCCTTCAGATATTTCTCTGAGATCTCAAT
TTGAGCTAAGGTATTGACTCAAAAGTAGTATAACTTTAGACATTTTATCCTCCCTTCTTAGAGATC
CTTCAAGAGTTCAGGGTCAGTACAACCTGGACAAAGAGTAATATTTGCTGTGCTTAGCAATAAAGACC
TAGGCTATCTGATCAGAAAATTCCTATACAGTGTCCATAAGTTTGAGATAACTCATTGGGCTTCATA
ATCATCTGTGCTTCATGATGAAAGCCTGTGTATATCAGGCTTTCATCACTCAGAAAAGTTGTGGTGT
GACACCAGAGACAATGAAAAGAAGTGTGAGTAATGATTTCTGGATTTTTAGCAATCTTCAGAAAATAA
GTGTTTAGGTTCCAACAGGGAAACAGCAGAGTCCCTGCCATCTGTAGAGGAAAANNNG

BAC 10567H SP6

CGAGAGTTTCTATTAACTGTATCTGGCCTTAGTAGAAAATCATCCTACTTAAGGGTGTAAATATAT
GTAAGAGGCTAGTAACATAATTAAGATTTGGTGTCTTGAGAGAGTAGGTTGAATAACATCATGCCCA
AAAGAATTCAATTAATGAAGTACCAACCTCTAAACCCAGAACAGCTTTAGGCTATCTATCACAAAA
TTCATTTGCTGTTGGAATCACTGAGTCTCCAATGAACTCGACATCAGGGAATAACGGTAGTCTGTT
TCAGAAGGCTGGTAAATACATCATGGCATTCTTTTTTTTTCTGTAATAAGTTATATCTATAGTTTCT
AATAAAATATGCAACATATCTACATGTATACATAAATAATTTAATTTTCTTAGGGCAATTATTTTAA
TACACTGATGAGAAGCTATTTATCATATTTGACCATCATAGTTCACAAAATAAGTTCCACAATTAGCT
ATGC

BAC 03308N T7

GGACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTATATTTAGCTGTCTGTTCTATAGGA
ATTGTTAAAAGTTCTATTTTGTCTTAGAATCTGTGTCACTGTAGAGCAACTCCAGCTTTTTCTTATTT
TTGTGAGTGAAAAAATTGGATGATGTCACAAAGTTCCATGTAGGAATTAATAACCTTTCTGCAACT
GCAACTGAAATGATTTTCACTAGCCTGTTTCCCTGCCCACTTAGGTGGCTTTTCATTGATATTTGGG
ATTTGCTAATGATCACCTACCTGAGATAATCTTGTCTGATGATGTCATCTAGAGAACTAGCTCATA
ATTTTTTTTTTACAAATCATGGTAATATGTATCACTTTATTCATAGGAATTATCACATACTGAAATTAG
TTTATTATCATGATTTATTCATATGTAGATATCAAAGATTATAATTTGAATAAATGAAAAACCTCTCT
ATCATGCTATCATTGTACATGGTATTTTATAAGGAGTTACTGATTCTCTCTAGACAGAAGAAATGTGT
AAATCTT

BAC 03308N SP6

TTATATGGAATCATTTTTTTTATACTTGATATTTGATTTATGAAATATTGTTGTGTCCTAAGACAGTAC
AAACATAAATCAATTTATAGATACAAATTTATTTAAAATTTACTTACTCTTATTTTTGTGAGTTATAT
AGCTATTAGGAAATCGAAGACATTTATTTTACAATGATTCCAGAGCAAGTTAAATGTTCTTAATTTA
TGTAGATGAGCCTTCAATATATCCTTAAGAATATATAAAAGAGATGAGAATTAACAATTCATCAAA
CAGAGCATCAAGAGTTTATTTTTTATTTTTAGCAAAACCATACTTCAAATTCAGTACTGTAAAATTA
TAAGATTCTTATTTATTGTTTATGTACATTTTCTCATCACCTAAACCATAACAGATACTTTTTAAAAA

TCAATGAATGAAGATAATTTCTCATCTTAAAATTAACATAAACTATCAGTCTCCACATATTACCTTGG
TACTACTAAATGTGGACCACTTATTTTGTATTAAAATGTTTGAAGTAACAACACAAATTTGTTGAACAT
CTATATAATATGAGCTCTTATAATGTCTTTTTTATTATTTATGAGACAGTGTCTTGCTCTGTAACCCAG
ACTGAAGTGCAGTGGTACAACACTGCCCCCGCAGGCTTGACCTCTTGGGCGCAAATGATCCTCCACCT
CAGCATCACAAGTAGCTGGGACATTACATTAATTAACCTTACAGCAATAATCCTTCTGCATCTGTTAAA
ATANNNTGTCATATTTATT

BAC 16313I SP6

GTGCCNTNTNGAANNCTAAGCTTGNTATTTGTTTCTAGAAGAAATGAAACAAACAACCAGGGTTTGT
CACCACAGGAGAAGGTGACAGGCTGCCTCTCCCAGCCAAGGATGCGCCATTCTTGCCAGAGCTGCTGT
TTGAGAGTATGCGTGACATTGTCGTCTTTTGTGACACACACTGGTTCCAGTGCATGACTGATGGCAG
CCACTCTGCCCTCTGCCAGCCCTGTCTCAGCTCCTTATGTAGTTAGTATGAGACTATAAAGCCGTGC
AAAACCTCAGGAGACCTAGAGGTGGCATGAGGCACATCAGTGAGTCACTTGTGTGGACAGAGCTCTGT
GTGGCCGTTTTCTTGGAAACTTGGCTATCGCAGGGCATTAGGAGGCAGTCCAGAAAAGAAAAAAA
AAATCTGTCATCCAAGACAAAGACAGCAGCTAGCCCTCCTGGGGTAAGACAGCAGAGACTGCTCAAAA
CCACTTACACAGCTGGGGAGGGCTTGCAAACCTGATGCCACTTATTTAGNAAAATAAAGAGNAACCCCC
AGATAACCCCTTAGACTGTCCTCCAGNGGCCAGGAGACAGCANNTGCCCTGGGCTCCCCACAGAGCAG
CTNANGANGAATTC AAGNNTTATNGNAGCANGNCTCGCNTCCCCANGATGGGCNNGCAGCANNNG
GTANCCCTATGAGCTTCTNGNCCCTAAANTGCCNTANTANNCCCCCCCCAACTTCCCNNTGGCGG
GANANTCCCGNCCCCCTANGGNCNCACGGGCCCTCNCCCAGNNTCGGCNCCCCGNCNCCCCNNNC
CNGNCCCTTGCGANAGNGCNGCNCNCNGNTCNTNNNTCNCGCGACNCNCTATCTGNTCTNNNTNNT
NGCCNACNNTACNTNCNNGCCCCCTNNCNTNNNNNNNNCTGNNCGNCTNNNNNNNCGNAGTAGNCCGN
CANNNNTNACNCGCCACNCCCCGCGNNGNCCACNNTTCTCGCGCCNATNNNCGCCGNGCGNGCN
CNCGCGACCGCGACCTGCTCGTCNCCNNNNNTTGNACNNACTAACANNNNNCTCNNTNCGNACCNT

BAC 10358B T7

GCTCGGTACCCGGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGGCATGCAAGCTTTCATAAATATCTGCATG
GAGGTTTTTGTGTGGATATGTTTTAGTTCCTTTGGGAAAATACCAAGGAGCAAGAATGCAGGATAGT
ATTTATAGTTTTGGGAGAACTGACAACTGTCTTCCAAAGTGGCTATACCATTTTTTCATCCCACCA
GCAATGAGTGAGAGTTTTCTGTTGCTCTACATTCTCACCAGCATTGGTGTGTCAGTGTCTGGATTT
TGGTCATTCTAATAAGTGTGTAGTGTATCTCATTTGTTGTTTTCTTTTGCATTTCCCTGATGACATATG
ATGTGGAGCATCTTTTCGTATGCTTATTTGCCATTTGTTTGTCTTATTTGCCATTTGTATGCCATTTGT
ATGTCAGTGAGGTGTCGAAGTCTTTAGATCATTTTTTGTATTGACTTGTTTTTCTTATTGTTGATTTTAA
TCATTCTTTCTATATTTTGGATAACAGTATTTTATCAGATATGCCTACTGNNNATATTTTTCTCCCAGC
CT

BAC 10358B SP6

TTATAGCTTCTGTAAAATTTATTTAATAATTACCATATAACCAAATGAATTAATTTTTCTAACTTTTTGGG
ATACTATTTTACTTTGCCATCTTCATTTTATTTCAGTTTTGAGCCATTCACTCTGCATTACTGTTTTTA
TTACAGGGATAAAAACCTGAGTGACAGTAAAACATAAACAGCTTTTTTACTATTTACGTAAAGCCTCCT
TCATGCATCAAACAATGCCAGAATAATGTCAAACATGTAGAGAAAGAAAAATAGCACCCACCTCCT
CATTAAATTATGGAGCTTTCAGAGCCCTGTGATGATGTGCATTTGGGATTATCTGGGAGCTACTGAAT
CAAAACAGGACAGCTAAGATCAAGCAGAATCCTGGGAGCCAGAGGAGGTCAGCATAATTTTGGAGCTGC
AGGAGCCTCTGGTGTGTTTTGAAAAATGGACAGTGTCTTCTAATAACTCTTTAGCAAAAATAAATAAATA
AATAAATAAATTCAATGTTTCTCAAATTCAAAAGAATGATGCAATTACCATTTTTTTCTTTTCAA
TTTTTTTCTTTAATTGTTGTCTTATGGAAAAACAAGCATGTGATTTTCAAGAAAAATTTTATTTGTTA
GTTTCTCAAACCTGTTCTAGTTTCAATGAGGCAAGAATCAGCTACTCTCTGGATTTCTAATCAGTCCA
GAACTNNNNNTGGACTATCANNCTNNNTAGTGANNNTTGCTTTTTTTTTTTTTTACAAA

BAC 11308P T7

CGNNTNNTNNNCTCANGATCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTAAACATTGGAAAATTTCTGCCTAATTC
TAATTTACAAAATACTGACAGTTAATGCACTACATTTTAAATCTGTTTAAACATTGCCTCTTTCTTTTT
AATTTTTGGTGGGAGGAGTACTAGCAGCTCATCTCTGTTATAGTCAGAGAAACGATTTTCTTTAGAC
TAGAGAAGAGGTCTGTCCTGACTTTGGTATTCTGCTCTTGTTCATACATATAGAGCAATGGTTCTCA
ACTGGGGAGATTTTATATTTGACAATATCTGGAAGCCTTTTTATATGTTACAACCTGAAGGGTGTCTAT
TGGTATCATTTGGGTAGAGGCCACAGGGATGCTACAAAGCATTTCTGTGCACAAGACAGCCCCATGAC

AAATAATCATCTGGCCCCACCTGTCAATAGTGCACACTTGGGAGACCTTGATGCAGACCGATCTGGAG
CTTGAGATGAAAAAATCTGT

BAC 11308P SP6

TACATCTTTAGTACGATTTTTATTACCCTTGGCCTTCTGATGTTAATGTCTGTCTAAAGTAAAGGAATA
TCAAATGTACTTATCACATTTAGGAAGAACAATTAATTAATCTTTTCAAGTCCTTTTTGAAGGAAGT
TTTTATGAGGACTTTCTAATTTTTATTGGCATTACTTTTTCAACATTTTTTCCCCAGACTTCATCAG
GACAGCCATGTTAGCATAATGTACTTGAATAACAGAAAACACATTTTTCTCTCATAATAAGCATCGATT
ATTTGATCTTCAATTTGGGTTTTGTTTTGCAAGGCTTCGAAGGTATTTTAAATGATTCAAATGCTGTCT
GTTTACTGTGCTACAGGGAAAATGAATCGAGGAGACTATAATCTATAGAGCTTTACTTTTTCTGAAAT
TTCCAGTCAAATATGTAATAACAACCTCCAACAGCAATGCCAAGTGAATTCCTATGCTTTTTGTCATG
AATAGTTGAGTAATATGTCCTGAGCCTCAGCAGCAAGATCATGCAGACCTGACTGGAAAAATGGTAC
TTTC

BAC 01348G T7

TTCTCTNNNGATCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTAAATTATAATTTTCAGTTTCTCCCCATGAAGC
GCTCTCGTCTGACATTTGTTTGGAAATCGTGCCACTGCTGGTCTGCGCCAGATGTACCGTCTTTCCAA
TACGATTTTCTGTTGCACCTTGTAGTGGATTCTGCATATCATCTTTCCCACCTAAAAATGTCTGAATG
CTTACACAAATAAAATTTTATAACACGCTTATTTGCATACTCCTTGAAATGTGACTCTTCAGAGGACA
GGGCACCTGCTGTGTATGTGTGGCCGTGCGTGTGTACTCGTGGCTGTGTGTGTGTGATGAGACACTTT
GGAAGACTCCAGGGAGAAGTCCCCAGGCCTGGAGCTGCCGAGTGCCCAGGTCAGCGCCCTGGACTGCT
TGCGCACTTGCTCACCAGATGATGCNNNTGGAGGTTGCTGATCTGTGCGATTGCTGTAGCGGTTGCC
GGGGACCTTAAGAGTTATTTTGCTTCTCTGGAAGGGCCTATTTCTTGCTAGGCAGGCAGCCAGTGTG
TC

BAC 01348G SP6

ACCCGATTTTGCGCCACTGCACTCAAGCCCGGGCAACAGAGTGAGACTTTGTTTCAAAAAAAAAACAA
AAACAAAACACTAGTGGTTGCTGTGTTGTGAAATACAGTGTTTTGCCGATACCTTAAATATTTATGAAA
CAATGCTCTTTTTAATTGTATTTGCCTTCATGGGTTGGTTTTGAAAGATGTTAGTAATATGCATAAGA
TGGAATAATATTTTTGTTTGTCTTTTTTATAGTTCCTTACCTAGCAGATTTAAAAATTAGCAAAGGC
TAAGATCATACTTCAACTTTCTTAATAAAACAGAGACCCTTTTGAAATCTGATTCTAGCTCATGA
CTGTGCTTGACCTTTGTGGATTTCTTGTACTGTATGTCAGGCAGAGCTCATGTGGGAAGTTCTCTTAT
GACTGCAAGAAAAGGAAGCGTAGTAGAAACATGTAGCTGGAAGTGTAGGCCATTGTGTGCGCAGTCAG
CCTCCCTTCCCAGCCCCAGATCCAGAACAATCTGTCTGAACATTAGAAAACACCAGTAAACGTTAAAG
CAACAACCCTTCTGGTGGGCCATTTGGCAACTGGTCAAAAATCTTAAGAATGGTGCACAGCTTTTGTG
CAGCAGGTTGCTTCTAGGAGGTGCTCTTACAGAGCCGGTAGAAATGAAATGCCCATC

BAC 04382H T7

CGGTTTTCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGACAAGCTTTAGGATAAATAATGGTTCTCAGGACATA
ACTTAGCTAACATAAAGCTATTTATAAGCTAACATAGAAGTTGCAACCAGAAGGGGGATCTTTTGG
CCAGCAGAACCTGGAAAAATGAAAGCCACAGAGGCAATACTAAAGTATCACTCAGGAAAGACAAGAG
TGTAGCTCTGTGACATAGATGGATATATTCTAATCATAAACTAATTTTACTTCTTCCAAATTTATGC
CCACAAACCAACTTTCTGCTTTTTTCTTGTCTCGTATGCATTTTTTAACTTAATAATCTTTAAACACT
TTTATAAGAGTTTTTATATTCTGCATAGAAACACTTTGTTAGCTATATGAATTGCAAAATTTGCTTTA
TCAAAAAGATTCCTAGAGTCATGAAAGAAAGCAAACAAAGTGCTAATATTGTGGTTTCAATGCTTCACTT
ATAAGATAAAATGCATACCATTTATCAATCTATAAACAATGTCTCAATTTGAGGTTGAATGTTAGAGT
TTACCCGGTAATCTAGTATTTCTCTAGAAATGTCAAAAAAAGGGCAAAATTTATATAGTACAGAGGAG
TGAGTGGCTGGAGGTTGTCTAGACAA

BAC 11321B T7

CCTGCCAGCATGCAAGCTTAGGTAATCTTATAGNNNGAAAAAGTTCTACCAATTTTTCGTAAGAACT
TGATTTGAGGTGGTCTATATTTTTTTCAGACGTGCTCATAGATCTGTAGTATATTTCCCGGTGGTAATA
GTTTATAGTTTTGCGACTTTTTTAAAGGAACCAGTCATTGTAAGTCTGTATTTTTGTGTAAAGTATGAA
ACTTCTTTGAAAAGGGGTTTTATTTTTATTTTTCTCTTATAGGAACAATTGGCTTCTTTGCATGCTT
TTGGTTGTTACCAAAATATACAGTGTGGTGAAGTTGACTGAAGAAGTTCAGTGTGTCCAGTTAAAA
CAGAAATAAATTAACCTTTCATCAACAAGACCTGTTTTTGTGACTGCCTTGAGTTTTATCAGAATT
ATTGGCCTAGTAATCTTCAGAAACACCGTAATCTAAATAAACCTCTTCCCATACACTTTT

BAC 11321B SP6

NNNNNAGCTTAAAATGTGCAAGATTTTGTAAAGATTTTGGAGTGGAGGAAGATACTTGATGAATTTA
TGTGAAGTCCCAAGGGCTAGATGCTGGGACCCTAGATTCCAGCCAGAGTGTACTTACTAAGGACAGGA
GGGGTGATGCTTGGGGTGTGAGGCCGGTTTTATTGAGAGTCTTCCAAAACAGAGTGGGCAGACCTGG
AAAACGCAGGTTTACCTTGGCCTCAGTCCCAAAGGTGCATCTGTACCACTAGCTTTTGTGAGGATGA
ATGATGGTGCTGAGTAATTTTCAGGAAAGCAACTCATCTGCCCAAATATGACTGCCAAAATATTCAGAA
TAATGTAGCTTAGCACTTCAATGTAAATTTTACTTTCTGACTTCACAAAATAAGGAAGAAGTTGCCTTT
TGGACGCTCTATCTTTTGCAGTGGCTTTAATACCCAGGAACGGCCACTGTCAGATCCTCCATTCCATG
CAGGAGCTGGAAGAGATATAAGGAATGTATTTCTTCTCTCTCTTTCATGTCACCACCTCTCATTTC
CAGTTCACTTGTTATTCTTAAAGAGTAATGCCAAGTTTGTACACTAAAAAAAAAAAAAGAATCGGAC

BAC 15377K T7

AGCATAGGGCTTATAAATAATGAAGTTTTTAATTTTTTAAAGACTTTATATTTTTTGGAGCAGTTTTTGG
TTTACAGTGAAGCTGAAAGGAAGACATAGAGATTTCCCTTATACCCTTTGCCCCACAGATCCATCAC
CTCTCCATTACCAATATACCACACCGGAGTGGTGCATTTGTTACACCTGATGAGTCTACACTGACACA
TCATCACTCAGAGTTCATAGTTTACATTAGGGTTCACCTCTGGTGTGTTGTGTGCTCCATGGGTTTAGAC
AAATATATAATGTATTCACCATTATAGTATCATGCAGAGTATCTTCACTGCCCTAAAAATCCTTGTGC
TTTTTAAAAGTATCCAAGTTAAGCTTGAAGGTAGACATATTAGAGGCCTAGTAAGAGCCTTGTCTGT
CACTGAGTCTTCTTTTGTACCTTGTAGGCCTAACGAGTCTTGATTTGCAAGCCTTTAGGACCTAAAG
AAGCCTAGAACAGTTTGTGTTTTGCCTACAGTGAGACTGGCTATAGACAGACAGTTCTGAA

BAC 15377K SP6

ANNNATTTCTCTCTCTTGGCCCTAGCATTGGGCTGCACAGCTAGAACTTATTTCCAGGCCTCCTTTGC
TTTTAGGTTTAGTCATGTGACTAGGTTCTTATCAATGGAAGTGAGTAAAAACAGTGTGTTCTACTTCC
AAAGCTTGGCCATAAAACCTCAGTTATGTACTCCACCATTCTTTTTTCTCATTTCTCATAAGCTAA
AACAGGGACATAATGGTGGTCAGCTACAATAAAGCCCTAAAGGATTTTTTTTTCAGCAACATGGAAATA
TGCTGGGTCTCTGAATAACATAACAAAGCCAAGCTACTCTGTCAGAATAAAATGGTTGAACTACAATA
GGAGAAAAATAACTTTCTATCTTCTTTAAGTGACGGTCTCTTTGTCATAGCAGCTTAGCTTTCACCAT
CACAAAATACAGAAGAAATTGACTTGCTCAACCAAATTCTGCCTTTTAATGCCACCTTTCCCAGAAGG
AACTCCATTTGAATATGGAATCCTGACAATTCAAAAATGT

BAC 045030 T7

GTGNNNCCTTANNNGATCATCCTGCAGGCATGCAAGCTTGCTGTTTTTTTTGCAACAAGAACTTAAAAG
AAGAACAATAAATCTAGGTTCAATTTCTGCATTTACCAAATAACATTGCTTGTAACCTTTGATATACA
GCGAATCTTTATAAATAAAACTGAGTTTCCCGTTAGGACAATGTAACAGTTTAGGGTTACATTTCTG
GGCATGGATTACAGGTGTAAATAAATAATAGACATAACAAATGATCTAATAAAAGCCAAGATGCAGCAT
TTACAGTGTTCATAATTAAGGTGGTAAAAAATGTATCCCAACTCCAATAAATGAGAATGTTGTCTAT
TTTTACTGCATTGTTTACGTAAAAATGCAACTCTACCTTATCTGAAAATCTGATCTCTCTAAAACAT
CAGAATAGCACAGAGAATAAATGAAAATATTTTCAGGCACAAAAACATATGTCTTCTTTATCGTTGTAG
AACCTCACAGGGTTCTTATGAGAGAATACGTGTATGTCTAT

BAC 11341A T7

TATTNNTCGTATTTCTGACTATTTTAAATTCTATATATACACCAAAAAAAGGAAAGTTGAAGGAGGAG
GTCAGACACATAAAAAGTGTGATATCTCCAGTCAGAGCCAAATTCCTAAAGGGTTAGCCCATTAACAG
CCAAGCAAATAAGACACAATCGGTGCTAACTTCATTTTCAAAGTTCCACAGTGTAGGTTTTATAAG
TGCTTAGTGTGATGAGTTAGCCTCAATTGTGTCTTGTTTAATTTGGCCACATAAAGGGCTAACCTTT
TCTAACTTGGCTCTAGTTGTAGATATCTCACCTCTAACGTCTGAACTTGATTCTTAACTTGGCTTTTT
CAGTGCACATTAATGTTTCTGATTTGGTATCACTCTAAAAGAATTTGTAAGTGGTTTCTTTGCACTA
TGTCTGGACGGATTGGGGTCAGGTGTGATTGGTGGGTTTCCACTGTTAAATTAATCCACGCTCCCTCA
CCCCACCTAATGGCTACACCTTCTGAGTTCATCTTCTGAGTGGGAGGCCAAAATATCCTGAGATCAC
GTACTGGGGAACCTAGATATACACACTGCAATTGCAACAAAACAAAATTGATATCTTACTTTGTTGAA
TAAATGTGTTGTCTTTGCCAAGAGCTTCTGA

BAC-Endsequenzen: Chromosom 21**BAC 06355L rev:**

AAATGATTACGCCAAGTCTATCTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTCTGATCATGGCAGAAGG
CAAGGGGGAGCAAGGCATCTTTTCATGTCAGGAAGAAGAACAAGAAAGAGAGAGAGAGGGGAAGAGGTGC
TACACACTTTTTAAACAACCAGATGTCATGAGAACTCACTCATTATTATCACAAGAACAGCACCAAGG
GAATGGTGTCAAACCATTCATGAGAAATATGCCCCATAATCCAATCGCTTCCCACCAGGCCACACCT
CCAAAATCGGGGATTACAATTCGACATAAGATTTGGGTGGGAACACAAATCATATCAGGGTTGGATCC
CTCAGGGCTTGGTGTGACTTCAAAGACAGTTAAATGACA

BAC 06355L uni:

GTAATACGACTCACTATACGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG
CATGCAAGCTTGATTCGAAAAATGCAAAATTTTCACTACTTTATACCAATGACTTTTGAAATATGAC
TTTTCAACAACCTTCTATTTTTAGGGTTTTTTTTCCACCACCTCTTAAATCTGCATTGGCTTTGTCACTT
GCTTTGGCCAATAGAATTTGACAGGAGTGGTTGTGTGCCCATCTCACACCTAGGTGTCAGGAGGCCTT
GTATGCTTCTGCTCAATCTCTTGAAAACTACCCAGTTTTTCAGGAGAACAAGCCAGGATTGCTTCTTG
GAAGGATTTAAAGGCTGGTTGGATAGTGACAAGCTGTCCCAGCTGAGGGCCACTAAGTSA

BAC 09381C rev:

ATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTACTGTGCCTGATAAAAACCAAAGAGTAACTCATTAT
GAAGCCCTGGGAATCCCTTTAAAAGGAGATACATATTACACTACATAAAAAGGTCATCACCATCAACAG
ACTGCTGATGGGTTTCTTCTCATTTGTTCAACACATAGATTTGAGAATCTGTTATGTTTGAGGCATTA
CACTAATAAATAAAAACCTTAGTTCTCCCATACAAAAGTTAAAGCTCTTGTATAAAACGACACCATGAA
CAAAAAGGCAATGCAAACCTTGGAAAATGTACCAGCAATAAGTAACAGTAAGTATCCCTAAAATCAAAA
GCATGATCATTAAAGAGGGGACTCACAGGCCCTGAATTTGCTCCCAGCTCCATCCCTTACTAGCTG
TGTGACCTGGGGCAGGCTACCGAACCTCTGTCTGGGTCAATCACAGTACCTGTACCAGAGTTATCATT
AGGAGTAAATAAGTTAATACCTGTAAATAATTTAGAATAGTCATTGGCATCTAGTAAGGGTTCAATGA
GAACTTTGGTAAATTAAGAAAAAAAATTTAAACCCCAAAGAAATATCAACAAAGAATGATAAAAGGA
AACTCACAAAAACATGAGTAACAAACCCCCCAAAAACATACTCGGTCTAATATTCAAGCAAATGTA
AATGTAAATATTGAGTTATG

BAC 09381C uni:

GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGAGAAAGGGT
CTATATTCACGCTGAGCCACAGGAACGGGATGAAGACCCTGGAAAATCAAACCTTGGACAATTTTCT
ATTATATTCATTCTGAATCAGAGAGAAAACCATATTTATAGGAATTCTGGAATCTCTACTCCCAAT
TTATTTGAATCATGATCTTAAGAAAGACTATTTTAAAGCAAAATACAAGTAATGGTGGGTGCAATGTGT
AGCTCTGGGGCTATGTCAAAATAAGAATAAATCTTATCAACATCTGTCTGAAATTGATACCTAGAATA
TTATTTATAATTACGAAGCAAAAATCCATAATGTGCCTACAATACCATAGTTTCCCCTTTCTGATCAAT
GCATTTATAAAATTATCAGTCTTCTGCATTTTGTTTAAATGTTTCAGGGCTTCAACTCATCATTTAAT
AAAGTTTTTGAGCACCTATTAAGTGGTGAAGTACTGCCAGGCCAGGAATACAAAGATAAAACAAAACCA
AATATTTTAATTGAGTGGACTAATAGAACAAGTCACTACAACAGA

BAC 10337F rev:

AAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTTTTTAACTTGATGTATCCCATTTGTCCATTTT
TGCTTAGGTTGCCTGTGCTTGTAAAGTATTACTCGAGAAATCTTTGCCAGTTGAATGTCTTGAAAG
TTTCCCAATGTTTTGTTTTGGTAGTGTACATAGTTTGAAGTCTTAGGTTTAAAGTTTTTAAATCATT
GATTTGATTTTTGTATATGGCAAGAGATAGGGATCTAGATTCATTCTTCTGCATATGGATGTCCAGTT
TTCCAGCACCATTTATTGAAGAGACTCTTCTTCCCAGTGTAGGTCCTTGGCACTTTTTGTCAAAAA
TGAATTCATGATATGTATGGATTTATTTCTGGGTTCTCTATTCTGTTCCACTGTCTGTGTGTCTGT
TTTTATGCCAGTACCATGCCTTTCTGGTTTCTACAGCTCTGCAGTATAAATTTGAAGTCAAGTAATGTG
ATTCTCCAGTTTTGTTCTTTTTGGTTAAGATAGTTTTGGCTTTTCTGGGTGTTTTGTGATCCCATAT
AAATTATAGGATTGTTTTTCTATTTCTGTGAAGAATGTCATTTGTATTTTGATAGGGATTGCATTGA
ATTTGTAGATTGCTTTGGGTAGATGAACATCTTAAACAATATTGATTC

BAC 10337F uni:

GACTCCTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAG
CTTGCAACCACACCAGACTAAAACATACAATATACTGATTACATTTTCTCCCCTATAAGAAATATT

TTTAGAATAACTGTAACTTTTTTTTTATCTGCAGTTAATGATGCTTGAGACACGGAAACAGCCTCTAT
 CCTCTCAATGTGTAATAGCCATTATTATGCCAGTAATGTATTAGCCAAGATCATCTCAAATGACAAA
 TCATACCATACTAACAATTTTATATTTTAGGTAGAAATAGAACACAGCTTTATAGTTTTGAAAAATAT
 CAAGTGGATAAAATTTTCAATTTGAAGCCATCTTATTTGGAAAAATATTCAAAGTCTGGCATGACT
 ACCTTGGTCAAGTTTTTAATACCTCATTCTCTAAAGTGAGGCTGCCACCACAGTTTTGCTGGACATCT
 TTCATAAAAACGTTAAGCCAAGTAGATATTTCTATTCTCTAACCTAAGGGCAATCCTGCTCTTTTTT
 GTCCCTACTTCTCATTAAGACTGTTTATAAAGCTAGAAGATAAACTGGTATTTAAATCTGGATTACA
 GACATAAATTTTTAACTACTGGACTATTGGACTATTCTTTACTCTTCTGAATCAACTAACCTCACATT
 TGGGTAACAGTGCCATCCTC

BAC 01357L rev

CTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTTGATAAACTTTAACCTTTTATAATAGATTTGTGTA
 TACTTTATGGCAGTAAAGTTAAAATAGACTAGTATCTGCATATGTTTTATGCATTCATGACATACCT
 TTTTCTTAATTTTTCAATATTTCTATGCTATGCTGTTTCATCTGCAAGTTTTTCAAATTTGTTGCAAT
 CTCCAAAATTTTTAAATATATTTGTATTGAAAAATATGTGTATAAGTGAAATCCATGCAGTTCAAACC
 CATGTTGTTCAAGTGCAACTGTATTTATGACACAACAGCCATAAGGCAAGTGTGACTGGGACGGTGA
 CATTTTCTGAACCACAAAATGGAAGTGTGCAGAGGAGAGACATGAACAGAAGGGAGGACTGGAAAAA
 ACAGGAAGAAATTAGTTCAAGAAAAGAGGTGAGTGAGAAGGGCTTGACTCAGGAGATGGTGGACGTTT
 TTAATATCCGTGGAAGGCAGAGAGGCAGCTGGATTGTGTGAGAGTAGGGAGATGAAAAGGGACATCAG
 AGACAATGCCAGGTGTTTCAAGTGGTGTTCATTTGCTGGGGAAGGAGCAGGCTTGCCAAGGAGCT
 GCCAACTTCCACACACGATTCTGCAGCCCTCAAGCAGACCAACGTGTGAGTGTTCCTTTGGAATCAG
 TGTTTGACCA

BAC 01357L uni

TTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTGTGCTAAT
 GATTTTTATCCTCTTTTCTACAATATTGCATTGAATAAGTTTAAACATAGTATATAACAGTGACATAG
 ATAATAAAAACAGAAGCTAACATTTTTATAAAAAGTGTGGTGTGTGTGCACAGTTTTCAATCTGTGT
 GCCTGTTGGTGGTATCTCATTAAACTTTGTAAACAAGGAATAGGGTCAGTATAGTAATACCTCTGCTT
 CATAGATAGGGAATCTAAGGCTTTGAATGGTTAAGAAATTTGCCAGTCACAGCCTTAGTCTTTTACTG
 TTTATAAGAACTTTTATATATTAAGGACCTCAATTCCTTTTATTTATATTCCTTCCCTACCTTTTTCT
 TTTTAATGTTTCAAGTTTAAAAGCCCTCATCACCCAGTATTTGAATTTAGATTTTCAATGTTTTGCT
 TTTACAAACAACACCAGGATAAACATGCTTGGCATCTTTGTGCACATCATTGATTATTGCCTTAGTGT
 AAGTTTGTAGAAGTCTTTTTAAAAAAGTGAACAAGGTTGTTTACAGATTTGAATTTGAATGAAAG

BAC 11531C M13

cCgggggatCCTctagagTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTCTGTCAAGTCCAGATCTAACagcTTC
 TCCAATAAAATAGTTCTCATTCCAGAGAGCAGATGAATATATTTATGGATGGTTATTGAATTAATCA
 GTCATTTCAATTGTCTTACAGTCCATCAGTGTGGATGGATGTGGTGGTTTTGAGTCCCTTTTATAACATT
 CAGTTTCTGTTGTCTGGGAATGCCATCCATGATGTCTACTGATTTTTCAGGATCTGGTCAGAATGTTT
 AAATCGGGCAGGGCACAGTGGCCTCTCGCCCGTAATACCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGTGGGCCAGG
 AGCTTGAGACCAGCCTGGCCAACACAGCAAACCTGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAatccagGc
 atggtGGTGTGCACCTGTAAACCagCTACCCatGGGCTgagGcagga

BAC 02324L rev

ACGCCAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTTGGTAGGAAAGTTGGTCACTTTAAAGTCA
 GTTTAATTTATAGTAATATTGGGAAAGAGGATCTATAAGGCAATCTCACTTCCAAAATGCAAACAAAC
 AAGTGAAAACCACTTTGCTTTGGTCTTTTTCATATTTCTTCCAGAGAAGGGAATAAAAATTTCTATTT
 AAAAAATTTGGGATAAACTAGGCTAGGTGGTGTGCACCTGTAATCCCTAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCA
 GGAGAATCGCTTGAGACCAAGAGTTCAGAGCAGCCGGGCAACATACTGAGACACAGACCCTTAAAA
 AAAAAAAGAGCCAGGGGCAGTGGCTAGCCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGG
 ATCACTTGAGGCCAGGAGTTAAGACCAGCCTGACCAACATGGTGAATTCCTCTCTACTACAAATA
 TAAAACTAGCCGGGTGTGGTGGTGCATGCCTGTAATCCAGCTACCTAtGAGGCTGAGGCAGGAGAA
 TCACTTtGAATCTGGGAGGCCGAGGTTGCAgTGAGCCAAgATCATGCCACTGCATTcCAGCCTGGGTG
 ACAGAGACTGTGTNTtCAAAAAAAGGACGGACGGGGGGATCTcCTTT

BAC 02324L uni

CTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCA
CGAGATTGATTCTCACTACTTTGCTTTAATATTATAAACTGCACAACCTCACACAGTAATGTAACCTC
ATATCCAGCTTGGGAAGCACATAGGTGTGCAAGAAGCTTGCTTAGAAATGTCCCTGACTGCTGTGGCC
TCCACTTTGTTTCAAATGACAAATTTTTTAATGGCCTTGTTCTTGGGTACACATCAGGTATAGTTCGT
GCAGCAAATAGGCTACACGTGGCCATGGCCCTTTTTGGTATGACCTTTGTTCTTTTATTTGTCA
TCTTGAGGCACAGACTGGAGCTGGTCTCCCATTTTTATTCTCTGTGTATGCTTTTTTTGCTTTCTTT
TGGGCTTTATGAATGTGTTTTAGACTTCCTTTTTAACTTATCTATTGTATTTTTTAACTATGCCTCTT
GGCATTATTTGGTAGTGGTTGTCTAGTGGCTATAATATGTATGTATTTTTTTAAGTTTTTTATTTcCA
TAGGTTTTGGGGACAGGTGGTATTTGGTTACACAAGCTCTTANCGGTGATTTGTAGATTTGGTGCA
CCCAT

BAC 12486I uni

ACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAG
CTTCTTGCTATGGTGTGCTGCCCGAGGTCCCCTGGCTGTGAACCCGAGTCAGGGTACTGCTAGTT
GACATTAGAAGGTGGGAAGAGGTATTTGTCAACCAGATGGAGGAAAATAGACAAAAACTCTACTTATA
ATTAATTTGTGAATTAATTAGTGTATCATTTATAAAGCTTTTATCCAAGATAACTTTATTTTGGGCCA
AATGTGCATTTATTGTTTTGAATGCACATCCTTGCAATTATACAAAAGGAGCCTAAATTCAGTCAACAAC
TGATTGCATGTTGACAATTTTGATAAAGATACGGGGTCTTTTAGCCTCTAATGGGGTCTATCTTATC
AAATAAGTAAAAACAGAACTCTGATTATTGAAGGGGTGATTATCCTTTTCTGTGCGAAGACTTTTAG
TTCGAATAGAACATATGTCCAAATATTTGGAAATATATTCACGATCCTAACAAAGGCATTCCTTTTAC
AGTTGTCTAGGTTACTTGGCTTTTTCACTAC

BAC 12486I rev

GATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTCTTCCCTGAAATTGTCCTTGGGA
GGAGGGTCTCCATTTTTTTGTTTCCAAGACCAGAGTAATTTAATTATACTACAATGACTTCTTCATTT
GAGCAGCTTGTTTTCAATTAGGCTAGTAAGTGGTATAAAAAACAAGGATAAGGGAAACGAATTGGAGGG
CTAAGGGCCTCTGCATGGGGACAGTGTTCCAGCTGAGACCCCCATGGTGAAAGGGCAGAAATGAGGA
GGGAGCATTCAGGCAGATGAGATCACAGCAAAGGCAAACACCCTGCACCAGGAACGTACCTGCTCAC
TGCTTAGCACTACCATGTAGAAAAATAGGCTGTAGCAGAGGGCAGATCATAAGTCAATGTGCGCAAATT
GCTTAGCCCAGTGAGCACCCTGTGAGATGGCTAGCCATGGCCTTGGGTCTTGAGATACCTGTCAA
GAAAGTGAAAGCATCCATCCATCCATCCTAGGCCAGAGCTCATGGTCTCAGGCTCTGAAATTGGTCTT
TGCTAAACTGTACGAGAGGCCGAGGCAGTGGCCCAGGCAGTGGTCTGCTCTGTCCCGGTCACCTGTGGG
GATGGGTC

BAC 03384B uni

GAATTCGAGctcGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCATGAATATGA
AGATTCTTGTAAGAAATCCCAGGACGCCCATGGTGAGGATTTGCAATGAAAATTTCTTCTCAGcTCAct
gTGACCTATTAGAGTGTcAGTTTGGctCAGTTTCAACATGGTGTTTACTCTTATGAAGTGCAAACCAC
NNATTAGCTAATTTTTTAAGCCATGGCAGAAGCAGCCTGAGAGGCACATTTGTCCAGAGGGCTTGACAA
AAAGCTAGAAGGTCAGTGTCTTTCACAGACCCACTGAGGTTcAGAAATTAATGATAATTTTGTAAACC
AGGCAGGAAGTGACATTTGTGCAATTGCCTTTGATATGTtTTCTTTGGCTGTGTTTTGGTTTCTTTGTC
TCTGCAGAATCTCANAATGAGCCAGCCTcTAACTAAAATGGCGCTGCTTCATCTTAAAATCTCTTTGT
GACAGCTTATGACAGGAGATCCCT

BAC 03384B rev

GCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTCACCAAGCACCAACCATGGGAGAAGTATG
AAGATTCCCATGAGCAATTACATAATCTTAGTGAAAACCCCTGTGAGACCAGCTTTATGATTATCTCTA
TTTTGCAAGGGAGGCATTGAGGAACAGAGAGGTTAAATAACTTACTCAAGTTCACAGACCTTAAAAGA
AGAGCCAGCCAGGGGTGGTGGCTCACACCTGTAATCCCTGCACCTTTGGGAGGCCAAGACAGGCAGATC
ACTCGAGGTTGGGAGTTTCGAGACCAGCCTGGCCACATGGTGAGACCCCGTCACTACTAAAAATACAA
AAATTAGCCAGGCGTGGTGGTGGGCACCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGAGAATTAC
TGGAACCTGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCCTGCCACTGCCTCAACCTGGGCAAAAAG
AGTGAAACTTAGTCTCAAAAAAACAAAAGAAAAAAGAAGAAGAGCCAGAAGTGGGGCACTGGCAGTC

ETS2**Q109A8 T3**

TTCTGTGACAACCCCTGGAGGCTGTGATTGACCTGGTGGCTTACAAGACGTAAGGAGACTAGATCCCTG
GGTTATACATGGAGAAGAACCAGCAGAGCTGCTCAGGCTGTATTGGAATGGGGATGAGGGGAAGCAA
ACCTTTGTGACATTACAACACTGAGATTAGGAGATTGTTAGCGCAGCTAGCATTACTATTCTGATGC
ATGCACCTTGTTCCTGGGAAGTACGGATGGATAACCACCAAGCAAGGTGCTTTGAAGTAGTTCGTTTAT
TGGCATTTCAGACCAAGTGTATAGTTTAAAAATCAGTCCCCAAAAAATCACAGTTGGGAAGAGAAA
GAGAAGCCCCGAGAATGAAAGGAGTATGATGCTGCTCACTTTGGGACCGAGTGCCATTAGATTCCCTAGA
GTAACAAGAACTGAAAGGATTACTCAGTTCATTCTCTAATTCTGAGCATAGCTGTGCCAGATCATC
CTTGAGGGACAGTCTGTTCCCTGTTCCCAAATGCAGCCAAGCATGAAATTCCACAGCCCAGACTAGTA
ATTTTAGTGACTCGAA

Q109A8 T7

CACACGCCCATCACAGCAAACAGGAGAAGAGCCTAGATCTTCCGACCCTAAGCCCAACCTCTTTCTAC
CAAATAGCTCTTCCCTCAGAAACGCAATGGCCGTTATCAATAAAGCTTTGCTGTAAAGCACGGGACAGG
CATTCTAGAACCAGAGCTGTGTGAGCACCGATAGCTGTCTGCCTGTGAGCCAATTTCCCCATCTGTAA
AATGGCCTCATACCACCCCATGCCAGGCTGTCTACAGACTGTATGCCTACTTAACTACAGAGTTGG
CAGTCAATAAACAGAACTTATGTTACTATTTAAAATGAACCACACTAACGTTATGGCTGTTTATTCTT
CTCAGGCCCTAACTCCCAATAATGAAACCGATAATGGCTTTCACACACTCTTTCGGTGTATTTTAAAT
ACGTTTACGTGGCTGATTGTTCTTAGATGACAGAAAAAGAATGAATGCCTCAGTATCCTTATTTTAA
CTTATCAGATTTTTTTAAGTTAGGTAATTTCAATCCACAGTGGCTCCATATGGTTAAAAAACAAAA
CAAAAACGCATTTAAGGATACACGAAGCAGTAAAACAAAGCCCCAGTATTTTCGCTAAAGTACTGGA
AATACCTGTTTCTAAAAACAGCTTTATATTTGTCCACTGC

Q12C7 T3

ACCATTTCAGAAACACTTCTATTCTCATTCTATCCCCATGAATTAGTTTTCTTGAGAAGGTCATAAA
TGTTATCATACTATGTACTTTTGTGTCTGCTTCTCTCACTCGGAATAATGCTTTTGAGATTCATGC
ATGTTGCTGTGTATTGGTGCTTTGGTCCTGTCTGTTGCTGAGTCATGTATGGGTACACTGCAATTTTG
TTATTGGTTCACCAGTTCATGAACGCTTGGCATAATTTCTGTTTTGGAGCTAGTATGAATAAAGCTGCT
ATGAACATTTTTGTGCAAGGATTTTTGTGGGCATATGTTTTCATATCTCTAGGAACTGAAATGTGAGT
CATAGGATAGATATATATTTAAAAATTATAAGAACTTCCAAACCATTTTTCAAATGGTTATATCATT
TTATGTGCTCACCAGCTACATGTAAGAGTTCAGTAGTTCGGCTTCCCTCTGCTATACTTGGAAATGGTC
AATCTTTTTCANNTAGCCATGCTAGAGGGCTGAAGTCCATCTCACTTTTAATATGCATNNCCTGA
TGACTAACGGTGTTCATGTGCTTATTGGTACATATCCTATTTGGTAAAGTCTCTNNNTAGTCTTTTA
CCTAATTTTAACTAGGGTTGTTTTTTTTATTATTAATTTCTAGCAGTTTTTTAAAAATATATGCAG

Q12C7 T7

TAGGATCTAAGAGATCTGCCACATAGCCTCCCAAGTGCTGGGGTTACAGGCATGAGCCACCATGCCTG
GCCCATTTTTGCCTTAAATAATGTAATATTTAAGGCCAAAAAGAGTAGAAAATGTATTTGCAGTTAAA
ATAAGGTGAGAAATAAAGTGTACGACAATAATAGCACAAAGATAGCAGGCCAAAAATAGAAATATGATG
TCCTAAGGATTATACATGAAGTAGCATAATATTTATATCTATATGGACTGTGAAAAGTTAAATTTGAAT
ATTGTAAATCTTAGAAGAATACTTAAAATAATAAAAGACTATAGCTTATCAGCCAATAGTGTCTATA
AATAGAGTAGAAAAAATATATTCCAAAAGAAAGTGGAAATTTAGGGGAAAAGAAATAAAAAAGGGATG
AGACGAATAGAAAAAAAAGGGAGATGGTAGATTTAAATTCACCATGTTGATAATTACATAACATGTC
ACCCCAATCAAAGACAGAGCTTGTTAAAAATGAAAGACAAAACCTGTGTGCGAGCTGCAAGAACTTA
ATTA

BAC-Endsequenzen: Chromosom 22**BAC 11416E rev**

TTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTGTATGGGGACACTAGGCAGGGGCACAGGTGGGCACGTG
CGTGCCATCCACTTGAATGGTCCAGCTCTGGAGCCAAGGGCACCTTCTGGACACCTAGAACC AAAAGA
CCTACACTCACACAAAGAGGACTGTCTGGGCGATTCAAGTGGATGCCAATGTCACCACAGACATTCACA
CCTTAGAGAGACACATGGGTTTTGGGTCCAGACCACCACAATAAAGTGAACATTGCAATAAAGTGAGTC
ATATTAATTCATGTTTACACTATGTTGTAGCCTAAGTGTGTAACAGCATTATGTCTACAAAAACACAG
TACACACCTTAATTTAAAAATATTTTAGTGCTAAAGAATGCTAACAATCATCTGAGCCTTCAGTGACTC
GTAATCTTTTTGCTGGGGAGGGTCTTGCCCTCAATGTTGATGGCTGCTGATTCATACAAGTGGTGGCTG
TTGAAGGCTGGAGAGGCTGTGGCAATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGATGGAGTCTTGCTC

GTCGCCACACTGGAGTGCAGTGCCGTGATCTCGGCTCACTGCATCCTCTGCCTCCCAGGTTCAAGCA
ATCAATTCTCCTGCCTCA

BAC 11416E uni

CTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTGCACCTGCAGGCATGCAAGCTTGA
AGCAAGGCATCAGAACCAACAACACTGTTTAGAAAATAATAAGTGCAGTTGTATGTGTTTGTACATCTGGG
AATCTGCAGATATTTTGGAGAACATGAATAAGAGATTTGAGACAAATTTACTTAGCTTTCAATAGGAA
AGAAATTTCCAGTTCACATCTTGTTTACAGTTCATATTTTAAAGTTGTTCAAAATATAAACTTCTCAT
ACTTTATGAGAAGTTCACAGTTAATAAGTTCCTTTTTTATTTTCTGTAAAGCTGTCTTCAAAAACA
ATTATTAATTTTATTCCTGTATTTACATCTTACTAAGGCATATTAATTATTTAAATTAACATCAATT
TAACTTTAATAATTGTCTAAGTAAATATTTGCATTTTCCCAGTTGTGCCCAATAATATAATGATATA
TATGAGTTAGATATCAAGTATCAGCTGCTTTGTTAGTCAAGATGCTGCAGAGAGACAGAAATCAATAGC
GTAGCTATAGCTATATGAAAGGGAGCCTGGGCAACATAGTGAGACCCCATCTCTACAAAACATTTTTT
TAAAAGTTAGCCAGGCATGGTGGTGCACACCTGTGGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGATGGGAGGA
TCGCTTGAGCCCTGAA

BAC 17441E rev

ATGGCAATCCTGCGTCTACTCTCCTAACACTAAGTGTGATTTTTTATTGGAAATTTTGTCTGAACTAAC
AAGCTAAATTTCTGCTTTGATGGTTGAATCCCTGGACTTAAGCCAGCAGCCTTGGTTTGAATCCTGGCA
TCACCACTTGTGTGCTGTGAGGTCTTGTGTGCTCACCACCTTGTGTGCTGTACTTAACCTGTGGGCCT
TAGTTTCCCATAGATAAAAGGGGATAATGATAGTACCTACCTGACTGTTCTGGGAAGACTGAACAAG
GGCCTTACACATGGCAAACACCATCACTACTATCAGTTCTTCTCGGTCTTCTCCCGGGGGCCCTGTG
TCTCCTGGGTTTTCTGCCTCTTTTTTGCCAGCCCTTCTTTTATGTGCCTGTGCACCTCTTGGGTGAGC
ACGTCACCAGTCCAGCTTACTTGCCTCTGGCCTTGTCTTTCAGCCACACCTCAAGGTCCATCAGAGAG
AGGGGGCGTCTATGTCATGACCTGCTGAGAGCTCACACTGCCCGCTGGGCCAGGCCCTAGGTTCT
ACCCCGTGTGGTGCCNCCCTTCCCAACCACTCGTACACCTGT

BAC 17441E uni

CCTGCAGGCATGCAAGCTTGACCCGTTCTCACNNTTCTCTCCTAACACCCCACTTGGCAGTACGCC
CTGCCGGCTCTGCCTTCAACACACATTCAGAAGCTGACTATGCTTTGCACTTGCCTTGCCACTTTAT
CTGCTGTCGCTGCCCCCTTGCACATCACTGCACCAATTCCTCTATGCACTCCCTGCTCCACCCTTGT
CCTTCACTCTGTTTCGTAGCATAACCAGCCAGAGGGGTTCCGCTGACCCCTATACCAGATCATTTTTCTC
CTCTGCTCAAATGTCCAGTCTCGCCATAGCATAAGCCATAGAATCCAGAGTCCCTGACGACGACCCC
TGAAGTCCCTGACCCGACAGGGCCAACAGCTGCCTCTTCTACTGCTCCCAAGCCTCTCTCGCTGGAT
GGCTGTGCTCCAGCCAGGGGCTCCTGCACCCACAATTGCTCCTCACAGGATCCTTGCACCTTGCCCC
GCTGTCTTGTCTAAGGGCTC

BAC 12464F uni

TCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTGCACCTGCAGGCATGCAAGCT
TTCCACTTTAGATAAGAATTCTGCAATTGCTACTCAAAAATTACCTAGACAGAAACATTCTTCAAGAA
AAGCTCCTGTGCTTTCTAAGGGAACCTACTCTAGAGTTGGGGCTTTTACTTGAACCTTATTTCCA
GTCTTGGTTACCCAGAGTTTCCAAGTGAACAAAAGACCTGTGTGAGCCATCCATAGCATAGCCTGATT
CTCAGAGTGTTCCTTCTTAATTACAGGTGACTTCAGGGAGCACATTCAATGGTACATATTTCTGGA
ATCACTCACTGGTTGTTAGAAAAGGATTCTACAGGAAATCTGGAGCTTAACTGCTGGCTTTTGTCTGG
AGAGCCTCCATGATCCAAGACATCTGGTGGGAATGAGGATGT

BAC 12464F rev

TATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTCTGTAGGATTCACAGGGGCTGACCACAGATGGAAG
GTGACGGCAGTGAGGTCTGGGGCCAGAGGCTGGGCCTGCAACCCAAGTGCCCTCCCTGTACCATGGAC
ACACAGGAGGACCCAGACTGCTGCAGGCAAAACCAACTGTGCCTGTGATCAATCGATGAGCAACCACC
CCACCCCTACACCCTAGGACACCCAATAGAGGGGTTCCAGAGTCTGTGACGCTCTCCTCTCCAAGTCT
CTCTGCCAGAGTGGCTCCACTTACTAGGGCCTTACCCGGGTCTTGGCCTTCCAGGAAAACATGGCTCTC
CATATCCTTGTGATTTACTGTGTGCCACACCAGCTTTCTCATGGCATCCTCGCTGAAACACAAAA
GGAGAAGAGACGTTTGCACACACCAGTACTCCACCGCTGCAGGGCCCTGGCCAACA

BAC 12336I uni

TCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT
TGCTCAGGCCCTAGCTGGTCTGTGGAAGGGATCAATGCCGTGAGCAAGAACCTGGTTTGTCTCAG
CCCCCTCCTAGGGGTCTTACCTAAGCCCTACAGGGCCCTGAGGCATGGGCCAGAAGCATTCCTGTCC
CCTTTTGCTAAGTGAAGAAGGTGATGCTTATCTAGAACTCGCCACAGGTGGAGTGGAGAAGAAGGATT
TCCACTATATGTGGGCTTTCTCCCTGGGTGGGGCACCACACTGAGGGCTTTATGTGACCACCTCCTTT
AATCTGTGTGTGCTCCCTGGGACAGAACCCTTTACTAGAAAATGAACAAAACACATATTCACCTGTGT
GCACGTGTGTGTGCAAGGCAGAGCTGCAAGAGCACAGGGACTGAGGTGGGGTAGAGTGGGCTCTGTAC
TATGGACACGTGTGACTGAAGTGGGATAGAGTGGGCTCTGTATTATGGATACGTGTCACTGAGGTGGG
GTA

BAC 12336I rev

CGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTCACTTGAGTGGCTGTGAGAGAGATTAGG
ATCCCTTTTCATTCAATTTTGCACCTTTTTTTTTTGGAGTCAGGGTCTCACTCTGTCACCCAGTTGCAGT
GCAGTGGTGTGATCGTAGCTCACTGCAGTCTCAAATTCCTTGGCTCAAGTGGTTCTCCTGTCTAAGCT
CCCCAAGCAGCTGGAAGTACAGGTACAGGTACCATACCTGGCTAAAGTTTTTAGAGATGGGGGCTTG
CTATGTTGCCAGGCTGGTTGCAAACCTTCTGACCTCAAGTGATCCTGTGCCATGGTCTCTCATGTCTT
GGGTCAATTTTGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGAGTCTCACTGTCGCCAGGCTGGAG
TGCAGCGG

BAC 02416N uni

TCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT
TGCCGGCCATGAAATAGTCACCATGAATAACACTTATTACCTCCTCAATTCCTTCTGGTCTGGTCT
ACAGGGAATGAAGTTTCTCAAAGCAATTAATATAGCCCTGCATGAATGCAACATTCTCCGTTGCAAA
GCTCCTACGTTATTTACTGTTAATAATTTAGCTGACCCTTGAACAACACGGATTTGAACGGTGTGGG
TCCACATATACGGGACTTTTTCTTCCATCTCTGCCACCCCTGAGTCAGCAAGACCACACCCTCCTCCT
CCTCCTCCTCCTCCTCAGCCACTCAACACGAAGACAATGAAGATGGAGACCTTTATGATGATCCACT
TCCACTTAATGAAGAGTAAATACATTTTCTCTTCTTAGGATTTTCTTAATAGCATTTTCTGTCTCT
AGCTTGTGTTGTAAGATTACAGCATATAACACACACCACATACTAAATATGTTTCATCAGCTATGTTA
TCAGTAAGACTTCCAGTCAGCAGTGGGTTATTAGTAGTTAGGTTTTTGGAGGAGTCAAAAGTTATACAC
GGACTTTTGCTTGCACGG

BAC 02416N rev

TATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTCTGGGACCCCTGAACCTCTCTCCTGACCTGTGCAGG
GTGGGGCAGTGTGTTGCCCGCGGTGCATGTGTTTCACATGAAGGCTGTCTCCTCCTTGCACCAGTA
TTGACGTGCCAGGAAGGAAAGAGGCCTGGCCCTGAAGGGCTCTTGGAGGTCAGATAGATCAAGGCAA
TCAGTATGCATCTGGGAAACTGAGGCTTATAGAGGCATGGTACTGGTCTAACATCAACTAAAAAGT
CAAGGGCAGAGTCAGGACCAGCCACTAAGCTTGATGCTGTCTGCCTGACCTGGCTCGCGGTGCCAGC
AGCCGGCCAGGGGAGAGGCCATCCACGAAGCAGTNCTTACCTCTGGCTCATCACCTaCACCTGCCC
CCGAAAACATCCAGGAGAGACAAGAATGTCCCATCCAACCTCCTCTCACCTAAAGGAGTGGCCCCAGCC
TCACACCA

BAC 22489F uni

CTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGC
TTGAGTGCAGCAGCGCCATCTGGGCTCACTGCAACCTCCACCTCCCGGGCTTAGACGATTCTCCTGCC
TCAGCCTCCCGAGTAGATGGAATTACTGGCATGTGCCACCACGCCAGCTAATTTTTTGTATTATTACT
ATTTTTTTTTTTTGGAGGCAGAATTTTGTCTTGTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAATGGCGCAATCTCAGCT
CACTGCAACCTCCGCTCCAGGTTCAAGTGATCCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTAC
AGTCATGTGCCACCACGCCGGATAATTTTCTGTTTTTAGTAGAGACGGGATTTACCATGTTGGCCA
GGCTGGTCTTGAACCTCCTGAACTCAGGTGATGTGCCTGCCTTGGCCTCCCAATGTGCTAGGATTACAG
GTGTGAGCCACGGGGCCTGGCCGAGCGGAGATTTTGGCCAGAGCAGCTGGAAGTGG

BAC 22489F rev

TATAGAATACTCAAGCTTTCAGTCTTTCAGCATTGAATATGTTGTCAGCTATGGGCTTTTCATAGGTG
 CCTTTATCATACTGAAGATATTTTCCTTCTATTTCCTAGTTTGAGTGTCTATCAAGAAAGTATGTTGAA
 TTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTTTTGCTCTTGTGCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCATGATCTTG
 GCTCACGGCAACCCGCCCTCCTGGGCTCAGGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGAT
 TACAGGCGTGTGCCACCATGCCCGGCTAATTTTTGTATTTTCAGTAAAGATGGGGTTTTACCACGTTG
 GCCAGGCTGGTCTTGAACCTCCTGACCTCAGGTGATCCACCCTCCTCGGCCTCCCAAAGTGTGGGATT
 ACAGGCATGAGCCACCGCACCTGGCCGTATGTGGAATTTTATCAGATT

Ergebnis RepeatMasker Analyse der ETS2-Sequenz:

SW score	perc div.	perc del.	perc ins.	perc sequence	query sequence	position in query begin	position in query end (left)	matching repeat	repeat class/family	position in repeat begin	position in repeat end (left)	repeat ID
185	36.6	11.6	0.9	Fasta		942	1053 (22057)	+ MIR	SINE/MIR	24	147 (61)	1
237	19.7	0.0	4.5	Fasta		1627	1692 (21418)	+ C-rich	Low_complexity	1	63 (0)	2
385	20.9	0.6	3.7	Fasta		1708	1870 (21240)	+ C-rich	Low_complexity	2	159 (0)	2
									Im Exon 1			
181	27.1	3.4	1.7	Fasta		4142	4200 (18910)	+ MIR	SINE/MIR	79	138 (70)	4
347	4.1	2.0	0.0	Fasta		4556	4604 (18506)	+ (TG)n	Simple_repeat	2	51 (0)	5
614	22.3	19.9	0.6	Fasta		5053	5293 (17817)	C MER33	DNA/MER1_type	(51)	273 (1)	6
									Exon 2			
344	33.1	2.3	1.5	Fasta		6135	6264 (16846)	+ MIR3	SINE/MIR	15	145 (63)	8
857	21.1	0.0	2.2	Fasta		7811	7990 (15120)	C FRAM	SINE/Alu	(0)	176 (1)	9
2068	9.8	0.3	0.0	Fasta		8475	8759 (14351)	+ AluSx	SINE/Alu	1	286 (26)	10
									Exon 3 bis 5			
264	3.0	0.0	0.0	Fasta		11147	11179 (11931)	+ (TG)n	Simple_repeat	2	34 (0)	11
1870	10.9	1.4	3.2	Fasta		11625	11908 (11202)	+ AluSx	SINE/Alu	1	279 (33)	12
1067	12.1	0.0	0.6	Fasta		11912	12084 (11026)	+ (GGAA)n	Simple_repeat	3	174 (0)	13
1870	10.9	1.4	3.2	Fasta		12625	12908 (10202)	+ AluSx	SINE/Alu	1	279 (33)	14
1067	12.1	0.0	0.6	Fasta		12912	13084 (10026)	+ (GGAA)n	Simple_repeat	3	174 (0)	15
309	28.2	8.6	1.7	Fasta		13583	13699 (9411)	+ L2	LINE/L2	3189	3313 (0)	16
									Exon 6			
1190	19.0	4.0	4.3	Fasta		14182	14481 (8629)	+ MER33	DNA/MER1_type	26	324 (0)	17
218	31.0	3.5	2.6	Fasta		14978	15093 (8017)	+ MIR3	SINE/MIR	15	131 (77)	18
									Exon 7			
268	26.8	9.9	0.0	Fasta		15774	15844 (7266)	C L2	LINE/L2	(31)	3282 (3205)	19
1394	22.6	8.2	1.8	Fasta		15900	16289 (6821)	C L1ME3	LINE/L1	(0)	6162 (5748)	20
									Exon 8			
193	16.1	0.0	0.0	Fasta		17639	17669 (5441)	C MIR	SINE/MIR	(119)	143 (113)	21
									Exon 9			
21	0.0	0.0	0.0	Fasta		20391	20411 (2699)	+ AT_rich	Low_complexity	1	21 (0)	22
									Im Exon 10			
228	3.5	0.0	0.0	Fasta		20592	20620 (2490)	+ (TTTG)n	Simple_repeat	2	30 (0)	23
354	22.1	1.3	0.0	Fasta		21736	21812 (1298)	+ MER116	DNA/Mariner	3	80 (0)	24
2011	17.1	13.6	0.7	Fasta		22382	22428 (682)	C Charliel	DNA/MER1_type	(31)	2730 (2690)	25
834	19.2	10.4	1.6	Fasta		22429	22621 (489)	C MER63A	DNA/MER1_type	(0)	210 (1)	26
2011	17.1	13.6	0.7	Fasta		22622	23110 (0)	C Charliel	DNA/MER1_type	(71)	2690 (2125)	25

Alignments:

total length: 23110 bp (23110 bp excl N-runs)
 GC level: 45.95 %
 bases masked: 4113 bp (17.80 %)

	number of elements*	length occupied	percentage of sequence
SINEs:	9	1481 bp	6.41 %
ALUs	4	1033 bp	4.47 %
MIRs	5	448 bp	1.94 %
LINEs:	3	578 bp	2.50 %
LINE1	1	390 bp	1.69 %
LINE2	2	188 bp	0.81 %
L3/CR1	0	0 bp	0.00 %
LTR elements:	0	0 bp	0.00 %
MaLRs	0	0 bp	0.00 %
ERV1	0	0 bp	0.00 %
ERV_classI	0	0 bp	0.00 %
ERV_classII	0	0 bp	0.00 %
DNA elements:	5	1347 bp	5.83 %
MER1_type	4	1270 bp	5.50 %
MER2_type	0	0 bp	0.00 %

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie der Universität Bielefeld angefertigt. Sie fand unter der Leitung von Herrn PD Dr. Thomas Schmitt-John statt, dem ich sowohl für die Bereitstellung des interessanten Themas als auch für seine freundliche Unterstützung während der Arbeit danke.

Dem Leiter des Lehrstuhls Herrn Prof. Dr. Harald Jockusch und der Firma Praenadia GmbH (Münster) danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Bernd Eiben (Institut für Klinische Genetik und Zytologie Nordrhein, Oberhausen) möchte ich für die Bereitschaft danken meine Arbeit als Zweitgutachter zu referieren.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Ingo Kennerknecht und Frau Dr. Beate Lemcke (Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Humangenetik, Münster), die mir freundlicherweise die klinischen Befunde und die Proben der Patienten CMI und JP zur Verfügung gestellt haben.

Ein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. Bettina Prager und Frau Dr. Annelore Junge (Gemeinschaftspraxis für Humangenetik und medizinische Genetik, Dresden), die mir freundlicherweise den klinischen Befund und die Proben des Patienten SR zur Verfügung gestellt haben.

Ich danke Herrn Dr. Gotthold Barbi (Universitätsklinikum Ulm, Abteilung Humangenetik, Ulm) und Herrn Dr. Holger Tönnies (Virchow Klinikum Berlin, Institut für Humangenetik, Berlin), für die Überlassung von Präparaten von Chromosom 22.

Frau Dr. Birgitta Gläser (Universitätsklinikum Ulm, Abteilung Humangenetik, Ulm) danke ich für die Übersendung der Zellen.

Ich danke Frau M.Sc. Biol. Mol. Jomuna V. Choudhuri (Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Bielefeld) für die Sequenzanalysen mit dem *REPuter* Programm.

Ich möchte Frau Dr. Jutta Wirth danken, ihr Engagement und Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Laborkollegen Frau Anika Tauchen und Herrn Dipl. Biol. Ralf Palmisano möchte ich für ihre freundschaftliche Unterstützung danken.

Allen Mitgliedern der 'wobbler'-Arbeitsgruppe und der Abteilung danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Haltung.

Auch möchte ich Karin Resch und Sonja Fuchs für ihre freundschaftliche Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Jürgen Horstmann und meiner Familie für ihre liebevolle Begleitung während all dieser Jahre.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig und nur mit den hier aufgeführten Materialien und Quellen angefertigt habe.

Bielefeld, 06.01.2003

Daniela Ehling

Lebenslauf

Name: Daniela Ehling

geb. am: 29.11.69 in Minden

Bildungsgang:

- | | |
|-----------|---|
| 1976-1980 | Besuch der Grundschule Windheim |
| 1980-1981 | Besuch der Hans-Lüken-Schule (Hauptschule) in Windheim |
| 1981-1987 | Besuch der Realschule Lahde;
Erwerb der Fachoberschulreife |
| 1987-1990 | Barmer Ersatzkasse in Minden;
Ausbildung zur Sozialversicherungsfachangestellten |
| 1990-1993 | Besuch des Weser-Kollegs in Minden;
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife |
| 1993-1999 | Studium der Biologie an der Universität Bielefeld;
Abschluß des Studiums Biologie mit Diplom |
| 1999-2003 | Promotion an der Universität Bielefeld |

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier (ISO 9706).