Identifizierung und Charakterisierung von krankheitsassoziierten Mikrodeletionen mit modernen molekularzytogenetischen Methoden

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Natalja Damatova

geboren in Kokand

Würzburg 2011

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission: .....

Vorsitzender: .....

Gutachter: .....

Gutachter: .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2008 bis Mai 2011 am Institut für Humangenetik der Universität Mainz und am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Thomas Haaf angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Doktorarbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Die Dissertation ist bisher weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Es wurde zuvor kein anderer akademischer Grad erworben.

Würzburg, Juni 2011 _____

Natalja Damatova

Abkürzungsverzeichnis

aCGH	Array comparative genomic hybridization
ACOG	American College of Obstreticians and Gynecologists
ADS	Autismus spectrum disorder
Ag-NOR	Silver nitrate staining of the nucleolar organization region
BAC	Bacterial artificial chromosome
CES	Cat eye syndrome
CML	Chronische myeloide Leukämie
CNP	Copy number polymorphism
CNV	Copy number variation
FISH	Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung
FoSTeS	Replication fork stalling and template switching
GTG	G-Bänder, durch Behandlung mit Trypsin und Färben mit dem Farbstoff Giemsa
kb	Kilobasen
LCR	Low copy repeat
LOH	Loss of heterozygosity
LTR	long terminal repeats
Mb	Megabasen
MIR	Mammalian-wide interspersed repeats
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification

MMBIR	Microhomology-mediated break-induced replication
MR	Mentale Retardierung
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NAHR	Non allelic homologous recombination
NCBI	National center for biotechnology information
NGS	Next generation sequencing
NHEJ	Non homologous end joining
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAC	P1 artificial chromosome
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
SBE	Single base extension
SNP	Single nucleotide polymorphism
STR	Short tandem repeat
UPD	Uniparentale Disomie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Mikrodeletionssyndrome 1
1.2 Entwicklung und Prinzipien zytogenetischer Methoden 5
1.2.1 GTG-Bänderung 5
1.2.2 FISH 6
1.2.3 MLPA 7
1.2.4 DNA-Mikroarray 9
1.2.4.1 Array-CGH 11
1.2.4.2 SNP-Arrays 13
1.2.4.2.1 Affymetrix-SNP-Arrays 15
1.2.4.2.2 Illumina-SNP-Arrays 16
1.2.5 Reihenfolge der Untersuchungen 17
1.2.6 Genotyp-Phänotyp-Korrelation 17
1.3 Zielsetzung der Arbeit 21
2 Kritische Evaluation und allgemeine Diskussion 23
2.1 Zusammenfassung der publizierten Ergebnisse 23
2.1.1 Anhang 1: Damatova N. et al.; Cytogenet Genome Res, 2009 23
2.1.2 Anhang 2: Behnecke A. et al; Am J Med Genet, 2010 24
2.1.3 Anhang 3: Bartsch O. et al.; Am J Med Genet, 2010 25
2.1.4 Anhang 4: Poot M. et al.; Neurogenetics, 2010 25
2.1.5 Anhang 5: Zechner U. et al.; Clin Genet, 2009 26
2.2 Allgemeine Diskussion 28
2.2.1 GTG-Bänderung 28
2.2.2 FISH 29
2.2.3 MLPA 31
2.2.4 Array-Methoden 32
2.2.4.1 Limitierungen 32
2.2.4.2 Größe der Veränderung 34
2.2.4.3 Copy Number Variations 34
2.2.4.3.1 Datenbanken mit benignen CNVs 34
2.2.4.3.2 Trios 36
2.2.4.4 Identifizierung von Kandidatengenen 38

2.2.4.4.1 Genfreie Regionen 38
2.2.4.4.2 Gen-Datenbanken 38
2.2.4.4.3 Schlussfolgerungen aus Modelorganismen, Expressionsanalysen 39
2.2.4.4.4 Pseudogene und andere Elemente 41
2.2.4.4.5 Vom Genotyp zum Phänotyp 41
2.2.5 Schlussfolgerungen 42
2.2.6 Ausblick 43
3 Zusammenfassung 45
4 Summary 47
5 Literaturliste 49
5.1 Internet-Quellen 55
6 Anhang 57
6.1 Anhang 1 59
6.2 Anhang 2 69
6.3 Anhang 3 79
6.4 Anhang 4 85
6.5 Anhang 5 97
7 Curriculum Vitae 109

1 Einleitung

1.1 Mikrodeletionssyndrome

Seit der ersten Darstellung menschlicher Chromosomen 1879 in Krebszellen (Ferguson-Smith MA., 2008) ist die Humangenetik zu einem anerkannten Zweig der Medizin angewachsen. Viele Krankheiten wurden durch Veränderungen im Genom erklärt, wobei die Notwendigkeit entstand diese Veränderungen zu klassifizieren. Im Laufe der Zeit hat sich die folgende Klassifikation herauskristallisiert.

Einzelgendefekte werden durch Mutationen in einem Gen verursacht. Bei einer multifaktoriellen Vererbung sind Mutationen in mehreren Genen und bestimmte Umwelteinflusse für die Entstehung einer Krankheit verantwortlich.

Chromosomalen Veränderungen unterscheiden zwischen numerischen und strukturellen Chromosomenmutationen. Im ersten Fall ist die Kopienzahl ganzer Chromosomen verändert und im zweiten Fall sind nur Teile von Chromosomen betroffen. Strukturelle Chromosomenmutationen werden unterteilt in Deletionen, Duplikationen, Insertionen, Inversionen und Translokationen.

Sind Deletionen so klein, dass man sie lichtmikroskopisch nicht mehr erkennt, d. h. ist die maximale Auflösungsgrenze von ca. 5 Mb unterschritten, spricht man von Mikrodeletionen. Sind dabei mehrere benachbarte Gene beteiligt, wird die phänotypische Ausprägung als Contiguous gene syndrome bezeichnet.

Die phänotypischen Effekte von Deletionen und Duplikationen können viele Ursachen haben. Befinden sich in der betroffenen Region dosis-sensitive Gene, kann eine veränderte Menge des Genprodukts zu einer Erkrankung führen. Ein Beispiel dafür ist das kürzlich entdeckte Deletions- (OMIM #610443) und ein Duplikations-syndrom (OMIM #613533) im Lokus 17q21.31 mit jeweils unterschiedlichen Phänotypen. Deletionen von Genen führen in der Regel zu schwerwiegenderen Phänotypen als Duplikationen (Murken J. et al., 2006). Das bekannteste Beispiel für eine Duplikation ist die Trisomie 21 (OMIM #190685).

Krankheitsassoziierte Phänotypen können auch durch Positionsänderungen bestimmter Abschnitte des Genoms entstehen, wie bei Translokationen, Inversionen

und Insertionen. Dabei können Gene oder deren Kontrollelemente auseinandergerissen und/oder neu zusammengesetzt werden und somit entweder ihre Funktion verlieren, was eine loss of function (lof)-Mutation bedeutet, oder eine neue Funktion gewinnen, die als gain of function (gof)-Mutation bezeichnet wird. Ein Positionseffekt entsteht durch die Beeinträchtigung von Kontrollelementen, die die Transkription eines Gens regulieren. Das Gen selbst bleibt dabei intakt. Liegen die Bruchpunkte jeweils in zwei verschiedenen Genen, können die vom Stückverlust nicht betroffenen Abschnitte zusammengeführt werden und Fusionsgene erzeugen.

Die Anzahl von Zellen, die Träger eines der obengenannten Ereignisse sind, hängt ab von dem Zeitpunkt in der Entwicklung eines Organismus in dem sie entstehen. Findet eine Mutation in der elterlichen Keimbahn statt, wird jede Zelle des Körpers Träger. Passiert die Veränderung nach der Befruchtung, wird nur ein Teil der Körperzellen die Mutation tragen, es entsteht ein somatisches Mosaik (Murken J. et al., 2006, Nussbaum RL. et al., 2007).

Die oben beschriebenen strukturellen Umbauten können nach Einwirkung von ionisierender Strahlung, Viren und chemischen Substanzen auf Chromosomen entstehen und führen zunächst zu Brüchen. Die Wiederzusammensetzungen führen zu den nachfolgend beschriebenen Veränderungen. Translokationen und Inversionen entstehen durch Schleifenbildung und fehlerhaftes Crossing-over. Deletionen und Duplikationen können durch ungleiches Crossing-over zwischen Chromatiden homologer Chromosomen oder Schwesterchromatiden entstehen. Für die Entstehung von Mikrodeletionen wurden mehrere Mechanismen entdeckt, wie die Non allelic homologous recombination (NAHR) zwischen repetitiven Sequenzen, den sogenannten Low copy repeats (LCR), die auch segmentale Duplikationen genannt werden. Die Entstehung der meisten immer wiederkehrenden Rearrangements ist auf diesen Mechanismus zurückzuführen (Stankiewicz P. and Lupski J., 2010). Da das menschliche Genom zu 5 % aus segmentalen Duplikationen besteht, die mehr als 90 % Sequenzähnlichkeit haben, können diese Ereignisse dementsprechend oft auftreten (Cheung VG. et al., 2001, Bailey JA. et al., 2002). Weitere Mechanismen, die zu Mikrodeletionen führen, sind das Non homologous end joining (NHEJ), homologe Rekombination zwischen Long terminal repeats (LTR), Mammalian-wide interspersed repeats (MIR), Alu repeats usw. (Shaw CJ. and Lupski JR., 2005) und nicht zu vergessen das Prinzip des „Replication fork stalling and template switching“

(FoSTeS)/Microhomology-mediated break-induced replication (MMBIR). Dieser Mechanismus soll die Hauptursache für sich nicht wiederholende CNVs sein (Stankiewicz P. & Lupski J., 2010).

Es gibt die ganz klassischen Mikrodeletionssyndrome, darunter das Prader-Willi-Syndrom (PWS; OMIM #176270), Angelman-Syndrom (AS, OMIM #105830), DiGeorge-Syndrom (OMIM #188400) usw. PWS kann auch durch eine maternale uniparentale Disomie (UPD) von Chromosom 15 verursacht werden. Bei der UPD stammen beide Kopien einer Region von einem Elternteil ab (Engel E., 1980). Beide ursächlichen Veränderungen führen zum Fehlen der paternalen Kopie der Region 15q11-q13 (Deutsche Gesellschaft für Humangenetik et al., 2010).

Mit der Einführung neuer Diagnosemethoden wurden in letzter Zeit viele neue Mikrodeletionssyndrome entdeckt (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Mittels der Array-Methoden gefundenen Mikrodeletionssyndrome benannt nach der zytogenetischen Lokalisation, Größe der Veränderung, das Entdeckungsjahr, einige klinische Eigenschaften und die OMIM-Nummer.

Zytogent. Lokus	Größe [Mb]	Entdeckungs-jahr	Einige klinischen Eigenschaften	OMIM
1q41-q42	1,12	2007	MR, Anfälle, Mittelliniendefekte (Gaumenspalte, Zwerchfellhernie), variierende Dysmorphien	612530
3q29	1,3-1,5	2005	MR, leichte Gesichtsdysmorphien, weitere variierende klinische Merkmalen	609425
8q13	0,6-0,8	2010	Mesomelische Dysplasie mit typischen akralen Synostosen, Hypertelorismus, Gaumenveränderungen, Ptosis, Harnleiteranomalien, angeborene Herzfehler	600383
15q13.3	1,5-4,0	2008	Sehr variabler Phänotyp mit möglichen kognitiven Einschränkungen, Epilepsie, verschiedenen Dysmorphien	612001
15q24	1,7	2007	Entwicklungsverzögerung, Hypotonie, Kleinwuchs, Fingeranomalien, überdehnbare Gelenke, Genitalanomalien, charakteristische Gesichtsmerkmale, Ohranomalien	613406
16p11.2	0,6	2008	Sprachentwicklungsverzögerung, kognitive Einschränkungen, Makrozephalie, breite Stirn, Mikrognathie, Hypertelorismus, flacher mittlerer Gesichtsbereich, evtl. ASD usw.	611913
17q21.31	0,5-0,7	2006	MR, Hypotonie, charakteristische Gesichtsmerkmale, verzögerte motorische Entwicklung, lange Finger, freundliche Wesensart, nasale Aussprache	610443

Ein besonderer Akzent wurde auf die Klärung vieler bis dahin idiopathischer Fälle mentaler Retardierung (MR) gesetzt, die mittlerweile sehr oft mit Mikrodeletionen assoziiert sind. MR taucht in der Population der entwickelten Länder mit einer Häufigkeit von 2-3% auf, wobei andere Studien eine Prävalenz von 1-10% angeben (Rauch A. et al., 2006). Bei 5% davon lassen sich die Ursachen mit konventionellen zytogenetischen Methoden finden (de Vries BBA. et al., 2005). Unter Anwendung von Array comparative genomic hybridization (aCGH)-Technologien lässt sich diese Rate auf 5-17 % erhöhen und durch die Anwendung von Single nucleotide polymorphism (SNP)-Arrays um ca. weitere 6 % (Galasso C. et al., 2010).

1.2 Entwicklung und Prinzipien zytogenetischer Methoden

Um Mikrodeletionssyndrome entdecken zu können, mussten viele technische Entwicklungen stattfinden. Jede neue Technik erlaubte einen tieferen und genaueren Einblick in das Genom, führte aber auch zu Beobachtungen, die zunächst nicht erklärt werden konnten.

Mit der Verbesserung von Mikroskopen wurden Chromosomen zum ersten Mal in der Mitte des 19. Jahrhunderts beobachtet. Zum Ende des Jahrhunderts versuchte man bereits die Anzahl der menschlichen Chromosomen herauszufinden. Es hat aber ca. ein halbes Jahrhundert gedauert bis 1956 die korrekte Anzahl der Chromosomen beim Menschen identifiziert wurde. Dafür musste die Zellkultur und Einsatz von Colchizin, zwecks Anreicherung von Zellen in der Metaphase, entwickelt werden. Drei Jahre später wurde die Trisomie 21 als Ursache für das Down-Syndrom erkannt, gefolgt von 45,X beim Turner-Syndrom und 47,XXY im Klinefelter-Syndrom. Diese Entdeckungen wurden anhand der Knochenmark-Analyse gemacht. 1960 wurde diese Technik jedoch von der Leukozyten Methode, also Blutkulturen, verdrängt. Im selben Jahr wurde das erste Mal eine chromosomale Aberration in der Form des Philadelphia-Chromosoms, als Ursache für eine Krebs-Erkrankung entdeckt (Ferguson-Smith MA., 2008).

1.2.1 GTG-Bänderung

Zunächst wurden Chromosomen betrachtet, die eine einheitliche Färbung aufwiesen. Auf diese Weise konnten die Chromosomen nicht eindeutig voneinander unterschieden werden und man konnte nur Aneuploiden, Markerchromosomen und sehr große Veränderungen entdecken (Feuk L. et al., 2006). Im Jahr 1969 wurde die Methode entwickelt, Chromosomen nach einer Behandlung mit einem proteolytischen Enzym mit Giemsa zu färben. Dies ergab für jedes Chromosom ein spezifisches Bandenmuster, welches eine eindeutige Identifikation des Chromosoms erlaubte (Ferguson-Smith MA., 2008).

Auch heute beginnt jede zytogenetische Untersuchung mit der GTG-Bänderung (G-Bänder, durch Behandlung mit Trypsin und Färben mit dem Farbstoff Giemsa) von Metaphasenchromosomen. Die Präparation der Chromosomen kann aus Lymphozyten des peripheren Blutes, Fibroblasten, Knochenmark und Amnionzellen erfolgen. Die hellen Banden sind GC- und somit auch Gen-reiche Abschnitte. Dort befinden sich die

sogenannte „Haushaltsgene“, die häufig abgelesen werden und deswegen früh replizieren, sowie schwächer gefaltet sind, als die DNA in dunklen Banden.

Normale Metaphasenpräparationen zeigen durchschnittlich eine Auflösung von 450 Banden. Prometaphasenchromosomen, die am Anfang des mitotischen Kondensationsprozesses stehen, weisen 550-850 Banden auf. Damit können auch relativ kleine (~ 5 Mb) strukturelle Veränderungen erkannt werden. Allerdings auch stark limitiert durch die Größe der Veränderung, die mindestens 5 Mb sein muss (Murken J. et al., 2006, Nussbaum RL. et al., 2007). Es lassen sich Deletionssyndrome diagnostizieren, wie z.B. das Cri-du-chat-Syndrom (OMIM #123450), wobei die Deletion bis zu 15 Mb betragen kann, oder das 6q11-q14 Deletionssyndrom mit einer durchschnittlichen Deletionssgröße von 13.9 Mb.

1.2.2 FISH

In demselben Jahr wie die Giemsa-Färbung, wurde auch die Technik der *in situ* Hybridisierung entwickelt. Damals wurden radioaktive Sonden eingesetzt, ab 1982 konnten zusätzlich fluoreszierende Farbstoffe verwendet werden. In den späten 70ern konnten DNA-Fragmente in Bakterien kloniert werden und ein gewünschter Teil des Genoms konnte aus einer Bibliothek herausgesucht und in ausreichender Menge amplifiziert werden (Ferguson-Smith MA., 2008). Solche BAC-Bibliotheken werden auch heute noch verwendet (http://bacpac.chori.org/).

Bei der Methode der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung werden DNA-Fragmente zunächst mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Nach Denaturierung werden diese Sonden auf fixierte und ebenfalls denaturierte Metaphasenchromosomen hybridisiert.

Die Auflösung dieser Methode ist abhängig von der Sondengröße. Nach mikroskopischer Evaluation können Mikrodeletionen ab 10 kb detektiert werden, es ist aber auch eine Sondengröße von 1 kb erreicht worden (Trask BJ., 2002).

Damit hat die Entdeckung der Mikrodeletionen, die per Definition lichtmikroskopisch auf GTG-gebänderten Karyogrammen nicht erkannt werden können, angefangen. Diese Methode wird auch verwendet, um z.B. Bruchpunkte von strukturellen Veränderungen genauer einzuengen, als es mit der GTG-Bänderung möglich ist. Es

lassen sich Deletionen, nicht tandemartige Duplikationen, Inversionen und Translokationen bestimmen (Murken J. et al., 2006, Nussbaum RL. et al., 2007). Heute wird die FISH-Methode auch zur Validierung von Array-generierten Daten verwendet. Dafür muss die Veränderung aber eine entsprechende Größe haben (Feuk L. et al., 2006).

Es können diagnostische Sonden für bekannte Mikrodeletionen wie das Williams-Beuren-Syndrom (OMIM #194050), DiGeorge-Syndrom (OMIM #188400) usw. kommerziell erworben werden.

1.2.3 MLPA

Im Jahr 1988 wurde die Polymerase chain reaction (PCR) eingeführt (Saiki RA et al., 1988). Ohne diese enzymvermittelte Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wären solche Techniken, wie die weiter unten beschriebenen MLPA, Mikro-Arrays oder Next generation sequencing (NGS), nicht möglich.

Bei der Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), handelt es sich um eine PCR-basierte Methode, wobei im Multiplex-Verfahren Sonden für mehrere Genorte eingesetzt werden.

Beide MLPA-Primer bestehen je aus einer spezifischen Hybridisierungssequenz und einem Universalprimer (s. Abb. 1). Die spezifischen Sequenzen liegen so, dass das 3'-Ende der einen Sonde an das 5'-Ende der anderen anlagert und diese ligiert werden. Die Ligation kann nicht stattfinden, wenn an dieser Stelle eine Deletion vorliegt, oder sich genau an der Ligationsstelle ein SNP befindet und daher die letzte Base nicht paaren kann. Dann findet anschließend auch keine PCR statt und das entsprechende Fragment wird nicht amplifiziert. Am Ende der Reaktion erhält man Fragmente unterschiedlicher Längen, die mit Hilfe eines Kapillar-Elektrophorese-Gerätes detektiert werden können (Schouten P. et al., 2002).

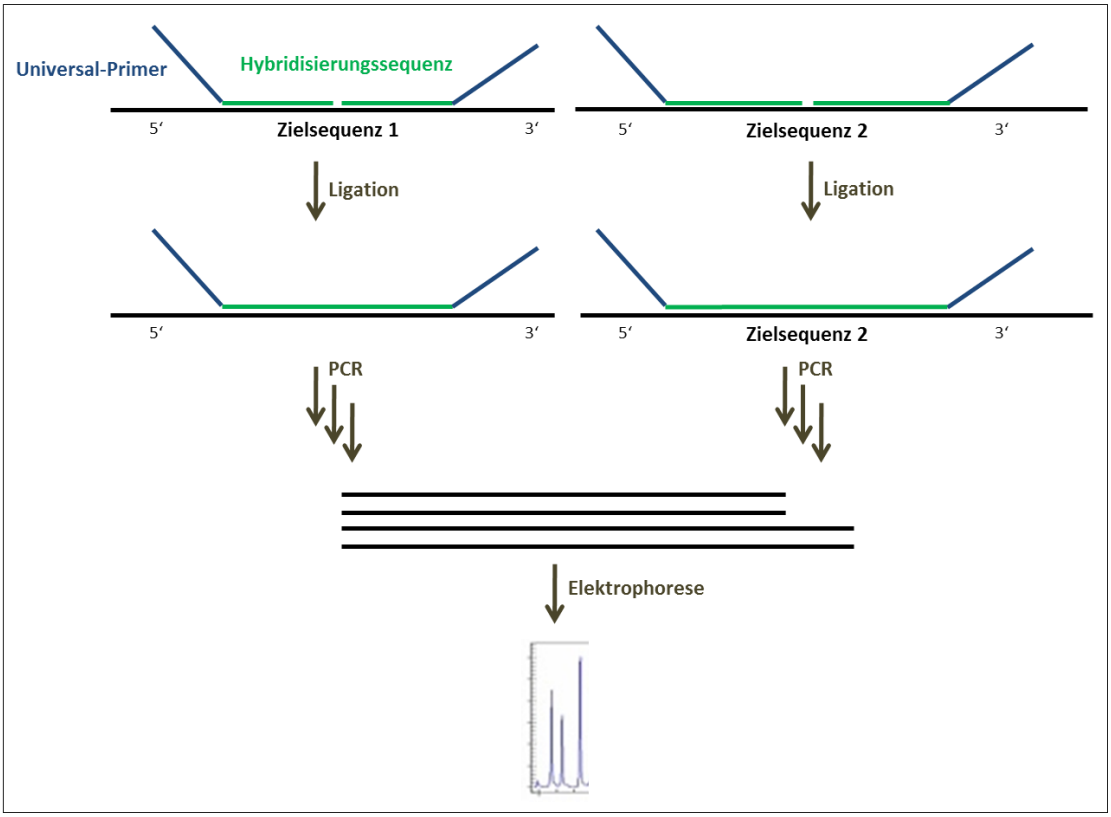


Abbildung 1: Das Funktionsprinzip der MLPA. Beide spezifische Hybridisierungssequenzen einer Sonde lagern sich an die Zielsequenz und werden miteinander ligiert. Dieser Bereich wird mittels der Universal-Primer in einer Multiplex-PCR amplifiziert, was für die jeweiligen Sonden unterschiedlich große PCR-Produkte ergibt. Diese werden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (verändert nach Schouten P. et al., 2002).

Mittlerweile können viele Kits zur Detektion von Deletionen und Duplikationen kommerziell erworben, aber auch selbst Sonden-Sets kreiert werden.

Mit dieser Methode können Deletionen ab einer Größe von 1 bp und auch SNPs detektiert werden (www.mrc-holland.com).

Diese Methode wird ebenfalls zur Validierung von Array-Daten verwendet. Da dabei aber keine Einzelsonden, sondern mehrere Sonden im Multiplex benutzt werden können, wird zwecks Validierung oft die quantitative PCR (qPCR) verwendet (Feuk L. et al., 2006). Diese Methode basiert auf der Verdoppelung der DNA-Menge bei jedem Amplifikationsschritt in der frühen Phase der PCR-Reaktion. Die Amplifikation der DNA kann durch den Einbau einer fluoreszierenden Substanz verfolgt werden, was in einem graphischen Plot dargestellt werden kann. Durch den Vergleich dieses Graphen mit dem eines bekannten DNA-Lokus mit bekannter Kopienzahl, kann auf die ursprüngliche DNA-Kopienzahl in der zu untersuchenden Probe rückgeschlossen

werden (Murken J. et al., 2006). Bei der Erstellung dieser Studie wurde diese Methode jedoch nicht angewandt.

1.2.4 DNA-Mikroarray

DNA-Mikroarrays entstanden aus der Notwendigkeit heraus, Kopienzahl-veränderungen genomweit, mit einer möglichst kleinen DNA-Ausgangsmenge und kostengünstig nachweisen zu müssen.

Diese Technologie ging aus Untersuchungen von Tumorgeweben hervor, die an Metaphasenchromosomen durchgeführt wurden. Dabei wurden gleichzeitig rot-fluoreszierende Referenz-DNA und grün fluoreszierende Tumor-DNA auf normale Metaphasen-Chromosomen hybridisiert. Die relative Menge der entsprechenden DNA-Abschnitte im Tumormaterial wurde dann anhand der Grün/Rot-Ratio ermittelt (Kallioniemi A. et al., 1992).

Eine Weiterentwicklung dieser Technologie führte dann zu den eigentlichen Mikroarrays. Dabei werden P1 artificial chromosome (PAC)-DNAs (Solinas-Toldo S. et al., 1997), Bacterial artificial chromosome (BAC)-DNAs (Pinkel D. et al., 1998), cDNAs (Pollack JR. et al., 1999), PCR-Produkte (Mantripragada KK. et al., 2004) oder schließlich Oligonukleotide (Brennan C. et al., 2004) auf eine feste Matrize, meist Glasobjektträger gespottet.

Bei der Entwicklung von verschiedenen Arraysystemen mussten zunächst technische Probleme, wie z.B. die Unterscheidung eines echten Signals vom Hintergrundrauschen (signal/noise ratio), gelöst werden. Die Korrektur von solchen und anderen Fehlern, die aus nicht biologischen Quellen stammen, nennt man Normalisierung (Khojasteh M. et al., 2005).

Mit der Einführung der Array-Technologie entdeckte man viele Copy Number Variations (CNVs), die definiert sind durch eine Größe von mehr als 1 kb und in phänotypisch normalen Individuen in unterschiedlicher Kopienanzahl vorkommen. Sie können bis zu mehreren Mb umfassen (Edelmann L. & Hirschhorn K., 2009). Im Durchschnitt sind 12 % des Genoms eines Individuums variabel (Rauch A., 2008).

Die Technologien, mit deren Hilfe Sonden auf die Chipoberfläche gebracht werden, haben sich mit der Zeit ebenfalls weiterentwickelt. Im Moment werden u. a. zwei Arten von Technologien verwendet. Die erste sieht die Synthese von Sonden direkt auf der Oberfläche des Chips mittels der Photolithographie und der sogenannten Ink-jet deposition vor (Gresham D. et al., 2008). Mit der zweiten Technologie werden vorgefertigte Oligonucleotide mittels Druckertechnologien auf Glas-Objektträger gespottet (Shalon D. et al., 1996).

Wie jede andere Technologie haben auch die DNA-Mikroarrays ihre Einschränkungen. Es können zwar kleine Duplikationen und Deletionen festgestellt werden. Bruchpunkte von Translokationen und Inversionen können aber nur erkannt werden, wenn es dort zu Verlust oder Zugewinn von DNA kommt.

Heute sind mehrere Mikroarray-Systeme kommerziell verfügbar. Dabei handelt es sich u. a. um BAC-CGH-Array-, Oligo-CGH-Array- und SNP-Array-Systeme. Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Technologien bezüglich der Abdeckung des Genoms in spezifischen Bereichen, der Qualität der Ergebnisse und der Auswahl der angebotenen Chips sind groß. Die Wahl einer Plattform und der verwendeten Chips sollte in Abhängigkeit von den Fragestellungen und Anforderungen des geplanten Experiments getroffen werden. (Curtis C. et al., 2009). Dazu zählt z.B. die grundlegende Frage, ob nur „Copy Number"-Informationen, oder auch Genotypdaten generiert werden sollen.

Die Array-Methoden sind relativ neu. Es gibt in kurzen zeitlichen Abständen neue Produkte auf dem Markt, für die noch keine Studien bezüglich der Verlässlichkeit der angezeigten Aberrationen existieren. Aus diesem Grund wird generell empfohlen, die generierten Daten mit einer unabhängigen Methode zu validieren (Rauch A. et al., 2008). Die Entwicklung geht in Richtung von immer dichteren Arrays. Die Grenzen dieser Entwicklung sind erreicht, wenn die Sonden so eng benachbart liegen, dass ein Abschnitt der Test-DNA gleichzeitig an zwei Stellen binden könnte (Curtis C. et al., 2009).

In den nächsten Kapiteln werden Mikro-Array-Technologien von Agilent, Affymetrix und Illumina vorgestellt, welche für die hier zusammengefassten Veröffentlichungen verwendet wurden.

1.2.4.1 Array-CGH

Das Prinzip der aCGH kommt der ursprünglichen Methode der CGH auf Metaphasenchromosomen am nächsten und wird hier am Beispiel des Mikroarray-Systems der Firma Agilent erläutert.

Dabei werden Oligonukleotide verwendet, die auf eine Matrix platziert werden und als Sonden fungieren. Agilent setzt dafür die „Ink-jet deposition"-Technologie ein (www.agilent.com). Zur Synthese werden die Nukleotide als Monomere mit Hilfe von Druckerköpfen auf Glasplatten gespottet (Hughes TR. et al., 2001). Auf diese Weise entstehen Oligonukleotide mit einer Länge von 60 bp. Eine limitierte Anzahl von Oligonukleotiden ist jeweils drei Mal auf den Chip gespottet und dient zu Kontrollzwecken.

Referenz- und Test-DNA werden dann mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen markiert und in der gleichen Menge auf die Sonden hybridisiert. Array-CGH wird deshalb auch als Zwei-Farben Experiment bezeichnet. Als Referenz- und Test-DNA können dabei Tumor- gegen Normal-Gewebe oder die DNA eines normalen gegen die DNA eines kranken Individuums eingesetzt werden (Gresham D. et al., 2008).

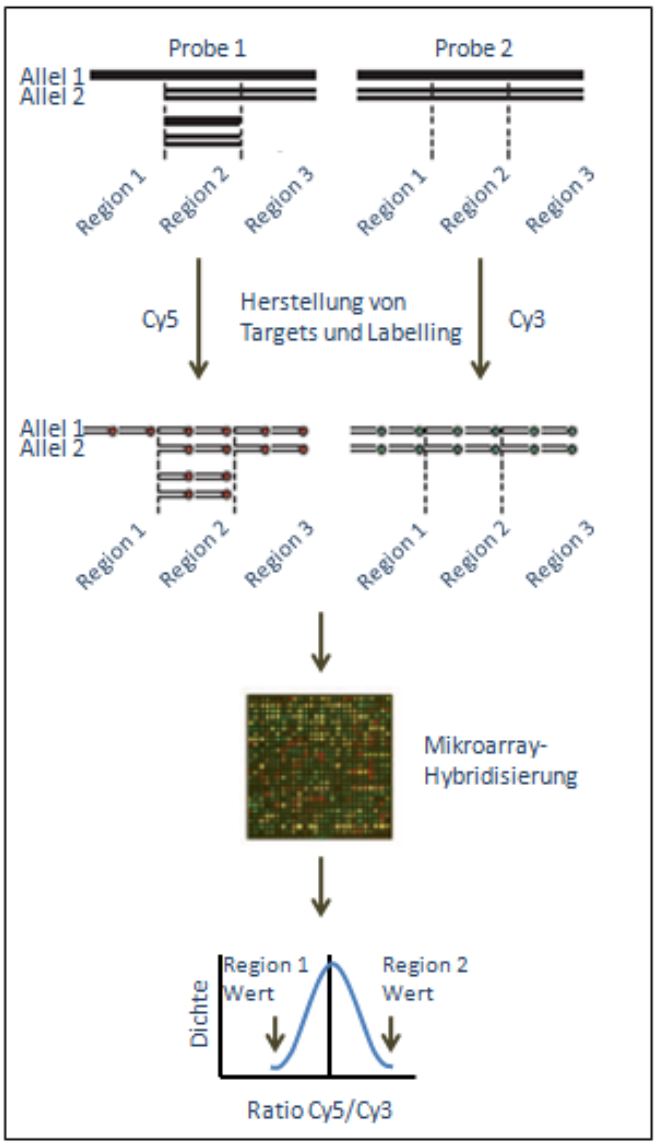


Abbildung 2: Prinzip der aCGH-Methodik. Referenz- und Test-DNA werden mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen markiert und in gleicher Menge auf die Sonden hybridisiert, die auf den Microarray-Chip gespottet sind (verändert nach Gresham D. et al., 2008). Nach der Hybridisierung wird der Objektträger gescannt und die Intensitäten einzelner Fluoreszenzfarbstoffe extrahiert. Das Hintergrundrauschen und die Differenz der Farbstoffhybridisierungseffizienz werden entfernt und erst dann die Kopienzahl durch das Verhältnis der zwei Fluoreszenzsignale ermittelt (Agilent Technologies Inc., 2008).

In dieser Arbeit wurde der Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 244A verwendet, der ca. 236 000 Sonden enthält. Alle anderen hier verwendeten Mikroarray-Chips haben eine dichtere Sondenabdeckung. In einer Studie wurde aber dieser Array mit drei von den Firmen Affymetrix, Illumina und NimblGen hergestellten Arrays verglichen und hat hinsichtlich fast aller Testkriterien die klarsten und eindeutigsten Ergebnisse gezeigt. Dabei wurden Kriterien wie das Signal/Rauschverhältnis, Streuung der Ergebnisse bei Wiederholungen von Versuchen, Klarheit der Ergebnisse bei unterschiedlich großen Aberrationen und bei Mosaiken mit unterschiedlichem Gehalt an aberranten Ziellinien usw. überprüft (Curtis C. et al., 2009).

1.2.4.2 SNP-Arrays

SNP-Array-Systeme unterscheiden sich von den oben genannten aCGH-Systemen in wenigen Punkten.

Der wichtigste Unterschied besteht darin, dass nur die Test-DNA mit einem Farbstoff markiert und hybridisiert wird. SNP-Array-Experimente werden deshalb auch als Ein-Farben Experimente bezeichnet. Nach der Hybridisierung wird ein absoluter Wert der Intensität ermittelt und der Vergleich mit der Referenz-DNA erfolgt *in silico*. Dabei gewinnt man nicht nur Informationen über die Kopienzahl, sondern gleichzeitig auch Genotyp-Daten (s. Abb. 3) (Gresham D. et al., 2008).

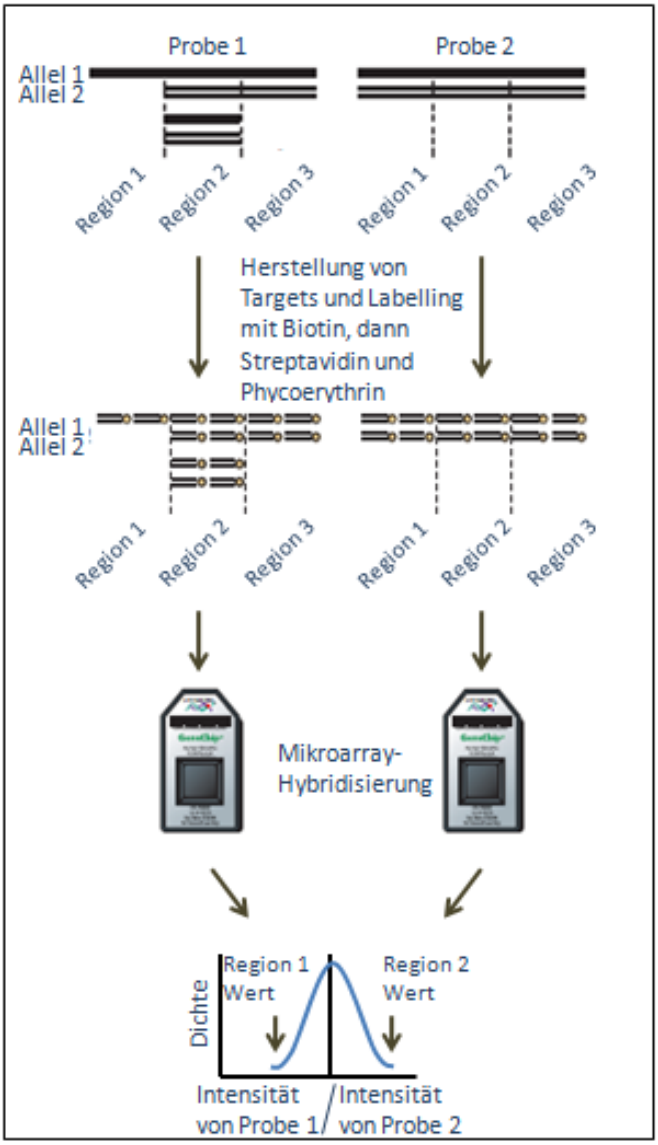


Abbildung 3: Prinzip der DNA-Mikroarray Methodik am Beispiel von Affymetrix-SNP-Arrays. Die Test-DNA wird mit einem Farbstoff markiert und mit den Sonden hybridisiert (verändert nach Gresham D. et al., 2008). Nach der Hybridisierung wird der Objektträger gescannt und die Intensitäten der Signale der Sonden extrahiert. Das Hintergrundrauschen wird entfernt. Die einzelnen Sondenintensitäten werden normalisiert und die Signalwerte für die einzelnen Allele berechnet. Die Kopienzahlen werden ermittelt durch den *in silico* Vergleich der normalisierten Signalwerte mit ebenso behandelten Referenz-Signalwerten aus früheren Experimenten.

Da SNP-Arrays auch Genotyp-Daten anzeigen, können damit der elterliche Ursprung einer *de novo* Deletion, und auch UPDs erkannt werden (Stankiewicz P. & Lupski JR., 2010). Diese sind sichtbar in Form von langen Strecken mit ausschließlich homozygoten SNPs, die als „Loss of heterozygosity" (LOH)-Regionen bezeichnet werden. Um die UPD aber als solche zu erkennen, müssen die Daten des Indexpatienten mit den elterlichen Genotypdaten verglichen werden (Dufke A. et al., 2008).

Für die im Anhang gezeigten Publikationen wurde der Human Mapping 500K SNP-Array und der Genome-wide Human SNP Array 6.0 der Firma Affymetrix und der Infinium HumanHap370 genotyping Beadchip SNP-Array der Firma Illumina verwendet. Im Folgenden werden die zwei zuletzt genannten SNP-Array-Systeme als Beispiele für die heute üblichen Analyseverfahren vorgestellt.

1.2.4.2.1 Affymetrix-SNP-Arrays

Die Chips von Affymetrix werden mit Hilfe der Photolithographie-Technologie hergestellt. Dabei wird eine feste Grundlage mit photolabilen Gruppen bedeckt. Diese werden dann durch eine phototolithographische Maske bestrahlt, was zur Ausbildung von Hydroxylgruppen an den lichtexponierten Stellen führt. Der Chip wird mit 3'-Phosphoramidit aktivierten Deoxynukleosiden beschickt, die am 5'-Ende eine photolabile Gruppe tragen, die nur an die Hydroxylgruppen binden können. Dieser Vorgang wird mit neuen Masken mit neuen Mustern wiederholt bis alle Nukleotide hergestellt sind (Pease AC. et al., 1994), die bei Affymetrix 25 Basen lang sind. Der hierfür verwendete Chip enthält ca. 940 000 CN Sonden und 900 000 SNPs (www.affymetrix.de) und ist somit derjenige mit der dichtesten Sondenabdeckung in dieser Studie.

Die Chip-Hybridisierung beginnt mit dem Restriktionsverdau der genomischen DNA mit *StyI* und der Ligation der Produkte mit dem Sty Adaptor, unabhängig von Fragmentlängen. Dasselbe wird mit dem Enzym *NspI* durchgeführt. Beide Adaptoren-Typen erkennen je 4 bp-Sequenzen an den Restriktionsschnittstellen. Immer noch getrennt, werden PCR-Reaktionen mit einem Primer durchgeführt. Nach einer Gelkontrolle, die Fragmentlängen von 200-1100 bp ergeben soll, werden alle PCR-Produkte einer Probe zusammengeführt und gereinigt. Die anschließende Fragmentierung mittels DNaseI auf Produkte kleiner als 180 bp soll die spätere Hybridisierung erleichtern. Beim Labelling werden die Fragmente mit Biotin und schließlich mit Streptavidin und Phycoerythrin versehen. Die DNA wird dann auf die Chips hybridisiert. Nach dem anschließenden Waschen und Färben können die Chips zur Detektion eingescannt werden (www.affymetrix.com; Affymetrix, 2008).

Nach dem Einscannen des Chips werden die Intensitäten der Signale der Sonden extrahiert. Nach dem Entfernen des Hintergrundrauschens werden die einzelnen Sondenintensitäten normalisiert (Bolstadt BM. et al., 2003) und die Signalwerte für die einzelnen Allele berechnet (Irizarry RA. et al., 2003). Auf diese Weise normalisierte Signalwerte werden *in silico* mit Referenz-Signalwerten aus bereits durchgeführten Experimenten verglichen und so die Kopienzahlen ermittelt (Gresham D. et al., 2008).

1.2.4.2.2 Illumina-SNP-Arrays

Die Chips dieser Firma werden wiederum mit einer anderen Methode hergestellt, einer Kombination aus Photolithographie und Plasmaätzung. Dabei wird die Silicon-Oberfläche des Chips mit einer photoresistenten Maske bedeckt und die kleinen Einbuchtungen, unter Verwendung von Plasmaätzung in die Siliconoberfläche des Chips, erzeugt. Die Oligos für die Sonden werden unter Verwendung der Oligator-Technologie hergestellt (www.illumina.com, Lebl M. et al., 2001). Die Beads selbst sind mit einer Silan-Verbindung beschichtet und werden nach weiteren chemischen Modifikationen mit Oligos versehen (Steinberg G. et al., 2004). Die einzelnen Oligo-Sondensets werden in 384-well Platten hergestellt und dann gepoolt. Die Chips werden mit Portionen aus diesem Pool beschickt (Steemers FJ. and Gunderson KL., 2007). Die Sonden sind somit an Beads gebunden, die durch Van-der-Waals Kräfte und hydrostatische Wechselwirkungen in den Einbuchtungen gehalten werden (www.illumina.com).

Die Hybridisierung beginnt mit einem isothermalen Whole-Genome Amplification-Schritt. Anschließend folgen eine enzymatische Fragmentierung bis zur Produktlänge von ca. 300 bp und die Hybridisierung auf dem Array. Die Sonden auf dem Array bestehen aus 80 bp langen Nukleotiden. Die ersten 30 bp sind Erkennungssequenzen, mit denen die Sondenidentität festgestellt wird, die restlichen 50 bp sind sequenzspezifisch. Die Hybridisierung findet über Nacht statt. Am nächsten Tag wird die Single base extension Technologie (SBE) angewandt, um die SNPs unterscheiden zu können. Dabei wird, wie der Name schon sagt, die Sonde entsprechend dem Template, also der Test-DNA, enzymatisch um eine Base verlängert. Die Basen A und T sind mit einem Farbstoff markiert, C und G mit einem anderen. Also können AT und CG Polymorphismen nicht unterschieden werden. Die Signale werden nun

immunohistochemisch verstärkt und durch Scannen mit einem zweifarbigen, konfokalen Lasersystem detektiert (Steemers FJ. and Gunderson KL., 2007).

Nach dem Einscannen des Objektträgers werden die Intensitäten extrahiert und das Hintergrundrauschen entfernt (Illumina; 2007). Die Genotypen werden errechnet, indem die normalisierten Daten mit Referenz-Daten in sogenannten Clustering-files verglichen werden. Diese stellen eine Zusammenfassung von Daten aus mindestens 100 Experimenten dar (Illumina 2010).

Die Suche nach Aberrationen wurde per Auge durchgeführt. Es wurde zunächst ein Mittelwert und die Standardabweichungen aus allen SNPs eines Chromosoms ermittelt. Wenn sich der Mittelwert der vermutlichen Aberration, die aus mindestens drei nebeneinander liegenden SNPs bestand, signifikant unterschied, wurd diese als echte Deletion oder Duplikation gewertet. Die Signifikanz wurde dabei mit Hilfe des zweiseitigen t-Tests ermittelt (Poot M. et al., 2010).

1.2.5 Reihenfolge der Untersuchungen

Typischerweise beginnt man die genetische Analyse mit der klassischen zytogenetischen Methode der GTG-Bänderung, und verfeinert die gewonnenen Erkenntnisse mit anderen Methoden wie z.B. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), C-Bänderung, Silbernitrat-Färbung der sogenannten Nucleolar organization region (Ag-NOR) usw. Für die noch feinere Analyse werden dann molekularzytogenetische Methoden wie MLPA und Array-basierten Technologien eingesetzt. Für die Analyse von bestimmten Phänotypen, wie z.B. der MR wird momentan die Verwendung von Array-basierten Technologien bereits zu Beginn der Diagnostik diskutiert, da auf diese Weise kleinere Veränderungen schneller detektiert werden (s. 1.2.2 FISH) und die Erfolgsrate für die Klärung der Ursachen für diesen Phänotyp höher ist (Edelmann L. & Hirschhorn K., 2009).

1.2.6 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Nachdem die genetische Untersuchung eines Patienten durchgeführt und Veränderungen gefunden wurden, gilt es eine Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp herzustellen.

Die Interpretation der Relevanz von genetischen Befunden hat in den verschiedenen Zeitperioden der Entwicklung von Methoden ähnliche Schwierigkeiten erlebt. In der Zeit vor der Entwicklung der Bänderungstechniken konnten die einzelnen Chromosomen kaum voneinander unterschieden werden. Aber schon damals wurden Veränderungen festgestellt, die als nicht krankheitsrelevante Varianten eingestuft wurden. Dazu zählten Varianten in den kurzen Armen (Satellitenregionen) der akrozentrischen Chromosomen (13-15, 21, 22), sekundäre Einschnürungsstellen, fragile Stellen und Größenvarianten in bestimmten heterochromatischen Regionen. Mit der Einführung von Bänderungstechniken wurden die vorher entdeckten Varianten bestätigt und weitere entdeckt. Man stufte alle mikroskopisch sichtbaren Heterochromatinvarianten in den Chromosomen 1, 3, 9, 16, Y als benigne ein (Feuk L. et al., 2006). Es wurden auch euchromatische benigne Varianten lichtmikroskopisch gefunden. Eine neuere Studie hat aber gezeigt, dass diese nicht immer benigne sind.

Dabei wurden Familien mit vererbten unbalancierten Translokationen untersucht, die durchschnittlich 10 Mb-große Deletionen hatten. In 59% der Fälle hatten betroffene Eltern und Kinder dieselbe Translokation. In den restlichen Familien war entweder kein krankheitsassoziierter Phänotyp (18%) zu sehen oder dieselbe Translokation war in betroffenen und nichtbetroffenen Familienmitgliedern (23%) zu beobachten. Bei Familien mit euchromatischen Varianten waren 54% phänotypisch normal. In 43 % der Fälle hatten betroffene und nichtbetroffene Individuen dieselbe Variante und in 3% der Familien war eine Co-Segregation von Variantenträgern mit einem milden Phänotyp zu beobachten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Großteil von Translokationsträgern und ein sehr kleiner Prozentsatz von Trägern euchromatischer Varianten phänotypisch auffällig sind (Barber JCK., 2005). In der Routine-Praxis wurde auch in der Zeit der Bänderungstechniken überprüft, ob das Vorhandensein eines Phänotyps mit der Veränderung co-segregiert mit eventuellen Rückschlüssen auf Kausalität.

Mittlerweile weiß man, dass es nicht nur benigne und krankheitsrelevante CNVs gibt. CNVs können auch einen subtileren Einfluss nehmen, z.B. auf Reaktionen auf Medikamente (Feuk L. et al., 2006) oder auf die Fitness. Es wurde auf dem Chromosom 17q21.31 ein 900 kb großer Inversionspolymorphismus in 20% der europäischen Population entdeckt, der von segmentalen Duplikationen umgeben ist. Eine weltweit durchgeführte Genotypisierung ergab eine positive Selektion dieser Inversion bei der

isländischen Bevölkerung, da Trägerinnen höhere Rekombinationsraten und mehr Kinder hatten als Nicht-Trägerinnen (Stefansson H. et al., 2005). In einer anderen Publikation wurde festgestellt, dass Träger einer niedrigeren Kopienzahl des Gens *CCL3L1* als der Bevölkerungsdurchschnitt, mit einer erhöhten HIV Anfälligkeit assoziiert ist (Feuk L. et al., 2006).

In einer weiteren Studie ist bewiesen worden, dass die mittels G-Bändern sichtbaren Polymorphismen mit einer populationsspezifischen Häufigkeit auftreten können. Sehr deutlich ist es bei der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 zu sehen. Am häufigsten tritt dieser Polymorphismus in der schwarzen amerikanischen Bevölkerung auf (3,57 %), weniger häufig bei dem hispanoamerikanischen Bevölkerungsanteil (2,42 %), dem weißen (0,73 %) und asiatischen Anteil (0,26 %) (Hsu LY. et al., 1987). Ausgehend von diesen Daten kann bei Polymorphismen im Allgemeinen auf eine bevölkerungsspezifische Häufigkeit zurückgeschlossen werden.

Die FISH und MLPA wurden unterstützend angewendet, um Ergebnisse, die mit der klassischen Karyotypisierung gemacht wurden, zu verfeinern. Mit beiden Methoden können bestimmte Loci überprüft werden. Sind die Grenzen der Veränderungen genauer abgesteckt, ist die Beteiligung bestimmter Regionen bei der Phänotyp-Genotyp-Korrelation ein- oder ausgeschlossen. Auf diese Weise können Kandidatengene oder Kandidatengen-Regionen spezifischer eingeengt sein. Als Beispiel kann die Suche nach den Ursachen für die chronische myeloide Leukämie (CML) dienen. 1960 wurde das Philadelphia Chromosom entdeckt. 1972 wurde mittels Quinacrin-Fluoreszenz und Giemsa-Färbung gezeigt, dass es sich um ein Translokationsprodukt zwischen den Chromosomen 9 und 22 handelt. Die Untersuchung der Bruchpunktregion ergab 1984 die Fusion der Gene *BCR* und *ABL*. 2002 wurde schließlich ein Medikament entwickelt, das die Funktion des krebsverursachenden Fusionsproteins einer Tyrosinkinase (BCL-ABL) blockiert (Trask BJ., 2002).

Mit der Entwicklung der Mikro-Arrays können gleichzeitig viele genetische Veränderungen bei einem Individuum gefunden werden. Nun liegt die Schwierigkeit nicht darin CNVs zu finden, sondern bei der Datenauswertung krankheitsverursachende von benignen Veränderungen zu unterscheiden (Rauch A.; 2008). Im Gegensatz zu den älteren Methoden, muss die Frage nach der

Krankheitsrelevanz mehrerer veränderter Regionen bei einem Individuum beantwortet werden. Man orientiert sich an den vorher gesammelten Erfahrungen. Rearrangements, die Heterochromatinregionen betreffen oder Varianten, die ererbt sind, werden eher als wahrscheinlich nicht ursächlich eingestuft. Sind Veränderungen *de novo,* unbalanciert, beinhalten sie Regionen mit einer hohen Gendichte oder sie betreffen Gene und/oder regulatorische Elemente, dann werden diese als wahrscheinlich ursächlich eingestuft (Feuk L. et al., 2006). Ein Individuum kann aber auch mehrere derartigen Veränderungen aufweisen. Dabei müssen noch Mechanismen der Entstehung von Phänotypen berücksichtigt und für jeden einzelnen Fall untersucht werden, z.B. dass dieselbe Mutation in verschiedenen Individuen unterschiedliche Phänotypen verursachen kann oder dass derselbe Phänotyp von Mutationen in differenten Loci oder sogar einer Kombination von Mutationen in verschiedenen Loci entstehen kann (Nussbaum RL. et al., 2007) usw. Unter anderem musste für diese Probleme während dieser Studie für die untersuchten Individuen eine Lösung gefunden werden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wurden mehrere Syndrompatienten mit unterschiedlichen Phänotypen untersucht. Dabei wurden verschiedene gängige und etablierte klassische zytogenetische und molekular-zytogenetische Methoden verwendet wie die GTG-Bänderung, FISH und MLPA. Eine der neuesten technischen Entwicklungen bei der Suche nach Aberrationen stellen verschiedene Mikro-Array-Systeme dar, die trotz einer rapide breiter werdenden Anwendung noch Schwierigkeiten bei der Evaluation der Daten machen. Arrays machen die erste mehr oder weniger vollständige genomweite, molekular-zytogenetische Analyse möglich. Das Hauptziel dieser Arbeit war es in der Übergangsphase zwischen der konventionellen zur molekularen Zytogenetik eine Evaluation von verschiedenen Array-Methoden, bei der Untersuchung von einzelnen bis wenigen Syndrompatienten in Bezug auf bestimmte Phänotypen zu geben. Die Patienten wurden so gewählt, dass verschiedene Regionen, Arten und Entstehungsmöglichkeiten bezüglich der jeweiligen genetischen Veränderungen angenommen und untersucht werden mussten, um die Möglichkeiten der neuen Technik auszuschöpfen.

Die Methoden sollten dabei so angewandt werden, dass sie einander ergänzten, bestätigten und gegenseitige Limitationen umgingen. Die Informationen über die genetischen Veränderungen sollten so vollständig und gesichert wie möglich sein.

Eine weitere Aufgabe bestand darin, die mit Hilfe der oben genannten Methoden erhaltenen Daten mit den phänotypischen Befunden bei den Indexpatienten zu korrelieren. Dafür sollten nicht relevante Daten aussortiert und schlussendlich die für die Krankheiten ursächlichen Regionen oder Gene identifiziert werden.

2 Kritische Evaluation und allgemeine Diskussion

2.1 Zusammenfassung der publizierten Ergebnisse

Diese kurze Zusammenfassung dient einem schnellen Überblick über die im Anhang dargestellten Publikationen mit einem Fokus auf die verwendeten Methoden und die dadurch gewonnen Teilergebnisse.

Die in den unten beschriebenen Arbeiten untersuchten Patienten wurden alle für diese Studie ausgewählt, weil sie den Einsatz von etablierten und neuen Methoden rechtfertigten. Die mit alten und neuen Methoden gewonnenen Ergebnisse sollten miteinander verglichen werden und einander ergänzen können.

2.1.1 Anhang 1: Damatova N. et al.; Cytogenet Genome Res, 2009

Haploinsufficiency of 16.4 Mb from Chromosome 22pter-q11.21 in a Girl with Unilateral Conductive Hearing Loss

In dieser Studie wurde nach den genetischen Ursachen für die einseitige Schalleitungshörstörung bei einem Mädchen gesucht. Außerdem war bei der Indexpatientin eine einseitige Ptosis zu beobachten, die allerdings bei der gesunden Schwester bei Ermüdung ebenfalls auftrat. Die Patientin hatte außerdem eine vorzeitige Telarche (Tanner stage 2) im Alter von 5 Jahren, die sich bis zum Alter von 7 Jahren nicht weiterentwickelt hatte. Diese Patientin ist ausgesucht worden, da hier die konventionelle Karyotypisierung einen Befund ergab, der mittels etablierter älterer Techniken sowie einer Array-basierten Methode untersucht werden konnte, um die Befunde miteinander vergleichen zu können.

Die GTG-Bänderung zeigte, dass ein Chromosom 22 auf ein Chromosom 18 transloziert ist und ergab die Karyotypformel 45,XX,der(18)t(18;22)(p11.32;q11.21) bei der Index-Patientin und normale Karyotypen bei den Eltern und der Schwester. Laut der Short Tandem Repeat- (STR)-Analyse stammt das derivative *de novo* Chromosom 18 aus der paternalen Keimbahn.

Mittels FISH- und dann MLPA-Subtelomerscreening konnte festgestellt werden, dass weder der Bruchpunkt, noch der von der Deletion betroffene Bereich auf Chromosom 18 Gene enthält. Der Bruchpunkt auf Chromosom 22 wurde sukzessiv eingeengt

zunächst mit selbsthergestellten FISH-Sonden auf BAC-Basis auf ein Intervall von 120 kb, dann mit einem selbstherstellten MLPA-Sondenset auf 45 kb und anschließend mit dem Affymetrix GeneChip Genome Wide Human SNP array 6.0 auf 5.7 kb. Mit dem MLPA-Sondenset wurde zudem ein Deletionspolymorphismus im *CECR6*-Gen entdeckt. Die heterozygote Deletion umfasst somit die Gene *POTEH*, *OR11H1*, *CT8L2*, *XKR3*, *GAB4*, *IL17RA*, *CECR6*, *CECR5*, *CECR1* und *CECR2* und eventuell die 5'-UTR des *SLC25A18* Gens.

Dieser Bereich überlappt mit der Region des Cat eye syndrome (CES #115470), das allerdings von einer Duplikation herrührt. Eine Recherche zu jedem einzelnen Gen ergab, dass nur die Gene *CECR5*, *CECR1* und *CECR2* in der CES eine Dosissensitivität haben und somit möglicherweise den Phänotyp erklären. Allerdings könnte die Deletion auch eine rezessive Mutation in den Genen *GAB4*, *IL17RA*, *CECR6*, *CECR5*, *CECR1* und/oder *CECR2* demaskiert haben.

2.1.2 Anhang 2: Behnecke A. et al; Am J Med Genet, 2010

Intragenic Deletions of *IL1RAPL1*: Report of Two Cases and Review of the Literature

Diese Patienten wurden aufgrund einer vorhandenen MR untersucht, die einen der Schwerpunkte des Einsatzes von Array-basierten Methoden darstellt.

Beide, miteinander nicht verwandten Patienten hatten MR, Verhaltensauffälligkeiten und Dysmorphiezeichen. Bei beiden Patienten ergaben zytogenetische Untersuchungen und MLPA mit Subtelomersonden keine Auffälligkeiten. Erst die SNP-Array-Analyse konnte bei beiden Patienten unterschiedliche Deletionen im X-chromosomalen *IL1RAPL1*-Gen nachweisen. Die Deletionen wurden mittels FISH und Multiplex-PCR verifiziert. Beim ersten Patienten war die Deletion *de novo* entstanden, beim zweiten wurde sie mittels FISH auch bei Mutter, Tante und Cousin des Indexpatienten nachgewiesen.

Die Datenbank-Recherche ergab, dass die oben beschriebene Deletion die MR der Patienten erklärt. Es sind mehrere Arten von intragenischen Mutationen und Deletionen dieses Gens bekannt. Zudem wurden „contiguous gene"-Syndrome beschrieben, die dieses Gen umfassen und zu unterschiedlichen Phänotypen führen. Es

kann jedoch noch keine genaue Korrelation zwischen der Art und Lokalisation einer Mutation und einem charakteristischen Phänotyp hergestellt werden. Dafür werden zusätzliche Fälle mit ähnlichen Veränderungen benötigt.

2.1.3 Anhang 3: Bartsch O. et al.; Am J Med Genet, 2010

Fulminant Hepatic Failure Requiring Liver Transplantation in 22q13.3 Deletion Syndrome

In dieser Studie wird ein Fall autoimmunbedingten Leberversagens vorgestellt, der nach einer normalen Erkältung auftrat und eine Lebertransplantation notwendig machte. Ein anderer, bereits veröffentlichter und ähnlich gelagerter Fall wurde mit einbezogen. Beide Patienten haben das Phelan-McDermid Syndrom (OMIM #606232), das jedoch nicht das Symptom des plötzlichen Leberversagens mit einschließt. Unser Indexpatient hatte eine fehlende Sprachentwicklung und eine mittel- bis hochgradige Entwicklungsverzögerung. Nach der Lebertransplantation zeigte sich jedoch ein Aufholen in der Entwicklung. Mit dieser Studie sollte festgestellt werden, ob der Einsatz einer höher auflösenden Technologie die genetische Ursache für ein untypisches Symptom bei einem gut charakterisierten Syndrom finden kann.

Die GTG-Bänderung ergab einen normalen Karyotyp. Eine MLPA mit Subtelomersonden zeigte eine Deletion im Chromosom 22q, die mit FISH-Sonden bestätigt werden konnte. Um die Deletion genauer einzuengen, wurden bei beiden Patienten Array-Analysen durchgeführt. Eine anschließende Datenbank-Recherche ergab, dass bei beiden Patienten das *PIM3*-Gen deletiert ist. *PIM3* ist ein Kandidatengen, welches das Leberversagen erklären könnte. *SHANK3/PROSAP2*, das als Ursache für die neurologischen Ausfälle des o. g. Syndroms gilt, könnte ebenfalls die Autoimmun-Reaktion erklären.

2.1.4 Anhang 4: Poot M. et al.; Neurogenetics, 2010

Disruption of *CNTNAP2* and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder

Hier wird ein autistischer Junge mit einer Entwicklungsverzögerung, Sprachentwicklungsstörung, gewalttätigen Ausbrüchen und anderen Symptomen untersucht. Dieser Phänotyp ist komplex und es sollte untersucht werden, ob der

Einsatz von Array-Technologien bei einem Fall mit vielfältigen Störungen zum Erfolg führt.

Die GTG-Bänderung ergab eine *de novo* perizentrische Inversion im Chromosom 7q. Eine Überprüfung mit FISH konnte aber ein kompliziertes Ereignis mit sieben Bruchpunkten auf dem Chromosom 7 im Gen *CNTNAP2* und drei Bruchpunkten auf Chromosom 1 aufdecken. Zwei Abschnitte aus dem Gen *CNTNAP2* auf Chromosom 7 sind in Chromosom 1 transponiert. Die SNP-Array-Analyse ergab zusätzlich je eine Deletion im *CNTNAP2*–Gen und in Chromosom 1q41 sowie eine Duplikation in Chromosom 1p32.3, die dann mit FISH verifiziert wurden. Mittels Datenbank-Recherche wurden außer *CNTNAP2* noch die Gene *KCTD3* und *USH2A* in der deletierten Region 1q41 gefunden, die alle drei mit Autismus assoziiert sind und wahrscheinlich zusammen diesen Phänotyp verursacht haben. Bestimmte Arten von Veränderungen im *CNTNAP2*–Gen sind auch mit dem Gilles de la Tourette-Syndrom assoziiert. In diesem Fall könnte das die gewalttätigen Ausbrüche erklären. Keiner der bis heute entdeckten Mechanismen, die zu Chromosomenbrüchen führen, kann die Entstehung des *CNTNAP2*-Rearrangements erklären.

2.1.5 Anhang 5: Zechner U. et al.; Clin Genet, 2009

Epimutation at human chromosome 14q32.2 in a boy with a upd(14)mat-like clinical phenotype

In dieser Studie wird ein Junge mit einer Sprachentwicklungsverzögerung und Adipositas aufgrund einer Hyperphagie beschrieben. GTG-Bänderung, Subtelomer-FISH und MLPA mit Sonden für die üblichen Mikrodeletions- und Mikroduplikationssyndrome waren unauffällig. Das Vorliegen eines mit diesem Phänotyp assoziierten Prader-Willi-Syndroms wurde durch eine *SNRPN*-Methylierungsanalyse ausgeschlossen. Die vorliegenden Symptome passen auch zum Phänotyp des maternalen UPD 14 (upd(14)mat)-Syndroms, das neben einer maternalen UPD von Chromosom 14 auch eine Mikrodeletion oder Epimutation in Chromosom 14q32.2 als Ursache haben kann. Daher wurde in der chromosomalen Region 14q32.2 nach Veränderungen gesucht. Dieser Patient ist für die Studie aufgrund einer kleinen umschriebenen Region ausgewählt worden. Es sollte festgestellt werden, ob nach einer erschöpfenden Analyse einer kleinen Region mit konventionellen Methoden der Einsatz einer Array-Methode angezeigt ist.

Es wurde eine Hypomethylierung der *MEG3*-DMR entdeckt, wie es bei upd(14)mat-Patienten typischerweise der Fall ist. Die Methylierung von Imprintingkontrollregionen auf anderen Chromosomen war unauffällig. Die Analysen von auf Chromosom 14 gelegenen STR- und SNP-Markern zeigte Allele von beiden Elternteilen, wodurch eine UPD14 ausgeschlossen werden konnte. Zur Bestätigung und der Erfassung der restlichen Region wurden FISH-Analysen durchgeführt und zusätzlich „Long range"-PCR Produkte des Patienten und eines gesunden Individuums hergestellt und mit Restriktionsenzymen geschnitten. Das ergab Fragmente gleicher Länge, so dass eine Mikrodeletion ausgeschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen die Limitationen der Array-Methode, da die Veränderung zu klein für eine verlässliche Detektion gewesen wäre. Daher wurde davon ausgegangen, dass der Phänotyp des Patienten auf eine Epimutation in der 14q32.2-Region zurückzuführen ist. Eine Literatur-Recherche ergab überdies, dass eine volle UPD(14)mat einen etwas anderen Phänotyp, als eine Epimutation oder Mikrodeletion der Region 14q32.2 bedingt. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen dieses Falls überein.

2.2 Allgemeine Diskussion

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Publikationen wurden verschiedene Kombinationen von zytogenetischen und molekularzytogenetischen Methoden erfolgreich zur Charakterisierung von genetischen Veränderungen eingesetzt. Die Methoden haben einander ergänzt und bestätigt. Das ermöglichte eine Evaluation der Einsatzmöglichkeit von Array-Methoden bei Syndrompatienten. In diesem Abschnitt werden auch die Stärken und Limitierungen der verwendeten Methoden diskutiert.

2.2.1 GTG-Bänderung

Die Stärke der Bänderungstechnik liegt darin, Genommutationen wie Triploidien und Chromosomenmutationen wie Deletionen, Duplikationen, balancierte und unbalancierte Translokationen, Inversionen und Ringchromosomen zu erkennen.

Die größte Limitierung dieser Methode stellt die Auflösung dar. Es können nur Veränderungen über 5 Mb Größe erkannt werden (Murken J. et al., 2006). Die Auflösung wird allerdings in den meisten Fällen nicht erreicht, da hierfür eine Präparation der Chromosomen in der frühen Phase der metaphasischen Kondensation benötigt wird. Eine Angabe über die Lokalisation des Bruchpunktes einer Translokation kann deshalb nur recht grob ausfallen (s. 2.1.1 Anhang 1). Zudem kommt hinzu, dass das richtige Erkennen und Zuordnen der Chromosomen und von strukturellen Anomalien viel Erfahrung erfordert.

In den hier vorgestellten Publikationen stammen die Fälle aus der zytogenetischen Routinediagnostik, die immer mit der GTG-Bänderung beginnt. Im 1. Fall mit der Karyotypformel 45,XX,der(18)t(18;22)(p11.32;q11.21) konnten beide Bruchpunkte auf Bandenniveau eingeengt werden. Der Bruchpunkt wurde im Chromosom 18 in der telomernahen Bande vermutet, die 2,9 Mb groß ist und Gene enthält. Der Bruchpunkt im Chromosom 22 wurde in der Bande q11.21 vermutet, die 4,3 Mb beinhaltet (s. 2.1.1 Anhang 1).

Ergab sich bei der Bänderungsanalyse eine Auffälligkeit, wurde diese intensiver untersucht (s. 2.1.1 Anhang 1, 2.1.4 Anhang 4). Wenn bei einem auffälligen Phänotyp der Karyotyp aber normal war, wurden andere Methoden des genomweiten Screenings verwendet, wie z.B. das Subtelomerscreening mittels FISH- und/oder

MLPA-Analyse (s. 2.1.2 Anhang 2, 2.1.3 Anhang 3, 2.1.5 Anhang 5) bzw. die MLPA mit Sonden für häufige Mikrodeletions-/Mikroduplikations-Syndrome (s. 2.1.5 Anhang 5). Wurden dann Veränderungen gefunden, waren sie immer wesentlich kleiner, als die Auflösungsgrenze der Bänderung, wie z.B. die Deletion im *IL1RAPL1*-Gen, die ca. 0.5 Mb beträgt (s. 2.1.2 Anhang 2).

Die GTG-Bänderung wird in der Diagnostik bereits seit Jahrzehnten erfolgreich angewendet. Obwohl die Ablösung dieser Methode schon sehr lange vorausgesagt wird, ist noch kein wirklich adäquater Ersatz gefunden worden. Vor allem in der Pränataldiagnostik bleiben große Diagnostikeinrichtungen, wie z.B. das American College of Obstretricians and Gynecologists (ACOG) bei der Anwendung der konventionellen Karyotypisierung (Hillman SC. et al., 2011).

2.2.2 FISH

Diese Methode erlaubt eine höhere Auflösung als die GTG-Bänderung. Es können verschiedene Materialien für die Sondenherstellung verwendet werden. Hier wurden BACs eingesetzt, die 50-200 kb lang sind (s. 2.1.1 Anhang 1, 2.1.4 Anhang 4). Um die Auflösung noch mehr zu erhöhen, können Sonden auch aus Long Range PCR Produkten hergestellt werden, die bis zu ca. 10 kb groß sein können (Trask BJ., 2002). In der Publikation unter Anhang 5 wurde erfolgreich eine ca. 5 kb große Sonde aus einem Long range PCR-Produkt verwendet.

Mit dieser Technik können Translokationen, Inversionen, Deletionen feinkartiert werden, Duplikationen jedoch nur dann, wenn sie nicht tandemartig sind. Verschieden große oder intensive Signale auf homologen Chromosomen können zwar als tandemartige Duplikation gewertet werden, aber auch dadurch verursacht werden, dass eines der beiden Chromosome etwas weniger kondensiert ist. Bei der Verwendung von BACs musste auch bedacht werden, dass manche in Datenbanken falsch annotiert waren. Ob das der Fall war, konnte anhand von Hybridisierungen an Metaphasen von gesunden Individuen festgestellt werden (s. 2.1.4 Anhang 4, Daten nicht dargestellt). Bei der Kartierung von Bruchpunkten musste auch in Kauf genommen werden, dass auch schon Teilhybridisierungen eines BACs schon ein Signal ergeben. Eine weitere Limitierung dieser Technik lag im hohen zeitlichen Aufwand, den die Sondenherstellung benötigte. Der Einsatz des Probanden-Materials für die Herstellung von Metaphasenpräparaten war ebenfalls hoch, und war ein

limitierender Faktor für die FISH-Untersuchung in der Publikation unter Anhang 1. Das war einer der Gründe für das Ausweichen auf das selbsthergestellte MLPA-Sondenset, obwohl die Möglichkeiten der FISH-Methode noch nicht erschöpft waren.

Bei den hier diskutierten Veröffentlichungen wurde FISH zur Bruchpunktkartierung angewendet. Wie bereits oben erwähnt, benötigte man hierfür einen Vorbefund als Ansatzpunkt, wie z.B. ein mittels GTG-Bänderung gefundener Translokations-bruchpunkt, was man in der Veröffentlichung unter Anhang 1 sehen kann. Der Bruchpunkt auf Chromosom 18 wurde mit zwei FISH-Sonden bis auf 100 kb eingeengt. Der Bruchpunkt auf Chromosom 22 wurde mit mehreren Sonden auf 120 kb eingeengt. Die etwas redundante Bruchpunktkartierung wurde mit der GTG-Bänderung, FISH, MLPA und dann SNP-Arrays durchgeführt. Die Array-Methode hätte auch direkt nach der Bänderung angewendet werden können. Die Reihenfolge wurde bestimmt durch die immer feiner werdende Auflösung der Methoden, wobei die mit verschiedenen Techniken erzielten Ergebnisse einander bestätigten.

Bei der Veröffentlichung im Anhang 4 wurde mittels der FISH-Methode ein sehr komplexes Ereignis untersucht. Der erste Ansatzpunkt für die Bruchpunktkartierung war eine zytogenetisch gefundene Inversion auf Chromosom 7. Die Bruchpunkte der Inversion wurden mittels FISH eingegrenzt und es wurden zusätzlich zwei Insertionen in das Chromosom 1 gefunden, die bei der nachfolgenden Array-Analyse nicht gesehen wurden. Die zwei mit Array-CGH bis dahin unentdeckten Deletionen und eine Duplikation wurden auch via FISH bestätigt. Die Interpretation von FISH-Daten war in diesem Fall schwierig, da viele Umbauten und veränderte Hybridisierungsmuster beachtet werden mussten.

Bei der Publikation unter Anhang 5 wurde eine Deletion mit mehreren Methoden ausgeschlossen. Dazu wurden SNPs und Mikrosatelliten-Marker genotypisiert. Diese Analysen konnten beide elterlichen Allele nachweisen. Sie erlauben aber nur eine punktuelle Überprüfung der Region. Es wurden auch die Längen von PCR-Produkten, die mit Restriktionsenzymen geschnitten wurden, mittels Gelelektrophorese verglichen. Mit der durchgeführten FISH-Analyse konnte eine Region besser abgedeckt werden. Mit den beiden zuletzt beschriebenen Methoden konnte aber eine kleine Deletion übersehen werden.

Auch wenn FISH mit der Einführung von „High Density"-Arrays zur Bruchpunktkartierung von unbalancierten Deletionen und Duplikationen nicht mehr gebraucht wird, ist die Verwendung dieser Technik für die Validierung und wie man oben gesehen hat, zur Vervollständigung von Array-generierten Daten noch sehr aktuell, wenn die Veränderungen groß genug sind.

2.2.3 MLPA

Der Vorteil dieser Technik liegt darin, dass mit Einsatz von sehr geringen DNA-Mengen viele Fragen beantwortet werden konnten. Es gibt mittlerweile auch viele Sondensets zu erwerben, die auf bestimmte Fragestellungen abgestimmt sind (www.mrc-holland.com). In den hier beschriebenen Veröffentlichungen wurde MLPA nach der GTG-Bänderung verwendet (s. 2.2.1 GTG-Bänderung).

Das Ziel war ein grobes Screening des gesamten Genoms mit Sets von Subtelomersonden und Sonden für Mikrodeletions-/Mikroduplikations-Syndrome (s. 2.1.1 Anhang 1, 2.1.2 Anhang 2, 2.1.3 Anhang 3, 2.1.5 Anhang 5). In der Studie im Anhang 1 kam noch hinzu, dass auf diese Weise die FISH-Befunde bestätigt und spezifiziert werden konnten. Die beiden mittels der Subtelomerkits getesteten Gene *USP14* und *THOC1* auf Chromosom 18p liegen im Bereich der überprüften FISH-Sonde und bestätigten, dass dieser Bereich nicht deletiert ist. Auf Chromosom 22 liegen die MLPA-Sonden desselben Kits so, dass sie nicht aufschlussreich über die Bruchpunktregion waren. Also musste ein Kit mit Sonden für Gene in diesem Bereich hergestellt werden. Das erlaubte eine Einengung des Bruchpunktes von 120 kb durch FISH auf einen Bereich von 45 kb mittels MLPA. Mit Hilfe dieses Sonden-Sets wurde ein Screening von phänotypisch unauffälligen Personen durchgeführt und ein Deletionspolymorphismus im *CECR6*-Gen aufgedeckt. Unerwarteterweise konnten keine Duplikationen gefunden werden. Es könnte sich dabei aber auch nur um einen SNP handeln, der genau in der Ligationsstelle der beiden Primer liegt, was jedoch nicht nachuntersucht wurde (s. 2.1.1 Anhang 1).

Wie bereits erwähnt, können die MLPA-Sonden nicht ligiert werden, wenn die Base an der Ligationsstelle der beiden Primern nicht da ist, was auf eine größere Deletion in dem Bereich hindeutet, oder wie bei einem SNP eine andere als erwartet ist. Die Hersteller der Subtelomer-Sondensets z.B. gehen davon aus, dass bei nicht erfolgter Bindung der Sonde die Region von der jeweiligen Position bis zum Telomer fehlt, was

nicht korrekt ist, denn es kann auch nur ein kleiner Teil des Subtelomerbereichs fehlen. Denselben Vorwurf könnte man natürlich auch bei der Verwendung von FISH-Subtelomersonden (s. 2.1.1 Anhang 1, 2.1.3 Anhang 3) machen, aber der Abdeckungsbereich dieser Sonden ist größer und somit ist die Aussage repräsentativer.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit dieser Technik gleichzeitig mehrere Genorte untersucht werden können, die Aussage aber auf die wenigen beteiligten Sonden begrenzter ist.

Die mit den bisher beschriebenen Methoden erzielten Daten wurden mit den Array-generierten Ergebnissen verglichen, um die letzteren zu verifizieren und zu vervollständigen (s. 2.1.1 Anhang 1, 2.1.2 Anhang 2, 2.1.3 Anhang 3, 2.1.4 2.1.4).

2.2.4 Array-Methoden

2.2.4.1 Limitierungen

Die Array-Methoden liefern eine weitaus höhere Auflösung, als die älteren Methoden. Die Auflösungen, die von den Herstellerfirmen angegeben werden, sind jedoch fragwürdig. Sie werden berechnet, indem die Anzahl der Sonden durch die Genomgröße geteilt wird (Coe BP. et al., 2007). Bei allen hier verwendeten Chips sind die Sonden jedoch nicht gleichmäßig verteilt. Manche Bereiche enthalten mehr Sonden als andere. Die telomer- und zentromer-nahen Bereiche sowie die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 und der heterochromatische Bereich der Chromosomen 1, 3, 9, 16 und Y sind nicht mit Sonden abgedeckt. Somit werden Robertson'sche Translokationen übersehen. Die Syndrompatienten, die für diese Studie ausgewählt wurden, zeigten nach der GTG-Bänderung keine Veränderungen, welche die oben genannten Bereiche betrafen. Eine submikroskopische Veränderung konnte aber nicht völlig ausgeschlossen werden. Zytogenetisch balanciert erscheinende Translokationen oder Inversionen enthalten in manchen Fällen Mikrodeletionen in den Bruchpunktregionen (Gribble SM. et al., 2005). Es wurden auch keine Fälle mit Mosaiken genommen, da diese nur ab einem gewissen Prozentsatz von aberranten Zellen gesehen werden, der bei verschiedenen Systemen unterschiedlich ausfallen kann. Das kann aber auch von der Größe der Veränderung

abhängen (Rauch A., 2008). Array-CGH Plattformen lassen aber kleinprozentigere Mosaike als die SNP-Arrays erkennen (Curtis C. et al., 2009).

Mit Array-Methoden konnten wie erwartet sehr kleine Deletionen und Duplikationen entdeckt werden. Balancierte Translokationen und Inversionen konnten nicht gesehen werden, wie z.B. im Anhang 4, wo weder die Inversions- noch die Translokationsbruchpunkte via Array identifiziert wurden. Der Array lieferte auch keine Hinweise auf die Insertionsstelle auf Chromosom 1.

Waren die Ereignisse jedoch unbalanciert, zeigten die Array-Daten eine Deletion und die assoziierten Bruchpunkte konnten bestimmt werden. Mit dieser Methode wurde der Bruchpunkt in der Publikation unter Anhang 1 von 45 kb mittels MLPA auf 5,7 kb mittels Array-Methode eingeengt. Die Tatsache, dass es sich dabei um eine Translokation handelt, wäre per Array jedoch übersehen worden. Der Telomerbereich des Chromosoms 18 war auch mit dieser Methode unauffällig geblieben. Das war nach den FISH- und MLPA-Ergebnissen aber auch nicht zu erwarten gewesen, da telomernahe Bereiche bei Arrays schlecht abgedeckt sind (s. 2.1.1 Anhang 1).

Wie bereits oben erwähnt, wurde in der im Anhang 5 dargestellten Publikation mit verschiedenen Methoden eine Mikrodeletion in Chromosom 14q32.2 ausgeschlossen (s. 2.2.2 FISH). Eine Array-Methode ist für die Delineation der vermuteten Mikrodeletion nicht angewandt worden, da die vorher gewonnenen Ergebnisse wenn überhaupt eine, dann eine kleine Deletion vermuten ließen, die mittels Array nicht mit Sicherheit detektiert worden wäre. Das hängt ab von der Dichte der Sonden in dem Bereich. Ein Array-Experiment hätte in diesem Fall aber einen besseren Überblick über das Genom geliefert.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, können UPDs mit SNP-Arrays detektiert werden, da diese Genotyp-Daten liefern. Auch hier bleibt die Frage nach der Relevanz für die Entstehung eines Phänotyps, die mindestens genauso problembehaftet ist, wie diejenige der CNVs, denn hierfür gibt es noch keine Datenbanken.

Je höher die Auflösung des Arrays ist, desto mehr CN-Veränderungen werden bei der Array-Analyse nachgewiesen. Dabei stellt sich die Frage, welche davon für den Phänotyp des Untersuchungsobjekts verantwortlich ist. Mittlerweile ist es bekannt,

dass ca. 6-10 % des menschlichen Genoms aus CN Variationen bestehen (Oldridge DA. et al., 2010). In den nächsten Kapiteln werden Schwierigkeiten dargestellt, die bei der Analyse von Array-Daten von Einzelpersonen entstehen können.

2.2.4.2 Größe der Veränderung

Die Auswertungsroutine, die bei der Erstellung der hier beschriebenen Publikationen entstanden ist, begann mit der Aussortierung aller Veränderungen unter 100 kb. Die Herstellerfirmen wie Affymetrix oder Illumina geben vor, dass eine Veränderung mindestens fünf nebeneinander liegende SNPs betreffen muss. Die meisten Laboratorien, die Array-Analysen betreiben, setzen aber auch zusätzlich unterste Grenzen für die Größe der Veränderung ein, die meistens 100 kb oder 200 kb betragen. Dabei gilt die Annahme, dass je größer die Veränderung ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass sie real und krankheitsrelevant ist (Rauch A., 2008). Wie man aber im Anhang 1 gesehen hat, wurde durch eine ca. 2 Mb große Deletion ein relativ milder Phänotyp erzeugt. Die 0,5 Mb große Deletion im *IL1RAPL1*-Gen erzeugt mit einer MR, Verhaltensauffälligkeiten und Dysmorphien einen weitaus schwerwiegenderen Phänotyp (s. 2.1.2 Anhang 2). Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass das Gengehalt der veränderten Region für die Krankheitsrelevanz eher entscheidend ist, als die Größe der Veränderung.

2.2.4.3 Copy Number Variations

Als nächstes wurden die Regionen, die beim Probanden Kopienzahlveränderungen anzeigten mit CNVs in Datenbanken verglichen, in denen benigne CNVs gesammelt werden. Das Grundproblem bei der Verwendung dieser Datenbanken liegt im Fehlen eines geeigneten Referenzgenoms. Das jetzt gültige Genome assembly repräsentiert das genetische Material von wenigen Menschen und enthält noch zahlreiche Lücken. Das Erschwert den Vergleich eigener Ergebnisse mit Daten aus einem anderen Projekt. Eine zentralisierte, mit Daten von mehr Menschen, allen Polymorphismen und allen bisher nicht sequenzierten Regionen vervollständigtes Genome assembly würde eine geeignete Referenz darstellen (Feuk L. et al., 2006).

2.2.4.3.1 Datenbanken mit benignen CNVs

Die erste Datenbank, die konsultiert wurde, ist die Toronto Database of Genomic Variance (DGV) (http://projects.tcag.ca/variation/). In diese Datenbank werden

benigne CNVs eingetragen. Die Betreiber geben an, dass der Katalog bei weitem noch nicht vollständig ist und die dort aufgeführten Veränderungen bei anderen Individuen krankheitsverursachend sein könnten. Das liegt zum großen Teil an der Auswahl der angeblich gesunden Personen, wie z.B. den HapMap Individuen, die gescreent wurden, um die benignen CNVs zu bekommen (Redon R. et al., 2006). Dabei handelt es sich um 270 Menschen aus vier verschiedenen Populationen aus Asien, Afrika und Europa. Um festzustellen, inwieweit solche CNVs populationsspezifisch sind, ist die Anzahl der Individuen zu klein. Außerdem sind keine medizinischen Daten über diese Personen bekannt, was den Status ihrer CNVs als nicht krankheitsrelevant in Frage stellt. Die DNA der HapMap-Individuen liegt als lymphoblastoiden Zelllinien vor, die auch Kulturartefakte tragen könnten (Pinto D. et al., 2007). Eine CNV darf also nicht sofort als benigne abgetan werden, wenn sie in dieser Datenbank zu finden ist.

Das gilt besonders, wenn die CNV das X-Chromosom betrifft. Das Gen *IL1RAPL1* enthält laut DGV z.B. benigne CNVs. Das ist aber nicht einmal für alle weiblichen Individuen richtig, die bei Verlust von *IL1RAPL1* phänotypisch normal intelligent bis mental eingeschränkt sein können und/oder „Autistic spectrum disorders“ (ASD) haben können (s. 2.1.2 Anhang 2).

Eine weitere Datenbank ist die Database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using ensembl resources (DECIPHER) (http://decipher.sanger.ac.uk/). Dort können teilnehmende Kliniken die Genotypen und Phänotypen von Patienten eintragen, die zu Vergleichszwecken eingesehen werden können. Für die Veröffentlichung, die unter Anhang 1 zu finden ist, konnte ein Fall mit einer ähnlichen Deletion im Chromosom 22 und zwei weiteren Imbalancen gefunden werden. Der dort beschriebene Phänotyp ist zwar schwerer als bei unserem Fall, aber beinhaltet ebenfalls eine Taubheit. Bei dieser Datenbank sind aber teilweise keine Phänotypen angegeben und in manchen Fällen alle genetischen Veränderungen, die ein Array-Versuch geliefert hat. Hier sollte auch die Zugehörigkeit der Individuen zu bestimmten Populationen bedacht werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beide Datenbanken nur bedingt nutzbar waren.

Bei den hier verwendeten SNP-Arrays konnte beobachtet werden, dass bei unterschiedlichen Patienten häufig dieselben plattformspezifischen Veränderungen aufgetreten sind. Man kann davon ausgehen, dass in Patienten mit unterschiedlichen

Phänotypen nicht dieselben ursächlichen Genotypen zu finden sind. Diese Veränderungen wurden daher als benigne eingestuft.

Wegen der Menge an Daten, die ein Array-Experiment hervorbringt, kam man nicht umhin Datenbanken zu verwenden. Die Ergebnisse der Recherche konnten Hinweise über die Pathogenität einer bestimmten Veränderung liefern. Die Daten wurden aber unter großer Vorsicht verwendet und mit anderen, weiter unten beschriebenen Kriterien der Unterscheidung zwischen benignen und krankheitsrelevanten CNVs kritisch überprüft.

2.2.4.3.2 Trios

Es gibt eine weitere Methode, um festzustellen ob eine Veränderung benigne oder krankheitsrelevant ist. Man untersucht z.B. Trios, d.h. die DNA-Proben von Eltern und Indexpatient. Veränderungen, die nur der Patient trägt, werden als *de novo* und in der Regel als krankheitsrelevant klassifiziert. Veränderungen, die auch ein gesundes Elternteil trägt, wären eher als benigne einzustufen. Stehen zusätzlich Geschwister und andere Verwandte zur Verfügung, liefern ihre Daten noch mehr Anhaltspunkte. Auf diese Weise werden gleichzeitig bevölkerungsgruppen- und familienspezifische CNVs berücksichtigt (Dufke A. et al., 2008), und auch genfreie Regionen können als krankheitsrelevant erkannt werden. In der Publikation unter Anhang 1 war die Translokation ein *de novo*-Ereignis, was bereits mittels der GTG-Bänderung anhand elterlicher Karyogramme festgestellt wurde. Die Eltern wurden in diesem Fall nicht mittels der Array-Methode untersucht. Die elterliche Herkunft des derivaten Chromosoms konnte aber anhand von polymorphen STR-Markern festgestellt werden. Da ein beim Kind in der deletierten Region vorhandener Marker von der Mutter stammt, ist die Translokation in der paternalen Keimbahn entstanden.

Bei der Publikation unter Anhang 2 war die Veränderung bei einem der untersuchten Indexpatienten ein *de novo*-Ereigniss, wobei ein mögliches somatisches oder Keimbahn-Mosaik bei der Mutter diskutiert wurde. Bei dem anderen Kind war die Mikrodeletion von der phänotypisch auffälligen Mutter geerbt worden, was nach der Array-Untersuchung des Kindes mittels FISH bei der Mutter, ihrer Schwester und Neffen nachgewiesen wurde.

Beim Fall unter Anhang 4 wurde mittels Array belegt, dass die Duplikation auf Chromosom 1p32.3 von der Mutter geerbt wurde, und die beiden Deletionen auf den Chromosomen 1q41 und 7q35 *de novo* in der paternalen Keimbahn entstanden ist.

Die Verwendung von Trios schließt aber nicht die Möglichkeit aus, dass eine neue Kombination der bei den Eltern harmlosen CNVs, beim Kind eine Krankheit auslösen kann. Erbt das Kind von einem gesunden Elternteil eine für diesen harmlose Deletion und vom anderen ebenfalls gesunden Elternteil ein Allel mit einer bei diesem folgenlosen rezessiven kleinen Mutation, würde letztere demaskiert und sich phänotypisch ausprägen. Auf dieselbe Weise könnte auch ein funktioneller Polymorphismus demaskiert werden (Stankiewicz P. & Lupski JR., 2010). Bei dem Hörstörungsfall könnten die Gene *GAB4*, *IL17RA*, *CECR6*, *CECR5*, *CECR1* und/oder *CECR2* rezessive Mutationen haben, die durch die Deletion demaskiert wurden. Eine Sequenzierung, um das festzustellen, wurde aber nicht durchgeführt (s. 2.1.1 Anhang 1). Da bei allen hier beschriebenen Studien mehrere Genorte Deletionen zeigten, könnte dort auch eine Demaskierung einer rezessiven Mutation stattgefunden haben. Deshalb wurde bei der Datenbankrecherche in den deletierten Bereichen auf Gene geachtet, die rezessiv krankheitsverursachend sind.

Bei dem Vergleich von Eltern und Kind musste auch beachtet werden, dass sich dieselbe Mikrodeletion in unterschiedlichen Generationen und Individuen verschieden stark ausprägen kann (Veltman JA. & Brunner HG., 2010). Das konnte auch in der Publikation im Anhang 2 gesehen werden, anhand der Mutter und Tante des Indexpatienten 2. Die genetische Untersuchung zeigte bei beiden dieselbe Veränderung, jedoch war die Lernschwäche bei der Tante schwerwiegender als bei der Mutter.

Es können natürlich auch mehrere Genorte an der Ausprägung eines Phänotyps beteiligt sein. Beim TAR-Syndrom z.B. wurde als Ursache eine Mikrodeletion im Chromosom 1q21.1 gefunden, die notwendig aber nicht ausreichend für die Ausbildung des Phänotyps ist. Dafür wird noch ein unbekannter Modifier benötigt (Klopocki E. et al., 2007).

Mit anderen Worten stellte die Verwendung von Trios für die Feststellung der Pathogenität eines Bereichs in den meisten Fällen eine wichtige Hilfe dar. In seltenen Fällen könnte diese Methode aber auch irreführend sein.

2.2.4.4 Identifizierung von Kandidatengenen

Nachdem also benigne CNV-Regionen ausgeschlossen wurden, konnten die restlichen Bereiche überprüft werden.

2.2.4.4.1 Genfreie Regionen

Genfreie Regionen wurden bei der Erstellung dieser Studie von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Solche Regionen können allerdings regulatorische Elemente enthalten, die Einfluss auf weit entfernt liegende Gene haben (Benko S. et al., 2009). Obwohl die Praxis genfreie Regionen zu ignorieren demnach fragwürdig ist, wäre die Alternative, alle Regionen nach regulatorischen Elementen zu durchsuchen und dort einen Zusammenhang nachzuweisen, aus Zeitgründen nicht praktikabel. Im oben erwähnten Fall (Benko S. et al., 2009) wurde diese Region bei einer Kopplungsanalyse gefunden, bei der mehrere Familien in mehreren Generationen zur Verfügung standen. Diese Anzahl von Probanden war bei den hier beschriebenen Fällen nicht vorhanden.

2.2.4.4.2 Gen-Datenbanken

Die Untersuchung des Gengehalts in den CNV-Regionen gab die wichtigsten Indizien für die Einstufung eines Gens oder einer Region als benigne oder krankheitsverursachend. Es wurde für jeden Fall untersucht, ob bereits genotypisch und phänotypisch ähnlich gelagerte Fälle bekannt waren.

Dafür wurden relevante Gene einzeln in Datenbanken wie Online mendelian inhertance in man (OMIM) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) recherchiert. Zusätzlich konnten Informationen zu Einzelgenen bei NCBI Gene (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) gefunden werden. Falls dort keine oder nur ältere Daten zu finden waren, wurden die neuesten Artikel in PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) zu Rate gezogen.

Auf diese Weise konnten bereits bekannte Krankheitsassoziationen beim Menschen gefunden werden. Wie in der Publikation unter Anhang 2 beschrieben, war *IL1RAPL1* bereits mit MR assoziiert. Da mehrere Fälle mit intragenischen Deletionen, Inversionen

und Punktmutationen bekannt waren, wurde versucht die Größe der Deletion mit der Schwere des Phänotyps zu korrelieren. Interessanterweise führt eine Deletion des gesamten Gens zu einem milderen Phänotyp als eine Veränderung innerhalb des Gens. Das war ein typischer Fall für die Aufklärung einer idiopathischen mentaler Retardierung nach einem negativen Befund der GTG-Bänderung (s. 1.1 Mikrodeletionssyndrome).

Bestimmte Mutationen im *CNTNAP2*–Gen wurden bereits mit Autismus und andere mit Gilles de la Tourette-Syndrom (GTS) (OMIM #137580) korreliert. Die Schwierigkeit bei unseren Fall (s. 2.1.4 Anhang 4) bestand jedoch in der Korrelation zwischen dem komplexen Umbau und bestimmten Teilbereichen des Phänotyps. Eine Deletion von Intron 8 wurde bei einem GTS-Patienten beobachtet. In unserem Fall wurde dann die Transposition der Introns 8 bis 13 ins Chromosom 1 mit den gewalttätigen Ausbrüchen, als Teil des GTS in Verbindung gebracht. Häufig sind die betroffenen Gene jedoch nicht so gut charakterisiert.

Es ist mittlerweile bekannt, dass Genprodukte, die bestimmte Funktionen in der Zelle erfüllen, wie z.B. in Signaltransduktionsketten bei Haploinsuffizienz genetische Erkrankungen hervorrufen können. Dazu gehören z.B. Transkriptionsfaktoren oder Teile von makromolekularen Komplexen (Veitia RA. & Birchler JA., 2010). Solche Gene wurden bei den vier als erstes gezeigten Fällen als mögliche Kandidatengene miteinbezogen (s. 2.1.1 Anhang 1, 2.1.4 Anhang 4, ansonsten Daten nicht gezeigt).

2.2.4.4.3 Schlussfolgerungen aus Modelorganismen, Expressionsanalysen

Wenn keine Krankheitsassoziationen beim Menschen bekannt waren, wurde nach Studien in Modellorganismen gesucht mit ähnlichen Phänotypen oder Studien an Zelllinien, bei denen die pathologischen Bedingungen im vorliegenden Fall imitiert werden.

Der im Anhang 3 beschriebene Indexpatient hatte eine virale Infektion, die zu einer Autoimmun-Hepatitis mit akutem Leberversagen führte. Von *PIM3* war anhand von Versuchen an Ratten bekannt, dass es sich um einen hepatischen Wachstums-stimulator handelt. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass *PIM3* beim Menschen und in der Maus im Hepatom, nicht aber in der normalen Leber exprimiert wird. Die Inaktivierung von *PIM3* in menschlichen Hepatom-Zelllinien mit RNAi führt zu einer

erniedrigten Zellproliferation und erhöhten Apoptoserate. In unserer Patientin entstand bei einer viralen Infektion ein Schaden an der Leber. Die niedrigere Menge von *PIM3* führte wahrscheinlich zu einer niedrigeren Proliferations- und erhöhten Apoptoserate. Der entstandene Schaden an der Leber wurde dadurch vermutlich noch verschlimmert und es kam zum Leberversagen. Es stellt sich natürlich die Frage, inwieweit Versuche an anderen Tierarten und/oder Zelllinien auf den gesamten menschlichen Organismus übertragbar sind. In diesem Fall wurde aber derselbe Mechanismus an Ratten und an humanen und murinen Zelllinien beobachtet, was eine Übertragung nahe legt. Außerdem war dieses Gen bei dem anderen in derselben Arbeit beschriebenen Patienten ebenfalls deletiert.

Es können auch Rückschlüsse auf eine funktionelle Beteiligung der Gene am Phänotyp aus Expressionsanalysen gezogen werden, wie in der Publikation unter Anhang 1 zu sehen war. Die Beteiligung der Gene *CECR1* und *CECR2* an der Hörstörung wurde anhand von Expressionsstudien an Mäusefeten diskutiert. *CECR1* wird u.a. im VII/VIII cranialen Nervenganglion exprimiert, wobei das VIII Ganglion den Vorläufer für das akustische Ganglion darstellt. *CECR2* wird im Neuralrohr exprimiert und spielt eine Rolle bei der Neurulation. Es wird davon ausgegangen, dass eine gewebespezifische Expression eines Gens auf eine Beteiligung an der Funktion des Gewebes und damit am Phänotyp hinweist.

Obwohl das CES durch eine Duplikation der entsprechenden Region verursacht wird, und in unserem Fall eine heterozygote Deletion besteht, versucht man die Funktion von z.B. *CECR1* in diesem Syndrom anhand von Knockout-Mausstämmen zu verstehen. Dabei geht man davon aus, dass das Gen generell dosissensitiv und damit möglicherweise ursächlich für den Phänotyp ist. Aufgrund der zu dem Zeitpunkt herrschenden Datenlage konnte man für diesen Fall keine einzelnen Kandidatengene vorschlagen.

Bei der Analyse von Array-Daten mussten noch weitere Aspekte berücksichtigt werden. So sind möglicherweise noch nicht alle proteinkodierenden Gene bekannt, die dementsprechend bei der Analyse gar nicht berücksichtigt werden können. Zudem sind viele Funktionen bekannter Gene noch nicht beschrieben worden. Z.B. wurde seit der Veröffentlichung der Publikation im Anhang 1 ein neuer Mechanismus entdeckt, der eine Beteiligung von IL17RA bei der Ansammlung von Basophilen in der Lunge

von Asthmatikern nach einer Allergenexposition zeigt (Wong CK. et al., 2010). Man hat die Kristallstruktur des CECR1-Proteins beschrieben (Zavialov AV. et al., 2010). In einer neueren Studie wurde an Mäusen gezeigt, dass eine homozygote Mutation von *CECR2* zu Exencephalie und Innenohrdefekten führt. Da eine heterozygote Mutante nur einen verspäteten Neuralrohrverschluß gezeigt hat, ist eine Dosissensitivität von *CECR2* zumindest in der Maus wahrscheinlich (Dawe CE. et al., 2011). Diese neuen Daten machen *CECR2* zum Kandidaten für die Erklärung der Hörstörung in der unter Anhang 1 beschriebenen Publikation. Bezüglich der Publikation in Anhang 3 ist in einer weiteren Studie gezeigt worden, dass *PIM3* im Pankreas nach einer Glucosegabe exprimiert wird und die Sekretion von Insulin negativ reguliert (Vlacich G. et al., 2010). (s. 2.1.3 Anhang 3).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Expressionsstudien und Ergebnisse aus Versuchen an Modelorganismen sehr gute Hinweise auf ein Kandidatengen oder eine Kandidatengenregion lieferten. Auf diese Weise konnten auch pathogenetischen Wirkmechanismen vorgeschlagen werden.

2.2.4.4.4 Pseudogene und andere Elemente

Während der Datenbankrecherche für alle hier beschriebenen Fälle konnten in CNVs neben proteinkodierenden Genen auch immer Pseudogene, miRNAs und andere Elemente gefunden werden. Zum jetzigen Zeitpunkt sind Daten über die Krankheitsrelevanz von Genomelementen wie Pseudogenen oder RNA-Genen sehr rar. In mehreren Fällen wurde gezeigt, dass Pseudogene transkribiert werden, oder regulative Funktionen haben (Balakirev ES. et al., 2003). Pseudogene können auch eine regulatorische Funktion haben, indem sie als miRNA für die Ursprungsgene fungieren (Poliseno L. et al., 2010). Da diesbezüglich noch nicht ausreichend Daten vorhanden sind, können über die Funktion von solchen Elementen nur Mutmaßungen angestellt werden. Aus diesem Grund wurden sie nicht in die Bewertung als mögliche Ursachen für krankheitsrelevante Phänotypen mit einbezogen.

2.2.4.4.5 Vom Genotyp zum Phänotyp

Ein weiteres Problem bei der Interpretation kann entstehen, wenn mehrere krankheitsrelevante Loci bei einem Patienten gefunden werden, die andere als die vorhandenen Phänotypen verursachen können, wie z.B. in der Publikation unter

Anhang 4. Dabei enthielt die deletierte Region auf dem Chromosom 1q41 das Gen *USH2A*. Veränderungen in diesem Gen verursachen autosomal rezessiv eine Hörstörung und im späteren Alter entwickelt sich eine Retinitis Pigmentosa. Hier könnte eine rezessive Mutation demaskiert worden sein, aber da der Patient die entscheidenden Symptome nicht aufwies, wurde das nicht weiter untersucht.

Mit dem heutigen Wissensstand ist es plausibler von einem Phänotyp ausgehend einen ursächlichen Genotyp zu finden. In sehr seltenen Fällen kann eine Voraussage über einen Phänotyp anhand eines gefundenen Genotyps getroffen werden. So gibt es bekannte genetische Störungen wie *BRCA1*-Mutationen, die eine 80 %-ige Penetranz aufweisen. In diesem Fall kann eine Prognose über das Auftreten eines Brustkarzinoms gemacht werden (Geversleben H. et al., 2010). Die hier diskutierten Array-Ergebnisse betrafen jedoch keine Gene, die solchen Prognosen erlaubt hätten.

2.2.5 Schlussfolgerungen

Am Anfang dieser Studie wurde die Frage gestellt, inwieweit die Array-Technologie für die Untersuchung von Syndrompatienten geeignet ist. Die Analyse von den hier beschriebenen Patienten hat zu Kandidatengenen oder Kandidatengenregionen geführt.

Aufgrund der Limitationen von einzelnen hier angewandten Techniken mussten diese miteinander kombiniert werden, so dass sie Daten vervollständigten. Die Größeneinschränkung der GTG-Bänderung konnte mit dem Array umgangen werden. Dagegen wurde das Unvermögen mit Hilfe der Array-Methoden balancierte große Rearrangements zu sehen, mit der GTG-Bänderung und FISH umgangen. Bei kleineren Veränderungen oder bei lokal eingeschränkten aber das gesamte Genom einschließenden Screenings wurde MLPA eingesetzt. FISH wurde zur Bestätigung und Präzisierung von Daten aus der GTG-Bänderung und Array-Versuchen eingesetzt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle hier angewandten Array-Technologien durchaus zur Untersuchung von Einzelpatienten geeignet sind, jedoch nur unter Einbezug von anderen Analysemethoden.

Damit wären aber erst die technischen Probleme gelöst. Die Fragestellung nach der Relevanz einer Veränderung für den krankheitsverursachenden Phänotyp bedarf einer Menge an Recherche nach bekannten benignen und pathogenen CNVs, wobei vieles

bei der Interpretation der Daten beachtet werden muss. Der endgültige Beweis für die Krankheitsrelevanz ist dann gegeben, wenn bei mehreren Patienten ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der genotypischen und der phänotypischen Veränderung gefunden werden kann, was nicht immer gegeben ist. Dafür müssen weltweit noch viele Daten gesammelt und als krankheitsrelevant oder benigne eingestuft werden.

2.2.6 Ausblick

Die oben beschriebenen Methoden sind alle noch entwicklungsfähig. Besonders bei den Array-Methoden geht die Entwicklung in Richtung einer immer dichterer Abdeckung des Genoms (Curtis C. et al., 2009). Es werden auch immer mehr neue, auf bestimmte Fragestellungen wie z.B. auf MR-Loci ausgerichtete, sogenannte „targeted" Arrays entwickelt und angeboten (Dufke A. et al., 2008).

Die neueste Technologie für die Suche nach genetischen Veränderungen wird „Next Generation Sequencing" (NGS) genannt. Diese Methode erlaubt die gleichzeitige, parallele Sequenzierung des ganzen Genoms. Die Länge der Fragmente ist bei den meisten NGS-Methoden jedoch kürzer, als bei der Sanger-Sequenzierung (Hall N., 2007). Dafür existieren bereits mehrere Methoden, von denen hier die „Cyclic Array Sequencing" als Beispiel kurz dargestellt wird. Viele der heute kommerziell verfügbaren NGS wie Roche 454 Sequenzierung, Solexa Technologie, SOLiD Plattform, der Polonator usw. arbeiten nach diesem Prinzip.

Die DNA wird fragmentiert und an jedes Fragment wird *in vitro* ein Adapter ligiert. Es werden sogenannte Polonien, d.h. PCR-Kolonien hergestellt. Eine Polonie besteht aus mehreren Kopien eines Fragments und ist räumlich getrennt von den anderen. Die Polonien befinden sich entweder direkt auf einem ebenen Array oder erst auf Beads, die dann ihrerseits auf dem Array sind. Die fixierte DNA wird denaturiert und ist einzelsträngig. Die Sequenzierung selbst erfolgt durch die Wiederholung von zwei Schritten, der Synthese eines komplementären Strangs mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden mit einer Polymerase oder Ligase entlang eines Templates und der Aufnahme eines Bildes des gesamten Arrays nach jedem Synthese-Zyklus.

Es gibt viele Anwendungsmöglichkeiten wie z.B. das Paired-end sequencing, womit strukturelle Variationen entdeckt werden können. Diese Methode ermöglicht eine genomweite Suche nach Chromosomenmutationen auch wenn diese balanciert sind,

mit einer exakten Bruchpunktbestimmung. Es können natürlich auch Resequenzierungen auf der Suche nach Mutationen und Polymorphismen durchgeführt werden und auch Untersuchungen auf der mRNA-, Methylierungs-Ebene und DNA-Protein-Interaktionen erforscht werden. Diese Methode ist deutlich mehr fehlerbehaftet, als die Sanger-Sequenzierung. Zudem müssen noch viele bioinformatische Probleme gelöst werden. (Shendure J. & Ji H.; 2008).

Wegen der verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten dieser Sequenzierungs-methoden werden vermutlich alle oben genannten Methoden mittel- bis langfristig verdrängt werden. Momentan sind jedoch noch zu viele technische und die Auswertung betreffende Unsicherheiten vorhanden. Das größte Problem dabei ist, genau wie bei den Array-Methoden, die Datenauswertung. Problematisch ist, dass bei NGS noch wesentlich mehr Daten gewonnen werden, bei denen eine Entscheidung bezüglich der Relevanz für einen Phänotyp getroffen werden muss. Das Problem kann nur gelöst werden, wenn mehr Referenzdaten zur Verfügung stehen. Für die Analyse von Einzelfällen ist die Methode momentan also nur eingeschränkt geeignet, da sie viel mehr Fragen aufwirft als beantwortet. Sie kann daher nur unterstützend eingesetzt werden, um z.B. die Frage nach der Demaskierung einer rezessiven Mutation in einem größeren Bereich zu klären oder die Bruchpunkte eines Ereignisses sehr genau zu bestimmen.

Die hier untersuchten Fälle könnten alle mit Hilfe verschiedener Anwendungsmöglichkeiten des NGS weiter untersucht werden, um ein vollständigeres Bild über die vorhandenen genetischen Veränderungen zu erhalten. Im Fall unter Anhang 1 könnte auf diese Weise geklärt werden, ob *SLC25A18* betroffen ist. In den Fällen, bei denen *IL1RAPL1*, *PIM3* und *CNTNAP2* betroffen sind, könnten die Bruchpunkte genauer eingeengt werden. Im Fall unter Anhang 5 könnte eine Deletion im Bereich des 14q32.2 noch detaillierter abgeklärt werden.

3 Zusammenfassung

Das Hauptziel der medizinischen Genetik ist es, die Ursachen für genetisch hervorgerufene Krankheiten zu finden, um eine bessere Behandlung der Patienten zu gewährleisten, sei es um die Medikamente auf den Metabolismus des Individuums anzupassen oder natürlich dazu, um die Krankheit selbst zu behandeln und in Zukunft auch heilen zu können. Um dieses Ziel zu erreichen werden immer neue Technologien entwickelt, die mit Hilfe von bereits etablierten Methoden auf ihre Eignung hin überprüft werden müssen. Eine der neuesten Entwicklungen stellt die Array-Technologie dar. In dieser Studie wurde versucht zu überprüfen, inwieweit diese neue Methode zur Analyse von einzelnen bis wenigen Patienten mit bestimmten Syndromen geeignet ist. Dafür wurden mehrere Patienten mir sehr unterschiedlichen Phänotypen ausgesucht, die verschiedene Ursachen und Entstehungsmechanismen der genetischen und phänotypischen Veränderung vermuten ließen.

Die erste hier dargestellte Publikation beschreibt einen Fall mit einer einseitigen Schalleitungsschwerhörigkeit, der mit einer Translokation der(18)t(18;22) mit der involvierten Deletion 22pter→q11.21, sowie den darin enthaltenden Genen der CES-Region, erklärt wurde. Der in der zweiten Publikation beschriebene Fall mit MR und Verhaltensauffälligkeiten wurde mit einer intragenischen Mikrodeletion im Gen *IL1RAPL1* korreliert. Zwei Fälle autoimmunbedingten Leberversagens bei einem Phelan-McDermid Syndrom wurden in der dritten Publikation primär auf eine Deletion des Gens *PIM3* zurückgeführt. Ein autistischer Junge mit einer Entwicklungsverzögerung und gewalttätigen Ausbrüchen zeigte in der vierten Publikation ein sehr komplexes Rearrangement mit mehreren Brüchen im Gen *CNTNAP2* und Deletionen anderer Gene, die zusammen für den Phänotyp verantwortlich sein können. Keine Mikrodeletion, sondern eine Epimutation in Chromosom 14q32.2 war die Ursache für die Adipositas mit einer Sprachentwicklungsverzögerung bei einem Jungen, der in der fünften Publikation beschrieben ist.

Um die o. g. genetischen Veränderungen zu finden, wurden verschiedene Methoden wie die GTG-Bänderung, FISH, MLPA und verschiedene Array-Systeme verwendet. Mit jeder von diesen Methoden konnten neue und einander ergänzende Daten zu den

genetischen Veränderungen eines Individuums gewonnen werden. Keine der Methoden konnte für sich allein ein vollständiges Bild liefern. Die GTG-Bänderung zeigt zwar das ganze Genom, hat aber die Limitierung der niedrigen Auflösung. Sie konnte dennoch Anhaltspunkte für höherauflösende Untersuchungsmethoden geben. Dazu gehörte die FISH, die entweder zur feineren Auflösung der Bänderungsdaten oder zur Bestätigung von Array-Befunden verwendet wurde. Die MLPA wurde unterstützend auf der Suche nach sehr kleinen Veränderungen in eingegrenzten Regionen eingesetzt. In einigen der beschriebenen Fälle wurden trotz eines negativen Bänderungsbefundes aufgrund des auffälligen Phänotyps genetische Ursachen vermutet, und daher feiner auflösende Methoden eingesetzt. Die am höchsten auflösenden Array-basierten Methoden wurden eingesetzt, wenn ansonsten keine Ergebnisse zu erzielen waren, oder eine feinere Auflösung der vorhandenen Daten erreicht werden sollte. Anschließend konnten die Erkenntnisse über die Veränderungen mit dem Phänotyp korreliert werden, um ein Kandidatengen oder eine Kandidatengenregion zu ermitteln. Aufgrund der großen Datenmenge aus den Array-Experimenten, waren zur Entscheidung über die Relevanz der Daten bezüglich der Entstehung des Phänotyps umfassende Datenbank- und Literatur-Recherchen notwendig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Array-Technologie einen großen Fortschritt darstellt, in der Suche nach Ursachen für genetische Erkrankungen. Sie hat aber technische Limitierungen und um das Problem der Phänotyp-Genotyp-Korrelation zu vereinfachen, werden weltweit noch viele Daten gesammelt werden müssen. Das ist eine Frage der Zeit und der Weiterentwicklung geeigneter Technologien.

4 Summary

The major aim of medical genetics is to find the reasons for genetic diseases, to ensure better treatment of patients, for example to better adapt medication to the patient's metabolism or to treat and in the future also to cure the illness. To reach this goal new technologies are developed, which have to be tested for their applicability by already established methods. One of the newest developments is constituted by the array-technology. In this study it has been tried to find out to which extent this new method is suited for testing individual or few patients with certain syndromes. To do that several patients have been chosen with very different phenotypes, for which different mechanisms underlying the genetic and phenotypic changes were presumed.

The first paper presented here describes a case with unilateral conductive hearing loss, which was explained by the translocation der(18)t(18;22) including the deletion of the region 22pter→q11.21 and the genes of the CES region. The case with MR and behavioral abnormalities described in the second paper was associated with an intragenic deletion of *IL1RAPL1*. Two cases of hepatic failure caused by an autoimmune reaction in patients with the Phelan-McDermid syndrome were explained by the deletion of *PIM3* in the third paper. In the fourth paper an autistic boy with a developmental delay and violent outbursts had a very complex rearrangement containing many breaking points in *CNTNAP2* and deletion of other genes, which altogether explain the phenotype. Not a microdeletion, but an epimutation in 14q32.2 was the cause for the obesity with a speech delay in a boy described in the fifth paper.

Different methods were used to find the above mentioned genetic changes, i.e. GTG-banding, FISH, MLPA and several array-systems. Each of these methods revealed new and complementing data about the genetic changes of an individual. None of the methods alone could provide a complete picture. GTG-banding shows the entire genome, but has the limitation of a low resolution. This banding method provided candidate regions for further investigations with higher resolving methods. FISH was used for this cause or to confirm array data. MLPA was used to search for very small changes in specific regions. In some of the described cases with negative findings in the GTG-banding but a noticeable phenotype, genetic cause was assumed and higher resolving methods were used. The method with the highest resolution were the array-

based technologies, which were used as screening method if no information could be obtained by any other method. Finally, the findings on the genetic changes were correlated with the phenotype to determine the candidate gene or a candidate gene region. Due to the large amount of data obtained from the array-experiments, the correlation required a decision about the relevance of the data for the development of the phenotype based on thorough database research.

Collectively, it can be said that the array-technology is a useful technique for searching for reasons of genetic diseases. But it has its technical limitations. To facilitate the problem of the phenotype-genotype-correlation, data has to be accumulated worldwide. It is a question of time and further development of adequate technologies.

5 Literaturliste

1. Affymetrix Inc; Affymetrix ® Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 User Guide. 2008 Affymetrix, Inc.

2. Agilent Technologies Inc; Agilent Feature Extraction Software (v.10.1); 2008

3. Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE; Recent segmental duplications in the human genome. Science. 2002 Aug 9;297(5583):1003-7.

4. Balakirev ES, Ayala FJ; Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA? Annu Rev Genet. 2003;37:123-51.

5. Barber JC; Directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities and euchromatic variants. J Med Genet. 2005 Aug;42(8):609-29.

6. Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan DJ, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT, McBride D, Golzio C, Fisher M, Perry P, Abadie V, Ayuso C, Holder-Espinasse M, Kilpatrick N, Lees MM, Picard A, Temple IK, Thomas P, Vazquez MP, Vekemans M, Roest Crollius H, Hastie ND, Munnich A, Etchevers HC, Pelet A, Farlie PG, Fitzpatrick DR, Lyonnet S; Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. Nat Genet. 2009 Mar;41(3):359-64. Epub 2009 Feb 22.

7. Brennan C, Zhang Y, Leo C, Feng B, Cauwels C, Aguirre AJ, Kim M, Protopopov A, Chin L; High-resolution global profiling of genomic alterations with long oligonucleotide microarray. Cancer Res. 2004 Jul 15;64(14):4744-8.

8. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP; A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. Bioinformatics. 2003 Jan 22;19(2):185-93.

9. Cheung VG, Nowak N, Jang W, Kirsch IR, Zhao S, Chen XN, Furey TS, Kim UJ, Kuo WL, Olivier M, Conroy J, Kasprzyk A, Massa H, Yonescu R, Sait S, Thoreen C, Snijders A, Lemyre E, Bailey JA, Bruzel A, Burrill WD, Clegg SM, Collins S, Dhami P, Friedman C, Han CS, Herrick S, Lee J, Ligon AH, Lowry S, Morley M, Narasimhan S, Osoegawa K, Peng Z, Plajzer-Frick I, Quade BJ, Scott D, Sirotkin K, Thorpe AA, Gray JW, Hudson J, Pinkel D, Ried T, Rowen L, Shen-Ong GL, Strausberg RL, Birney E, Callen DF, Cheng JF, Cox DR, Doggett NA, Carter NP, Eichler EE, Haussler D, Korenberg JR, Morton CC, Albertson D, Schuler G, de Jong PJ, Trask BJ; BAC Resource Consortium; Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. Nature. 2001 Feb 15;409(6822):953-8.

10. Coe BP, Ylstra B, Carvalho B, Meijer GA, Macaulay C, Lam WL; Resolving the resolution of array CGH; Genomics. 2007 May;89(5):647-53.

11. Curtis C, Lynch AG, Dunning MJ, Spiteri I, Marioni JC, Hadfield J, Chin SF, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C; The pitfalls of platform comparison: DNA copy number array technologies assessed. BMC Genomics. 2009 Dec 8;10:588.

12. Dawe CE, Kooistra MK, Fairbridge NA, Pisio AC, McDermid HE; Role of chromatin remodeling gene *Cecr2* in neurulation and inner ear development. Dev Dyn. 2011 Feb;240(2):372-83.

13. Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V. (GfH) & Berufsverband Deutscher Humangenetiker e.V. (BVDH); Leitlinien für die molekulare und cytogenetische Diagnostik bei Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom. Medgen. 2010;22:282-286.

14. de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw N, Smeets D, Sistermans EA, Feuth T, van Ravenswaaij-Arts CM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA; Diagnostic genome profiling in mental retardation. Am J Hum Genet. 2005 Oct;77(4):606-16.

15. Dufke A, Riess O, Bonin M; Molekulare Karyotypisierung in der klinischen Anwendung. Medgen. 2008;20:419–430.

16. Edelmann L, Hirschhorn K; Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. Ann N Y Acad Sci. 2009 Jan;1151:157-66.

17. Engel E; A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. Am J Med Genet. 1980;6(2):137-43.

18. Ferguson-Smith MA; Cytogenetics and the evolution of medical genetics. Genet Med. 2008 Aug;10(8):553-9.

19. Feuk L, Carson AR, Scherer SW; Structural variation in the human genome. Nat Rev Genet. 2006 Feb;7(2):85-97.

20. Galasso C, Lo-Castro A, El-Malhany N, Curatolo P; "Idiopathic" mental retardation and new chromosomal abnormalities. Ital J Pediatr. 2010 Feb 14;36:17.

21. Gevensleben H, Serçe N, Büttner R; Hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinome. Pathologe. 2010 6;438-444.

22. Gresham D, Dunham MJ, Botstein D; Comparing whole genomes using DNA microarrays. Nat Rev Genet. 2008 Apr;9(4):291-302.

23. Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP; The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. J Med Genet. 2005 Jan;42(1):8-16.

24. Hall N; Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. J Exp Biol. 2007 May;210(Pt 9):1518-25.

25. Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy A, McMullan DJ, Davison EV, Maher ER, Kilby MD; Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2011 Jan;37(1):6-14.

26. Hsu LY, Benn PA, Tannenbaum HL, Perlis TE, Carlson AD; Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: a large prenatal study. Am J Med Genet. 1987 Jan;26(1):95-101.

27. Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, Kobayashi S, Davis C, Dai H, He YD, Stephaniants SB, Cavet G, Walker WL, West A, Coffey E, Shoemaker DD, Stoughton R, Blanchard AP, Friend SH, Linsley PS; Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. Nat Biotechnol. 2001 Apr;19(4):342-7.

28. Illumina, Illumina's genotyping data normalization methods. 2007, Illumina

29. Illumina, Infinium Genotyping Data Analysis. 2010, Illumina

30. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP; Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics. 2003 Apr;4(2):249-64.

31. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D; Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.

32. Khojasteh M, Lam WL, Ward RK, MacAulay C; A stepwise framework for the normalization of array CGH data. BMC Bioinformatics. 2005 Nov 18;6:274.

33. Klopocki E, Schulze H, Strauss G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM, Habenicht R, König R, Seemanova E, Megarbane A, Ropers HH, Ullmann R, Horn D, Mundlos S; Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. Am J Hum Genet. 2007 Feb;80(2):232-40.

34. Lebl M, Burger C, Ellmann B, Heiner D, Ibrahim G, Jones A, Nibble M, Thompson J, Mudra P, Pokorny V, Ponkar P, Zenisek K; Fully automated parallel oligonucleotide synthesizer. Collect Czech Chem Commun. 2001;66:1299-1314.

35. Mantripragada KK, Tapia-Páez I, Blennow E, Nilsson P, Wedell A, Dumanski JP; DNA copy-number analysis of the 22q11 deletion-syndrome region using array-CGH with genomic and PCR-based targets. Int J Mol Med. 2004 Feb;13(2):273-9.

36. Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E; Taschenlehrbuch der Humangenetik. Georg Thieme Verlag; 2006; 7. Auflage.

37. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF; Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Saunders Elsevier; 2007; 7th edition.

38. Oldridge DA, Banerjee S, Setlur SR, Sboner A, Demichelis F; Optimizing copy number variation analysis using genome-wide short sequence oligonucleotide arrays. Nucleic Acids Res. 2010 Jun;38(10):3275-86.

39. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP; Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 May 24;91(11):5022-6.

40. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG; High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet. 1998 Oct;20(2):207-11.

41. Pinto D, Marshall C, Feuk L, Scherer SW; Copy-number variation in control population cohorts. Hum Mol Genet. 2007 Oct 15;16 Spec No. 2:R168-73.

42. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP; A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. Nature. 2010 Jun 24;465(7301):1033-8.

43. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO; Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. Nat Genet. 1999 Sep;23(1):41-6.

44. Poot M, Eleveld MJ, van 't Slot R, Ploos van Amstel HK, Hochstenbach R; Recurrent copy number changes in mentally retarded children harbour genes involved in cellular localization and the glutamate receptor complex. Eur J Hum Genet. 2010 Jan;18(1):39-46.

45. Rauch A.; Molekulare Karyotypisierung in der klinischen Diagnostik; Medgen. 2008;20:386–394.

46. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschendorf F, Nürnberg P, Reis A, Trautmann U; Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. Am J Med Genet A. 2006 Oct 1;140(19):2063-74.

47. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME; Global variation in copy number in the human genome. Nature. 2006 Nov 23;444(7118):444-54.

48. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA; Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.

49. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G; Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 2002 Jun 15;30(12):e57.

50. Shalon D, Smith SJ, Brown PO; A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. Genome Res. 1996 Jul;6(7):639-45.

51. Shaw CJ, Lupski JR; Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. Hum Genet. 2005 Jan;116(1-2):1-7.

52. Shendure J, Ji H; Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol. 2008 Oct;26(10):1135-45.

53. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P; Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. Genes Chromosomes Cancer. 1997 Dec;20(4):399-407.

54. Stankiewicz P, Lupski JR; Structural variation in the human genome and its role in disease. Annu Rev Med. 2010;61:437-55.

55. Steemers FJ, Gunderson KL; Whole genome genotyping technologies on the BeadArray platform. Biotechnol J. 2007 Jan;2(1):41-9.

56. Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Masson G, Barnard J, Baker A, Jonasdottir A, Ingason A, Gudnadottir VG, Desnica N, Hicks A, Gylfason A, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, Sainz J, Agnarsson K, Birgisdottir B, Ghosh S, Olafsdottir A, Cazier JB, Kristjansson K, Frigge ML,

Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K; A common inversion under selection in Europeans. Nat Genet. 2005 Feb;37(2):129-37.

57. Steinberg G, Stromsborg K, Thomas L, Barker D, Zhao C; Strategies for covalent attachment of DNA to beads. Biopolymers. 2004 Apr 5;73(5):597-605.

58. Trask BJ; Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. Nat Rev Genet. 2002 Oct;3(10):769-78.

59. Veitia RA, Birchler JA; Dominance and gene dosage balance in health and disease: why levels matter! J Pathol. 2010 Jan;220(2):174-85.

60. Veltman JA, Brunner HG; Understanding variable expressivity in microdeletion syndromes. Nat Genet. 2010 Mar;42(3):192-3.

61. Vlacich G, Nawijn MC, Webb GC, Steiner DF; Pim3 negatively regulates glucose-stimulated insulin secretion. Islets. 2010 Sep-Oct;2(5):308-17.

62. Wong CK, Cao J, Yin YB, Lam CW; Interleukin-17A activation on bronchial epithelium and basophils: a novel inflammatory mechanism. Eur Respir J. 2010 Apr;35(4):883-93.

63. Zavialov AV, Gracia E, Glaichenhaus N, Franco R, Zavialov AV, Lauvau G; Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. J Leukoc Biol. 2010 Aug;88(2):279-90.

5.1 Internet-Quellen

Affymetrix	www.affymetrix.de
Agilent	www.agilent.com
BAC PAC Resources Center	http://bacpac.chori.org/
DECIPHER	http://decipher.sanger.ac.uk/
DGV	http://projects.tcag.ca/variation/
Ilumina	www.illumina.com
MRC-Holland	www.mrc-holland.com
NCBI Gene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene
OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

6 Anhang

Anhang 1:

N. Damatova, V. Beyer, D. Galetzka, E. Schneider, U. Napiontek, A. Keilmann, U. Zechner, O. Bartsch, T. Haaf; Haploinsufficiency of 16.4 Mb from Chromosome 22pter-q11.21 in a Girl with Unilateral Conductive Hearing Loss; Cytogenet. Genome Res. 2009; 125:241–247.

Anhang 2

A. Behnecke, K. Hinderhofer, O. Bartsch, A. Nümann, M.-L. Ipach, N. Damatova, T. Haaf, A. Dufke, O. Riess, and U. Moog; Intragenic Deletions of IL1RAPL1: Report of Two Cases and Review of the Literature; Am. J. Med. Genet. Part A 2011; 155:372-379.

Anhang 3

O. Bartsch, E. Schneider, N. Damatova, R. Weis, M. Tufano, R. Iorio, A. Ahmed, V. Beyer, U. Zechner, and T. Haaf; Fulminant Hepatic Failure Requiring Liver Transplantation in 22q13.3 Deletion Syndrome; Am. J. Med. Genet. Part A 2010; 152A:2099–2102.

Anhang 4

M. Poot, V. Beyer, I. Schwaab, N. Damatova, R. van't Slot, J. Prothero, S. E. Holder, T. Haaf; Disruption of CNTNAP2 and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder; Neurogenetics 2010; 11:81–89.

Anhang 5

U. Zechner, N. Kohlschmidt, G. Rittner, N. Damatova, V. Beyer, T. Haaf, O. Bartsch; Epimutation at human chromosome 14q32.2 in a boy with a upd(14)mat-like clinical phenotype; Clin. Genet. 2009; 75: 251–258

6.1 Anhang 1

N. Damatova, V. Beyer, D. Galetzka, E. Schneider, U. Napiontek, A. Keilmann, U. Zechner, O. Bartsch, T. Haaf

Haploinsufficiency of 16.4 Mb from Chromosome 22pter-q11.21 in a Girl with Unilateral Conductive Hearing Loss

Cytogenet. Genome Res. 2009; 125:241–247.

Der experimentelle Beitrag von N. Damatova lag in der Untersuchung der haploinsuffizienten Region mittels der folgenden Techniken: FISH, arrayCGH, MLPA mit einem selbst hergestellten Sondenset, STR-Analysen.

Die Auswertung der ArrayCGH-Daten, Datenbankrecherchen und die Identifizierung von Kandidatengenen wurden ebenfalls von N. Damatova durchgeführt. Das Manuskript wurde von ihr geschrieben und revidiert.

Human Cytogenetics Case Report

Cytogenetic and Genome Research

Cytogenet Genome Res 2009;125:241–247
DOI: 10.1159/000230008

Accepted after revision: April 24, 2009
by J. Crolla

Haploinsufficiency of 16.4 Mb from Chromosome 22pter-q11.21 in a Girl with Unilateral Conductive Hearing Loss

N. Damatova[a] V. Beyer[a] D. Galetzka[a] E. Schneider[a] U. Napiontek[b]
A. Keilmann[b] U. Zechner[a] O. Bartsch[a] T. Haaf[a]

[a]Institute for Human Genetics, and [b]Division for Communication Disorders, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

Key Words
Chromosome 22 · Conductive hearing loss · der(18) · Haploinsufficiency

Abstract
We present the postnatal diagnosis of a de novo der(18)t(18;22)(p11.32;q11.21)pat, resulting in an unbalanced 45,XX,der(18)t(18;22) karyotype in a girl with conductive hearing loss on the left and ptosis of the right upper eye-lid. Unilateral ptosis was also observed in the patient's 2 years and 8 months younger sister, who grows noticeably faster and appears to be a much quicker learner. After speech therapy the patient was eventually placed in normal school. The haploinsufficient 16.4-Mb region on chromosome 22pter→q11.21 contains 10 genes as well as many predicted genes, pseudogenes, and retrotransposed sequences with unknown functions. This observation may prove useful for prenatal diagnosis and genetic counselling of chromosome 22q11.1 gains and losses.
Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

Chromosomal imbalances that are detected by conventional chromosome banding analyses usually involve 10 or more megabases of DNA and result in an abnormal phenotype. The specific malformations that have been associated with deletions and duplications of a chromosome region are caused by the decreases and increases in the dosage of developmentally important genes [Brewer et al., 1998, 1999]. The phenotypic consequences of deletions are generally more severe than those of duplications. However, there is an increasing number of exceptions to this rule, showing chromosomal non-penetrance of cytogenetically detectable imbalances [Barber, 2005]. The Chromosome Anomaly Register (http://www.ngrl.org.uk/Wessex/collection.html) reviews more than 150 families with unbalanced chromosome abnormalities in individuals without apparent or very mild phenotype. The fact that in some families the child had an abnormal phenotype whereas one of its parents and other carriers in the family were completely healthy may be explained by chance coincidence of malformations and unbalanced karyotype in the index patient. On the other hand, it is plausible that similar to single gene mutations, the phenotypic consequences of chromosomal imbalances are influenced by other genetic and environmental factors and, therefore, are highly variable. Here we report on a girl with unilateral conductive hearing loss and a de novo deletion of chromosome 22pter→q11.21. The unbalanced chromosome abnormality was ascertained for 'incidental reasons' in the course of a scientific project. In order to identify disease-associated balanced chromosome rearrangements for positional cloning of new deafness genes,

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2009 S. Karger AG, Basel
1424–8581/09/1253–0241$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/cgr

Professor Thomas Haaf
Institute for Human Genetics, Johannes Gutenberg University
Langenbeckstrasse 1, Bldg. 601, 55131 Mainz (Germany)
Tel. +49 6131 175 790, Fax +49 6131 175 690
E-Mail haaf@humgen.klinik.uni-mainz.de

we have conducted cytogenetic analyses in >300 children with varying degrees of non-syndromal hearing impairment [Schneider et al., 2009]. Neither pediatricians nor clinical geneticists suspected that the girl with a haploinsufficient 16.4-Mb region had a 'chromosomal phenotype'.

Materials and Methods

Cytogenetic and Molecular Cytogenetic Analyses

Metaphases were prepared from short term phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures and analysed with classic GTG-banding at the 500 band level. Region-specific bacterial artificial chromosome (BAC) clones were selected from the Wellcome Trust Sanger Institute Ensembl contigs (http://www.ensembl.org). Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed, as described previously [Yue et al., 2005].

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

MLPA analysis of the subtelomere regions was performed with kits P036 and P070 (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer's protocols. To determine the relative number of genes from chromosome 22q11.1 we designed our own MLPA probe mixture (table 1) using AlleleID software (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA).

Array Comparative Genomic Hybridization (arrayCGH)

High-resolution deletion breakpoint mapping was performed with the Affymetrix GeneChip Genome Wide Human SNP array 6.0 and the GeneChip Genome Wide SNP Sty Assay Kit 5.0/6.0, following the protocol developed by the manufacturer (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

Short Tandem Repeat (STR) Analysis

The Readymix Taq kit (Sigma, Deisenhofen, Germany) was used to amplify the polymorphic markers GATA198B05N, D22S686, D22S689, D22S691, D22S692, and D22S417 from genomic DNA of the patient and her parents.

Results

Clinical Report

The patient was the first child of a healthy 34 year old gravida-I, para-I and a healthy father. Her younger sister was also healthy. Family history was unremarkable. The pregnancy had been uncomplicated, but due to pelvic presentation and premature labor, our patient was born in week 37 by Caesarean section. Weight was 2,390 g (10th percentile), length 46 cm (10–25th percentile), and OFC 34 cm (75th percentile). Apgar scores were 10 and 10. At birth, mildly low birthweight and ptosis of the right upper lid were noted. Developmental milestones were reached late. She began sitting at 10 months, walked at 18 months, and spoke first words around 13 months, and a very mild developmental delay not requiring special treatment was recorded.

She was introduced to the Division for Communication Disorders at the age of 5 years because of dyslalia and limited comprehension of speech and speech therapy was initiated. Moderate conductive hearing impairment on the left was diagnosed when she was 5 years and 4 months old. Pure tone audiometry indicated a 60 dB hearing loss on the left and normal hearing on the right. Routine workup included creatinine, blood urea nitrogen, complete blood count, tests for thyroid hormone levels, ophthalmologic examination including funduscopy, and electrocardiogram. The most common autosomal recessive form of deafness, DFNB1 [Hone and Smith, 2003], was excluded by complete sequencing of the *GJB2* gene. Physical examination revealed a premature thelarche (Tanner stage 2). Height was 111 cm (25–50th percentile) and weight 18 kg (25–50th percentile). IQ was 108 by nonverbal intelligence testing (Raven's Coloured Progressive Matrices).

After provision with a hearing aid, she caught up in development and started normal primary school at the age of 7 years, which is late normal school age in Germany. When last seen at the age of 7 years and 10 months, she was a reposeful amiable girl with clear, age-adequate speech and good school achievements. The ptosis of the right eye had remained constant since birth. Thelarche had not progressed in the past years and pediatric endocrinological evaluation of sex hormones had been normal. Genital development was prepubertal (Tanner stage 1). Height was 125 cm (25th percentile) and OFC 52 cm (50–75th percentile).

Remarkably, the younger sister was said to show a unilateral ptosis as well but only when tired and it was much milder. Despite the patient's development in the normal range, her mother reported essential differences between her 2 children and described her 2 years and 8 months younger daughter as a much quicker learner. Moreover, the younger daughter had grown noticeably faster and had been 5 cm taller at any given age, and both daughters had the same size of shoes despite the difference in age.

Delineation of the Haploinsufficient Region

Chromosome banding analysis of the index patient revealed an unbalanced karyotype, 45,XX,der(18)t(18;22)(p11.32;q11.21) (fig. 1A). Almost the entire long arm of chromosome 22 appeared to be fused to the subtelomeric region of chromosome 18, resulting in loss of one copy of the proximal long arm and short arm of chromosome 22

Table 1. MLPA kit for chromosome 22q11.1 used for the analysis of the index patient

Gene	Probe type	Primer and amplicon sequence	Tm (°C)	Length (bp)	Chromosomal position (basepair position)	Dosage quotient
AGRN intron 2–3 (reference gene)	LPO	GGCTGAGCTG GTGGAAGGAA CTCTTGGCT	69.7	29	1p36.33 (gene: 945,366–981,355) (amplicon: 951,331–951,386)	0.975
	RPO	P-TTTTCCAGAC CCCACCCCAC TCCCTCA	68.5	27		
	Amplicon	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAT GGCTGAGCTG GTGGAAGAA CTCTTGGCTT TTTCCAGACC CCACCCCACT CCCTCACTCT AGATTGGATC TTGCTGGCAC		100		
LMLN intron 1–2 (reference gene)	LPO	GTGTGTATAA TTGTGTTGAG ATTCCCAAGA CACTCCAGGTTT	71.8	45	3q29 (gene: 199,171,468–199,254,988) (amplicon: 199,181,533–199,181,615)	1.030
	RPO	P-GTGATTGCTA GTGGCCTCGC AGATTCAGCT GTCG	72.4	37		
	Amplicon	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAT GTGTGTATAA TTGTGTTGAG GATTCCCAAG ACCACTCCAG GTTTGGTGAT TGCTAGGTGG CCTCGCTAGA TTCAGCTTGT CGCTCTAGAT TGGATCTTGC TGGCAC		126		
CECR6 exon 1	LPO	CCATTGTCCC ATGCCTTGAA ATTGACCCAG AACCCACTTT	72.7	40	22q11.1 (gene: 15,977,189–15,982,257) (amplicon 15,979,812–15,979,898)	0.614
	RPO	P-CCACTGATGT GTCTCTTGGA TTTCTTCCAG GTGATGATA CAAAGT	70.8	46		
	Amplicon	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAT CCATTGTCCC ATGCCTTGAA ATTGACCCAG AACCCACTTT CCACTGATGT GTCTCTTGGA TTTCTTCCAG GTGATAGATAC AAAGTCTCTA GATTGGATCT TGCTGGCAC		130		
CECR5 intron 6–7	LPO	TGTAATCCTA GCTCTGCCCT CTTGAACAAG TTACTTAATC TTGCT	70.7	45	22q11.1 (gene: 15,998,411–16,026,177) (amplicon: 15,999,809–15,999,899)	0.628
	RPO	P-GTGCCTTGGT TTCCTCGTTT TACAAATAGC GTCATCTCAT AGAGT	71.5	45		
	Amplicon	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAT TGTAATCCTA GCTCTGCCCT CTTGAACAAG TTACTTAATC TTGCTGTGCC TTGGTTTCCT CGTTTTACAA ATAGCGTCATC TCATGAGTC TCTAGATTGG ATCTTGCTGGCAC		134		
CECR1 exon 2	LPO	GATTTGCTCA CCCAACTCCC CGTCCATCAG AAAA	70.0	34	22q11.1 (gene: 16,040,192–16,082,879) (amplicon: 16,067,991–16,068,063)	0.618
	RPO	P-ATGTTCCAAG TGGATTCTGC TGGAGGATTA TCGGAAGC	70.7	38		
	Amplicon	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAT GATTTGCTCA CCCAACTCCC CGTCCATCAG AAAAATGTTC CAAGTGGATT CTGCTGGAGG ATTATCGGAA GCCTCTGAT TGGATCTTGC TGGCAC		116		
CECR2 intron 6–7	LPO	AAGGGTATAG ATGGTTTACA GATGCGGCGA TGGGAAAGT	71.3	39	22q11.1 (gene: 16,336,135–16,413,845) (amplicon: 16,369,122–16,369,201)	0.687
	RPO	P-GCGTAGGGAA ACATTCACGT TCTGTATCAA GAATAGCATT	68.6	40		
	Amplicon	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAT AAGGGTATAG ATGGTTTACA GATGCGGCGA TGGGAAAGTG CGTAGGGAAA CATTCACGTT CTGTATCAAG AATACATTC TCTAGATTGG ATCTTGCTGG CAC		123		
CECR2 exon 17	LPO	CCACCGCCAC AGCCTTCCTA CCACCACTAT CA	72.0	32	22q11.1 (gene: 16,336,135–16,413,845) (amplicon: 16,408,538–16,408,602)	0.623
	RPO	P-GCGAACTCCT TACTATGCCT GTCCACAGAG CT	69.1	32		
	Amplicon	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAT CCACCGCCAC AGCCTTCCTA CCACCACTAT CAGCGAACTC CTTACTATGC CTGTCCACAG AGCTCTCTAG ATTGGATCTT GCTGGCAC		108		
SLC25A18 exon 11	LPO	CTGCGTTGTA GTGCTACCTC AATCTCGGGA GAAAC	71.8	35	22q11.21 (gene: 16,423,150–16,453,647) (amplicon: 16,453,108–16,453,182)	0.992
	RPO	P-AGCCCTATAT TCTAACAAGT TGAGCACAGC CTTCTTCCC	70.3	39		
	Amplicon	GGGTTCCCTA AGGGTTGGAT CTGCGTTGTA GTGCTACCTC AATCTCGGGA GAAACAGCCC TATATTTAA CAAGTTGAGC ACAGCCTTCT TCCCCTCTAG ATTGGATCTT GCTGGCAC		118		

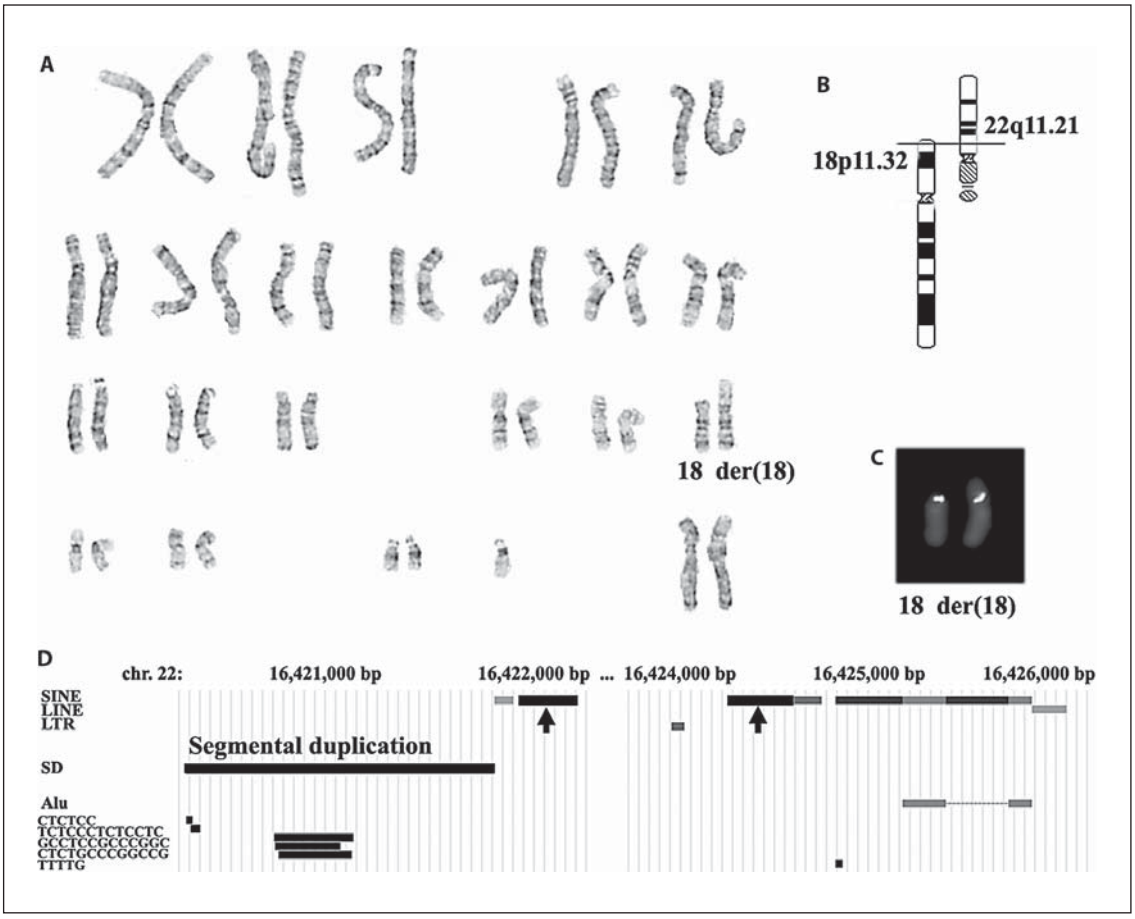


Fig. 1. A Karyotype, 45,XX,der(18)t(18;22)(p11.32;q11.21) of the patient with unilateral hearing impairment. **B** Ideograms of chromosomes 18 and 22 with the cytogenetic breakpoint regions. **C** Normal chromosome 18 and der(18) hybridized with the subtelomeric probe pVYS249B (Vysis). **D** Repetitive DNA elements in the chromosome 22q11.21 breakpoint region, identified with the UCSC Genome Browser (http://genome.ucsc.edu/). The 1.5-kb-long segmental duplication shares high sequence similarity with the 11p subtelomeric region. The 2 SINEs marked by arrows have paralogous 200–300 bp segments on chromosomes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, and 20.

(fig. 1B). The karyotypes of both parents and the patient's younger sister were normal. To determine the parental origin of the derivative chromosome, we chose polymorphic STR markers from chromosome 22. One informative marker, GATA198B05N (chr. 22: 16,030,650–16,030,795 bp), in the deleted region delineated an allele on the patient's normal chromosome 22, which was clearly derived from the mother. Therefore, we conclude that the derivative chromosome 18 arose in the paternal germ line.

An 18p subtelomeric probe (pVYS249B, Vysis) and BAC RP11-68L23 (chr. 18: 5,961–142,961 bp) hybridized to both the normal and the derivative chromosome 18 (fig. 1C). Subtelomere MLPA analysis revealed normal gene dosages for *USP14* and *THOC1* at chromosome 18p11.32 (data not shown). This implies that the breakpoint on chromosome 18p occurred within the first 100 kb of the short-arm telomere and that no known gene was lost from chromosome 18. In order to delineate the haploinsufficient region on the derivative chromosome, BAC clones from chromosome 22q11 were hybridized to the patient's metaphase spreads. BAC RP11-172D07 (chr. 22: 16,245,214–16,382,809 bp) did not hybridize to the der(18), whereas RP11-313A18 (chr. 22: 16,297,981–16,501,061 bp) was clearly present (data not shown). Because in our experience 20 kb of genomic DNA sequences are more than sufficient to generate a detectable FISH signal, the chromosome 22q11.21 breakpoint must lie in the 120-kb interval between 16,362,809 bp and 16,481,061

bp, including the distal 20 kb of both BACs. We used a customized MLPA kit to determine the copy number of *CECR6*, *CECR5*, *CECR1*, *CECR2*, and *SLC25A18* in the critical region 22q11.1. We found one genomic copy of each tested *CECR* gene but 2 copies of *SLC25A18* (table 1, last column). This localized the breakpoint to the 45-kb interval (chr. 22: 16,408,602–16,453,108 bp) between *CECR2* exon 17 and *SLC25A18* exon 11.

ArrayCGH analysis revealed no segmental aneuploidy in any chromosome, except for the deleted chromosome 22 region. The deletion breakpoint in band 22q11.21 was narrowed down to the 5.7-kb interval between SNP CN_895837 (16,420,148 bp) (deleted) and CN_895838 (16,425,846 bp) (retained). The haploinsufficent region encompasses 16.4 Mb. Apart from the rRNA gene cluster on the short arm, the deleted chromosome 22pter→q11.21 contains 10 genes, *POTEH*, *OR11H1*, *CCT8L2*, *XKR3*, *GAB4*, *IL17RA*, *CECR6*, *CECR5*, *CECR1*, and *CECR2*, as well as a number of pseudogenes and predicted genes. The breakpoint interval partially overlaps with the 5′-UTR of the *SLC25A18* gene (chr. 22: 16,423,150–16,453,647 bp). It contains a 1.5-kb-long segmental duplication and 2 short interspersed nuclear elements (SINEs) with paralogous sequences on multiple other chromosomes (fig. 1D).

In addition, we performed MLPA analysis of chromosome 22q11.1 in a population of hearing loss patients without *GJB2* mutations. Eight of 126 (6.4%) patients with non-syndromal hearing impairment were endowed with only one copy of *CECR6*. However, when we screened 26 control individuals without hearing impairment, 3 of them (11.5%) also showed *CECR6* haploinsufficiency, implying that this is a frequent deletion polymorphism. Interestingly, we did not find any *CECR6* duplications. No copy number variations were found for *CECR5*, *CECR1*, *CECR2*, and *SLC25A18*.

Discussion

Imbalances of the proximal long arm of chromosome 22 are associated with distinct syndromes. Duplication of 22pter→q11.2 causes cat eye syndrome (CES, OMIM #115470), which is charactererized by a combination of iris coloboma and anal atresia. Other clinical features include facial anomalies, preauricular skin tags and pits, heart, renal, skeletal and genital anomalies, and mild to moderate mental retardation. The CES phenotype is highly variable, ranging from severe malformations (with lethal outcome) to near normal [Schinzel, 2001]. Although familial transmission is possible, most supernumerary idic(22)(pter→q11.2::q11.2→pter) chromosomes arise de novo in the germ line of one parent. The frequent occurrence of mosaicism is explained by early loss of the marker during embryo cleavage divisions. Deletion of chromosome band 22q11.2 causes DiGeorge (DGS, OMIM #188400) and velocardiofacial syndrome (VCFS, #192430), comprising conotruncal heart defects, hypoplasia of thymus (T cell defects) and parathyroids (hypocalcemia), and facial anomalies. The malformations may largely result from haploinsufficiency of the *TBX1* gene at chromosome 22q11.2 [Jerome and Papaioannou, 2001]. The duplication breakpoints that give rise to the smaller type I and the larger type II CES marker chromosomes are clustered in 2 intervals, which correspond to the proximal and common distal breakpoint region, respectively, of the 1.5–3-Mb deletion in DGS/VCFS. The proximal breakpoint interval was mapped between markers D22S427 and D22S1638 (16,971,376–17,375,064 bp) and the distal interval between *CRKL* and D22S112/D22S636 (19,601,714–20,718,185 bp) [McTaggert et al., 1998]. The recurrent deletions, duplications, and translocations involving chromosome 22q11.2 are mediated by nonallelic homologous recombination events between low-copy repeats or segmental duplications adjacent to the breakpoints [Emanuel, 2008].

The chromosome 22q11.21 breakpoint region (chr. 22: 16,420,148–16,425,846 bp) that was involved in formation of the der(18) described here lies approximately 550 kb proximal to the type I CES breakpoint interval. The relatively mild phenotype of our patient suggests that there are very few dosage-sensitive genes in the 16.4-Mb haploinsufficient region. Indeed, the chromosome band 22q11.1 is gene poor and enriched with euchromatic DNA segments that were duplicatively transposed to the pericentromeric regions of other chromosomes during primate evolution [Bailey et al., 2002]. Several genes in the critical region, i.e. *CCT8L2*, *XKR3*, *GAB4*, and *CECR6*, lie in DNA segments that show copy number variations in the human genome (Database of Genomic Variants, http://projects.tcag.ca/variation/; Database of Chromosome Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; https://decipher.sanger.ac.uk/application/). Other genes, i.e. *POTEH*, *OR11H1*, and *GAB4* have functionally related loci on other chromosomes that may substitute those deleted. Considering the non-penetrance of monogenic disorders, deletion of a single or a few dosage-sensitive genes must not always result in an apparent clinical phenotype. Additional evidence for the lack of severe phenotypic consequences of 22q11.1 deletions

comes from a family, in which an unbalanced (9q;22q) translocation with monosomy for chromosome 22q11 was ascertained during prenatal diagnosis and found in 3 other apparently normal family members [Barber, 2005]. By FISH mapping the 9q subtelomere was intact and the chromosome 22 breakpoint was in band 22q11.21. Because there is no correlation between the length of the duplicated segment in CES and the severity of the phenotype, the additional duplicated segment (chr. 22: 17,375,064–19,637,884 bp) in type II marker chromosomes may contribute little to the phenotype. Instead, dosage-sensitive genes in the 1-Mb segment (chr. 22: 16,423,150–17,375,064 bp) that is duplicated in type I marker chromosomes but present in 2 copies in our patient may be largely responsible for the spectrum of malformations in CES.

Although so far there is no evidence for a deafness locus on chromosome 22q11.1 (Hereditary Hearing Loss Homepage, http://webh01.ua.ac.be/hhh), it is tempting to speculate that the conductive hearing loss in our patient is caused by haploinsufficiency of a gene in the deleted region. *POTEH* is expressed in prostate, testis, ovary, and placenta [Lee et al., 2006]. *OR11H1* is a member of the olfactory receptor gene family. *CCT8L1* encodes a chaperonin, which helps misfolded proteins to regain their functional structure. *XKR3* is a testis-specific homologue of XK, a component of the Kell blood group complex [Calenda et al., 2006]. GAB4 belongs to the GRB2-associated binding protein family. The cytokine receptor IL17RA binds with low affinity to the proinflammatory interleukine 17A. All these genes are unlikely candidates for a deafness-causing locus. MLPA revealed copy number variation of the CES critical region gene 6 (*CECR6*), whereas *CECR5, CECR1*, and *CECR2* were always present in 2 copies. Little is known about *CECR6* and *CECR5*, which have conserved synteny between humans and mice [Footz et al., 2001]. *CECR1* encodes a putative growth factor which is expressed in numerous fetal and adult tissues. RNA in situ hybridization showed specific expression in the developing human heart, the notochord, and the VII/VIII cranial nerve ganglion [Riazi et al., 2000]. Overexpression of *CECR1* in a transgenic mouse model resulted in abnormal heart, kidney, and eye development [Riazi et al., 2005]. *CECR2* is expressed in a developmental stage and tissue-specific manner. In the fetus it is most abundant in the neural tube and adjacent spinal ganglia, the nasal epithelium, lens and neuroretina. It forms a chromatin remodelling complex, which plays a critical role in neurulation. *Cecr2*$^{-/-}$ knockout mice showed neural tube defect exencephaly [Banting et al., 2005]. These data suggest that an increased *CECR5*, *CECR1*, and/or *CECR2* dosage may be responsible for at least some features of CES. *SLC25A18* encodes a mitochondrial glutamate transporter with strong expression in adult human brain and weaker expression in other tissues [Fiermonte et al., 2002]. Most likely this gene is not disrupted in our patient, however we cannot exclude the possibility that the deletion affects its 5′-UTR.

Interestingly, patient 4110 in the decipher database (https://decipher.sanger.ac.uk/application/patient/4110) carries a del(22)(q11.1;q11.21) (0.86 Mb, containing 10 genes), which partially overlaps with the haploinsufficient region in our patient, as well as a dup(22)(q11.21; q11.22) (3.58 Mb, 52 genes), a del(22)(q11.23;q11.23) (0.23 Mb, 2 genes), and a del(22)(q12.1;q12.1) (2.07 Mb, 9 genes). Although patient 4110 presents a more severe phenotype with mental retardation, hypotonia, and multiple congenital abnormalities, she also has deafness. This strengthens the notion that a gene(s) relevant for hearing impairment is located in the 0.65-Mb interval (chr. 22: 15,767,644–16,420,148 bp), which is deleted in both patients. Although we cannot exclude a chance coincidence, we propose that the unbalanced chromosome rearrangement in our patient has created a dominant mutation or unmasked a recessive mutation in a gene(s), *GAB4*, *IL-17RA*, *CECR6*, *CECR5*, *CECR1*, and/or *CECR2*, that maps to this region.

Acknowledgements

We thank Dr. Heidi Rossmann for help with the microarray experiment. This study was supported by research grant HA 1374/7-1 from the German Research Foundation.

References

Bailey JA, Yavor AM, Viggiano L, Misceo D, Horvath JE, et al: Human-specific duplication and mosaic transcripts: the recent paralogous structure of chromosome 22. Am J Hum Genet 70:83–100 (2002).

Banting GS, Barak O, Ames TM, Burnham AC, Kardel MD, et al: CECR2, a protein involved in neurulation, forms a novel chromatin remodeling complex with SNF2L. Hum Mol Genet 14:513–524 (2005).

Barber JCK: Directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities and euchromatic variants. J Med Genet 42:609–629 (2005).

Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D: A chromosomal deletion map of human malformations. Am J Hum Genet 63:1153–1159 (1998).

Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D: A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality and tolerance of segmental aneuploidy in humans. Am J Hum Genet 64:1702–1708 (1999).
Calenda G, Peng J, Redman CM, Sha Q, Wu X, Lee S: Identification of two new members, XPLAC and XTES, of the XK family. Gene 370:6–16 (2006).
Emanuel BS: Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. Dev Disabil Res Rev 14:11–18 (2008).
Fiermonte G, Palmieri L, Todisco S, Agrimi G, Palmieri F, Walker JE: Identification of the mitochondrial glutamate transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. J Biol Chem 277: 19289–19294 (2002).
Footz TK, Brinkman-Mills P, Banting GS, Maier SA, Riazi MA, et al: Analysis of the cat eye syndrome critical region in humans and the region of conserved synteny in mice: a search for candidate genes at or near the human chromosome 22 pericentromere. Genome Res 11:1053–1070 (2001).
Hone SW, Smith RJ: Genetic screening for hearing loss. Clin Otolaryngol 28:285–290 (2003).
Jerome LA, Papaioannou VE: DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. Nat Genet 27:286–291 (2001).
Lee Y, Ise T, Ha D, Saint Fleur A, Hahn Y, et al: Evolution and expression of chimeric POTE-actin genes in the human genome. Proc Natl Acad Sci USA 103:17885–17890 (2006).
McTaggert KE, Budarf ML, Driscoll DA, Emanuel BS, Ferreira P, McDermid HE: Cat eye syndrome chromosome breakpoint clustering: identification of two intervals also associated with 22q11 deletion breakpoints. Cytogenet Cell Genet 81:222–228 (1998).
Riazi AM, Van Arsdell G, Buchwald M: Transgenic expression of CECR1 adenosine deaminase in mice results in abnormal development of heart and kidney. Transgenic Res 14: 333–336 (2005).
Riazi MA, Brinkman-Mills P, Nguyen T, Pan H, Phan S, et al: The human homolog of insect-derived growth factor, CECR1, is a candidate gene for features of cat eye syndrome. Genomics 64:277–285 (2000).
Schinzel A: Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man (De Gruyter, Berlin 2001).
Schneider E, Märker T, Daser A, Frey-Mahn G, Beyer V, et al: Homozygous disruption of *PDZD7* by reciprocal translocation in a consanguineous family: a new member of the Usher syndrome protein interactome causing congenital hearing impairment. Hum Mol Genet 18:655–666 (2009).
Yue Y, Grossmann B, Holder SE, Haaf T: De novo t(7;10)(q33;q23) translocation and closely juxtaposed microdeletion in a patient with macrocephaly and developmental delay. Hum Genet 117:1–8 (2005).

Addendum

Addendum to the article 'Telomeres, Histone Code and DNA Damage Response' (Cytogenet Genome Res 2008;122:297–307 by Misri et al.)

Acknowledgements

Thanks are due to Clayton Hunt, Ryuji Higashikubo, Susana Gonzalo, Girdhar Sharma, Qin Yang and laboratory members for their contribution in writing the review.

6.2 Anhang 2

A. Behnecke, K. Hinderhofer, O. Bartsch, A. Nümann, M.-L. Ipach, N. Damatova, T. Haaf, A. Dufke, O. Riess, and U. Moog

Intragenic Deletions of *IL1RAPL1*: Report of Two Cases and Review of the Literature

Am. J. Med. Genet. Part A 2011; 155:372-379.

Der Beitrag von N. Damatova für diese Veröffentlichung umfasste die Analyse von arrayCGH-Daten, Datenbankrecherchen und die Identifizierung des Kandidatengens *IL1RAPL1*.

CLINICAL REPORT

AMERICAN JOURNAL OF medical genetics PART A

Intragenic Deletions of *IL1RAPL1*: Report of Two Cases and Review of the Literature

Anne Behnecke,[1]* Katrin Hinderhofer,[1] Oliver Bartsch,[2] Astrid Nümann,[1,3] Marie-Luise Ipach,[4] Natalja Damatova,[2,5] Thomas Haaf,[2,5] Andreas Dufke,[6] Olaf Riess,[6] and Ute Moog[1]

[1]Institute of Human Genetics, Heidelberg University, Heidelberg, Germany

[2]Institute of Human Genetics, University of Mainz, Mainz, Germany

[3]Department of Neurology, Charité-Humboldt University, Berlin, Germany

[4]Social Paediatric Center Trier, Trier, Germany

[5]Institute of Human Genetics, University of Würzburg, Mainz, Germany

[6]Medical Genetics Tübingen, Institute of Human Genetics, Tübingen, Germany

Received 14 April 2010; Accepted 11 July 2010

IL1RAPL1 (interleukin-1 receptor accessory protein-like 1) located at Xp21.3-22.1 has repeatedly been shown to be deleted in patients with a contiguous gene syndrome also affecting neighboring genes, in particular *DMD* (dystrophin), *DAX-1* (*NR0B1*, nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1), and *GK* (glycerol kinase). In contrast, intragenic deletions of *IL1RAPL1* or other mutations or cytogenetic aberrations affecting *IL1RAPL1* have only rarely been identified. Up to date, they have mostly been associated with nonspecific mental retardation (MRX). We report on two nonrelated patients with MR and additional dysmorphic features who both show intragenic deletions of *IL1RAPL1*, one of them being de novo (exon 2) and the other one being inherited from his mother (exons 3–5). Deletions were identified by microarray-based chromosome analysis and confirmed by multiplex PCR and FISH, respectively. These data, along with recent functional studies indicating its role in neuronal development, provide further evidence for the relevance of *IL1RAPL1* in the pathogenesis of X-linked MR and add knowledge to the phenotypic spectrum of *IL1RAPL1* mutations.

© 2010 Wiley-Liss, Inc.

Key words: X-linked mental retardation (XLMR); nonsyndromic XLMR (MRX); syndromic XLMR (MRXS); IL1RAPL1; intragenic deletion

How to Cite this Article:
Behnecke A, Hinderhofer K, Bartsch O, Nümann A, Ipach M-L, Damatova N, Haaf T, Dufke A, Riess O, Moog U. 2010. Intragenic deletions of *IL1RAPL1*: Report of two cases and review of the literature.
Am J Med Genet Part A 9999:1–8.

INTRODUCTION

To date, >90 genes associated with X-linked mental retardation (XLMR) have been identified, and 84 additional loci have been mapped for syndromic (MRXS) or nonsyndromic XLMR (MRX) [Gecz et al., 2009; http://www.ggc.org/xlmr.htm]. Among these, *IL1RAPL1* (interleukin-1 receptor accessory protein-like 1) was first described and mapped to Xp22.1-Xp21.3 in 1999 [Carrie et al., 1999]. It is located distal to *DMD* (dystrophin), *GK* (glycerol kinase), and *DAX-1* (*NR0B1*, nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1) and proximal to *ARX* (aristaless-related homeobox), and has been found to be deleted together with a variable number of adjacent genes in numerous patients with a contiguous gene syndrome [Carrie et al., 1999; Jin et al., 2000; Sasaki et al., 2003; Wheway et al., 2003; Zhang et al., 2004; Klein et al., 2006]. So far, three point mutations of *IL1RAPL1* [Carrie et al., 1999; Tabolacci et al., 2006; Piton et al., 2008] and different cytogenetic aberrations involving *IL1RAPL1* [Laumonnier et al., 2002; Lepretre et al., 2003; Bhat et al., 2008] have been identified. In addition, a small number of intragenic deletions have been reported, all associated with MRX [Carrie et al., 1999; Nawara et al., 2008; Piton et al., 2008]. We now report on one sporadic patient and one family with two affected males with intragenic *IL1RAPL1* deletions, involving exon 2 and exons 3–5, respectively, who both presented with MR, additional dysmorphic signs and behavioral problems. In both cases the

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

*Correspondence to:
Anne Behnecke, M.D., Institute of Human Genetics, Heidelberg University, Im Neuenheimer Feld 366, 69120 Heidelberg, Germany.
E-mail: anne.behnecke@med.uni-heidelberg.de

Published online 00 Month 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)
DOI 10.1002/ajmg.a.33656

© 2010 Wiley-Liss, Inc.

deletions were identified by array techniques and confirmed by multiplex PCR.

MATERIALS AND METHODS

Molecular Karyotyping

DNA from Patient 1 and his parents was extracted from whole blood and hybridized on Affymetrix Human Mapping 500K SNP Array, version *Nsp* I and *Sty* I, and analyzed with the GCOS 1.4 and GTYPE software (Affymetrix, Santa Clara, CA).

DNA from Patient 2 and his mother was hybridized on Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix), which contains ~1,850,000 probes with an average distance of 1.3 kb between neighboring probes according to the manufacturer. Analyses were performed using the GeneChip Genome-Wide SNP Assay Kit 6.0 (Affymetrix) and the Genotyping Console 3.0.1 (Affymetrix) software. All CNVs required a minimum of five consecutive array probes detected and CNVs needed to be called by two or more algorithms.

Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR)

Multiplex PCR was performed in a 25 µl reaction containing 50 ng of DNA, 10 pmol of each primer, 200 µmol/L dNTPs, 2,5µl 10X PCR buffer, Minus MG (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.5 mmol/L $MgCl_2$, and 1 U of Taq DNA polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Carlsbad, CA). Primer sequences and details on PCR cycle length and temperature can be found in the supporting information which may be found in the online version of this article.

Cytogenetic Analysis, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA), and X-Inactivation Studies in Female Carriers

Methods were carried out as described previously [Allen et al., 1992]. Details can be found in the supporting information which may be found in the online version of this article.

CLINICAL REPORT AND RESULTS

Patient 1 (III:2 in Fig. 1b) was born in week 38 with a birth weight of 3,340 g (50th centile), a head circumference of 35 cm (50th centile), and a length of 49 cm (25th centile) as the second child of German nonconsanguineous parents. He showed no muscular hypotonia but his motor development was delayed. He never crawled, learned to walk at the age of 2 years, and had restricted fine motor skills. In addition, he developed scoliosis and a pectus excavatum. Until the age of 3 years, he was screaming frequently without perceptible reason. He always had difficulties in adjusting to new situations or surroundings and in socializing, and needed a well-structured daily routine. Speaking ability and his mood changed quickly in the course of the day, and his memory skills seemed to be extraordinary. At the age of $8^{9}/_{12}$ years his IQ was evaluated by HAWIVA (Hannover–Wechsler Test of Intelligence for Preschool-children)

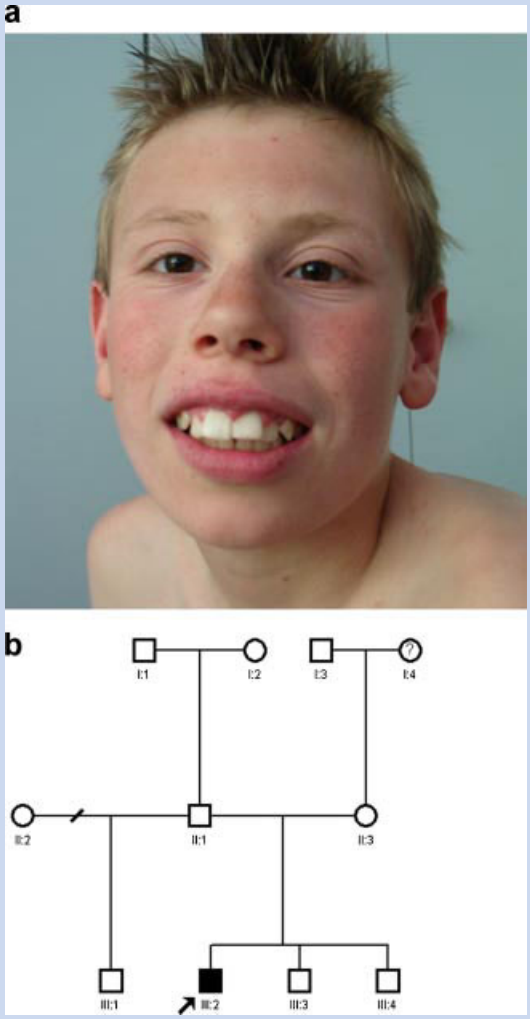


FIG. 1. a: Patient 1 at the age of 13 years. Note strabism, mild ptosis, receding forehead, high nasal bridge and broad nasal base, large mouth with full vermillions, maxillary prognathism and macrodontia of the central maxillary incisors. [Some of the facial features have been distorted by the way the picture was taken.] b: Pedigree of Family 1 with deletion of exon 2 of *IL1RAPL1*. Patient 1 as index person labeled with arrow and filled-in box. Person not available for study labeled with question mark. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

and attested to be according to the age of a $6^{6}/_{12}$ years old with an IQ between 70 and 85 (verbal and mathematical IQ: 85, performance IQ: 70). His parents reported that he had a reduced pain perception and that he shows hyperactive behavior. He was not tested for autism.

On examination at 13 years of age, his length and weight corresponded to the 25th and 3rd centile, respectively; his OFC was 52 cm (3rd to 10th centile). Aside from the thoracic scoliosis he had normal body proportions. He presented with strabism convergens and focal hyperpigmentation secondary to severe atopic dermatitis which had been diagnosed at the age of 36 months. He

showed minor dysmorphic facial features including a receding forehead, mild ptosis, a high nasal bridge and broad nasal base, a large mouth with full vermillions, maxillary prognathism, and macrodontia especially of the central maxillary incisors and broad alveolar ridges (Fig. 1a). He still had limited fine motor skills. Both parents (II.2, II:3 in Fig. 1b) did not show any dysmorphic signs.

Chromosome analysis showed a normal 46,XY karyotype at a 500 banding level. Subtelomeric screening by MLPA did not reveal subtelomeric imbalances. Results of a subsequent molecular karyotyping with a high-resolution SNP-array (Affymetrix Human Mapping 500K SNP-Array) indicated a loss from 28.6 to 28.9 Mb on the X-chromosome. This loss corresponds to a 300-kb deletion in Xp21.3 and encompasses parts of the *IL1RAPL1* gene. Multiplex PCR analysis confirmed this result and more specifically showed a deletion of exon 2 of *IL1RAPL1* (P1 in Fig. 3a) which presumably is de novo as his mother (II:3 in Fig. 1b) showed a diploid copy number at this locus. A somatic or germline mosaicism though cannot be entirely excluded. The grandmother was not available for the study.

Patient 2 (III:1 in Fig. 2b) was the second child of physically healthy, nonconsanguineous German parents. Following spontaneous labor at 39 weeks, he was born with a birth weight of 3,170 g (25th centile), a length of 50 cm (50th centile), and an OFC of 36 cm (90th centile). At the age of $1^{10}/_{12}$ years, developmental and speech delay were first diagnosed. He could walk at the age of $2^{10}/_{12}$ years and visited a kindergarten for children with special needs from age 3 years. At age 4 years, his weight was 15 kg (3rd to 10th centile), length 97 cm (3rd centile), and OFC 53 cm (90th centile). At the age of $4^{9}/_{12}$ years, his intelligence was evaluated by SON-R (Snijders–Oomen nonverbal intelligence test for children, revised), indicating

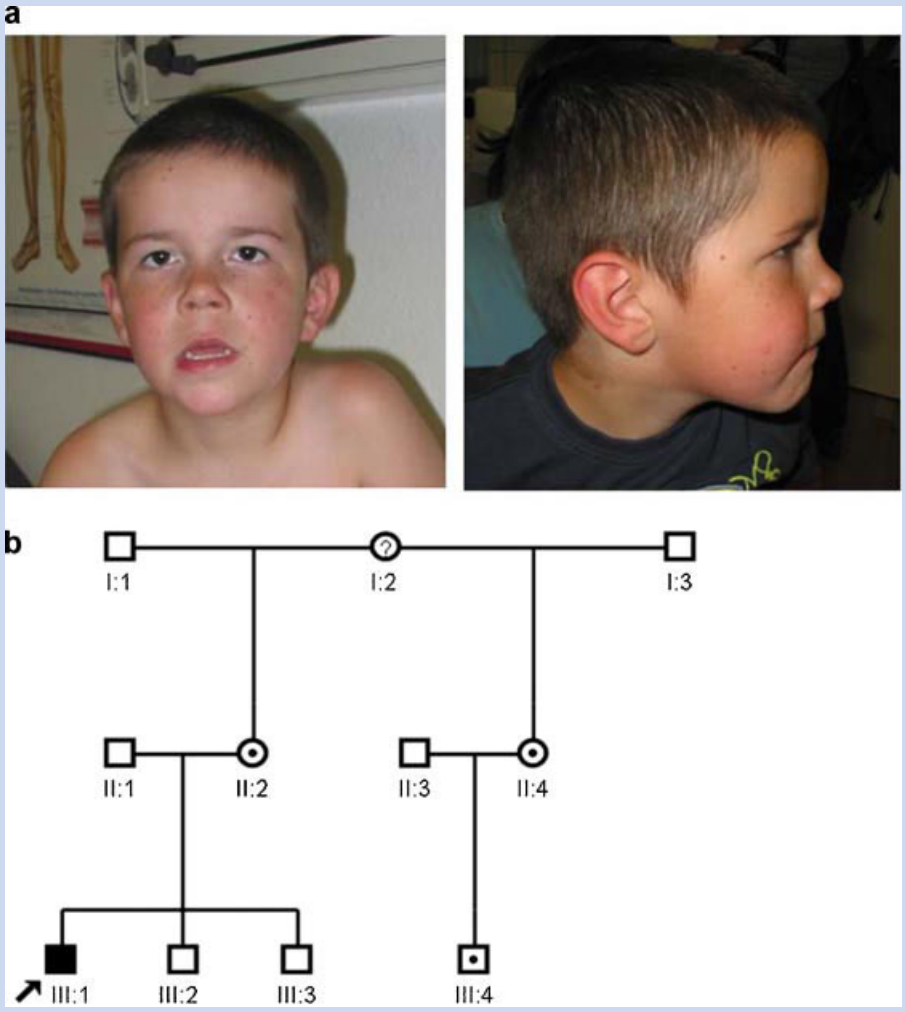


FIG. 2. a: Patient 2 at the age of 7 years. Note macrocephaly, long forehead, mildly downslanting palpebral fissures, deep-set eyes, fullness of the upper eyelids, squint and ptosis, strabism, short upturned nose with a broad tip, long philtrum, thin upper vermillion, facial hypotonia, mouth held open with salivation, and facial freckling. b: Pedigree of Family 2 with deletion of exons 3–5 of *IL1RAPL1*. Patient 2 (III:2) as index person labeled with arrow and filled-in box, his mother (II:1), her half-sister (II:3), and his cousin (III:4) labeled with black dot as mutation carriers. Phenotype of III:4 unknown, but *IL1RAPL1* deletion verified. Person not available for study labeled with question mark. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

a developmental age between $2^{1}/_{12}$ and $2^{10}/_{12}$ years, corresponding to a development quotient (DQ) which can be roughly equated with an IQ between 44 and 60. He had marked strabism (angle 15°), hyperopia and astigmatism (right eye +4.0 to 0.75 dpt, left eye +4.5 to 0.75 dpt), and lack of stereo vision.

When seen at age $7^{6}/_{12}$ years (Fig. 2a) he had relative macrocephaly, long forehead, mildly down-slanting palpebral fissures, deep-set eyes, fullness of the upper eyelids, squint and ptosis, strabism, short upturned nose with a broad tip, long philtrum, thin upper vermillion, facial hypotonia, mouth held open with salivation, and facial freckling. He had a wide space between the first and second toes. He also had moderate-to-severe developmental retardation, muscular hypotonia, limited motor skills, slow reactions, and a very short attention span, but no hyperactivity or impulsivity. He was not fully toilet-trained. He used single words, understood simple requests and could count to six with help. An electroencephalogram revealed no abnormalities.

Chromosome analysis at 500 bands resolution and subtelomeric screening by MLPA showed normal results. Microarray analysis indicated loss of 482 kb from the short arm of the X-chromosome from 28,964,917–29,446,770 bp (according to NCBI 36/HG18), corresponding to exons 3–5 (c.82 + 245454_c.703 + 117424del) of the *IL1RAPL1* gene (NM_014271) (Fig. 3a). The deletion starts 245,454 bp after exon 2 and ends 117,424 bp after exon 5. The deletion was confirmed using FISH and multiplex PCR (Fig. 3b).

His mother (II:2 in Fig. 2b), who had learning difficulties at school, showed a similar squinting of the eyes. She spoke fluently and had acquired the skills for her everyday life, but needed a social worker. IQ testing was not performed. Her third child, a son, was born normal. He could walk independently at the age of 12 months.

The mother's maternal half-sister (II:4 in Fig. 2b) by report had more marked learning difficulties, and the 3-year-old son of her (III:4 in Fig. 2b) resembled Patient 2, both physically and in terms of development. Both were unavailable for physical examination.

Conventional karyotyping of the mother (II:2 in Fig. 2b) at a 450 band level was normal, but FISH analyses indicated that she, her half-sister (II:4 in Fig. 2b) and her nephew (III:4 in Fig. 2b) also carried the *IL1RAPL1* deletion. XCI analysis in her showed an

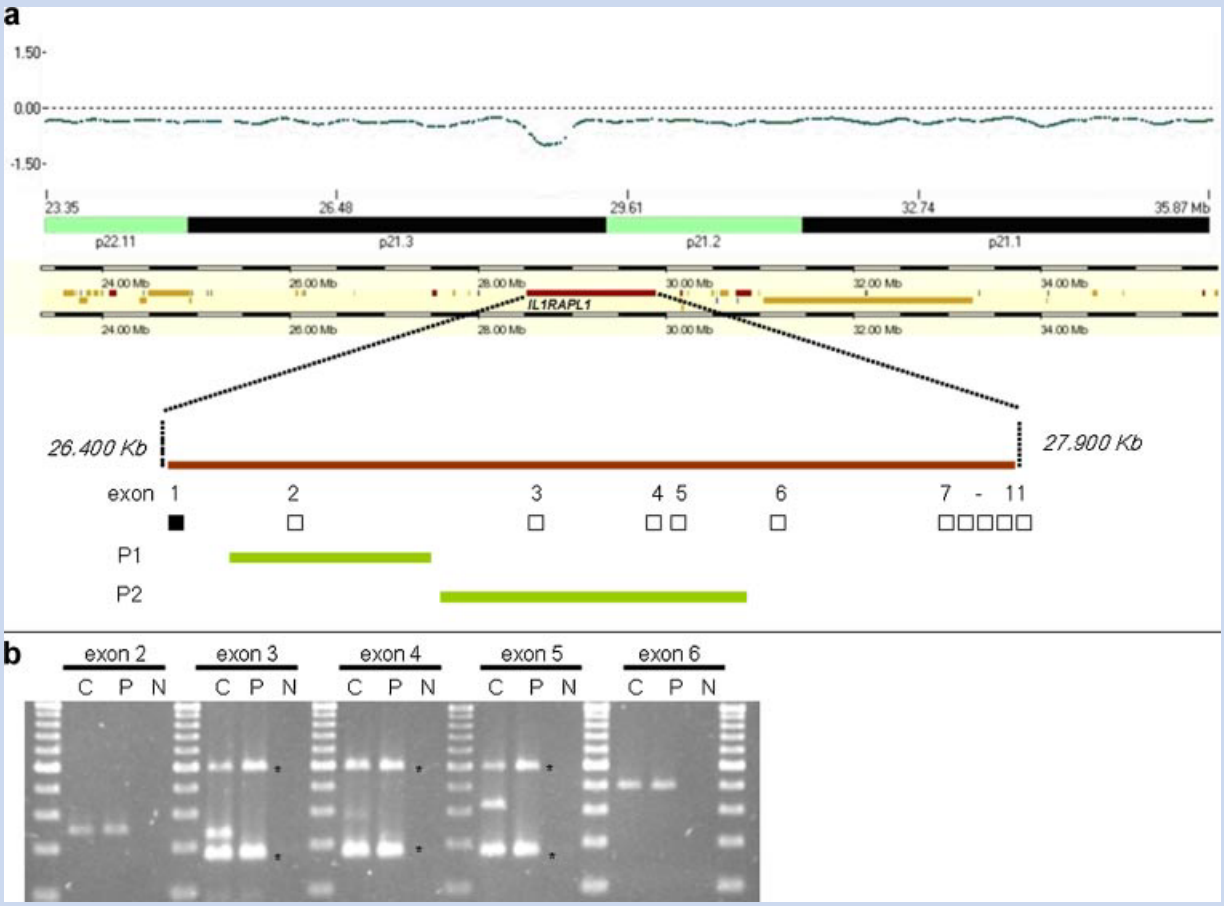


FIG. 3. a: Microarray results of Patient 1 indicating a 300 kb deletion of *IL1RAPL1* corresponding to exon 2 and schematic illustration of *IL1RAPL1* and the deletions found in Patient 1 (P1) and Patient 2 (P2). b: Multiplex PCR results of Patient 2 (P2) confirming the deletion of exons 3–5 of *IL1RAPL1*: PCR amplification from genomic DNA of proband 2 (P), an unrelated control (C), and a negative control (N). The fragments cover coding exons 2–6 of the *IL1RAPL1* gene. Control fragments (upper band: exon 19 of the *DMD* gene; lower band: exon 72 of the *DMD* gene) are marked with asterisks. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

unskewed X-inactivation pattern. The grandmother of Patient 2 was not available for the study.

DISCUSSION

Most of the patients with *IL1RAPL1* deletions described so far had a contiguous gene syndrome and thus showed further clinical signs of, for example, adrenal hypoplasia or glycerol kinase deficiency in addition to MR [Carrie et al., 1999; Jin et al., 2000; Wheway et al., 2003; Zhang et al., 2004]. Some of these patients also presented with short stature and epilepsy which could not unambiguously be explained by the involvement of the respective deleted genes [Jin et al., 2000], but most of the signs could be ascribed to mutations of contiguous genes. Interestingly, Zhang et al. [2004] described a 4-year-old boy with normal intelligence despite a deletion of the entire *IL1RAPL1* gene and *DAX1* (*NR0B1*), but no clinical follow-up data or formal test results were given.

So far, patients from nine families with changes affecting only the *IL1RAPL1* gene have been reported. Three of the nine index patients had intragenic deletions, three had point mutations and three pericentric inversions of the X-chromosome. A summary of their findings is presented in Table I. Most of them presented with MR only and lacked dysmorphic, neurological or behavioral symptoms which could have helped to distinguish between affected and unaffected family members [Kozak et al., 1993; Billuart et al., 1996; des Portes et al., 1998; Carrie et al., 1999; Hane et al., 1999; Tabolacci et al., 2006; Piton et al., 2008]. Thus, both intragenic deletions and point mutations of *IL1RAPL1* have been considered to be associated with the nonsyndromic form of MR.

Nevertheless, there are a few reports of patients with changes affecting *IL1RAPL1* who show subtle dysmorphic signs or other clinical features in addition to MR or global developmental delay. Two unrelated males with a pericentric X-chromosome inversion involving *IL1RAPL1* were described to have different facial dysmorphic signs, in one case also autism. In both cases, the respective features were not present in the carrier mothers [Lepretre et al., 2003; Bhat et al., 2008]. Also behavioral disturbances have been observed in some patients, for example, hyperactivity and autoaggressive behavior in a family with four males with a deletion of exons 2–5 [Nawara et al., 2008].

Our patients also presented with dysmorphic signs and changes in behavior in addition to their MR. Thus, there is increasing evidence that *IL1RAPL1* changes can be associated with both, MRX and MRXS, as it has been shown for a growing number of X-linked genes influencing intellectual function [Frints et al., 2002; Kleefstra and Hamel, 2005; Ropers and Hamel, 2005]. Nevertheless, the distinction between syndromic and nonsyndromic XLMR is not always evident, and it seems that the additional dysmorphic, behavioral or neurological features seen in patients with mutations in *IL1RAPL1* are rather unspecific and inconsistent. In conclusion, and until more information about families with *IL1RAPL1* mutations can be gathered, *IL1RAPL1* continues to be associated with MRX rather than MRXS.

It is well known that a loss of one or several exons of a gene can be damaging to different degrees. At the protein level, the deletion identified in Patient 2 predicts loss of 207 amino acids from Asp29 till Ala235 (p.Asp29_Ala235del). The full-length protein consists of 696 amino acids including three extracellular immunoglobulin-like domains, a transmembrane domain and a cytoplasmic part that contains a TIR domain and a specific tail [Bahi et al., 2003]. The mutated protein should lack the first two Ig-like domains. However, since it is quite possible that protein synthesis stops after the deletion, it is difficult to predict whether a protein is synthesized at all. Exon 2 of *IL1RAPL1* contains the start codon, it can only be speculated whether additional start codons in exon 3 can be used alternatively leading to a truncated and partially functional protein in Patient 1. Bhat et al. [2008] suggest a less severe clinical feature in patients with complete absence of IL1RAPL1 but severe consequences in patients with a truncated IL1RAPL1. Comparing patients with mutations and intragenic deletions of *IL1RAPL1*, so far no genotype–phenotype correlation can be established [Carrie et al., 1999; Tabolacci et al., 2006; Piton et al., 2008].

Carrier females were found to be of normal intelligence and without physical abnormalities by des Portes et al. [1998], Carrie et al. [1999], and Nawara et al. [2008]. Other carrier women, especially those with an underlying cytogenetic aberration, presented with learning difficulties or a mild form of MR, in one case also with hypotonia [Laumonnier et al., 2002; Lepretre et al., 2003; Bhat et al., 2008; Piton et al., 2008]. In the case of a pericentric inversion the second breakpoint might contribute to the phenotype as well. Taken together, however, the phenotypic spectrum caused by mutations of *IL1RAPL1* varies in females from normal intelligence and no physical abnormalities or obvious neurological impairment, to learning disabilities, mild MR and/or autistic spectrum disorder (ASD). In the present case, the mother of Patient 2 and her half-sister both were carriers of a deletion of exons 3–5 of *IL1RAPL1*, and had learning difficulties.

Analysis of X-chromosome inactivation (XCI) in carrier women has been performed in a few studies only and showed inconsistent results. It was found to be unskewed in two carrier woman with an inverted X chromosome disrupting *IL1RAPL1* who presented with mild MR [Lepretre et al., 2003; Bhat et al., 2008]; skewed in favor of the wild-type in two carrier women from family MRX21, one of whom had a normal IQ and the other a learning disability; and skewed in favor of the mutant allele in a female carrier with normal IQ from another family [Tabolacci et al., 2006]. In our family, the mother of Patient 2 showed an unskewed X-inactivation pattern. In agreement with other groups we conclude that because of the inconsistent XCI pattern in the blood of female carriers of *IL1-RAPL1* mutations XCI is neither a valuable tool to identify carrier females nor to predict the phenotype of those women. The variable phenotype may however correlate to their X-inactivation status in the central nervous system.

So far, only a small part of the role of *IL1RAPL1* in the central nervous system has been unraveled. IL1RAPL1 interacts with the synaptic protein neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) which modulates synaptic transmission and plasticity through voltage-gated Ca^{2+} channels [Gambino et al., 2007]. It has been proposed that *IL1RAPL1* is involved in the pathogenesis of ASD although mutations in this gene probably are a rare cause of ASD [Bhat et al., 2008; Piton et al., 2008]. A link between the regulation of calcium levels and ASD has been suggested [Krey and Dolmetsch, 2007], in particular since other genes encoding calcium channel subunits

TABLE I. Clinical, Cytogenetic, and Molecular Data of Patients With Mutations/Deletions/Cytogenetic Aberrations of *IL1RAPL1*

		Clinical information					
Refs.	**Patients**	**Degree of MR**	**Intrafamilial variability**	**Behavior**	**Dysmorphism**	**Results**	**XCI**
Present study	1 M isolated	IQ 70–85	Isolated case	Hyperactive	+	Del exon 2	
	2 M and 2 F relatives	M: IQ 44–60, F: learning difficulties	M: low variability, F: low variability	Attention deficit	M: +, F: −	Del exons 3–5	Random XCI
Carrie et al. [1999]	6 M relatives	MR (IQ <70)	n.d.	n.d.	−	Del exons 3–5	n.i.
	3 M relatives	MR (IQ <70)	n.d.	n.d.	−	Mut exon 10 (p.Y459X)	n.i.
Nawara et al. [2008]	4 M and 4 F relatives	1/4 M mild MR, 2/4 M moderate MR, 1/4 M severe MR, F: normal IQ	M: high variability, F: clinically normal	2/4 M hyperactive, autoaggressive	−	Del exons 2–5	n.i.
Piton et al. [2008]	3 M and 1 F relatives	1/3 M profound MR, 1/3 M mild MR, 1/3 M borderline IQ, F: normal IQ	M: high variability, F: clinically normal	1/3 M autism; 1/3 M ADHS; 1/3 M PDD-NOS	−	Del exons 3–7	n.i.
	1 F isolated	Borderline IQ	Isolated case	Marked anxiety; Asperger syndrome	−	Mut exon 9 (p.I367SX6)	n.i.
Tabolacci et al. [2006] and Kozak et al. [1993]	4 M and 5 F relatives	M: moderate MR, 1/5 F mild MR, 2/5 F learning disability	M: low variability, F: high variability	n.d.	−	Mut exon 10 (p.W487X)	Inconsistently skewed XCI
Laumonnier et al. [2002]	1 F isolated	Mild MR (IQ 50–55)	Isolated cases	—	−	Pericentric inversion (inv(X)(p21.3q27.1))	Random XCI
Lepretre et al. [2003]	1 M and 1 F relatives	M: MR (IQ 54), F: mild MR	Isolated cases	M: violent, stereotypical	M: +, F: −	Pericentric inversion (inv(X)(p21.3q27.1))	Random XCI
Bhat et al. [2008]	1 M and 1 F relatives	M: global DD (n.d.), F: mild MR (IQ 69)	Isolated cases	M: ASD, F: ASD	M: +, F: −	Pericentric inversion (inv(X)(p22.1q13))	Random XCI

+, present; −, absent; ADHS, attention deficit hyperactivity disorder; ASD, autistic spectrum disorder; DD, developmental delay; Del, deletion; M, male; MR, mental retardation; Mut, mutation; n.d., not defined; n.i., not investigated; PDD-NOS, pervasive developmental disorder—not otherwise specified; XCI, X-chromosome inactivation analysis.

have been associated with autistic phenotypes [Splawski et al., 2004, 2006; Hope et al., 2005]. *IL1RAPL1* may also exert a key function during cerebellar development by regulating the balance between local excitatory and inhibitory circuits [Gambino et al., 2007, 2009].

In conclusion, the present reports add to the knowledge of the phenotypic spectrum of *IL1RAPL1* deletions and indicate the limit of strict differentiation between syndromic and nonsyndromic XLMR also for *IL1RAPL1* mutations and deletions. Being 1 of >90 identified genes on the X-chromosome associated with MR so far and with more still in queue, *IL1RAPL1* might play a rather minor role in the pathogenesis of mental retardation. Nevertheless, further clinical investigations and functional studies of *IL1RAPL1* will contribute to the understanding of the complex genetic landscape of XLMR.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients and their parents whose help and participation made this work possible.

REFERENCES

Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. Am J Hum Genet 51:1229–1239.

Bahi N, Friocourt G, Carrie A, Graham ME, Weiss JL, Chafey P, Fauchereau F, Burgoyne RD, Chelly J. 2003. IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with neuronal calcium sensor-1 and regulates exocytosis. Hum Mol Genet 12:1415–1425.

Bhat SS, Ladd S, Grass F, Spence JE, Brasington CK, Simensen RJ, Schwartz CE, Dupont BR, Stevenson RE, Srivastava AK. 2008. Disruption of the IL1RAPL1 gene associated with a pericentromeric inversion of the X chromosome in a patient with mental retardation and autism. Clin Genet 73:94–96.

Billuart P, Vinet MC, des Portes V, Llense S, Richard L, Moutard ML, Recan D, Bruls T, Bienvenu T, Kahn A, Beldjord C, Chelly J. 1996. Identification by STS PCR screening of a microdeletion in Xp21.3-22.1 associated with non-specific mental retardation. Hum Mol Genet 5:977–979.

Carrie A, Jun L, Bienvenu T, Vinet MC, McDonell N, Couvert P, Zemni R, Cardona A, Van Buggenhout G, Frints S, Hamel B, Moraine C, Ropers HH, Strom T, Howell GR, Whittaker A, Ross MT, Kahn A, Fryns JP, Beldjord C, Marynen P, Chelly J. 1999. A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. Nat Genet 23:25–31.

des Portes V, Carrie A, Billuart P, Kieffer V, Bienvenu T, Vinet MC, Beldjord C, Kahn A, Ponsot G, Chelly J, Moutard ML. 1998. Inherited microdeletion in Xp21.3-22.1 involved in non-specific mental retardation. Clin Genet 53:136–141.

Frints SG, Froyen G, Marynen P, Fryns JP. 2002. X-linked mental retardation: Vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. Clin Genet 62:423–432.

Gambino F, Pavlowsky A, Begle A, Dupont JL, Bahi N, Courjaret R, Gardette R, Hadjkacem H, Skala H, Poulain B, Chelly J, Vitale N, Humeau Y. 2007. IL1-receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1), a protein involved in cognitive functions, regulates N-type Ca2+-channel and neurite elongation. Proc Natl Acad Sci USA 104:9063–9068.

Gambino F, Kneib M, Pavlowsky A, Skala H, Heitz S, Vitale N, Poulain B, Khelfaoui M, Chelly J, Billuart P, Humeau Y. 2009. IL1RAPL1 controls inhibitory networks during cerebellar development in mice. Eur J Neurosci 30:1476–1486.

Gecz J, Shoubridge C, Corbett M. 2009. The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. Trends Genet 25:308–316.

Hane B, Stevenson RE, Arena JF, Lubs HA, Simensen RJ, Schwartz CE. 1999. Gene for apparently nonsyndromic X-linked mental retardation (MRX32) maps to an 18-Mb region of Xp21.2-p22. Am J Med Genet 85:271–275.

Hope CI, Sharp DM, Hemara-Wahanui A, Sissingh JI, Lundon P, Mitchell EA, Maw MA, Clover GM. 2005. Clinical manifestations of a unique X-linked retinal disorder in a large New Zealand family with a novel mutation in CACNA1F, the gene responsible for CSNB2. Clin Exp Ophthalmol 33:129–136.

Jin H, Gardner RJ, Viswesvaraiah R, Muntoni F, Roberts RG. 2000. Two novel members of the interleukin-1 receptor gene family, one deleted in Xp22.1-Xp21.3 mental retardation. Eur J Hum Genet 8:87–94.

Kleefstra T, Hamel BC. 2005. X-linked mental retardation: Further lumping, splitting and emerging phenotypes. Clin Genet 67:451–467.

Klein RD, Thorland EC, Gonzales PR, Beck PA, Dykas DJ, McGrath JM, Bale AE. 2006. A multiplex assay for the detection and mapping of complex glycerol kinase deficiency. Clin Chem 52:1864–1870.

Kozak L, Chiurazzi P, Genuardi M, Pomponi MG, Zollino M, Neri G. 1993. Mapping of a gene for non-specific X linked mental retardation: Evidence for linkage to chromosomal region Xp21.1-Xp22.3. J Med Genet 30:866–869.

Krey JF, Dolmetsch RE. 2007. Molecular mechanisms of autism: A possible role for Ca2+ signaling. Curr Opin Neurobiol 17:112–119.

Laumonnier F, Ronce N, Hamel BC, Thomas P, Lespinasse J, Raynaud M, Paringaux C, Van Bokhoven H, Kalscheuer V, Fryns JP, Chelly J, Moraine C, Briault S. 2002. Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency. Am J Hum Genet 71:1450–1455.

Lepretre F, Delannoy V, Froguel P, Vasseur F, Montpellier C. 2003. Dissection of an inverted X(p21.3q27.1) chromosome associated with mental retardation. Cytogenet Genome Res 101:124–129.

Nawara M, Klapecki J, Borg K, Jurek M, Moreno S, Tryfon J, Bal J, Chelly J, Mazurczak T. 2008. Novel mutation of IL1RAPL1 gene in a nonspecific X-linked mental retardation (MRX) family. Am J Med Genet Part A 146A:3167–3172.

Piton A, Michaud JL, Peng H, Aradhya S, Gauthier J, Mottron L, Champagne N, Lafreniere RG, Hamdan FF, Joober R, Fombonne E, Marineau C, Cossette P, Dubé MP, Haghighi P, Drapeau P, Barker PA, Carbonetto S, Rouleau GA. 2008. Mutations in the calcium-related gene IL1RAPL1 are associated with autism. Hum Mol Genet 17:3965–3974.

Ropers HH, Hamel BC. 2005. X-linked mental retardation. Nat Rev Genet 6:46–57.

Sasaki R, Inamo Y, Saitoh K, Hasegawa T, Kinoshita E, Ogata T. 2003. Mental retardation in a boy with congenital adrenal hypoplasia: A clue to contiguous gene syndrome involving DAX1 and IL1RAPL. Endocr J 50:303–307.

Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. 2004. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. Cell 119:19–31.

Splawski I, Yoo DS, Stotz SC, Cherry A, Clapham DE, Keating MT. 2006. CACNA1H mutations in autism spectrum disorders. J Biol Chem 281:22085–22091.

Tabolacci E, Pomponi MG, Pietrobono R, Terracciano A, Chiurazzi P, Neri G. 2006. A truncating mutation in the IL1RAPL1 gene is responsible for X-linked mental retardation in the MRX21 family. Am J Med Genet Part A 140A:482–487.

Wheway JM, Yau SC, Nihalani V, Ellis D, Irving M, Splitt M, Roberts RG. 2003. A complex deletion-inversion-deletion event results in a chimeric IL1RAPL1-dystrophin transcript and a contiguous gene deletion syndrome. J Med Genet 40:127–131.

Zhang YH, Huang BL, Niakan KK, McCabe LL, McCabe ER, Dipple KM. 2004. IL1RAPL1 is associated with mental retardation in patients with complex glycerol kinase deficiency who have deletions extending telomeric of DAX1. Hum Mutat 24:273.

6.3 Anhang 3

O. Bartsch, E. Schneider, **N. Damatova**, R. Weis, M. Tufano, R. Iorio, A. Ahmed, V. Beyer, U. Zechner, and T. Haaf

Fulminant Hepatic Failure Requiring Liver Transplantation in 22q13.3 Deletion Syndrome

Am. J. Med. Genet. Part A 2010; 152A:2099–2102.

Der Beitrag von N. Damatova für diese Veröffentlichung umfasste die Analyse von arrayCGH-Daten, Datenbankrecherchen und die Identifizierung des Kandidatengens *PIM3*.

CLINICAL REPORT

AMERICAN JOURNAL OF medical genetics PART A

Fulminant Hepatic Failure Requiring Liver Transplantation in 22q13.3 Deletion Syndrome

Oliver Bartsch,[1]* Eberhard Schneider,[1,2] Natalja Damatova,[1,2] Roger Weis,[3] Maria Tufano,[4] Raffaele Iorio,[4] Alischo Ahmed,[5] Vera Beyer,[1] Ulrich Zechner,[1] and Thomas Haaf[1,2]

[1]Johannes Gutenberg—University Mainz, Institute of Human Genetics, Mainz, Germany

[2]Julius Maximilians—University, Institute of Human Genetics, Würzburg, Germany

[3]Kinderneurologisches Zentrum, Mainz, Germany

[4]Department of Pediatrics, University of Naples Federico II, Naples, Italy

[5]Department Human Molecular Genetics, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany

Received 15 February 2010; Accepted 13 May 2010

We report on a 4-year-old girl with severe developmental delay, absent speech, and chromosome 22q13.3 deletion (Phelan–McDermid syndrome), karyotype 46,XX.ish del(22)(q13.31qter) (ARSA-,N85A-,SHANK3-). At the age of 3 years, she needed an emergency liver transplantation because of fulminant hepatic failure, most likely caused by hyperacute autoimmune hepatitis triggered by a viral infection. This is the second report of a patient with 22q13.3 deletion and fulminant liver failure. By array-CGH we identified in this patient a 5.675 Mb terminal deletion (22q13.31 → qter; including ~55 genes; from *NUP50* to *RABL2B*) and in the previous patient a 1.535 Mb deletion (22q13.32 → qter; including ~39 genes; from *BRD1* to *RABL2B*). *PIM3* is a prime candidate gene for the fulminant hepatic failure in the two patients; *SHANK3*/*PROSAP2* could be another candidate gene. We recommend liver function tests and array-CGH in the management of patients with Phelan–McDermid syndrome. This patient showed a developmental catch-up following the liver transplantation, possibly suggesting that chronic hepatic disease could contribute to the developmental delay in a subset of these patients. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Key words: 22q13.3 deletion syndrome; fulminant hepatic failure; liver transplantation; *PIM3*; *SHANK3*/*PROSAP2*; *PPARA*

How to Cite this Article:
Bartsch O, Schneider E, Damatova N, Weis R, Tufano M, Iorio R, Ahmed A, Beyer V, Zechner U, Haaf T. 2010. Fulminant hepatic failure requiring liver transplantation in 22q13.3 deletion syndrome.
Am J Med Genet Part A 152A:2099–2102.

INTRODUCTION

The 22q13.3 deletion syndrome or Phelan–McDermid syndrome (OMIM 606232) is characterized by absent or severely delayed expressive speech, hypotonia, global developmental delay, mildly abnormal craniofacial features, normal or advanced growth, and autistic behavioral traits [Nesslinger et al., 1994; Phelan et al., 2001; Havens et al., 2004; Cohen et al., 2005]. The deletions vary widely in size from 100 kb to >9 Mb [Anderlid et al., 2002; Wilson et al., 2003] and are predominantly of paternal origin (69–74%) [Luciani et al., 2003; Wilson et al., 2003]. The minimum deletion region includes the most distal genes on 22q, *SHANK3*/*PROSAP2*, *ACR*, and *RABL2B* [Luciani et al., 2003]. A recent case report of autoimmune hepatitis (AIH) in a girl with a 22q13 deletion suggested a link with the development of autoimmune disorders [Tufano et al., 2009]. Meanwhile 21 months after liver transplantation under maintenance therapy with tacrolimus (blood levels 3–5 ng/ml) and low doses of prednisone, this girl had a relapse of AIH with increased aminotransferase serum levels (AST 167 U/L; ALT 232 U/L) and antibodies against liver–kidney microsomal type 1 (LKM1). Liver biopsy of graft showed interface hepatitis, perivenular cell necrosis, bridging fibrosis, and collapse without the typical changes of an acute or chronic rejection. Treatment with high doses of prednisone (2 mg/kg/day) and azathioprine (1.5 mg/kg/day) led to prompt normalization of liver enzymes.

Here, we report on a second girl with 22q13.3 deletion who needed a split liver transplantation at the age of 3 years after a viral and/or AIH and fulminant hepatic failure. The deletion comprised the terminal 5.675 Mb of 22q, including the genes from *NUP50* to *RABL2B*. The report confirms that a subset of patients with 22q13.3 deletion are at risk of hyperacute liver failure. Therefore, we also

*Correspondence to:
Oliver Bartsch, Institut für Humangenetik, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg—Universität, Langenbeckstrasse 1, D-55101 Mainz, Germany. E-mail: bartsch@humgen.klinik.uni-mainz.de
Published online 15 July 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)
DOI 10.1002/ajmg.a.33542

© 2010 Wiley-Liss, Inc.

determined the deletion interval in the previous patient [Tufano et al., 2009] and identified *PIM3* as a prime candidate gene for the fulminant hepatic failure in both patients.

CLINICAL REPORT

The proposita is the first child of healthy, non-consanguineous German parents with a healthy younger daughter and uninformative family history. Following an uneventful pregnancy, she was born at term with normal measurements [weight 3,170 g, length 53 cm, and occipitofrontal circumference (OFC) 33 cm]. Apgar scores were 9 and 10 at 1 and 5 min. Postnatal adaptation was normal, but developmental milestones were delayed. She could crawl at the age of 1 year and walk at $1^{3}/_{12}$ years. At $2^{3}/_{12}$ years muscular hypotonia, a positive Galant reflex, broad-based gait, deficient fine motor and coordination skills, and absent speech were noted. She avoided eye contact and was easily irritated and anxious. An electroencephalogram (EEG) was normal. At $3^{3}/_{12}$ years, findings included moderate-to-severe developmental retardation, severely disturbed sensory perception, and reduced sensitivity to pain. She still had no speech, but could duplicate syllables. A diagnosis of Rett syndrome was considered but rejected, and parents did not wish genetic testing at that time. Laboratory findings, especially liver enzymes and blood counts were always normal.

At the age of $3^{10}/_{12}$ years, she suffered from fulminantly progressive liver failure requiring split liver transplantation (at University of Heidelberg, Germany). A week before, she had an upper airway infection with subfebrile temperatures, fatigue, and scleric icterus. Laboratory results at emergency admission to the pediatric intensive care unit were as follows: ALT > 1,000 U/L, AST > 1,000 U/L, total bilirubin 11 mg/dl, Quick 20%, and NH_3 79 µmol/L. Following rapid deterioration, increasing coagulation failure despite infusion of fresh frozen plasma, edema, floppiness, severe gum bleeding, and beginning hepatic encephalopathy, she was referred within hours for emergency liver transplantation (split segments 2 and 3). Laboratory results before transplantation included INR 2, AT III 20%, activated partial thromboplastin time >50 sec, and ANA 1/640. Serologic tests for hepatitis A, B, C, D, and E viruses, Epstein–Barr virus, HHV-6, varicella virus, enterovirus, and cytomegalovirus were negative. There was no history of drug intake or of metabolic disorders; ceruloplasmin and copper serum levels were normal. Liver biopsy was not performed because of the severe coagulopathy. Based on the clinical and laboratory findings, ANA-associated (type 1) AIH was suspected. Histologic evaluation of the explant liver showed subacute liver dystrophy with near-total loss of liver tissue, lobular necroses, chronic inflammatory reaction, and already considerable fibrosis. Only sparse hepatocytes remained, most of them ballooned and filling less than 5% of the organ. Fulminant hepatic failure in the course of non-A–non-E hepatitis was diagnosed. According to the criteria of the International Autoimmune Hepatitis Group the diagnosis of AIH was probable (score 14), specifically type-1 AIH [Alvarez et al., 1999]. Furthermore, on the basis of the recent history of upper airway infection and postoperative detection of HSV-I and influenza A virus in tracheal secretion, it is likely that the hepatitis could have been triggered by a viral infection.

Following the transplantation and initiation of immunosuppressive treatment, the patient returned home healthy with normal liver function. When referred for genetic testing at the age of $4^{3}/_{12}$ years, her height was 97 cm (3rd centile), weight 15 kg (25th centile), and OFC 49.8 cm (25th–50th centile). She had normal facial morphology, mild immunosuppression-derived hirsutism, non-irritant scars on her abdomen, and normal female genitalia. Her extremities were normal and fully mobile, but her big toes and the left little toe exhibited dystrophic and discolored toenails. Speech was absent. She showed reduced fine motor skills, slightly diminished coordination, and anxiety, preferring familiar activities. The parents noted global developmental catch-up of their daughter beginning immediately after the transplantation, and despite immunosuppressive treatment. Findings included marked improvement particularly in social interaction, sequential planning, and imitation of complex movements, and were confirmed by her Pediatric Neurologist, who also reported febrile seizures and generalized epilepsy from age 5 years, which was controlled by levitiracetam.

CYTOGENETIC STUDIES AND RESULTS

Cytogenetic Study, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

Chromosomal analysis using GTG banding showed a normal 46,XX karyotype at 450 band resolution. Deletion of the subtelomeric region of 22q was detected by MLPA with the P036 and P070 subtelomere screening kits (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands), and confirmed by two-color FISH with probes for 22q11.2 and 22q13.3 (Cytocell, Cambridge, UK; not shown).

Array Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)

Molecular chromosome analysis of this patient was first performed using an oligonucleotide-based array platform (244K chip, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), which has an 8.9 kb median probe spatial resolution. Results were visualized with Agilent's Feature Extraction 10.1 Image Analysis software and the CGH PRO software (Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany). We then studied both this and the previously published patient [Tufano et al., 2009] using the Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) with ~1,850,000 probes and an average distance of 1.3 kb between neighboring probes. Analyses were performed with the GeneChip Genome Wide SNP Sty Assay Kit 5.0/6.0 (Affymetrix) and the Genotyping Console 3.0.1 (Affymetrix). Results indicated deletion of the terminal 5.675 Mb (22q13.31 → qter; including ~55 genes; *NUP50* to *RABL2B*) in this patient (Fig. 1A), and of 1.535 Mb (22q13.32 → qter; including ~39 genes; *BRD1* to *RABL2B*) in the previously published patient [Tufano et al., 2009] (Fig. 1B).

DISCUSSION

The clinical, cytogenetic and molecular studies indicate that the proposita had a 22q13.3 deletion syndrome with typical physical

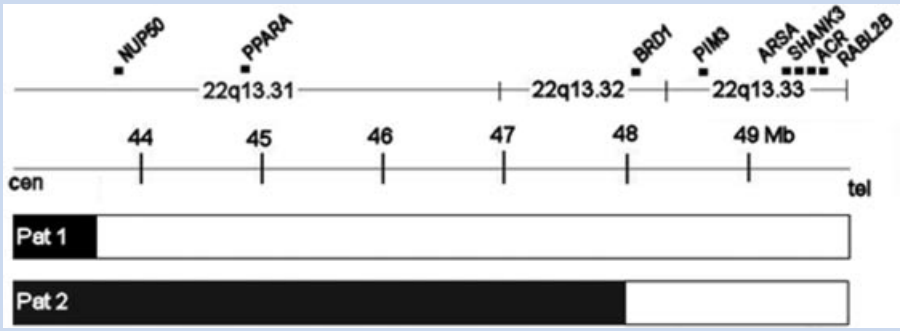


FIG. 1. Schematic representation of the chromosome 22 deletion intervals in the two patients. The deleted regions extend (A) in this patient from 43,906,513 bp to the telomere (22q13.31 → qter) and (B) in the previous patient from 48,046,496 bp to the telomere (22q13.32 → qter). The area of deletion overlap comprises the terminal 1.535 Mb of 22q13.3.

and behavioral features. Sudden liver failure occurred approximately 1 week after a common cold, most likely due to a severe AIH promoted by a HSV-I and/or influenza A virus infection. It is well known that these viruses can cause acute hepatitis and liver failure [Eron et al., 1976; Meerbach et al., 2006; Whitworth et al., 2006]. This is the second case of 22q13.3 deletion syndrome associated with fulminant AIH [Tufano et al., 2009].

This report including the recent recurrence of AIH in the previously published patient provides additional evidence for a predisposition to AIH and liver failure in a subset of these patients. The Phelan–McDermid syndrome has been associated with frequent respiratory infections and a susceptibility to viral infections [Havens et al., 2004], but it is yet unknown if and how this could be related to sudden liver failure.

This and the previously published patient [Tufano et al., 2009] share a deletion region of 1.535 Mb (Fig. 1) containing 39 genes, from *BRD1* to *RABL2B*. Of the deleted genes notably *PIM3* has been associated with liver disease before; in particular with the repair of hepatocyte injury [Liu et al., 2010]. *PIM3* is a member of the proto-oncogene Pim family encoding serine/threonine kinases and was reported to be aberrantly expressed in human and mouse hepatoma but not in normal liver [Fujii et al., 2005]. Downregulation of *PIM3* by RNA interference in human hepatoma cell lines was shown to result in decreased cell proliferation and increased apoptosis rate [Fujii et al., 2005]. In mice, liver-specific transgenic expression of *Pim3* was recently demonstrated to accelerate hepatocellular carcinoma development [Wu et al., 2010]. Most interestingly, another recent study concluded that the *Pim3* gene could protect rats from fulminant hepatic failure by inhibiting liver apoptosis and improving inflammatory response of liver tissues [Liu et al., 2010]. In addition, mice deficient for PIM kinases including *Pim3* showed reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors [Mikkers et al., 2004]. Based on these reports, we suggest that *PIM3* haploinsufficiency contributed to the fulminant liver failure in these 22q13.3 deletion patients by bringing forward hepatitis (viral or autoimmune), mainly by prolonging or preventing recovery from hepatocyte injury.

Our findings could also support a role of SHANK3/PROSAP2 in the development of the fulminant hepatic failure in some patients with 22q13.3 deletion. Deletion of SHANK3/PROSAP2 appears to be the major cause of the neurological signs, speech defect, and autism spectrum disorders in Phelan–McDermid syndrome [Wilson et al. 2003; Havens et al., 2004; Durand et al., 2007]. Furthermore, the ProSAP/Shank proteins are expressed in thymocytes and in lymphoid organs, and may also function in the coordination of membrane receptor-dependent signal transduction in immune cells [Redecker et al., 2006]. Tufano et al. [2009] proposed that SHANK3/PROSAP2 belongs to a group of genes outside the major histocompatibility complex (MHC) which, if mutated, may lead to increased risk of immunodeficiency and autoimmune phenomena. However, the pathogenic links remain to be clarified.

Interestingly, the parents of this patient and her Pediatric Neurologist noted a marked global developmental catch-up after the liver transplantation, and despite the immunosuppressive treatment. A possible explanation could be that chronic hepatic disease had contributed to the developmental delay in this patient and was alleviated by the liver transplantation.

PPARA, which is deleted in this but not in the previous patient with AIH (Fig. 1), encodes the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, which is important in hepatic and cardiac metabolism [Djouadi et al., 1998]. *Ppara*$^{-/-}$ knockout mice demonstrated hypoglycemia and massive lipid accumulation in liver and heart [Djouadi et al., 1998], and polymorphisms in *PPARA* have been associated with hyperapobetalipoproteinemia [Vohl et al., 2000] and hepatocellular carcinoma after HBV or HCV infection [Akkiz, 2008]. Further studies are needed to determine precisely how *PIM3*, SHANK3/PROSAP2, *PPARA*, and other genes lead to the developmental delay and the other clinical features in 22q13.3 deletion syndrome.

We recommend liver function tests in patients with deletion of 22q13.3, and we recommend the use of array-CGH in this disorder and other genomic disorders for predicting complications and improving management.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. Konrad Härtel for assistance with the manuscript and figures.

REFERENCES

Akkiz H. 2008. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: Does PPAR alpha polymorphism have a role in hepatocarcinogenesis associated with HBV and HCV infections? Turk J Gastroenterol 19:231–233.

Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M. 1999. International Autoimmune Hepatitis Group Report: Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J Hepatol 31:929–938.

Anderlid BM, Schoumans J, Annerén G, Tapia-Paez I, Dumanski J, Blennow E, Nordenskjöld M. 2002. FISH-mapping of a 100-kb terminal 22q13 deletion. Hum Genet 110:439–443.

Cohen D, Pichard N, Tordjman S, Baumann C, Burglen L, Excoffier E, Lazar G, Mazet P, Pinquier C, Verloes A, Héron D. 2005. Specific genetic disorders and autism: Clinical contribution towards their identification. J Autism Dev Disord 35:103–116.

Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, Kelly DP. 1998. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. J Clin Invest 102:1083–1091.

Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboy M, Bourgeron T. 2007. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. Nat Genet 39:25–27.

Eron L, Hirsch MS, Kosinski K. 1976. Hepatitis in an adult caused by Herpes simplex virus type I. Gastroenterology 71:500–504.

Fujii C, Nakamoto Y, Lu P, Tsuneyama K, Popivanova BK, Kaneko S, Mukaida N. 2005. Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. Int J Cancer 114:209–218.

Havens JM, Visootsak J, Phelan MC, Graham JM Jr. 2004. 22q13 deletion syndrome: An update and review for the primary pediatrician. Clin Pediatr (Phila) 43:43–53.

Liu LM, Zhang JX, Wang XP, Guo HX, Deng H, Luo J. 2010. Pim-3 protects against hepatic failure in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized rats. Eur J Clin Invest 40:127–138.

Luciani JJ, de Mas P, Depetris D, Mignon-Ravix C, Bottani A, Prieur M, Jonveaux P, Philippe A, Bourrouillou G, de Martinville B, Delobel B, Vallee L, Croquette MF, Mattei MG. 2003. Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: Cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations. J Med Genet 40:690–696.

Meerbach A, Sauerbrei A, Meerbach W, Bittrich HJ, Wutzler P. 2006. Fatal outcome of herpes simplex virus type 1-induced necrotic hepatitis in a neonate. Med Microbiol Immunol 195:101–105.

Mikkers H, Nawijn M, Allen J, Brouwers C, Verhoeven E, Jonkers J, Berns A. 2004. Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. Mol Cell Biol 24:6104–6115.

Nesslinger NJ, Gorski JL, Kurczynski TW, Shapira SK, Siegel-Bartelt J, Dumanski JP, Cullen RF Jr, French BN, McDermid HE. 1994. Clinical, cytogenetic, and molecular characterization of seven patients with deletions of chromosome 22q13.3. Am J Hum Genet 54:464–472.

Phelan MC, Rogers RC, Saul RA, Stapleton GA, Sweet K, McDermid H, Shaw SR, Claytor J, Willis J, Kelly DP. 2001. 22q13 deletion syndrome. Am J Med Genet 101:91–99.

Redecker P, Bockmann J, Böckers TM. 2006. Expression of postsynaptic density proteins of the ProSAP/Shank family in the thymus. Histochem Cell Biol 126:679–685.

Tufano M, Della Corte C, Cirillo F, Spagnuolo MI, Candusso M, Melis D, Torre G, Iorio R. 2009. Fulminant autoimmune hepatitis in a girl with 22q13 deletion syndrome: A previously unreported association. Eur J Pediatr 168:225–227.

Vohl MC, Lepage P, Gaudet D, Brewer CG, Bétard C, Perron P, Houde G, Cellier C, Faith JM, Després JP, Morgan K, Hudson TJ. 2000. Molecular scanning of the human PPARa gene: Association of the L162V mutation with hyperapobetalipoproteinemia. J Lipid Res 41:945–952.

Whitworth JR, Mack CL, O'Connor JA, Narkewicz MR, Mengshol S, Sokol RJ. 2006. Acute hepatitis and liver failure associated with influenza A infection in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 43:536–538.

Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, Phelan MC, Hu S, Marshall J, McDermid HE. 2003. Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. J Med Genet 40:575–584.

Wu Y, Wang YY, Nakamoto Y, Li YY, Baba T, Kaneko S, Fujii C, Mukaida N. 2010. Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in the liver. Oncogene 29:2228–2237.

6.4 Anhang 4

M. Poot, V. Beyer, I. Schwaab, N. Damatova, R. van't Slot, J. Prothero, S. E. Holder, T. Haaf

Disruption of *CNTNAP2* and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder

Neurogenetics 2010; 11:81–89.

Der Beitrag von N. Damatova zur experimentellen Arbeit und der Datenanalyse lag in der FISH Kartierung der Regionen mit den chromosomalen Rearrangements.

Neurogenetics (2010) 11:81–89
DOI 10.1007/s10048-009-0205-1

ORIGINAL ARTICLE

Disruption of *CNTNAP2* and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder

Martin Poot · Vera Beyer · Ira Schwaab · Natalja Damatova · Ruben van't Slot · Jo Prothero · Sue E. Holder · Thomas Haaf

Received: 22 April 2009 / Accepted: 17 June 2009 / Published online: 7 July 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Patients with autism spectrum disorder (ASD) frequently harbour chromosome rearrangements and segmental aneuploidies, which allow us to identify candidate genes. In a boy with mild facial dysmorphisms, speech delay and ASD, we reconstructed by karyotyping, FISH and SNP array-based segmental aneuploidy profiling a highly complex chromosomal rearrangement involving at least three breaks in chromosome 1 and seven breaks in chromosome 7. Chromosome banding revealed an inversion of region 7q32.1–7q35 on the derivative chromosome 7. FISH with region-specific BACs mapped both inversion breakpoints and revealed additional breaks and structural changes in the *CNTNAP2* gene. Two gene segments were transposed and inserted into the 1q31.2 region, while the *CNTNAP2* segment between the two transposed parts as well as intron 13 to the 5-UTR were retained on the der(7). SNP array analysis revealed an additional de novo deletion encompassing the distal part of intron1 and exon 2 of *CNTNAP2*, which contains *FOXP2* binding sites. Second, we found another de novo deletion on chromosome 1q41, containing 15 annotated genes, including *KCTD3* and *USH2A*. Disruptions of the *CNTNAP2* gene have been associated with ASD and with Gilles de la Tourette syndrome (GTS). Comparison of disruptions of *CNTNAP2* in patients with GTS and ASD suggests that large proximal disruptions result in either GTS or ASD, while relatively small distal disruptions may be phenotypically neutral. For full-blown ASD to develop, a proximal disruption of *CNTNAP2* may have to occur concomitantly with additional genome mutations such as hemizygous deletions of the *KCTD3* and *USH2A* genes.

Keywords Autism · Speech delay · Insertion translocation · *CNTNAP2* gene · *KCTD3* gene · *USH2A* gene

M. Poot (✉) · R. van't Slot
Department of Medical Genetics,
University Medical Centre Utrecht,
Mail stop: KC.04.084.2, P. O. Box 85090, 3508 Utrecht,
The Netherlands
e-mail: M.Poot@umcutrecht.nl

V. Beyer · I. Schwaab · N. Damatova · T. Haaf
Institute of Human Genetics,
Johannes Gutenberg University Mainz,
Langenbeckstrasse 1, Bldg. 601,
55131 Mainz, Germany

J. Prothero · S. E. Holder
North West Thames Regional Genetics Service,
NWLH NHS Trust,
Harrow HA1 3UJ, UK

Introduction

Impaired development of speech, language use and communication in general account for roughly 40% of referrals in paediatric monitoring centres [1]. Although in some cases initial delays may be compensated for without specific intervention, persistent problems in language use may accompany further developmental delay and eventually mental retardation. To prevent such developmental deterioration, precise and comprehensive assessment of the phenotypic spectrum in these children is paramount. In addition, aetiological diagnosis is essential to guide appropriate treatment and to prevent secondary mental retardation and behavioural impairment.

While only a limited number of autosomal recessive, dominant or X-linked genes for language disorders have been reported, numerous studies demonstrated chromosom-

al rearrangements in patients with such disorders [2–4]. Such rearrangements could either have disrupted a gene or have provoked deletion, duplication or transposition of several genes. This makes it difficult to pinpoint a single causative gene and to indicate an aetiologically relevant mutational mechanism [5, 6]. The advent of techniques for high-resolution genome-wide segmental aneuploidy screening (e.g. oligonucleotide and SNP arrays) enabled searches for smaller rearrangements containing fewer candidate genes [7].

Here, we report on the elucidation of a highly complex chromosomal rearrangement, involving at least three breaks on chromosome 1 and seven breaks on chromosome 7 in a boy with speech delay, violent outbursts and autistic behaviour. He carries a maternally inherited duplication in region 1p32.3, a *de novo* deletion in region 1q41 and a complex disruption of one copy of the *CNTNAP2* gene. We compared this rearrangement with those reported for a patient with Gilles de la Tourette syndrome [5] and healthy individuals [6] and suggest a mechanism that could explain the phenotypic differences among these carriers of different *CNTNAP2* disruptions.

Case report

The patient is the first child of healthy non-consanguineous parents. His two younger brothers are healthy, and there is no significant family history of medical problems. He was born by emergency lower segment caesarean section for foetal distress at term, following a normal pregnancy. Apgar scores at 1 and 5 min after birth were 5 and 7, respectively. His birth weight was 2.75 kg (second to ninth centile). He showed positional talipes at birth, which did not require surgery. Apart from mild hypospadia, his genitalia were normal. He fed well and was allowed to leave the hospital on day 5.

The patient was able to sit at 6 months and crawled at 10 months. There were no other concerns until about 16 months of age when he was referred to a paediatrician because he was not walking or speaking and his parents felt he was clumsy. He was assessed as showing mild global developmental delay and referred for physiotherapy and speech therapy. At 2 years of age, he was seen by a neurologist. He had been walking since his 21st month of age but was unsteady and was investigated for mild truncal ataxia and developmental delay. At this point, he spoke only single words.

At 2 years of age, an apparently balanced de novo paracentric inversion of 7q was found by standard G-banded karyotyping. Parental karyotypes were normal. The patient tested normal for fragile X. Metabolic investigations, including plasma amino acids, urine organic acids, AFP, IgA, IgM, IgG and creatine kinase, T4 and TSH, all showed results within the normal range. An EEG showed immature features, but no epileptogenic discharges. By magnetic resonance imaging, no abnormalities were noted.

When seen in the genetic clinic at aged 3 years, he remained delayed with poor coordination, speaking in simple sentences. He had hypermobile joints. He was not strikingly dysmorphic, but looked different to his parents and was noted to be fair with small facial features that were felt to be consistent with a chromosomal abnormality (Fig. 1). His facial appearance (not including micrognathia, ptosis and a typical nose), normal feeding behaviour, absence of cataracts, congenital heart or renal disease and a syndactyly 2/3 of his toes argued against Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS; OMIM 270400). Prader Willi syndrome was also excluded. His growth parameters were all within the normal range. During subsequent follow-up at age 11 years, he showed hyperactive and self-directed behaviour with some autistic features. Therefore, he received a formal assessment for autism, which included an assessment of his cognitive profile and evaluation with the Diagnostic Interview for Social and Communication Disorder (DISCO), the Autistic Diagnostic Observation Schedule (ADOS) and the Children's Communication Checklist (CCC-2). These diagnostic instruments showed that he has problems with social communication and social interaction together with repetitive interests and behaviours, consistent with this diagnosis. He attends a school for children with moderate learning difficulties and continues to have problems with hyperactivity and easy distractibility.

Fig. 1 Facial image of the proband

Materials and methods

Illumina infinium HumanHap370 genotyping beadchip SNP array

In order to determine whether the reciprocal inversion 7q was molecularly balanced or associated with segmental aneuploidies that would allow to determine its breakpoint regions and whether these structural genome abnormalities were inherited or have arisen de novo, we analysed 750 ng of DNA of the patient and both his parents using the Infinium HumanHap370 Genotyping BeadChip SNP array according to the protocol as described by the manufacturer (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). This array contains 370,000 SNPs with a median probe spacing of 8 kb.

Karyotyping and molecular cytogenetic analyses

For detailed molecular cytogenetic analyses, metaphases were prepared from short-term phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures and analysed with classic GTG-banding at the 700 band level. Region-specific BAC clones for FISH mapping were selected from the Wellcome Trust Sanger Institute Ensembl contigs (http://www.ensembl.org). Genomic BAC DNAs were labelled with fluorescein-12-dUTP or tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) by standard nick translation. FISH was performed on the patient's metaphase spreads, as described previously [8, 9].

Results

Standard G-banded karyotyping of the index patient revealed a satellited Y chromosome as well as a de novo paracentric inversion 7q32.1-7q35. Subsequent FISH mapping demonstrated a much more complex rearrangement, however. The proximal inversion breakpoint was contained in BAC RP11-791P8 at 125.5–125.7 Mb on chromosome 7q32.1 (Fig. 2a). The distal inversion breakpoint was located between BACs RP11-374N8 and RP11-49G5 at 144.2 Mb on chromosome 7q35 (Table 1). The *CNTNAP2* gene, which lies in close proximity (<200 kb) to the distal inversion breakpoint, was disrupted by multiple breaks, and part of the gene was inserted into band 1q31.2 of a derivative chromosome 1 (Fig. 2b–f, red BAC). *CNTNAP2* extends from 145,444,902 to147,749,019 bp (March 2006 freeze of the human genome reference sequence; NCBI Build 36.1). Two gene segments, the first one containing the promoter region of *CNTNAP2* (delineated by part of BAC RP11-49G5 and the entire BACs RP11-409M7 and RP11-697B15) and the second one containing intron 8 to intron 12 (delineated by BACs RP11-643A21, RP11-291N9, RP4-811H12, and part of RP4-777G9) were transposed and inserted into a gene-poor region (between BACs RP11-92K2 and RP11-379L12) at 191–194 Mb on chromosome 1q31.2 (Table 1). The *CNTNAP2* sequence between the two transposed segments, delineated by the proximal BAC RP4-630F1 (Fig. 2c, green) and the distal BAC RP5-969D4 (Fig. 2e, green), was retained at 7q35 on the der(7). The cytogenetically cryptic 7q35 rearrangements disrupting the *CNTNAP2* gene were on the cytogenetically visible inverted chromosome 7 (data not shown). This complex rearrangement is reconstructed in the ideograms of Fig. 3. By high-resolution SNP array analysis, the proximal part of *CNTNAP2* that was retained on the der(7) showed a de novo hemizygous loss of minimally 402 kb and maximally 435 kb DNA in the *CNTNAP2* gene ranging from SNP rs10275851 (nt:145,717,255) to SNP rs12674168 (nt: 146,120,055) and flanked by SNP rs17170068 (nt: 145,696,390) and SNP rs11972861 (nt: 146,131,465). This intragenic deletion, involving the distal part of intron 1 and exon 2 of *CNTNAP2*, was confirmed by FISH with the 7q35 probe RP11-766K8 (Fig. 2d, green). The deleted segment contains multiple FOXP2 protein binding sites [10]. SNP array analysis combined with FISH data (Table 1) revealed that intron 13 up to the 3′-UTR of *CNTNAP2* were also retained on the der(7) chromosome. The tag SNP rs2710102 (nt: 147,205,323), which has previously shown highly significant association with ASD [11], occurred in our patient and both his parents as two G alleles, which is the risk allele [11]. Figure 4 depicts our data on the *CNTNAP2* disruptions in our patient and in those reported by Verkerk and coworkers [5] and by Belloso and coworkers [6].

Secondly, we found a de novo loss of 5.65 Mb in band q41 in the long arm of the derivative chromosome 1 ranging from SNP rs2841616 (nt: 213,240,461) to SNP rs2889895 (nt: 218,894,753) and flanked by SNP rs1452623 (nt: 213,231,930) and SNP rs366414 (nt: 218,915,724). The deleted region encompasses BACs RP11-5F19 (Fig. 2b, green) and RP11-332J14 (Table 1) and is located on the same chromosome as the 1q31.2 insertion (delineated by the red BAC RP4-777G9 in Fig. 2b). Among the 15 known genes that are deleted from the der(1) (Table 2) are *KCNK2*, *KCTD3* and *USH2A*. Two of those (*KCTD3* and USH2A) have previously been found in a paternally inherited loss in a boy with autism [12].

Thirdly, we found a maternally inherited gain of 298 kb DNA of band p32.3 of chromosome 1 ranging from SNP rs2270003 (nt: 55,021,290) to SNP rs17111584 (nt: 55,319,284) and flanked by SNP rs12740946 (nt: 55,016,785) and SNP rs497159 (nt: 55,326,142). This gain contains six annotated genes (Table 2), among which the *DHCR24* gene, which encodes the 24-dehydrocholesterol reductase (EC 1.3.1.–). This gene shows strong transcript

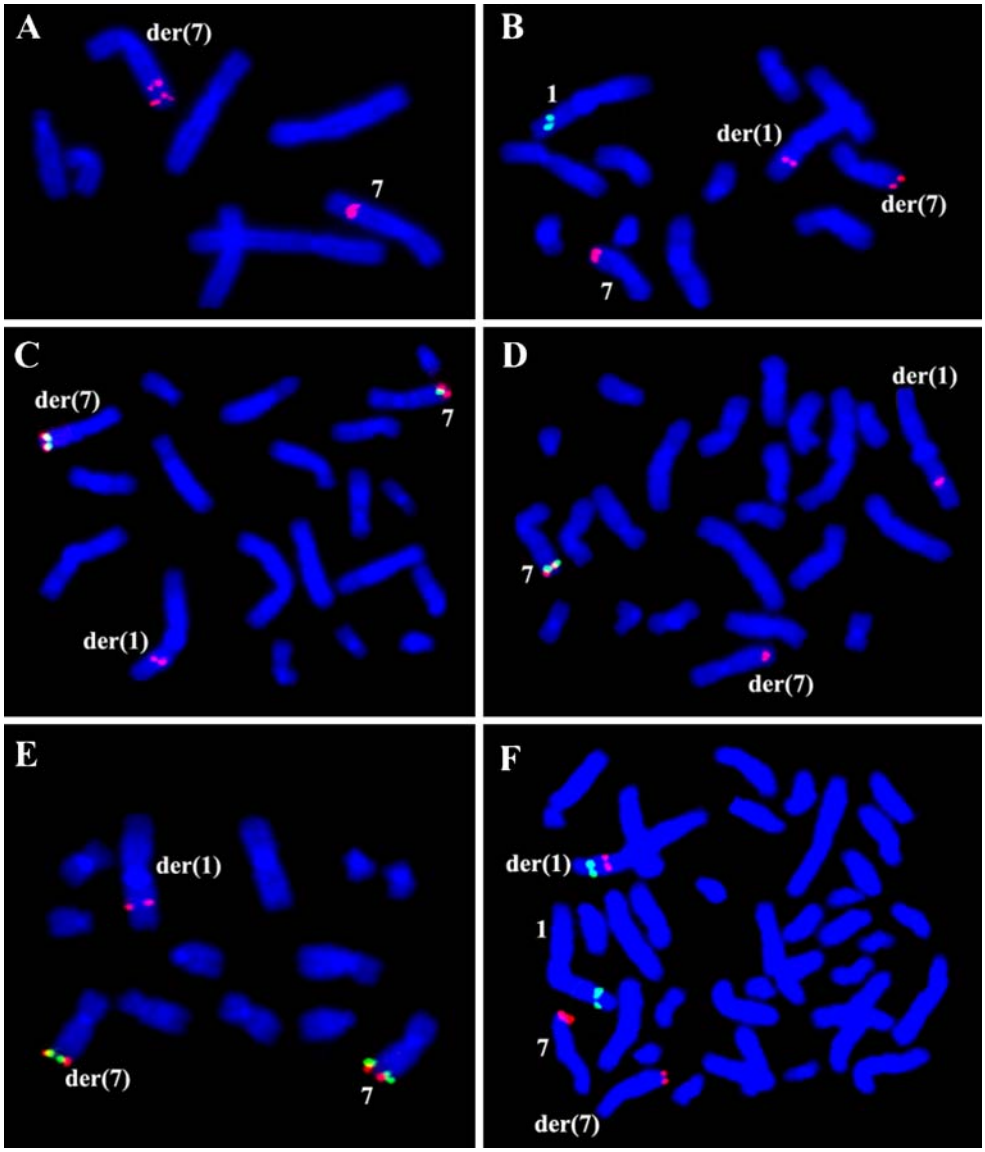


Fig. 2 Representative FISH images for mapping the complex chromosome 1 and 7 rearrangements. BACs are labelled with fluorescein (*green*) or tetramethyl-rhodamine (*red*); chromosomes are counterstained with DAPI (*blue*). **a** BAC RP11-791P8 from chromosome 7q32.1 produces a split hybridisation signal on the der(7), indicative for an inversion-breakpoint-spanning clone. **b** Hybridisation of BACs RP4-777G9 (*red*) from chromosome 7q35 and RP11-5F19 (*green*) from chromosome 1q41. BAC RP4-777G9 maps to the normal chromosome 7, the der(7) and the der(1), indicating that part of its sequence is transposed from 7q35 to 1q31.2. BAC RP11-5F19 maps to the normal chromosome 1, but not to the der(1), delineating a deletion in the paternal chromosome 1q41. **c** Hybridisation of BAC RP4-777G9 (*red*) to chromosome 7, der(7) and der(1) and of BAC RP4-630F1 (*green*) to chromosome 7q35 and the homologous site on the der(7). **d** BAC RP11-766K8 (*green*) hybridises to the normal chromosome 7q35 but not to the der(7), indicating a deletion. BAC RP4-777G9 (*red*) is cohybridised to chromosome 7, der(7) and der(1). **e** Hybridisation of BAC RP4-777G9 (*red*) to chromosome 7, der(7) and der(1) and of BAC RP5-969D4 (*green*) to chromosome 7q35 and der(7). **f** Hybridisation of BAC RP11-172L10 (*green*) to the normal chromosome 1q41 and the der(1), distal to the 1q31.2 insertion site delineated by BAC RP4-777G9 (*red*)

expression in the substantia nigra, the nucleus caudatus, the hippocampus, the medulla oblongata and the pons and has been implicated in embryonic brain development [13–15]. Overexpression of this enzyme possibly causes a similar effect as does loss of delta-7-sterol reductase (EC 1.3.1.21), which is the cause of SLOS [16]. The phenotype of our patient is not consistent with this syndrome (see "Case report").

For all de novo losses, the maternal SNP alleles were retained, such that we presume that this highly complex chromosomal rearrangement involving multiple breaks on two chromosomes has occurred as a single event during the paternal meisois. To integrate the results of karyotyping, FISH and SNP array analyses, we propose the following summary (according to the ISCN 2009 nomenclature): 46,

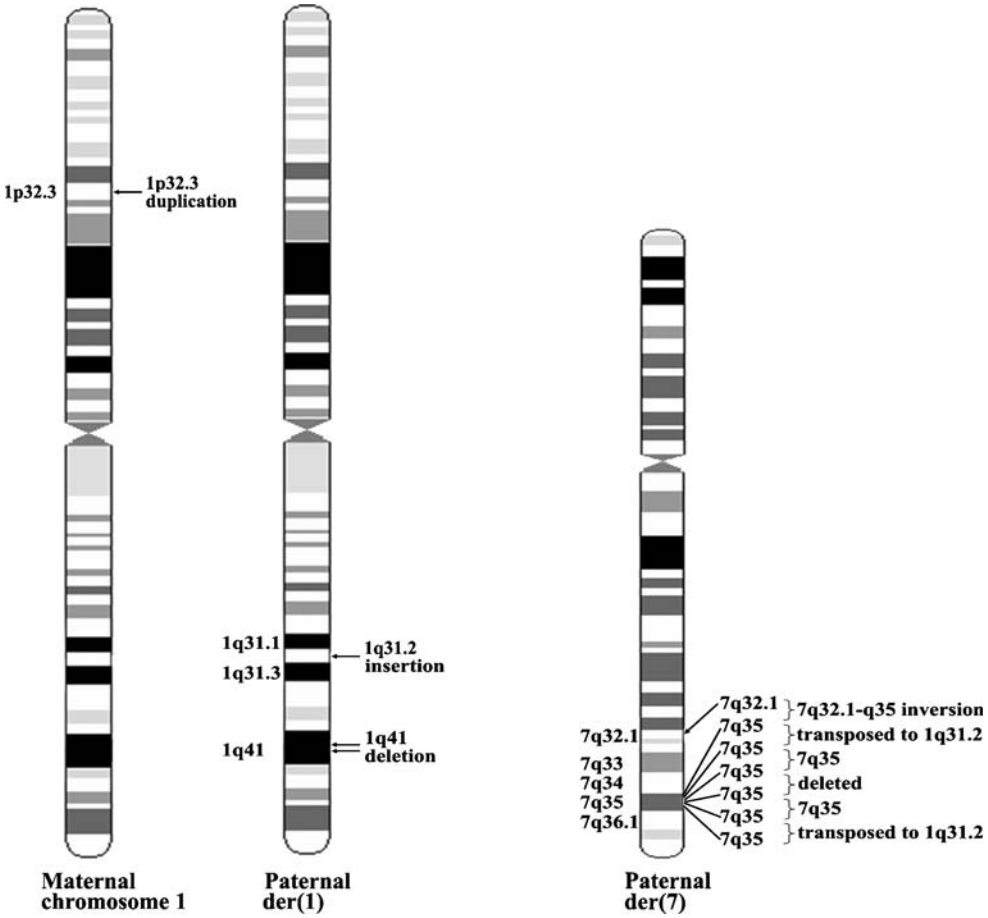
Table 1 FISH mapping results of BACs from chromosomes 1 and 7

BAC clone	Band position	Bp position on the normal chromosomes 1 and 7	FISH mapping on the derivative chromosomes
RP11-420P16	1q31.1	188,815,279–188,974,191	Proximal to der(1) insertion
RP11-463J7	1q31.1-31.2	188,892,717–189,058,635	Proximal to der(1) insertion
RP11-184F4	1q31.2	189,162,791–189,327,857	Proximal to der(1) insertion
RP11-189O8	1q31.2	189,468,242–189,624,029	Proximal to der(1) insertion
RP11-191J5	1q31.2	189,624,272–189,797,018	Proximal to der(1) insertion
RP11-6E3	1q31.2	189,843,455–190,027,923	Proximal to der(1) insertion
RP11-92K2	1q31.2	190,888,976–191,038,120	Proximal to der(1) insertion
RP11-379L12	1q31.3	193,875,766-194,047,789	Distal to der(1) insertion
RP11-172L10	1q41	213,142,008–213,293,491	Distal to der(1) insertion
RP11-5F19	1q41	213,843,688–214,005,803	Deleted on der(1)
RP11-332J14	1q41	218,698,681–218,866,026	Deleted on der(1)
RP11-322F10	1q41	218,805,714–218,985,621	Distal to der(1) insertion
RP11-313M4	7q31.33	123,973,902–124,124,128	Not rearranged on der(7)
RP11-791P8	7q32.1	125,542,411–125,692,927	Inversion-breakpoint spanning on der(7)
RP11-105E3	7q32.1	125,859,365–126,027,400	Inverted on der(7)
RP11-475H14	7q32.1	126,130,514–126,312,406	Inverted on der(7)
RP11-309K22	7q32.1	126,310,437–126,465,834	Inverted on der(7)
RP11-224A1	7q32.1	127,107,823–127,230,031	Inverted on der(7)
RP11-62J1	7q32.1	127,648,902–127,757,541	Inverted on der(7)
RP11-274B21	7q32.1	128,038,544–128,215,419	Inverted on der(7)
RP11-307I2	7q34-q35	143,102,265–143,209,337	Inverted on der(7)
RP11-374N8	7q35	144,143,400–144,233,517	Inverted on der(7)
RP11-49G5	7q35	144,233,518–144,359,203	Not rearranged on der(7) and partially transposed to der(1)
RP11-409M7	7q35	144,359,003–144,399,136	Transposed to der(1)
RP11-697B15	7q35	145,051,154–145,187,440	Transposed to der(1)
RP4-630F1	7q35	145,654,135–145,781,660	Not rearranged on der(7)
RP11-766K8	7q35	145,781,461–145,799,433	Deleted on der(7)
RP5-969D4	7q35	146,102,541–146,178,149	Not rearranged on der(7)
RP11-643A21	7q35	146,553,728–146,706,612	Transposed to der(1)
RP11-291N9	7q35	146,706,412–146,787,701	Transposed to der(1)
RP4-811H12	7q35	146,787,501–146,949,716	Transposed to der(1)
RP4-777G9	7q35	146,949,516–147,038,613	Partially transposed to der(1) and not rearranged on der(7)
RP11-654P5	7q35	147,038,413–147,084,470	Not rearranged on der(7)
RP11-1150H5	7q35	147,259,181–147,317,996	Not rearranged on der(7)
RP11-519M4	7q36.1	147,542,899–147,689,274	Not rearranged on der(7)
RP11-312C1	7q36.1	152,089,700–152,229,850	Not rearranged on der(7)

XYqs pat, dup(1)(pter->p32.3::p32.3->p32.3::p32.3->qter) mat, der(1)(1pter->1q31.2::7q35->7q35::7q35->7q35::1q31.2->1q41.1::1q41.1->1qter),der(7)(7pter->7q32.1::7q35->7q32.1::7q35->7qter)de novo(pat). The term "mat" indicates a maternally inherited gain; de novo(pat) indicates de novo losses that occurred during the paternal meiosis. On the latter point, this nomenclature deviates from the 2009 guidelines of the ISCN.

Discussion

By classical karyotyping, SNP array-based segmental aneuploidy profiling and region-specific FISH analyses, we have reconstructed a highly complex chromosomal rearrangement involving at least three breaks on chromosome 1 and seven breaks on chromosome 7. Application of a combination of these techniques allows revealing a



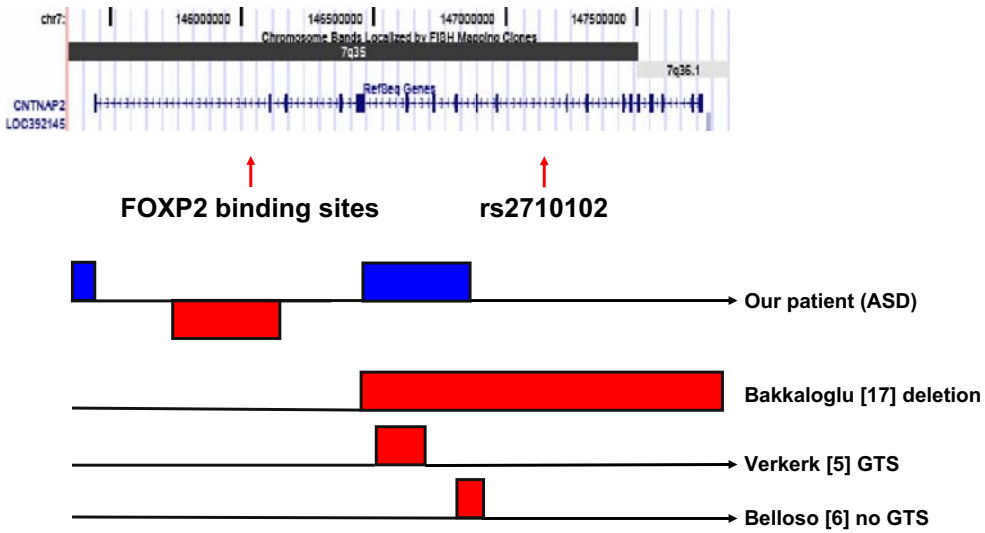


Fig. 3 Ideograms of the maternal chromosome 1 with the 1p32.3 duplication as well as of the paternal derivative chromosomes 1 and 7, indicating the positions of the three breakpoints on chromosome 1 and the 7 breakpoints on chromosome 7

Fig. 4 Summary of *CNTNAP2* disruptions in our patient and those reported in the literature. The *top panel* represents the region of chromosome 7 containing the *CNTNAP2* gene. The *red arrows* indicate the positions of the FOXP2 binding sites and the SNP rs2710102, respectively. The *bottom panels* compare the *CNTNAP2* rearrangements in our and previously published patients. The *blue boxes* indicate the transposed sections and the *red boxes* the deleted section of the *CNTNAP2* gene in our patient and those described by Bakkaloglu, Verkerk, and Belloso and coworkers [5, 6, 22]. The *black line* and *arrow* indicate the parts of *CNTNAP2* retained in their original positions. *GTS* Gilles de la Tourette syndrome, *ASD* autism spectrum disorder

Table 2 Names and functional data on genes in the de novo hemizygous loss in region 1q41 (A) and in the maternally inherited gain in 1p32.3 (B)

Gene	Name	Functional data
A		
KCNK2	Potassium channel, subfamily K, member 2	
KCTD3	Potassium channel tetramerisation domain	
USH2A	Usher syndrome type-2A protein	Defects in *USH2A* are the cause of Usher syndrome type 2A (USH2A) [MIM: 276901]
		Defects in *USH2A* are a cause of retinitis pigmentosa autosomal recessive (ARRP) [MIM: 268000]
ESRRG	Oestrogen-related receptor gamma isoform 1	Expressed at high levels in foetal brain and also in the foetal kidney, lung and liver, also in the heart, kidney, brain, lung, bone marrow, adrenal gland, trachea, spinal cord and thyroid gland
GPATCH2	G patch domain containing 2	
SPATA17	Spermatogenesis associated 17	
RRP15	Ribosomal RNA processing 15 homolog	
TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	Found in a translocation t(1;7)(q41;p21) with *HDAC9* in a family with Peters anomaly [MIM: 604229]
LYPLAL1	Lysophospholipase-like protein 1 (EC 3.1.2.-)	
SLC30A10	Solute carrier family 30 (zinc transporter)	
EPRS	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	Includes: glutamyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.17) and prolyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.15)
BPNT1	3'(2'),5'-Bisphosphate nucleotidase 1 (EC 3.1.3.7)	Highly expressed in kidney, liver, pancreas and heart; at lower levels in brain, lung and skeletal muscle
IARS2	Mitochondrial isoleucine tRNA synthetase (EC 6.1.1.5)	
RAB3GAP2	rab3 GTPase-activating protein, non-catalytic	Defects in RAB3GAP2 are the cause of Martsolf syndrome [MIM: 212720], an autosomal recessive disorder involving congenital cataracts, mental retardation and hypogonadism
MARK1	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1	Highly expressed in heart, skeletal muscle, brain, foetal brain and foetal kidney
B		
TTC22	Tetratricopeptide repeat domain 22 isoform 1	Highly expressed in brain and adrenal gland, moderately in liver, lung, spleen, prostate and spinal cord
DHCR24	24-Dehydrocholesterol reductase precursor (EC 1.3.1.)	Defects in DHCR24 are the cause of autosomal recessive desmosterolosis [MIM: 602398]
TMEM61	Transmembrane protein 61	
BSND	barttin	Defects in BSND are the cause of Bartter syndrome type 4 (BS4) [MIM: 602522], also known as infantile Bartter syndrome with sensorineural deafness
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	Defects in PCSK9 are the cause of autosomal dominant hypercholesterolemia 3 (FH3) [MIM: 603776]
USP24	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24 (EC 3.1.2.15)	

hitherto unsuspected complexity (see [7] and references therein) and prompts the question as to how this may have originated from a single event. Mechanisms such as fork stalling and template switching (FoSTeS) and the "contact-first" hypothesis have been proposed [17–19]. The latter assumes that ends from different DNA-damage induced DNA strand breaks that were closely juxtaposed in the interphase nucleus of the paternal germ cell in which the DNA damaging event occurred were joined. Consistent with this hypothesis the breakpoint regions in our patient did not contain specific LCRs, SINEs or LINEs that could have mediated illegitimate recombination. In this situation, the risk of recurrence would be considered not to be above the population risk.

The boy with speech delay, violent outbursts and autistic behaviour described here carries a complex disruption of one copy of the *CNTNAP2* gene, such that the gene segment containing exon 1 and the proximal part of intron

1 and the one containing intron 8 to intron 12 were transposed and inserted into a gene-poor region (191–194 Mb) on chromosome 1q31.2. The distal part of intron 1 and exon 2, which contain FOXP2 binding sites [10], were deleted. This means that our patient is hemizygous for the genomic FOXP2 protein binding sites on the *CNTNAP2* gene. Hemizygous loss of part of *CNTNAP2* may alter the balance between free and bound FOXP2 protein and, in this way, may provide a molecular mechanism for the speech delay of our patient.

Disruptions of the *CNTNAP2* gene have also been found in patients with Gilles de la Tourette syndrome and in healthy individuals [5, 6]. In a patient with Gilles de la Tourette syndrome (GTS), a deletion of intron 8 of *CNTNAP2* has been observed [5], while a smaller and more distal disruption appeared to be phenotypically inconsequential [6]. In our patient, the segment, including introns 8 up to 13, was transposed onto chromosome 1. This means that they are disconnected from the remainder of the *CNTNAP2* gene. Our patient shares with GTS features such as violent outbursts and obsessive and self-directed behaviours. Thus, even a disruption proximal to the gene segment ranging from intron 8 up to intron 13 of *CNTNAP2*, as is found in our patient, may be sufficient to provoke symptoms of GTS. More distally located hemizygosity, as found by Belloso and coworkers [6], may be innocuous.

Two segments of *CNTNAP2*, one ranging from the distal part of intron 2 up to intron 8 and one ranging from intron 13 up to the 3′-UTR were retained on the der(7). The latter contains the SNP rs2710102, which has been associated with ASD [11]. Although our patient carries the risk-associated allele [11], it is unclear whether this particular SNP haplotype may contribute to his phenotypes. Given the complexity of the *CNTNAP2* rearrangement, it seems very unlikely that a functional protein is expressed from the der (1) or the der(7), implying that our patient is haploinsufficient for *CNTNAP2*.

Recently, an adult woman with autism and primary amenorrhea carrying a 12 Mb deletion in 7q33-q35 containing, among others, *CNTNAP2* has been described [20]. This report further emphasises the association of structural alterations of *CNTNAP2* with behavioural phenotypes. In contrast, in Old Order Amish children with cortical dysplasia, focal epilepsy, relative macrocephaly and diminished deep-tendon reflexes, language regression, hyperactivity and impulsive and aggressive behaviour point mutations in *CNTNAP2* have been found [21]. A patient with ASD described by Bakkaloglu and coworkers [22] carries a pericentric inversion of chromosome 7 that disrupts the *AUTS2* gene and deletes the *CNTNAP2* gene from intron 5 on. Truncation of *AUTS2* has been reported in patients with mental retardation, but without ASD [23]. Thus, this structural change may, in comparison to those found by Verkerk and coworkers [5] and Belloso and coworkers [6], by itself not be sufficient to cause full-blown ASD. Therefore, one is inclined to search for additional mutations that may contribute to the more complex phenotype of ASD patients. In the patient of Bakkaloglu and coworkers [22], the disrupted *AUTS2* gene may have represented such an additional mutation. In our patient, the *AUTS2* gene and all other genes implicated in ASD [12] appeared diploid. It cannot be excluded, however, that the inversion of chromosome 7 may alter the expression of diploid genes in the vicinity of the inversion breakpoints as has been suggested recently by studies in the mouse [24]. Our patient carries a de novo deletion in region 1q41, containing brain-expressed genes such as *KCTD3* and *USH2A*, however. These two genes have been found in a paternally inherited loss in a boy with autism [12]. Thus, our data are consistent with a contribution of hemizygous losses of *KCTD3* and *USH2A* concomitantly with *CNTNAP2* disruption to the autistic phenotype of our patient. This situation fits into the threshold model proposed by Cook and Scherer [25]. It remains to be seen, however, whether *CNTNAP2* and *KCTD3* participate in a single, shared or two mutually complementing pathways of brain development. The latter implicates a polygenic model of ASD analogous to what has been proposed for Bardet Beadle syndrome [26].

In summary, our detailed molecular cytogenetic analyses revealed in a patient with a complex behavioural phenotype, involving a combination of speech delay and ASD, several concomitantly occurring genome mutations, including disruption of the *CNTNAP2* gene. The particular form of *CNTNAP2* disruption in our patient and the *de novo* loss of *KCTD3* and *USH2A* may, in concert, have led to the development of full-blown ASD, whereas an isolated *CNTNAP2* disruption may by itself may prompt GTS. Testing this hypothesis by high-resolution genome analyses of other patients with ASD and GTS appears worthwhile.

Acknowledgements We gratefully acknowledge the kind cooperation of patient and his parents and their giving consent to publish these data. We are also indebted to Dr. S. W. Scherer (Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada) for helpful discussions. This work was supported by grants from the Netherlands Foundation for Brain Research (grant no. 2008(1).34 to M. Poot) and the German Research Foundation (grant no. HA1374/7-2 to T. Haaf).

References

1. Harel S, Greenstein Y, Kramer U, Yifat R, Samuel E, Nevo Y, Leitner Y, Kutai M, Fattal A, Shinnar S (1996) Clinical characteristics of children referred to a child development center for evaluation of speech, language, and communication disorders. Pediatr Neurol 15:305–311

2. Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F, Monaco AP (2001) A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. Nature 413:519–523
3. Lichtenbelt KD, Hochstenbach R, van Dam WM, Eleveld MJ, Poot M, Beemer FA (2005) Supernumerary ring chromosome 7 mosaicism: case report, investigation of the gene content, and delineation of the phenotype. Am J Med Genet A 132A:93–100
4. Ropers HH, Hamel BC (2005) X-linked mental retardation. Nat Rev Genet 6:46–57
5. Verkerk AJ, Mathews CA, Joosse M, Eussen BH, Heutink P, Oostra BA, Tourette Syndrome Association International Consortium for Genetics (2003) CNTNAP2 is disrupted in a family with Gilles de la Tourette syndrome and obsessive compulsive disorder. Genomics 82:1–9
6. Belloso JM, Bache I, Guitart M, Caballin MR, Halgren C, Kirchhoff M, Ropers HH, Tommerup N, Tümer Z (2007) Disruption of the CNTNAP2 gene in a t(7;15) translocation family without symptoms of Gilles de la Tourette syndrome. Eur J Hum Genet 15:711–713
7. Poot M, v. 't Slot R, Leupert R, Beyer V, Passarge E, Haaf T (2009) Three *de novo* losses and one insertion within a pericentric inversion of chromosome 6 in a patient with complete absence of expressive speech and reduced pain perception. Eur J Med Genet 52:27–30
8. Wirth J, Nothwang HG, van der Maarel S, Menzel C, Borck G, Lopez-Pajares I, Brøndum-Nielsen K, Tommerup N, Bugge M, Ropers HH, Haaf T (1999) Systematic characterization of disease associated balanced chromosome rearrangements by FISH: cytogenetically and genetically anchored YACs identify microdeletions and candidate regions for mental retardation genes. J Med Genet 36:271–278
9. Yue Y, Grossmann B, Holder SE, Haaf T (2005) De novo t(7;10)(q33;q23) translocation and closely juxtaposed microdeletion in a patient with macrocephaly and developmental delay. Hum Genet 117:1–8
10. Vernes SC, Newbury DF, Abrahams BS, Winchester L, Nicod J, Groszer M, Alarcón M, Oliver PL, Davies KE, Geschwind DH, Monaco AP, Fisher SE (2008) A functional genetic link between distinct developmental language disorders. N Engl J Med 359:2337–2345
11. Alarcon M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, Sebat J, Wigler M, Martin CL, Ledbetter DH, Nelson SF, Cantor RM, Geschwind DH (2008) Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. Am J Hum Genet 82:150–159
12. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CE, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW (2008) Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. Am J Hum Genet 82:477–488
13. Luciani P, Deledda C, Rosati F, Benvenuti S, Cellai I, Dichiara F, Morello M, Vannelli GB, Danza G, Serio M, Peri A (2008) Seladin-1 is a fundamental mediator of the neuroprotective effects of estrogen in human neuroblast long-term cell cultures. Endocrinology 149:4256–4266
14. Pedretti A, Bocci E, Maggi R, Vistoli G (2008) Homology modelling of human DHCR24 (seladin-1) and analysis of its binding properties through molecular docking and dynamics simulations. Steroids 73:708–719
15. Roux C, Wolf C, Mulliez N, Gaoua W, Cormier V, Chevy F, Citadelle D (2000) Role of cholesterol in embryonic development. Am J Clin Nutr 71:1270S–1279S
16. Yu H, Patel SB (2005) Recent insights into the Smith-Lemli-Opitz syndrome. Clin Genet 68:383–391
17. Hastings PJ, Ira G, Lupski JR (2009) A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. PLoS Genet 5(1):e1000327
18. Nelms BE, Maser RS, MacKay JF, Lagally MG, Petrini JH (1998) In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. Science 280:590–592
19. Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE (2000) Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. Science 290:138–141
20. Rossi E, Verri AP, Patricelli MG, Destefani V, Ricca I, Vetro A, Ciccone R, Giorda R, Toniolo D, Maraschio P, Zuffardi O (2008) A 12 Mb deletion at 7q33-q35 associated with autism spectrum disorders and primary amenorrhea. Eur J Med Genet 51: 631–638
21. Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, Stephan DA, Morton DH (2006) Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. N Engl J Med 354:1370–1377
22. Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Tanriover G, Abrahams BS, Duvall JA, Robbins EM, Geschwind DH, Biederer T, Gunel M, Lifton RP, State MW (2008) Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. Am J Hum Genet 82:165–173
23. Kalscheuer VM, FitzPatrick D, Tommerup N, Bugge M, Niebuhr E, Neumann LM, Tzschach A, Shoichet SA, Menzel C, Erdogan F, Arkesteijn G, Ropers HH, Ullmann R (2007) Mutations in autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) in patients with mental retardation. Hum Genet 121:501–509
24. Henrichsen CN, Vinckenbosch N, Zöllner S, Chaignat E, Pradervand S, Schütz F, Ruedi M, Kaessmann H, Reymond A (2009) Segmental copy number variation shapes tissue transcriptomes. Nat Genet 41:424–429
25. Cook EH Jr, Scherer SW (2008) Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. Nature 455:919–923
26. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006) The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. Annu Rev Genomics Hum Genet 7:125–148

6.5 Anhang 5

U. Zechner, N. Kohlschmidt, G. Rittner, N. Damatova, V. Beyer, T. Haaf, O. Bartsch

Epimutation at human chromosome 14q32.2 in a boy with a upd(14)mat-like clinical phenotype

Clin. Genet. 2009; 75: 251–258.

Der Beitrag von N. Damatova zur experimentellen Arbeit und Datenauswertung lag in der Untersuchung des chromosomalen Umbaus mittels FISH.

Clin Genet 2009: 75: 251–258
Printed in Singapore. All rights reserved

© 2008 The Authors
Journal compilation © 2008 Blackwell Munksgaard

CLINICAL GENETICS
doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.01116.x

Short Report

Epimutation at human chromosome 14q32.2 in a boy with a upd(14)mat-like clinical phenotype

Zechner U, Kohlschmidt N, Rittner G, Damatova N, Beyer V, Haaf T, Bartsch O. Epimutation at human chromosome 14q32.2 in a boy with a upd(14)mat-like clinical phenotype.
Clin Genet 2009: 75: 251–258. © Blackwell Munksgaard, 2008

Recently, three reports described deletions and epimutations affecting the imprinted region at chromosome 14q32.2 in individuals with a phenotype typical for maternal uniparental disomy of chromosome 14 [upd(14)mat]. In this study, we describe another patient with upd(14)mat-like phenotype including low birth weight, neonatal feeding problems, muscular hypotonia, motor and developmental delay, small hands and feet, and truncal obesity. Conventional cytogenetic analyses, fluorescence *in situ* hybridization subtelomere screening, multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of common microdeletion and microduplication syndromes, and methylation analysis of *SNRPN* all gave normal results. Methylation analysis at 14q32.2 revealed a gross hypomethylation of the differentially methylated regions (intergenic DMR and *MEG3*-DMR). Further molecular studies excluded full or segmental upd(14)mat as well as a microdeletion within this region. Evidently, the upd(14)mat-like clinical phenotype is caused by an epimutation at 14q32.2. The clinical and molecular features of this novel case are discussed with respect to the recently published cases.

U Zechner, N Kohlschmidt, G Rittner, N Damatova, V Beyer, T Haaf and O Bartsch

Institute of Human Genetics, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

Key words: chromosome 14q32.2 – epimutation – IG-DMR – upd(14)mat-like phenotype

Corresponding author: PD Dr Ulrich Zechner, Institute of Human Genetics, Johannes Gutenberg University Mainz, Langenbeckstraße 1, D-55131 Mainz, Germany.
Tel.: +49 6131 17 5850;
fax: +49 6131 17 5689;
e-mail: zechner@humgen.klinik.uni-mainz.de

Received 23 April 2008, revised and accepted for publication 19 September 2008

Uniparental disomy (upd) is the inheritance of two copies of a chromosome pair from one parent and no copy from the other parent (1). For several chromosomes, upd results in distinct clinical phenotypes depending on the parental origin of the chromosomes. Maternal upd of chromosome 14 [upd(14)mat] has been reported to be associated with intrauterine growth retardation, followed by postnatal hypotonia, feeding problems, motor delay, short stature, small hands and feet, scoliosis, obesity, distinctive facial appearance, and early onset of puberty (2). These phenotypic abnormalities are usually attributed to dysfunction of a cluster of imprinted genes at 14q32.2 including the paternally expressed genes *DLK1* (delta-like 1 homolog, Drosophila) and *RTL1* (retroposon-like 1, *PEG11*) and the maternally expressed genes *MEG3* (also called *GTL2*, gene trap locus 2), *RTL1as* (*RTL1* antisense), and *MEG8*. These genes are associated with two paternally methylated, differentially methylated regions (DMRs), the intergenic DMR (IG-DMR) between *DLK1* and *MEG3*, which is believed to regulate imprinting in this cluster, and the *MEG3*-DMR (3, 4). So far, eight upd(14)mat-like cases without uniparental disomy have been described (5–7). Of these, four patients were assumed to carry an epimutation at the 14q32.2 IG-DMR (5, 7) and four patients displayed a deletion in the 14q32.2 imprinted gene domain encompassing the IG-DMR (6, 7). In this study, we present another patient with a upd(14)mat-like clinical phenotype and evidence for an epimutation at 14q32.2, and we compare his features with the phenotypes reported so far.

Materials and methods

Case report

The patient (Fig. 1) was the third child of a 35-year-old mother with long-standing hypertension treated with beta-blockers and a 29-year-old non-consanguineous healthy father. He was conceived normally and was born by caesarean section at 38 weeks with Apgar scores 7 and 8 at 1 and 5 min. Birth weight was 2300 g (3rd percentile), length 47 cm (25th percentile), and occipitofrontal circumference (OFC) 33.5 cm (50th percentile). Exhibiting low birth weight, poor neonatal adaptation, and bradyarrhythmia, he was immediately admitted to a children's hospital. He showed muscular hypotonia and a weak sucking reflex, lost weight as far as 1600 g, and was treated by nasogastric feeding, antibiotics, and infusions. When discharged from the hospital at the age of 4 weeks, he was underweight (2400 g) and multiple anomalies were noted including hyperextensible joints, micrognathia, naevi on the right eye lid and ear lobe, single palmar crease on the left, a shallow pilonidal dimple, and 'marfanoid appearance'. He reached his gross motor milestones in time, sat at the age of 8 months and walked without support at the age of 12 months old. Around age 2.5 years, absent speech was noted and he was seen by otorhinolaryngologists, but hearing was normal. At the age of 2 years, he still weighed only 8670 g (below third percentile) but then gained weight rapidly weighing 18–19 kg (between 75th and 90th percentile) at the age of 4 years.

Fig. 1. The patient, 6 years and 3 months old. Note obesity.

Three years old, he was referred for genetic evaluation of speech delay. He appeared mildly obese, had pale and slightly eczematous skin, blonde dense hair, sparse eyebrows, wide nasal bridge, short broad nose, high palate, receding chin, and large normal ears. He had a mild clinodactyly of the forefinger on the right and the fifth fingers, pilonidal pit, and normal male prepubertal genitalia. Height was 91 cm (10th percentile), and OFC was 49 cm (25th percentile). Self-help milestones had been reached late, fine motor skills were delayed and active speech was absent, but gross motor development was normal. At the age of 6 years and 3 months, a speech delay of 1.5–2 years was diagnosed. He was only able to count to five and name the basic colors (red, blue, green, and yellow), but already wrote first words such as his name, mama (mommy), and papa (daddy).

He was last seen at the age of 6 years and 9 months, shortly after having successfully passed the entrance exam for regular primary schools. He had truncal obesity and very small hands and feet, European shoe size 27 (American scale, child's size 10). Height was 117 cm (10th percentile), weight 35.5 kg (above 97th percentile, 40% overweight, body mass index 25.9 kg/m^2), and OFC 50.8 cm (25th percentile). His initial muscular hypotonia had almost vanished, but he still had hyperextensible finger joints and clumsy movements. Parents reported insatiable appetite. His siblings were of slim build and normal appetite. The 10-year-old sister had developed normally, and the 12-year-old brother had attention-deficit hyperactivity disorder treated by methylphenidate.

Conventional chromosome banding and subtelomere fluorescence *in situ* hybridization (FISH) revealed a normal karyotype. Common microdeletion and microduplication syndromes were excluded by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Methylation analysis of the Prader–Willi/Angelman syndrome region gave normal results.

Methylation analysis of the 14q32.2 imprinted gene region

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes of the patient and his parents using a standard salting-out procedure. Bisulfite treatment of genomic DNA was performed using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The methylation status of both the *MEG3*-DMR and the IG-DMR (CG4 region) was examined. For the *MEG3*-DMR located in the *MEG3* promoter, two methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) assays were

carried out as described previously (4, 5). The MS-PCR amplicons corresponded to the following regions on chromosome 14 (positions according to the NCBI database, build 36): 100,360,424–100,360,583 bp [MS-PCR assay 1 (4), methylated product]; 100,361,886–100,362,005 bp [MS-PCR assay 1 (4), unmethylated product]; 100,362,234–100,362,432 bp [MS-PCR assay 2 (5), methylated product]; 100,362,206–100,362,432 bp (MS-PCR assay 2 (5), unmethylated product]. For the IG-DMR (CG4 region), classical bisulfite sequencing analysis was used. PCR amplification was performed with the forward primer 5′-TTTTATTATTGAATTGGGTTTGTTAGT-3′ and the reverse primer 5′-ACAATTCCTACTACAAAATTTCAACA-3′ [amplicon on chr 14: 100,345,426–100,345,735 bp in the NCBI database, build 36, as described in (6)]. Then, the PCR products were cloned using the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), and positive clones were sequenced using the CEQ DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) and a Beckman CEQ 8000 Genetic Analysis System. The methylation status of the *MEG3*-DMR and the IG-DMR (CG4 region) was further analyzed by bisulfite pyrosequencing (8). PCR products for bisulfite pyrosequencing of the *MEG3*-DMR were generated using the forward primer 5′-GATTTTTTTTATATATTGTGTTTG-3′ and the biotinylated reverse primer 5′-CTCATTTCTCTAAAAATAATTAACC-3′ (amplicon on chr 14: 100,361,908–100,362,127 bp in the NCBI database, build 36). PCR products for bisulfite pyrosequencing of the IG-DMR (CG4 region) were amplified using the same primer pair as for classical bisulfite sequencing analysis but with the reverse primer biotinylated. Pyrosequencing was performed on a PSQ 96MA Pyrosequencing System (Biotage, Uppsala, Sweden) with the PyroGold SQA reagent kit (Biotage) using the sequencing primers 5′-GTGTTTGAATTTATTTTGTTTGG-3′ (*MEG3*-DMR) and 5′-GAATTGGGTTTGTTAGTAGT-3′ (CG4 region of the IG-DMR), respectively. Pyro Q-CpG software (Biotage) was used for data analysis. The physical map positions of the amplicons of the two MS-PCR assays, the classical bisulfite sequencing assay, the two bisulfite pyrosequencing assays as well as the three CpG sites analyzed by bisulfite pyrosequencing in the *MEG3*-DMR region are illustrated in Fig. S1 (supporting information online).

Microsatellite and single nucleotide polymorphism genotyping

Microsatellite genotyping of the patient and his parents was performed using a tailed primer method with a locus-specific forward primer with M13 universal tail, a non-tailed locus-specific reverse primer, and a fluorescence-tagged primer specific for the M13 universal tail (9). The analyzed microsatellite loci and their localization are listed in Table 1. Microsatellite PCR products were separated and visualized on a Beckman CEQ 8000 Genetic Analysis System. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping was carried out by PCR amplification of the SNP, followed by direct sequencing on a Beckman CEQ Genetic Analysis System. The following SNPs in the 14q32.2 imprinted gene region were analyzed: rs6575799, rs2273607, rs1058006, rs2295660, rs1058009, rs12975, rs3198687, rs7501 [all primers from (6)], rs12437020 (forward primer, 5′-TGAGGGAGACTTGCTGTCCT-3′; reverse primer, 5′-GGAAAAGAACTGGGGTCACA-3′; amplicon on chr 14: 100,345,292–100,345,830 bp in the NCBI database, build 36), rs10133627, rs1884538, rs1884539, rs12885923, rs12890188, rs12891580 [all primer pairs from (6)], and rs11627993 (forward primer, 5′-TCCTTGGGCTGTCAGTAAGG-3′; reverse primer 5′-GACAAGGGGCTCGCATTC-3′; amplicon on chr 14: 100,360,002–100,360,392 bp in the NCBI database, build 36).

Deletion analysis

Metaphase spreads of the patient were co-hybridized with rhodamine-5-dUTP-labeled FISH probes for specific sequences in the 14q32.2 imprinted gene region and the fluorescein-12-dUTP-labeled BAC RP11-820M16 from chromosome 14qter (for chromosome identification) using standard protocols (10). FISH probe 1 was generated by long-range PCR from the IG-DMR using the forward primer 5′-ATACACCTCCAGGGATTCATGTGAGGAT-3′ and the reverse primer 5′-GAGGGTTGCCTAAGCATCAAGATTCCAT-3′ [amplicon on chr 14: 100,342,415–100,347,518 bp in the NCBI database, build 36; as described in (6)]. The BAC RP11-566J3 (chr 14: 100,120,601–100,295,975 bp in the NCBI database, build 36) covering the *DLK1* gene was purchased from imaGenes (Berlin, Germany). The physical map positions of the regions covered by the two FISH probes in the *DLK1-MEG3* region are illustrated in Fig. S1 (supporting information online).

For the exclusion of a tiny deletion, we also amplified the long-range PCR product covering the IG-DMR from the patient and a control individual and used agarose gel electrophoresis to compare product sizes before and after restriction digestion with *Pst*I and *Pvu*II, respectively.

Table 1. Results of microsatellite and SNP genotyping in the patient and his parents

STR/SNP	Position[a]	Patient	Mother	Father	Informativity
D14S608	27,919,195	2-3	1-3	2-2	+
D14S306	37,398,001	1-2	1-4	2-3	+
D14S128	85,450,372	3-4	2-3	1-4	+
D14S553	93,406,110	1-4	3-4	1-2	+
D14S1426	99,689,318	1-2	2-3	1-3	+
rs6575799[b]	100,268,170	G	G	G	−
rs2273607[b]	100,268,179	G	G	G	−
rs1058006[b]	100,268,192	A	A	A	−
rs2295660[b]	100,270,533	T	T	T	−
rs1058009[b]	100,270,613	G	G	G	−
rs12975[b]	100,270,941	C	C	C	−
rs3198687[b]	100,270,983	C	C	C	−
rs7501[b]	100,271,026	G	G	G	−
rs12437020[c]	100,345,703	G	G	G	−
rs10133627	100,347,327	C	C	C	−
rs1884538	100,347,410	G	G	A/G	−
rs1884539	100,347,539	G	G	A/G	−
rs12885923	100,347,562	A	A	A	−
rs12890188	100,351,176	A	A	A	−
rs12891580	100,351,189	T	T	T	−
rs11627993[d]	100,360,216	C/A	C	C/A	+
D14S543	103,658,598	1-4	1-3	2-4	+

+, informative; −, not informative; SNP, single nucleotide polymorphism; STR, short tandem repeat.
[a]Position on chromosome 14 in base pair according to Ensembl v49, Dec 2006 (http://www.ensembl.org/), based on the NCBI 36 assembly of the human genome [October 2005].
[b]SNP located within the *DLK1* gene.
[c]SNP located within the intergenic differentially methylated region.
[d]SNP located within the *MEG3* promoter.

Results

Using two different methylation-specific PCR assays of the *MEG3*-DMR, the unmethylated product (expected from the maternal allele) but not the methylated product (expected from the paternal allele) was amplified in the patient. This is typical for upd(14)mat (Fig. 2a,b). Results were confirmed by bisulfite pyrosequencing, which showed a severe hypomethylation of the *MEG3*-DMR (Fig. 2c). Bisulfite pyrosequencing and classical bisulfite sequencing of the IG-DMR (CG4 region) demonstrated a gross hypomethylation in the patient similar to that described in upd(14)mat patients (6) (Fig. 2d,e). Full upd(14)mat was excluded by the detection of both maternally inherited and paternally inherited alleles of the microsatellite loci D14S128, D14S306, D14S543, D14S553, D14S608, and D14S1426 (Table 1). Genotyping of the SNP rs11627993 within the *MEG3* promoter approximately 15 kb downstream of the IG-DMR and 208 bp upstream of the amplicon of MS-PCR 1 (methylated product) also detected heterozygosity (C/A) with the A allele unequivocally of paternal origin (Table 1, Fig. 3a, and Fig. S1, supporting information online). This rules out both a segmental maternal upd and a deletion within the paternal allele of the corresponding region. Other genotyped SNPs closer to the IG-DMR or encompassing the *DLK1* gene region were not informative (Table 1). However, FISH with a long-range PCR product encompassing the IG-DMR and the BAC clone RP11-566J3 encompassing the *DLK1* gene region each identified two signals with similar intensities on both chromosomes 14 (Fig. 3b,c). In addition, a comparison of the IG-DMR long-range PCR products of the patient and a control individual before and after restriction enzyme digestion yielded bands of identical size and, thus, no abnormalities in the patient (Fig. S2, supporting information online). Together, these data strongly argue against a deletion within the IG-DMR or the *DLK1* gene. Furthermore, methylation analysis of the *H19*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, and *NESPAS* imprinted gene loci by bisulfite pyrosequencing gave inconspicuous results (data not shown). Thus, we conclude that the patient has an epimutation at the 14q32.2 imprinted gene region.

Discussion

We described a patient with clinical features similar to upd(14)mat and severe hypomethylation at the 14q32.2 imprinted gene region. Our results exclude full upd(14)mat and also strongly argue against a deletion of the IG-DMR or the *DLK1* gene. Even

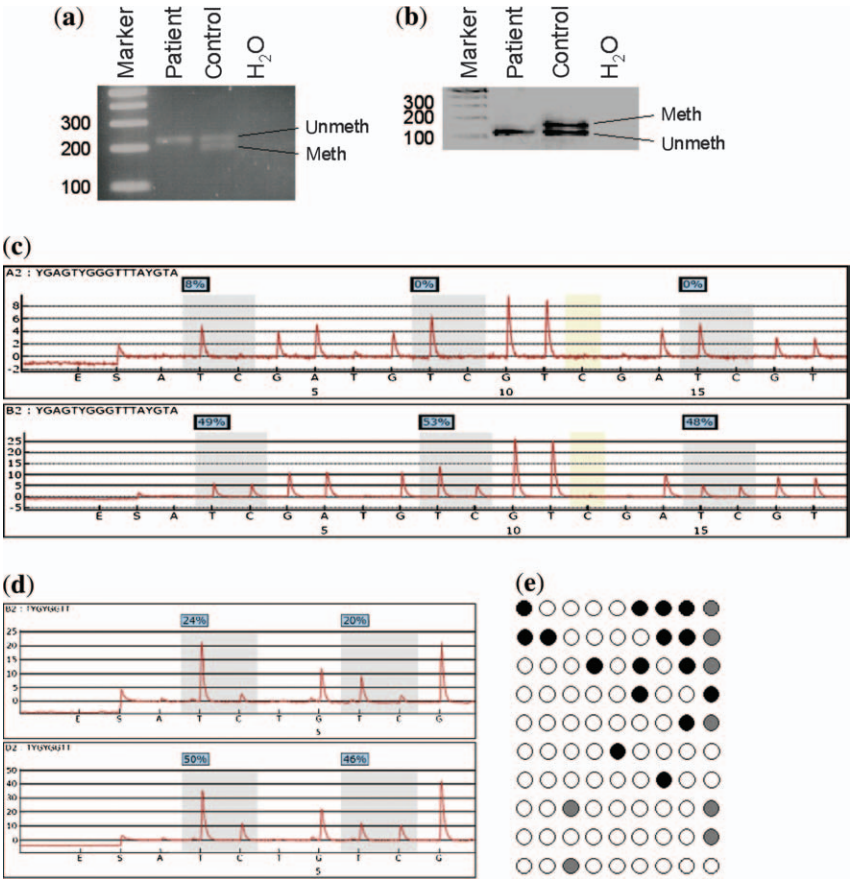


Fig. 2. Methylation analysis of the 14q32.2 imprinted gene region. (**a** and **b**) Methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) assay two (**a**) and one (**b**) of the *MEG3* differentially methylated region (DMR) each in the patient and a control individual. In the patient, only the unmethylated (maternal) band is present, whereas the methylated (paternal) band is absent. The normal control displays a methylated (meth) and an unmethylated (unmeth) band of equal intensity. (**c** and **d**) Bisulfite pyrosequencing of the *MEG3*-DMR (**c**) and the intergenic DMR (IG-DMR) (CG4 region) (**d**) each in the patient (top) and a control individual (bottom). In the pyrogram of the patient, the methylation percentages (highlighted in blue) of the analyzed CpG sites (shaded in gray) vary between 0% and 8% for the *MEG3*-DMR and between 20% and 24% for the IG-DMR. These results indicate a severe (*MEG3*-DMR) and, respectively, a gross (IG-DMR) hypomethylation of the paternal allele. In the pyrogram of the control individual, the methylation percentages (highlighted in blue) of the analyzed CpG sites (shaded in gray) vary between 48% and 53% for the *MEG3*-DMR and between 46% and 50% for the IG-DMR. These differential methylation profiles indicate the normal situation, where both a methylated paternal and an unmethylated maternal allele are present. In the *MEG3*-DMR, a bisulfite treatment control representing an unmethylated cytosine residue that must be converted to uracil was also analyzed and indicated complete conversion (shaded in yellow). (**e**) Classical bisulfite sequencing of the IG-DMR (CG4 region) in the patient. Each line denotes a cloned and sequenced PCR product. Unfilled, filled, and shaded circles represent unmethylated CpGs, methylated CpGs, and CpGs whose methylation status could not be determined unequivocally, respectively. Concordant with the results obtained by bisulfite pyrosequencing, a gross hypomethylation is detected.

if the IG-DMR is deleted on the paternal chromosome, one would not expect that this results in a severe phenotype because mice carrying such a paternally derived deletion of the IG-DMR appear healthy (11). The presence of segmental upd(14)mat within the 14q32.2 imprinted domain is also unlikely because of biparental inheritance of a SNP 15 kb downstream of the IG-DMR. The normal methylation levels at the *SNRPN*, *H19*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, and *NESPAS* imprinted gene loci further argue against the notion that a generalized hypomethylation of other imprinted loci contributes to the phenotype. Thus, the clinical features of our patient are most likely due to an epimutation at 14q32.2, that is the observed hypomethylation is most likely to affect indeed both parental chromosomes and might result in a maternal epigenotype of the paternal chromosome, thereby leading to aberrant gene expression and in consequence to the observed phenotype.

Together with three recent reports describing deletions and epimutations of the 14q32.2 imprinted domain, our study provides strong evidence that the upd(14)mat phenotype arises exclusively from abnormalities of imprinted genes in this region (5–7). Additional evidence comes from

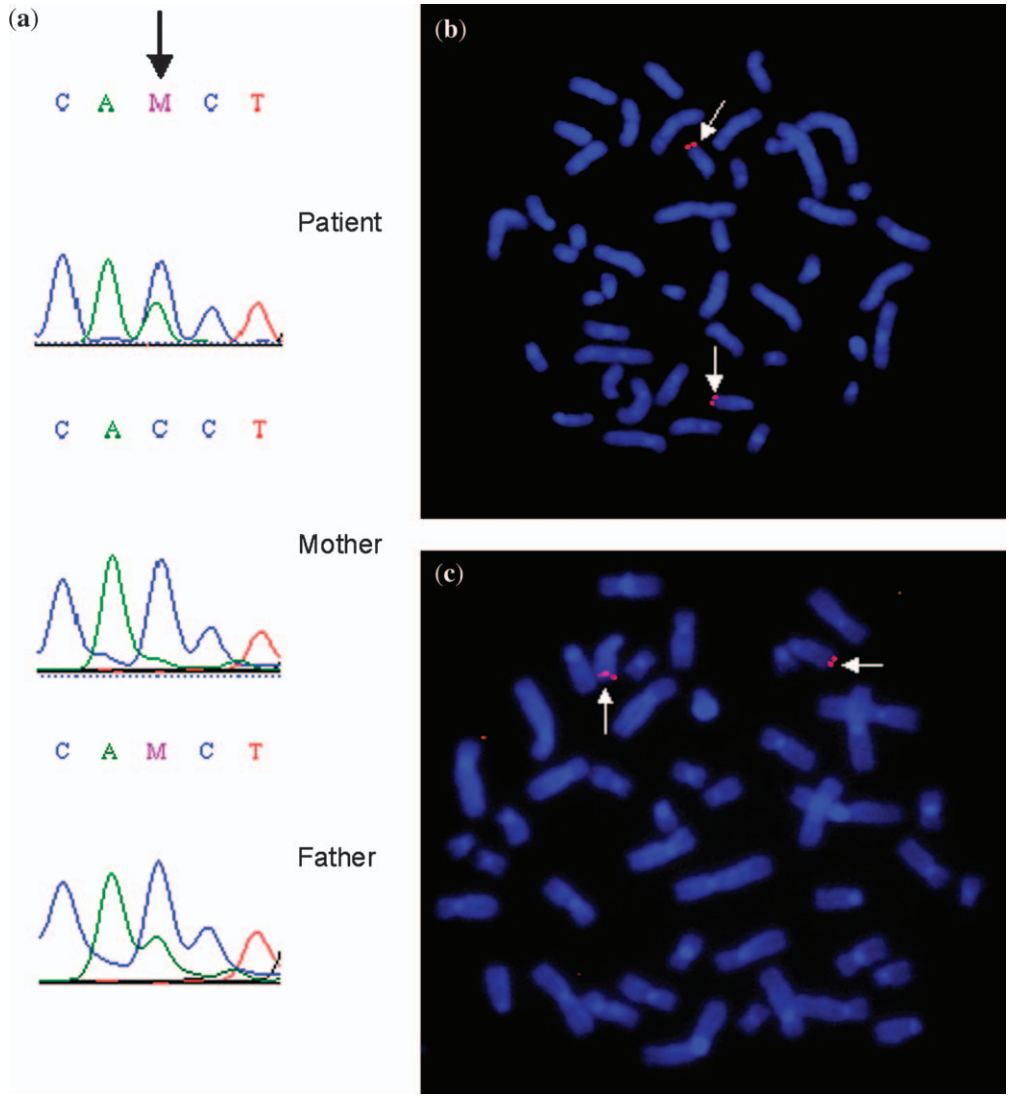


Fig. 3. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis. (**a**) Genotyping of SNP rs11627993 located within the *MEG3* promoter in the patient and his parents. Electropherograms of conventional sequence analysis are shown. The SNP position (C/A) is marked by an arrow. The patient is heterozygous (C/A) for the SNP with the A allele being of paternal origin. (**b** and **c**) FISH analysis of the patient with a long-range polymerase chain reaction product from the intergenic differentially methylated region (**b**) and the bacterial artificial chromosome clone RP11-566J3 encompassing the *DLK1* gene (**c**). For both probes, two red signals (arrows) with similar intensity are visible on both chromosomes 14.

mice with a paternally inherited *Dlk1* null mutation and a paternally inherited null mutation of the *Rtl1* gene, respectively. The upd(14)mat-like symptoms in these mice (12, 13) demonstrate that decreased expression of these two genes plays a crucial role in the clinical manifestation of the upd(14)mat phenotype. In this light, it is interesting to note that one patient with deletion of *DLK1* and *RTL1* displayed a more severe growth retardation than two patients with a deletion involving only *DLK1* (6). Expression analyses of these two genes in patients with epimutations may further elucidate their contribution to the etiopathogenesis of upd(14)mat and upd(14)mat-like phenotypes.

Upd(14)mat is characterized by pre- and postnatal growth retardation, muscular hypotonia, feeding problems in infancy and truncal obesity beginning around the age of 2–4 years, small hands and feet, joint laxity, developmental delay, and early onset of puberty (2, 5–7). Our patient showed all these features except for precocious puberty, for which he was too young to be evaluated. When comparing the clinical features evaluated in the majority of reported patients with epimutation, deletion or full upd(14)mat, we made some interesting observations (Table 2). Low birth weight, muscular hypotonia, facial dysmorphisms, small hands and feet, and early onset of puberty were

Table 2. Comparison of clinical features evaluated in the majority of reported patients with upd(14)mat, deletion of the IG-DMR, and epimutation in the IG-DMR including the patient described in this study

Clinical features	Patients with upd(14)mat ($n = 14$)[a]	Patients with deletion of the IG-DMR ($n = 4$)[b]	Patients with epimutation in the IG-DMR ($n = 4$)[c]	Patient with epimutation in the IG-DMR described in this study
Low birth weight[d]	10/13	3/3	4/4	Yes, −2 SD
Low birth length[d]	9/14	2/2	3/4	No, −1.5 SD
Low height at reporting[d]	9/14	4/4	2/4	No, −1.5 SD
Facial dysmorphisms	6/6	3/4	2/4	Yes
Microcephaly	4/12	0/1	1/4	No, −1 SD
Hydrocephaly/Macrocephaly	3/6	0/1	0/4	No
Small hands	8/8	4/4	4/4	Yes, small hands and feet
Hyperextensible joints	5/5	0/1	2/4	Yes
Scoliosis	4/4	0/4	1/4	No
Muscular hypotonia	10/10	1/1	4/4	Yes
Mental retardation	11/14	1/4	2/4	Too young, only developmental delay
Precocious puberty	7/9	3/3	4/4	Too young

IG-DMR, intergenic differentially methylated region; SD, standard deviation.
[a]From (2).
[b]From (6, 7), two of the four patients were from the same family.
[c]From (5, 7).
[d]Defined as <5th percentile in (2, 5) and as <2 SD in (6, 7), and this report.

found in the vast majority of patients irrespective of the underlying molecular defect. However, scoliosis, mental retardation, and hydrocephaly/macrocephaly seem to be features that are more frequently found in patients with full upd(14)mat than in patients with deletion or epimutation of the *DLK1/MEG3* cluster. These frequency differences may be fortuitous considering the small number of analyzed patients, but they could also indicate that the respective features arise at least in a subset of patients with isodisomic upd(14)mat due to recessive mutations. Reduced and extended spectrums of clinical features have been reported in patients with very small deletions removing only a subset of the differentially regulated genes and with large deletions extending beyond the cluster of imprinted genes at 14q32.2, respectively (6). One might also expect milder phenotypes in patients with a 14q32.2 epimutation occurring after fertilization and leading to somatic mosaicism. However, in our patient, there was no hint for mosaicism, and therefore, his phenotype may be regarded as characteristic of, in particular, pure maternal heterodisomy 14. Further studies of patients with epimutation or deletion of the *DLK1/MEG3* cluster are needed to corroborate this genotype–phenotype relationship.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Fig. S1. The *DLK1-MEG3* region on chromosome 14q32.2 analyzed in the patient. The paternally expressed *DLK1* gene is shown in blue and the maternally expressed *MEG3* gene in red. The green bars indicate the two differentially methylated regions (DMRs), the orange bar the amplicon of the CG4 bisulfite sequencing and pyrosequencing assay, and the purple bars the two regions covered by the employed fluorescence *in situ* hybridization probes. On the bottom, the region encompassing the *MEG3*-DMR is enlarged with the amplicons of the two methylation-specific polymerase chain reaction assays and the bisulfite pyrosequencing assay displayed in orange, the informative single nucleotide polymorphism rs11627993 in yellow and the three CpG sites analyzed by bisulfite pyrosequencing in green.

Fig. S2. Comparison of the intergenic differentially methylated region long-range polymerase chain reaction (PCR) product sizes of the patient and a control individual before (**a**) and after digestion with *Pst*I and *Pvu*II (**b**), respectively. Before digestion, the products of three independent PCR reactions from the patient and four independent PCR reactions from the control individual were analyzed. After digestion, both the inverted (left) and the normal (right) images are displayed. In the patient, no abnormalities were observed. *Pst*I digestion yielded fragments of 1506, 1459, 1207, 345, 319, and 268 bp, and *Pvu*II digestion yielded fragments of 1872, 1758, 702, 415, 196, 143, and 18 bp.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Acknowledgements

We sincerely thank the patient described in this study and his parents whose help and participation made this work possible. We are further thankful to Cornelia Wetzig and Daniela Weise for excellent technical assistance.

References

1. Engel E. A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. Am J Med Genet 1980: 6 (2): 137–143.
2. Sutton VR, Shaffer LG. Search for imprinted regions on chromosome 14: comparison of maternal and paternal

UPD cases with cases of chromosome 14 deletion. Am J Med Genet 2000: 93 (5): 381–387.
3. Geuns E, De Temmerman N, Hilven P et al. Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of *DLK1-GTL2* in human. Eur J Hum Genet 2007: 15 (3): 352–361.
4. Murphy SK, Wylie AA, Coveler KJ et al. Epigenetic detection of human chromosome 14 uniparental disomy. Hum Mutat 2003: 22 (1): 92–97.
5. Temple IK, Shrubb V, Lever M et al. Isolated imprinting mutation of the *DLK1/GTL2* locus associated with a clinical presentation of maternal uniparental disomy of chromosome 14. J Med Genet 2007: 44 (10): 637–640.
6. Kagami M, Sekita Y, Nishimura G et al. Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. Nat Genet 2008: 40 (2): 237–242.
7. Buiting K, Kanber D, Martin-Subero JI et al. Clinical features of maternal uniparental disomy 14 in patients with an epimutation and a deletion of the imprinted *DLK1/GTL2* cluster. Hum Mutat 2008: 29 (9): 1141–1146.
8. Tost J, Dunker J, Gut IG. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by pyrosequencing. Biotechniques 2003: 35 (1): 152–156.
9. Boutin-Ganache I, Raposo M, Raymond M. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. Biotechniques 2001: 31 (1): 24–26.
10. Haaf T. Fluorescence in situ hybridization. In: Meyers RA, ed. Encyclopedia of analytical chemistry, Vol. 1. Chichester: John Wiley & Sons, 2000: 4984–5006.
11. Lin SP, Youngson N, Takada S et al. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. Nat Genet 2003: 35 (1): 97–102.
12. Moon YS, Smas CM, Lee K et al. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. Mol Cell Biol 2002: 22 (15): 5585–5592.
13. Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K et al. Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the feto-maternal interface of mouse placenta. Nat Genet 2008: 40 (2): 243–248.

Danksagung

Als erstes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Haaf für die hervorragende fachliche Betreuung und die Möglichkeit diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Bei Frau Prof. Dr. Dabauvalle von der Abteilung für Elektronenmikroskopie bedanke ich mich für das freundliche Einverständnis zur Begutachtung dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Dr. Kress vom Institut für Humangenetik in Würzburg und Herrn PD Dr. Ulrich Zechner vom Institut für Humangenetik in Mainz für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei sämtlichen Mitarbeitern der Institute für Humangenetik in Mainz und Würzburg für Lehre, großartige Zusammenarbeit, die tolle Arbeitsatmosphäre und auch viele entspannte Stunden außerhalb des Labors.

Bei meiner gesamten, mittlerweile angewachsenen, Familie bedanke ich mich für die immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen.

7 Curriculum Vitae

Natalja Damatova

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum /-Ort	18.07.1980 / Kokand
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

AUSBILDUNG

11/2009 – 08/2011	Julius-Maximilians-Universität, Würzburg Promotionsstudium Thema: „Identifizierung und Charakterisierung von krankheitsassoziierten Mikrodeletionen mit modernen molekularzytogenetischen Methoden“
01/2008 – 10/2009	Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz Promotionsstudium Thema: „Identifizierung und Charakterisierung von krankheits--assoziierten Mikrodeletionen mit modernen molekularzytogenetischen Methoden“
10/2001 – 05/2007	Westfälische Wilhelms-Universität Münster Studium der Biologie (Note: 1,7) Thema: „Expression und Funktion stressaktivierter MAP-Kinasen (KGB-1) von *Caenorhabditis elegans*“
10/2000 – 10/2001	Akademisches Jahr an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
03/1996 – 06/2000	Marienschule Münster Abschluss: Abitur
02/1995 – 03/1996	Friedensschule Münster (Realschulzweig)
04/1993 – 02/1995	Hauptschule Vlotho
09/1990 – 03/1993	Staatliche Schule, Taschkent
09/1987 – 05/1990	Staatliche Schule, Kokand

PRAKTIKA

09/2004 – 10/2004	Praktikum im Max-Plank-Institut für Endokrinologie, Hannover
07/2005 – 08/2005	Praktikum am Institut für molekulare Virologie, Münster

SPRACHEN

Deutsch, Russisch: Muttersprache

Englisch: verhandlungssicher

Französisch: gute Grundkenntnisse

Hebräisch: Grundkenntnisse

Natalja Damatova