



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Molekularcytogenetische und molekulargenetische Untersuchung eines Patienten mit  
DiGeorge- verwandter Klinik und renalem Rhabdoidtumor

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasser:	Markus Galhuber
Matrikel-Nummer:	0201950
Studienrichtung:	Anthropologie (A442)
Betreuerin:	Prof. Dr. Rotraud Wieser

Wien, im Februar 2011



# Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung .....	1
A.	Mutationstypen des Genoms (nach European Bioinformatics Institute).....	1
B.	Chromosomenbande 22q11 .....	2
C.	Velo- Cardio- Faciales Syndrom/DiGeorge Syndrom (VCFS/DGS) .....	3
D.	Maligne Rhabdoid Tumore (MRT).....	9
II.	Patientenbeschreibung.....	11
A.	Indexpatient .....	11
B.	Familienanamnese .....	13
III.	Methoden .....	14
A.	Cytogenetische Aufarbeitung des Patientenmaterials .....	14
B.	DNA- Sondenherstellung für Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) .....	16
C.	Reinigung von ‚Bacterial Artificial Chromosomes‘ (BACs) .....	19
D.	Gel- Elektrophorese .....	21
E.	Restriktionsverdau der BAC-DNA.....	22
F.	DNA- Sonden- Markierung.....	23
G.	Fluoreszenz in situ Hybridisierung .....	25
H.	DNA- Isolierung aus Vollblut (nach Miller, S.A.) .....	28
I.	PCR (‚polymerase chain reaction‘) aus genomischer DNA .....	29
J.	Aufreinigung der PCR- Produkte .....	31
K.	Sequenzierung der PCR- Produkte .....	31
IV.	Resultate .....	34
A.	Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Material des Indexpatienten .....	34
B.	Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Material der Eltern des Indexpatienten .....	39
C.	Array CGH an genomischer DNA des Indexpatienten und der Eltern des Indexpatienten zur Bestätigung der ununterbrochenen 2.8- Mb Deletion .....	40
D.	Mutationsanalyse SMARCB1 - Gen .....	40
V.	Diskussion .....	42
VI.	Zusammenfassung .....	44
VII.	Bibliographie .....	45
VIII.	Abbildungsverzeichnis .....	48
IX.	Tabellenverzeichnis .....	49
Appendix A.	Liste der verwendeten Chemikalien, Reagentien und Enzyme .....	50
Appendix B.	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien.....	52
Appendix C.	Liste der verwendeten Geräte.....	56



# I. Einleitung

## A. Mutationstypen des Genoms (nach European Bioinformatics Institute)

Grundsätzlich kann zwischen drei verschiedenen Typen von Mutationen unterschieden werden. Diese sind: Nukleotid- Austausche, Insertionen und Deletionen sowie chromosomale Mutationen.

Bei einem **Nukleotid- Austausch** wird *eine* Base des Genoms durch eine andere ersetzt. Es liegt dann eine so genannte Punktmutation vor. Die Auswirkung der Punktmutation wird, nach Abschreiben (Transkription) der genetischen Information zur mRNA, erst bei der Übersetzung (Translation) der mRNA in Proteinsequenz offenbar. Dem so genannten genetischen Code folgend, werden bei der Translation von mRNA in Protein jeweils 3 Basen zu einem Basentriplett (Codon) zusammen gefasst. Jedes Codon entspricht einer bestimmten Aminosäure, die gemäß der Basenabfolge der mRNA in die Proteinsequenz eingebaut wird. Es existieren 64 ( $4^3$ ) mögliche Codons die für 20 Aminosäuren codieren, d.h. für jede Aminosäure stehen mehrere Codons zur Verfügung. Das bedeutet, dass eine Änderung der Basensequenz des Genoms noch nicht zwingend zu einer Änderung in der Aminosäurenabfolge des Proteins führen muss.

In diesem Sinne unterscheidet man (i) *stille* Mutationen, bei denen der Nukleotid- Austausch keinerlei Veränderung der Aminosäurenabfolge des translatierten Proteins verursacht; (ii) *Missense-* („Falsch-Sinn“-) Mutationen, bei denen im Gen- Produkt eine Aminosäure gegen eine andere ausgetauscht wird und, abhängig von der Art der ausgetauschten Aminosäure, zu unterschiedlich schweren Beeinträchtigungen führen kann; und (iii) *Nonsense* („Unsinn“-) Mutationen, welche durch die Synthese unvollständiger Protein- Fragmente gekennzeichnet sind. Die Protein- Fragmente bei *Nonsense-* Mutationen erfüllen ihre angestammte Funktion meist nicht. Ein spezieller Fall des Nukleotid- Austausches führt zu einer fehlerhaften Prozessierung der transkribierten mRNA beim Splicing, so genannte *Splice-site-* Mutationen, was ebenfalls zu nicht-funktionalen Protein- Fragmenten führen kann.

Bei der zweiten großen Gruppe genetischer Veränderungen werden Basenpaare der DNA innerhalb einzelner Gene hinzugefügt bzw. weggenommen. Man spricht dann von **Insertionen bzw. Deletionen**. Der Bereich insertierter bzw. deletierter Basenpaare kann von einzelnen bis zu mehreren Tausend Basenpaaren reichen. Werden nur ein oder zwei Basenpaare (oder ein vielfaches dessen) in die Basenabfolge des betroffenen Genes insertiert bzw. deletiert hat dies zu Folge, dass die genetische Information wohl in Protein umgewandelt wird, diese Proteine jedoch fehlerhaft sind. Auslöser ist die Verschiebung des Trinukleotid- Leserasters („Frameshift- Mutation“) welche zu einer falschen Übersetzung und damit zu einem nicht- funktionalen Protein führt. Werden drei (oder ein Vielfaches von drei) Basenpaare in die Gensequenz eingebaut bzw. daraus gelöscht, verschiebt sich der Leseraster bei der mRNA- Übersetzung nicht, d.h. die phänotypischen Folgen durch die dadurch veränderte Proteinsequenz sind hier oft wesentlich geringer oder bleiben überhaupt aus. Wie bereits gehört, hat die Insertion bzw. Deletion von drei Nukleotiden (Trinukleotid) in der Gensequenz den Einbau *einer* zusätzlichen bzw. das Fehlen *einer* Aminosäure

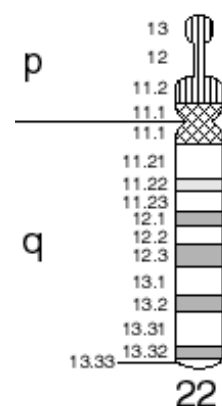
im fertigen Protein zur Folge. Bei Krankheiten wie dem Fragilen X Syndrom bzw. der Huntington'schen Krankheit ist ein solches, so genanntes Trinukleotid, in mehrfacher Ausführung vorhanden und kann im Laufe von Generationen noch verlängert werden. Im fertigen Protein führt eine multiple Wiederholung von einzelnen Trinukleotiden zum multiplen Einbau der entsprechenden Aminosäure und damit zu einem nicht-funktionalen Protein.

Die dritte Gruppe genetischer Veränderungen sind **chromosomale Mutationen**. Eine chromosomale Mutation ist eine Veränderung der Struktur bzw. des Arrangements einzelner oder mehrerer Chromosomen bzw. einzelner oder mehrerer Chromosomenabschnitte. Man unterscheidet zwischen Deletionen (große Chromosomenabschnitte sind deletiert und damit Gene nicht vorhanden), Duplikationen (Chromosomenabschnitte mit darauf liegenden Genen sind in doppelter oder mehrfacher Ausführung vorhanden), Inversionen (Chromosomenabschnitte sind in ihrer Orientierung zum Rest des Chromosoms umgedreht eingebaut), Insertionen (Chromosomenabschnitte sind zwischen normale Sequenzabfolgen eingebaut) und Translokationen (Chromosomenabschnitte zwischen verschiedenen Chromosomen werden reziprok ausgetauscht). Bei Deletionen bzw. Duplikationen ist die Menge an genetischem Material verändert (unbalanzierter Karyotyp), was zu einem klinisch auffälligen Phänotyp führen kann. Bei Inversionen, Insertionen oder Translokationen bleibt, trotz struktureller Veränderungen, die Menge an genetischem Material in der Regel unverändert. Hierbei spricht man von einem balanzierten Karyotyp. Die Träger eines balanzierten Karyotyps können klinisch vollkommen unauffällig sein.

Hinsichtlich der Vererbbarkeit von Mutationen kann zwischen zwei Fällen unterschieden werden. Entweder sind lediglich die somatischen Zellen (Körperzellen) eines Organismus von einer Mutation betroffen und haben dadurch nur auf den Mutationsträger eine Auswirkung oder eine chromosomale Mutation betrifft die Keimzellen eines Organismus, welcher diese Mutation dadurch an Tochtergenerationen weiter vererben kann. Als Ursache von somatischen Mutationen können Spontanmutationen bzw. induzierte Mutationen (durch ein Mutagen) angeführt werden, wodurch unkontrolliert wuchernde Krebszellen entstehen können. Somatische Mutationen sind nicht vererblich. Gibt ein *gesunder Organismus* eine chromosomale Mutation an die Tochtergeneration weiter, so ist die Mutation mit größter Wahrscheinlichkeit während der elterlichen Keimzellenreifung neu (*de novo*) entstanden. In diesem Falle spricht man von einer Keimbahnmutation, die während der Stadien der homologen Rekombination, dem Crossing-Over und der anschließenden Segregation entstehen können.

### B. Chromosomenbande 22q11

Chromosomenabschnitt 22q11 ist ein Bereich, welcher sowohl von angeborenen (konstitutionellen), als auch erworbenen (somatischen) Chromosomenrearrangements betroffen sein kann. Obwohl das Chromosom 22 nur 2% des haploiden menschlichen Genoms ausmacht, ist es in viele konstitutionelle und somatische Aberrationen involviert. (Kaplan, 1987) So zählt,



**Abbildung 1.**  
**Chromosom 22**  
Schematische Darstellung des Chromosoms 22 mit Chromosomenbanden

in Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) bzw. chronisch myeloischer Leukämie (CML), die balanzierte t(9;22) Translokation (Philadelphia-Chromosom) zu den häufigsten erworbenen 22q11 Rearrangements. Außerdem werden Rearrangements des Bereichs 22q11 mit dem Burkitt's Lymphom (t(8;22)), und weitere maligne Tumoren (Ewing Sarkom t(11;22); Rhabdoid Tumore, Meningiome) mit Chromosom 22 in Verbindung gebracht. (Edelmann, et al., 1999) Neben den erworbenen chromosomalen Veränderungen von Chromosomenbande 22q11 sind in der Literatur angeborene 22q11 Aberrationen und daraus resultierende Syndrome beschrieben. Zu diesen gehören: Cat Eye Syndrom (CES), DiGeorge Syndrom (DGS) (DiGeorge, 1965), Velo-cardio-faciales Syndrom (VCFS), Shprintzen Syndrom (Shprintzen, et al., 1978). Bei den angeführten Syndromen handelt es sich, auf genetischer Ebene, um Deletionen und anderer Abberationen variabler Größe, welche Ähnlichkeiten in Spannweite bzw. chromosomaler Position zeigen. Die genetischen Grundlagen von VCFS, DGS und Shprintzen- Syndrom sind heute so weit erforscht um gesichert sagen zu können, dass dieselben als *ein* Syndrom (VGFS/DGS) bezeichnet werden können. (Carey, et al., 1992, Edelmann, et al., 1999) Anfänglich ging man bei den genannten Syndromen, basierend auf ihrer großen phänotypischen Heterogenität, von verschiedenen Erkrankungen aus, was sich jedoch mit Fortschritt der molekularcytogenetischen und molekulargenetischen Analysemethoden als falsch heraus stellte. Von VCFS/DGS werden das CES Typ I bzw Typ II (McDermid, 1986) und das *der(22)* Syndrom (Zackai, 1980) abgegrenzt, welche ihre genetischen Ursachen ebenfalls innerhalb von 22q11 haben.

### C. *Velo- Cardio- Faciales Syndrom/DiGeorge Syndrom (VCFS/DGS)*

Das VCFS/DGS wurde, unter Rücksichtnahme obiger Ausführungen erstmals 1978 als Syndrom beschrieben. (Shprintzen, et al., 1978) In der Literatur gibt es unterschiedliche Meinungen darüber, mit welcher Häufigkeit VCFS/DGS auftritt. Die Angaben zur Inzidenz schwanken zwischen 1:1600 (Shprintzen, 2008) und 1:9700 (Tezenas Du Montcel, 1996). Manche Autoren, wie Shprintzen gehen von vielen, nicht diagnostizierten („stillen“) Anomalien mit atypischem bzw. minimalem Phänotyp aus, welche im neonatalen bzw. frühkindlichen Alter nicht erkennbar sind und, falls überhaupt, erst im späteren Leben entdeckt werden. Es handelt sich demnach, bei der von Shprintzen genannten Zahl von einem betroffenen Kind auf 1600 Geburten, um eine Schätzung der gesamten, auch nicht diagnostizierten Betroffenen. Somit zählt das Velo-Cardio-Faciale Syndrom beim Menschen zu den häufigsten Syndromen. Die Mehrheit der Deletionen entstehen *de novo* (d.h. als Keimbahnmutation). (Shaikh, et al., 2000) Nicht weniger als 180 differenzierbare klinische Phänotypen, die nahezu alle Organsysteme und Entwicklungsfunktionen betreffen und in unterschiedlicher Häufigkeit auftreten, sind beschrieben. (Shprintzen, 2008) Zu den vielfältigen phänotypischen Kennzeichen zählen angeborene Herzfehlbildungen (Conotruncus, 49-83%, Ventrikelseptumdefekt, 13-14%), Hypocalcämie, 17-60%, Anomalien des Gaumens (Gaumenspalte), 69-100%, und der Nieren, 36-37%, neurologische, 8%, sowie Sprach- und Entwicklungsstörungen, ~80%. (Kobrynski & Sullivan, 2007) In vielen Fällen wird von fehlender bzw. hypoplastischer Schilddrüse/Nebenschilddrüse (Carey, et al., 1992) und milden bis ernsthaften Störungen des Immunsystems, welche sich dann vor allem durch häufige Infektionen des Respirationstraktes sowie Mittelohrentzündungen und Sinusitis im frühkindlichen Alter äußert (Shprintzen, 2008), berichtet. Neben den körperlichen Manifestationen werden auch Komplikationen im Verhaltens- und

psychischen Bereich (9-50%), sowie Schizophrenie (6-30%) und depressive Störungen mit dem VCFS/DGS assoziiert. (Maynard et al. 2002; Hoogendoorn et al. 2004)

In einer Studie von Carlson et al. (1997) wurde eine Gruppe von 151 VCFS/DGS- Patienten untersucht. 90% der Fälle zeigen eine 3-Mb Deletion mit jeweils identen proximalen und distalen Bruchpunkten. Dieser 3-Mb große Bereich wird seitdem auch ‚Typically Deleted Region‘ (TDR) genannt. Weitere ca. 8-10% der Betroffenen zeigen eine 1.5-Mb bis 2.0-Mb Deletion, mit dem gleichen proximalen Bruchpunkt. Da beide Deletionen, diese starke Übereinstimmung zeigen wird der betroffene Bereich auch ‚DiGeorge Critical Region‘ (DGCR) genannt. Beide Deletionen zeigen keinen Unterschied im klinischen Erscheinungsbild, wobei man jedoch davon ausgeht, dass durch weitere, noch genauere Differenzierung der Merkmale, eine klinische Unterscheidung theoretisch möglich wäre. Diese ist zurzeit noch ausständig. (Carlson, et al., 1997; Edelmann, et al., 1999; Shprintzen, 2008) Bei den restlichen, weniger als 1% der Patienten handelt es sich um atypische Deletionen oder Translokationen nicht wiederkehrenden Charakters. Größere, atypische Deletionen innerhalb von 22q11.2, telomerisch der TDR, wurden erstmals von Rauch et al. (1999) sowie Saitta et al. (1999) beschrieben. Seitdem werden diese so genannten atypischen, distalen 22q11.2 Deletion intensiv untersucht. (Rauch, et al., 2005; Shaikh, et al., 2007; Mikhail, et al., 2007; Jackson, et al., 2007; Lafay-Cousin et al. 2009). Wie schon bei den häufiger vorkommenden Deletionen in 22q11.2, überschneiden sich auch die atypischen, distalen 22q11.2 Deletionen in ihrer phänotypischen Erscheinung mit den typischen VCFS/DGS- Deletionen. Eine klinische Unterscheidbarkeit der verschiedenen Deletionen zu ermöglichen, steht heute im Fokus der medizinisch wissenschaftlichen Untersuchungen. (Ben-Shachar et al., 2008)

In manchen Patienten mit VCFS/DGS Symptomatik wird trotz ihrer klinischen Erscheinung keine der oben genannten Deletionen, weder typische noch atypische, gefunden. Es könnte sich in diesen Fällen eventuell um kürzere Mutationen, innerhalb bestimmter Gene im Chromosomenband 22q11.2 handeln bzw. die VCFS/DGS- Symptomatik andernorts begründet liegen, z.B. in Symptom auslösenden Einflüssen während der Embryo- bzw. Fetogenese. (Carlson et al., 1997) In einer Zusammenfassung von McDermid und Morrow (2002) werden 4 Gene als Kandidatengene für VCFS/DGS vorgestellt. Als eines dieser Kandidatengene gilt *Tbx1*, welches im haploinsuffizienten Zustand bei der Entstehung von VCFS/DGS eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Das Genprodukt von *Tbx1* ist während der Embryonalphase an der Ausbildung der Neuralleiste beteiligt, aus welcher sich im Laufe der Neurulation Teile der Kiemenbögen bilden. (Lindsay, 2001; Yamagishi & Srivastava, 2003) Viele Gewebe und adulte Strukturen, welche bei VCFS/DGS unregelmäßig entwickelt sind, gehen auf diese embryonalen Anlagen zurück. Auch im Mausmodell zeigten Individuen mit ausgeknocktem *Tbx1*- Gen VCFS/DGS- Merkmale. *Tbx1* hemizygoten Individuen zeigen milde Kardio- vaskuläre Defekte, homozygote Individuen hingegen zeigten ernste, dem VCFS/DGS Syndrom sehr ähnliche Auffälligkeiten und waren häufig perinatal letal. (Jerome & Papaioannou, 2001; McDermid & Morrow, 2002) Weiters wird in der genannten Zusammenfassung davon berichtet, dass VCFS/DGS- Phänotypen auch beobachtet werden können, wenn eine Überexpression von *Tbx1* vorliegt. Dies legt den Schluss nahe, dass gendosisgekoppelte Einflüsse von *Tbx1* (und 3 weitere, benachbarte Kandidatengene) während der Embryonalphase wesentlichen Anteil an der Entwicklung von bestimmten klinischen Aspekten VCFS/DGS haben. Dazu zählen

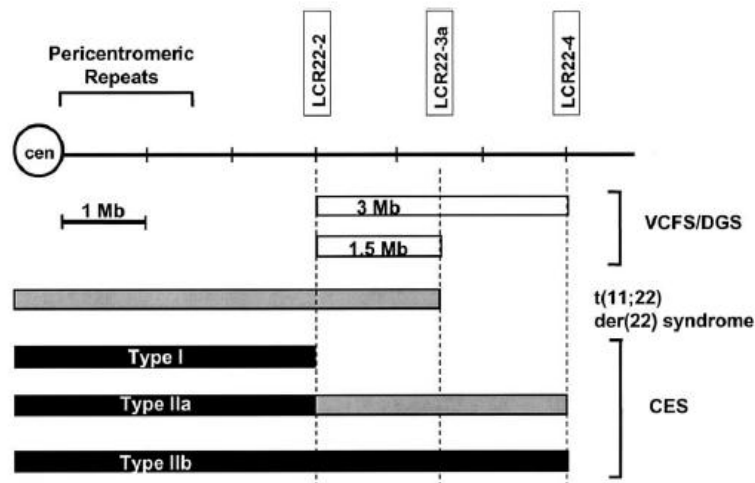


Gaumenspalte, konotrunkale Herzdefekte, Aplasie oder Hypoplasie der Thymusdrüse und Ohrdefekte. Die weitaus größere Bandbreite an Symptomen bei VCFS/DGS mit typischer 3-Mb- bzw. 1.5-Mb- Deletion kann damit jedoch nicht erklärt werden. Neben *Tbx1* sind schon bei der typischen 1.5-Mb Deletion ungefähr 30 Gene von der Deletion betroffen (Maynard et al. 2002) Diese große Anzahl an haploid vorliegenden Genen bei der typischen VCFS/DGS- Erkrankung ist auch Begründung für ihr komplexes klinisches Spektrum.

Auf Grund der Häufigkeiten der 3-Mb- bzw. 1.5-Mb- Deletion, gilt es diese zuerst ins Zentrum der Aufmerksamkeit zu rücken. Interessanterweise gibt es zwischen den Bruchpunktregionen der 3- Mb und der 1.5 Mb- Deletion, sowie den Bruchpunktregionen der anderen 22q11 Chromosomenstörungen, CES und *der(22)* Syndrom, eine teilweise hohe Übereinstimmung. Erstmals wurden die VCFS/DGS Deletionen 1993 mit speziellen, repetitiven Sequenzen an den Bruchpunktregionen in Verbindung gebracht. Die Bruchpunkte der 3- Mb und 1.5- Mb Deletion wurden 1999 von Edelmann et. al. an 105 Patienten mit VCFS/DGS genauer untersucht. Sie fanden dabei in allen Patienten, dass dieselben repetitiven Chromosomenabschnitte an den Aberrationen beteiligt sind. Eine genauere Analyse dieser Regionen offenbarte extrem paraloge Strukturen, die über die gesamte Chromosomenbande 22q11 verteilt liegen. Als paraloge Sequenzabschnitte werden ähnliche Sequenzen, d.h. Basenabfolgen, innerhalb des Genoms eines Organismus bezeichnet. Es handelt sich bei diesen paralogenen Sequenzabschnitten um so genannte ‚Low Copy Repeats‘ (LCR), die eine zentrale Rolle im molekularen Mechanismus von 22q11 Rearrangements spielen. Low-Copy Repeats machen ca. 5% des menschlichen Genoms aus. (Bailey et al., 2002) und kommen nicht nur auf Chromosom 22 vor. Sie werden auch mit anderen krankheitsauslösenden Rearrangements in Verbindung gebracht. Dazu gehören das Williams-Beuren Syndrom auf Chromosom 7q11.2, Prader-Willi/Angelman- Syndrom auf Chromosom 15q11-13, Charcot-Marie-Tooth Typ I (CMT1A)/ Hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Drucklähmungen (HNPP) auf Chromosom 17p11.2, Smith-Magenis Syndrom (SMS) auf Chromosom 17p11.2-13, und Neurofibromatose (NF1) auch Chromosom 17q11.2. (Pavlicek, 2005)

Die Low Copy Repeats auf Chromosom 22 (LCRs22) sind mehrere ~10-400kb große, paraloge DNA-Abschnitte, die innerhalb ihrer Sequenzen große Übereinstimmung zeigen. Heute sind in 22q11.2 acht LCRs22 bekannt, die einen Anteil von 11% der Region ausmachen. (Babcock, et al., 2003) Die vier am häufigsten in chromosomale Aberrationen involvierten LCRs22 werden von centromerisch nach telomerisch mit LCR22-2, LCR22-3a, LCR22-3b und LCR22- 4 gekennzeichnet. (Dunham, et al., 1999) Weiter proximal liegt LCR22-1. Die weiter distal liegenden LCRs22-5 bis –8 sind kleiner und weisen weniger Übereinstimmung ihrer Sequenzen auf. LCR22-5 bis LCR22-8 sind außerdem seltener in Rearrangements involviert. Charakteristisch für die LCRs22 ist ihr Aufbau. Die LCRs22 setzen sich aus mehreren kurzen Untereinheiten (Modulen) zusammen, die innerhalb der genomischen Sequenz unterschiedlich ausgerichtet sind, d.h. dass einzelne Module (Duplikons) in gleicher (5'→3'), als auch in gegengleicher (reverser) (3'→5') Ausrichtung in die Genomsequenz eingebaut sind. LCR22-1 bis LCR22-8 unterscheiden sich in Art, Anzahl und organisatorischer Komplexität der jeweils darin vorkommenden Duplikons. Die Duplikons enthalten DNA- Abschnitte mit verschiedenen Genen und Pseudogenen, wie z.B. *GGT-Rel*, *GGT*, *V7-Rel*, *POM121L* und *BCRL*, die Paralogien zwischen den LCRs22 und zu anderen Chromosomen aufweisen. Vergleicht man LCR22-1

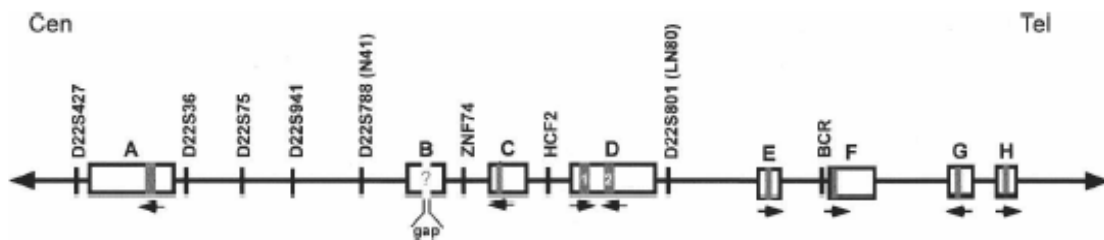
bis LCR-8, so weisen sie eine Sequenz- Übereinstimmung innerhalb ihrer paralogen Bereiche von 97-98% auf. Außer den LCRs22 selbst, wurden bei den Untersuchungen noch weitere, teilweise instabilisierende Sequenzabschnitte in 22q11 gefunden. Dies sind z.B. AT-reiche Abschnitte, die in einem beschriebenen Fall einer Familie zu einer t(17,22) Translokationen mit NF1- Phänotyp führt (Kehrer-Sawatzki, et al., 1997), oder VNTR (,Variable Number Tandem Repeats‘)- ähnliche Repeats, die an einer 1.9-Mb Xp22.3 Deletion beteiligt sind. (Shaikh, et al., 2000) Durch das hohe Maß an sequenzieller Übereinstimmung der LCRs22 und den Sequenz- instabilisierenden Abschnitten wurde der molekulardiagnostische Verdacht von 22q11 als ,Hotspot‘ für Chromosomen- Rearrangements bestätigt.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung von LCRs22 in 22q11 Chromosomen- Rearrangements.** Die häufigste 22q11-Deletion in VCFS/DGS ist die 3-Mb Deletion (90%) zwischen den LCR22-2 und LCR22-4. 8-10% der VCFS/DGS- Fälle geschehen durch eine 1.5-Mb Deletion zwischen demselben proximalen (LCR22-2) und LCR22-3a als distalem Bruchpunkt. In die weiteren beschriebenen 22q11- Aberrationen sind ebenfalls die LCRs22 involviert. Als distaler Bruchpunkt LCR22-3a der konstitutionellen t(11,22) Translokation, sowie LCRs22-2 und -4 beim Cat Eye Syndrom. Deletionen (weiße Boxen); partielle Trisomien (graue Boxen); partielle Tetrasomien (Schwarze Boxen). Aus McDermid & Morrow, Genomic Disorders on 22q11, 2002

Die 3-Mb Deletion in VCFS/DGS betrifft den Bereich zwischen LCR22-2 und LCR22-4. LCR22-2 (~350kb) und -4 (~400kb) sind die beiden größten Repeats und stimmen in einem Bereich von ~250kb zu 97-98% in ihrer DNA- Sequenz überein. (Shaikh, et al. 2001) An der 1.5-Mb Deletion sind LCR22-2 und -3a, mit einer ~135kb Paralogie (97-98%) beteiligt. Die selteneren Aberrationen kommen zwischen kürzeren LCRs22, mit gleichem Maß an Paralogie (97-98%), jedoch kürzerer übereinstimmender Sequenz vor. Shaikh et al. (2001) fanden heraus, dass es bei VCFS/DGS einen Zusammenhang zwischen der Größe der übereinstimmenden Sequenzbereiche, in denen das Rearrangement stattfindet, und der Häufigkeit ihres jeweiligen Auftretens gibt. Je länger die Übereinstimmung der paralogen Sequenzabschnitte, desto häufiger kommt die jeweilige Deletion vor. Der Zusammenhang mit anderen 22q11 Rearrangements, d.h. dem CES- Syndrom Typ I und II sowie *der(22)* Syndrom liegt in der Übereinstimmung der chromosomalen Bruchpunkte, d.h. die Lage der Bruchpunkte innerhalb der LCRs22. (Abbildung 2) Die LCRs22 sind daher praktisch an allen angeborenen typischen und atypischen Deletionen bzw. Translokationen innerhalb der Region 22q11.2 als Mediatoren beteiligt. Der CES Typ I distale Bruchpunkt fällt mit dem proximalen

Bruchpunkt der TDR (LCR22-2) zusammen, der CES Typ II Endpunkt liegt innerhalb LCR22-4. Auch die konstitutionelle t(11,22) Translokation, sowie das *der(22)* Syndrom zeigen dieselben Bruchpunktregionen wie VCFS/DGS und CES. Trotz dieser Tatsache können die Syndrome auf phänotypischer Ebene unterschieden werden. (McDermid, 2002) Genauere Sequenzanalysen der Bruchpunkte auf Nukleotidebene wurde in einer weiteren Untersuchung von Shaikh et al. (2007) für 2 VCFS/DGS- Patienten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Deletionsbruchpunkte innerhalb von BCRL (BCR- Pseudogen)- Modulen liegen. Die BCRL- Module kommen als einzige in 7 von 8 LCRs22 (Babcock, et al., 2003) vor und gelten auch als Kandidaten für Bruchpunkte in den anderen 22q11- Deletionen.



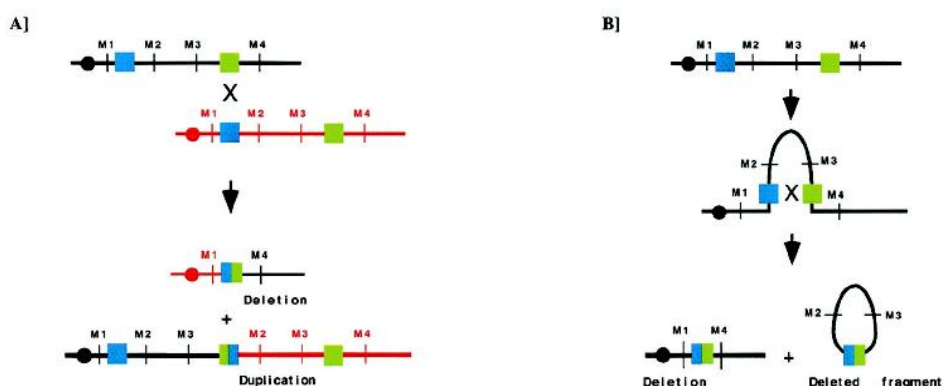
**Abbildung 3. LCRs22-1 bis 8 und die Ausrichtung der BCRL-Module.** Die weißen Boxen stellen die LCR22 dar. Abschnitte von LCR22-3a(B) sind auf Grund ihrer Struktur schwer zu sequenzieren, daher die mit ‚?‘ gekennzeichnete Lücke („gap“). Die Ausrichtung der einzelnen BCRL- Module innerhalb der LCRs22 in grau mit dem jeweiligen Pfeil darunter, der die Ausrichtung anzeigt. Shaikh et al. verwenden eine andere Nomenklatur zur Bezeichnung der LCRs22. Die äquivalenten LCRs22 sind: A, LCR22-2; B bzw. C, LCR22-3a bzw. 3b; D, LCR22-4; E-H, LCR22-5 bis LCR22-8 (aus **Shaikh, et al., 2007**)

Das BCRL- Modul ist in den LCRs22 unterschiedlich ausgerichtet. Es fallen BCRL-2, BCRL-3b, BCRL-4.2, und BCRL-7 in eine Gruppe, die von Centromer nach Telomer ausgerichtet ist. BCRL-4.1, BCRL-5, BCRL-6, und BCRL-8 fallen in die zweite Gruppe, die in Gegenrichtung eingebaut sind. (Abbildung 3) Das könnte die Häufung bestimmter, einzelner Deletions- und Duplikationsereignisse innerhalb 22q11 erklären. (Shaikh, et al., 2007) Das BCR-like Pseudogen (BCRL), welches zum 3'-Ende des BCR-Gens homolog ist, ist außerdem in die t(9,22) Translokation involviert. Diese führt zum Philadelphia-Chromosom, das wie eingangs bereits erwähnt, zu den häufigsten somatischen 22q11 Rearrangements zählt.

Um den genetischen Mechanismus der konstitutionellen 22q11 Rearrangements in VCFS/DGS zu erklären, wurde die Hypothese über nicht- allelische homologe Rekombinationsereignisse (NAHR) aufgestellt. Während der Keimzellentwicklung (Gametogenese) lagern sich homologe väterliche und mütterliche Chromosomen aneinander und tauschen genetisches Material aus. Dieser Austausch wird chromosomale Rekombination (Crossing-over) genannt und erfolgt an homologen Strukturen innerhalb der Schwesternchromatiden. Dadurch wird eine stetige Durchmischung der genetischen Information über die Generationen gewährleistet. Dieser Mechanismus kann jedoch auch ungewünschte Effekte haben. Durch die hohe Übereinstimmung der LCRs22 kann es nämlich während der chromosomalen Rekombination zu Fehlpaarungen derselben kommen. Dadurch tauschen die Schwesterchromatiden genetische Information ungleich aus, d.h. als Ergebnis der genetischen Rekombination gehen Zellen bzw. Keimzellen mit zu viel (Duplikationen) bzw. zu wenig (Deletionen) genetischem Material hervor. Genau das passiert innerhalb Chromosomenband 22q11 bei VCFS/DGS. Um die Entstehung in VCFS/DGS zu erklären, werden zwei unterschiedliche Modelle

vorgeschlagen. Diese sind insofern verschieden, als sie den jeweiligen Zeitpunkt, an dem die Fehlauflösungen stattfinden unterschiedlich setzen und die Anzahl der beteiligten Chromosomen variiert. Man unterscheidet zwischen inter- chromosomalem und intra- chromosomalem Austausch von genetischen Material. Im ersten Modell findet eine inter- chromosomale Fehlpaarung während Meiose I (Reduktionsteilung) statt und zwar zwischen direkt zueinander ausgerichteten Modulen innerhalb der LCRs22 der homologen Chromosomen. Durch die Fehlpaarung zwischen väterlichem und mütterlichem Chromosom, anschließendem Crossing-over und Reduktionsteilung kommt es zu einer reziproken Deletion bzw. Duplikation in den Gameten. Oder, so das zweite Modell, es findet eine fehlerhafte Anlagerung der einzelnen, intra- chromosomalen Stränge während der Mitose bzw. Meiose II (Äquationsteilung) statt. Dabei lagern sich Duplikons, die in inverser Orientierung zueinander stehen, unter Ausformung einer Schleife aneinander. Bei der anschließenden Teilung hat das zur Folge, dass die zwischen den beteiligten LCRs22 liegenden DNA- Abschnitte deletiert werden. (Shaikh, 2001) Durch Haplotypanalyse, einer Methode zur Feststellung der väterlichen oder mütterlichen Vererbung eines Gens oder Chromosomenabschnittes, konnte für VCFS/DGS die praktische Existenz beider Modelle nachgewiesen werden. (Baumer, et al., 1998)

Das Interessante an Modell I ist, dass neben den beschriebenen Deletionen in gleicher Häufigkeit auch Duplikationen auftreten müssten. Diese sind jedoch, vermutlich durch einen milderen bis unauffälligen Phänotyp, seltener beschrieben. (Shaikh, 2001) Edelman et al. (1999) beschreiben zum ersten Mal eine Familie, die eine solche interstitielle Duplikation zeigt. Vom phänotypischen Erscheinungsbild zeigte das 4- jährige Kind keine typischen Anzeichen eines VCFS/DGS, vor allem keine Herzanomalien, jedoch milde faziale Dysmorphien, velopharyngeale Insuffizienzen und Störungen der motorischen bzw. intellektuellen Entwicklung. Außer dem genannten Patienten wurde noch zwei weitere, verwandte Personen (Mutter, Großmutter) untersucht und bei allen dieselbe 3-Mb Duplikation festgestellt. Beim duplizierten Bereich handelt es sich um die 3-Mb TDR in VCFS/DGS, die zwischen LCR22-2 und LCR22-4 liegt. Es wurde hier die vorhergesagte Existenz des genetischen Pendantes zur Deletion, nämlich die 3- Mb Duplikation zwischen LCR22-2 und LCR22-4, mit milderer Erscheinungsform, bestätigt.



**Abbildung 4. Modell I und II zu NAHR- Ereignissen.** Schematische Modell- Darstellung der Ereignisse während der homologen Rekombination, die zu Deletionen bzw. Duplikationen innerhalb von 22q11.2 führen. An den Rearrangements sind die LCRs22 beteiligt, welche als grüne bzw. blaue Boxen dargestellt sind. A: inter- chromosomale Rekombination zwischen zwei homologen Chromosomen 22 führt zu einer Duplikation und reziproker Deletion. B: intra- chromosomale Rekombination zwischen LCRs22 führt zu einer Deletion bzw. einem deletierten Fragment, das während der NAHR verloren geht. (aus Shaikh et al. 2001)

Trotz der Tatsache, dass 22q11 Mikroduplikationen in gleichem Maße auftreten müssten wie die 22q11 Deletionen, wird in der Literatur weniger davon berichtet. Die erste systematische Suche nach 22q11.2 Mikroduplikationen wurde von Ensenauer et al. 2003 durchgeführt. Beim Screening von 653 Patienten mit VCFS/DGS Merkmalen wurden 10 (1.5%) nicht verwandte Patienten mit 22q11.2 Mikroduplikation identifiziert. Weitere Screenings mit unterschiedlichen Methoden (FISH, aCGH, MLPA) brachten in den untersuchten Patientengruppen eine Häufigkeit der Mikroduplikation von 0-2.3% als Ergebnis. (Portnoi, 2009). Die duplizierten Bereiche können in Größe und Lage innerhalb von 22q11.2 variieren und sind stets mit den LCRs22 assoziiert. Es wurden mikroduplizierte Bereiche zwischen 3-Mb und 6-Mb (Ensenauer, et al., 2003) beschrieben; in einem Fall eine 3-Mb Triplikation der TDR (Yobb, et al., 2005) Das bedeutet, ähnlich dem CES und dem *der(22)* Syndrom, kommen bei 22q11.2 Mikroduplikationen/Triplikationen chromosomale Abschnitte, und deren Gene, in erhöhter Dosis vor. Die Frage, inwiefern die erhöhte Gendosis eine klinische Rolle spielt, gilt es im Laufe noch tätiger Untersuchungen zu klären. Die klinischen Merkmale der 22q11 Mikroduplikationen sind vielfältig. Innerhalb der beschriebenen Patienten und deren Familien herrscht auch zwischen betroffenen Individuen eine große inter- und intrafamiliäre Variabilität. Im Übersichtsartikel von Portnoi (2009) sind 92 (47 nicht- verwandte) Patienten mit 22q11.2 Mikrodupliktionssyndrom beschrieben. Manche Träger der 22q11.2 Mikroduplikationen zeigen keine phänotypischen Merkmale, d.h. weder mentale, noch körperliche Einschränkungen oder Verhaltensauffälligkeiten. (Ensenauer et al., 2003; Yobb et al., 2005; De La Rochebrochard et al., 2006) Neben den Duplikationsträgern ohne phänotypischer Merkmale zählen bei den klinisch auffälligen Patienten Wachstumsstörungen (26.5%), faziale Dysmorphien (79.7%), velopharyngeale Insuffizienz (40.2%), Hörverlust (20%), kardiovaskuläre Anomalien (auch Ventrikel- Septum- Defekt) (15%), urogenitale Anomalien (19.4%), kognitive Auffälligkeiten bzw. Verhaltensauffälligkeiten (77.6%) und psychiatrische Störungen (13.6%) zum syndromalen Spektrum. (Portnoi, 2009) Ein phänotypisches Spektrum, das sich mit jenem von VCFS/DGS stark überschneidet, und eine klinische Unterscheidung der zum VCFS/DGS daher besonders schwer macht.

#### D. *Maligne Rhabdoid Tumore (MRT)*

Maligne Rhabdoid Tumore (MRT) sind seltene, hoch aggressive Neoplasien, die vorwiegend bei Neugeborenen und jungen Kindern gefunden werden. Hauptsächlich treten sie in den Nieren und dem zentralen Nervensystem (Gehirn und Rückenmark) auf. Auch von Rhabdoid Tumoren in Erwachsenen wurde berichtet, wobei diese jedoch nicht der klassischen Form im frühkindlichen Alter entsprechen. (Biegel, 2006) MRTs werden mit einer homozygoten Inaktivierung, sei es durch Mutationen oder Deletionen, des *SMARCB1*- Gens (synonym *INI1*, *hSNF5*, *BAF47*) in Verbindung gebracht. (Versteeg et al., 1998; Roberts & Biegel, 2009) Identifiziert wurde das Gen durch die Feststellung, dass bei cerebralen und renalen MRT gehäuft Monosomien 22 bzw. Mutationen und Deletionen auf Chromosom 22 auftreten. Durch spezielle Klonierungsstrategien wurde das *SMARCB1* - Gen als Tumor Suppressor Gen für MRT der Niere und weicher Gewebe identifiziert. Das *SMARCB1*- Gen liegt innerhalb Chromosomenbande 22q11.2 ca. 2.5-Mb telomerwärts der VCFS/DGS- TDR, flankiert von den LCR22-6 und LCR22-7, und kodiert für *eine* von 10 Untereinheiten des ATP- abhängigen Chromatin Remodellierungskomplex SWI/SNF. *SMARCB1* ist ein nicht varianter

Bestandteil aller SWI/SNF Komplexe und wird in allen Geweben in allen Stadien der Entwicklung exprimiert. In den Geweben hat das exprimierte Protein als Teil des SWI/SNF Komplexes eine transkriptionsregulierende Funktion. Die Funktion als Enhancer bzw. Repressor übt der SWI/SNF Komplex vor allem an Promotoren aus, die mit Genen des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Signaltransduktion assoziiert sind. Zumindest eine intakte Kopie von *SMARCB1* ist für eine normale Entwicklung notwendig. Sind beide Allele des Tumor Suppressor Gens durch Mutationen oder Deletionen inaktiviert, kann dies die Entwicklung von MRTs auslösen. (Klochendler-Yeivin et al., 2002; Roberts & Biegel, 2009) Neben den Mutation und Deletion, die in 70% der Fälle für einen Ausfall der *SMARCB1*- Allele sorgen, sind auch Fälle bekannt (20-25%) in denen eine reduzierte Expression auf RNA oder Protein- Ebene mit einem Funktionsverlust einher gehen. (Biegel, 2006; Jackson et al., 2007)

## II. Patientenbeschreibung

### A. Indexpatient

#### *Allgemeine Beschreibung*

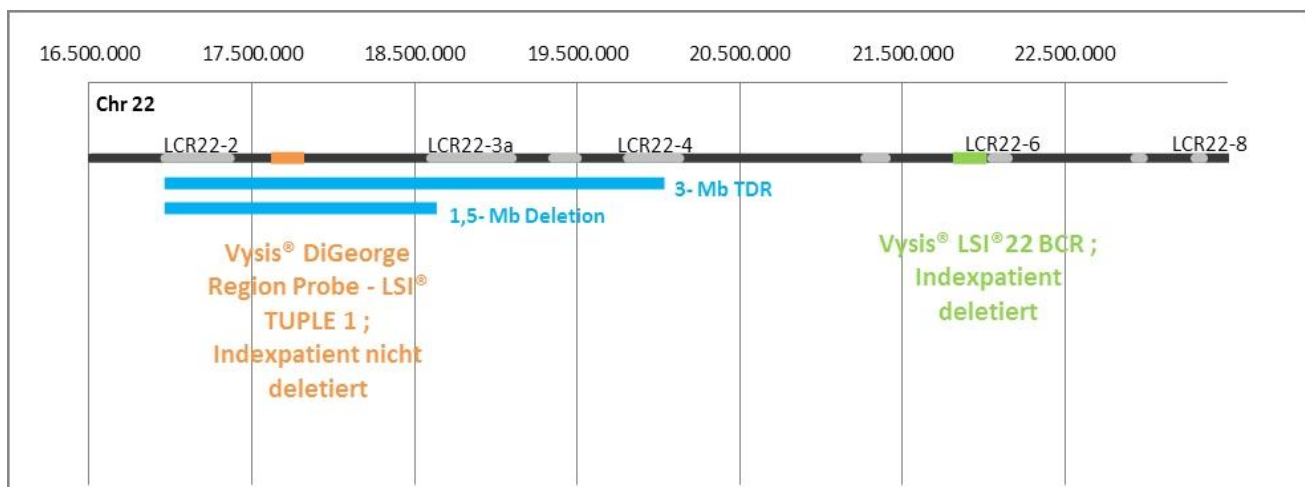
Bei dem männlichen Patienten handelt es sich um das zweite Kind einer 28-jährigen Schwangeren (Gravida 3 Para 2) und eines 30-jährigen Vaters. Nach der Geburt (25.6.2002) wurde ein Ohranhängsel auf der rechten Seite entfernt. Nach Durchführung eines Hörscreenings wurde eine hochgradige kongenitale Schwerhörigkeit festgestellt, die die Verwendung eines Hörgerätes notwendig machte. Ein hartnäckiger pulmonaler Infekt, und damit verbundene schlafbezogene Atmungsstörungen, sowie starker Husten führten zu einer stationären Aufnahme in der Marburger Kinderklinik im Dezember 2002. Der starke Husten und die Atemstörungen führten zu einer erschwerten Ernährung des Patienten. Bei der genaueren Untersuchung des Patienten wurden klinische Auffälligkeiten, die auf eine syndromale Erkrankung Hinweis gaben, festgestellt.

#### *Klinische Beschreibung*

Bei den multiplen Dysmorphiezeichen handelte es sich um eine Dextrokardie (Rechtsverlagerung des Herzens) sowie einem kleinen Ventrikel-Septum-Defekt (VSD). Weitere faziale Merkmale, wie mandelförmige Augen, Stupsnase, schmales Lippenrot, Ohrmuscheldysplasie, sowie eine Brachycephalie, wurden festgestellt. An den Händen zeigte sich eine Vierfingerfurche (rechts) und leicht gebogene Finger (Klinodaktylie) sowie eine Sandalenfurche an beiden Füßen. Im Rahmen der Untersuchung im Dezember 2002 wurden keine pathologischen Veränderungen der Oberbauchorgane (Milz, Niere) festgestellt. Im Alter von 9 Monaten entwickelte der Patient einen schnell wachsenden Nierentumor rechts (Stadium II+, regionärer pathologischer Lymphknoten zwischen Tumor und *Vena cava inferior*; jedoch ohne erkennbarer Infiltration der benachbarten Organsysteme) mit pulmonaler Metastasierung. Nach anfänglicher Größenregredienz des Tumors und des pathologischen Lymphknotens ca. 4 Wochen nach Beginn einer zytostatischen Therapie, verschlechterte sich der Zustand des Patienten weiter. In Folge dessen wurde eine Resektion des Nierentumors und der lokalen Lymphknotenmetastasen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die rechte Niere nahezu vollständig durch nekrotische Tumormassen von 7,5 x 6,5 x 6 cm Durchmesser infiltriert war. Histologisch fand sich ein hoch maligner Nierentumor. Durch die charakteristische Zytologie (bläschenförmige Zellkerne, prominente Nukleoli, deutliche Kernmembranen) und trotz des Fehlens rhabdoider Gewebsstrukturen wurde die Verdachtsdiagnose eines hoch malignen Rhabdoidtumors der Niere bestätigt. Nach ausgedehnter zytostatischer Therapie verstarb der Patient im Alter von 19 Monaten an den multiplen Tumormetastasen.

Basierend auf den klinischen Auffälligkeiten des Patienten, wurde eine Verdachtsdiagnose in Richtung des Formenkreises 22q11 Mikrodeletionssyndrom gestellt.

Die Voruntersuchungen fanden am Institut für klinische Genetik, Philipps- Universität, Marburg statt. Die cytogenetische Analyse von 20 Metaphasen aus Lymphozytenkulturen ergab einen numerisch und strukturell unauffälligen männlichen Karyotyp. Auf Grund des Syndromverdacht wurde jedoch, zum Ausschluss eines subtelomerischen Rearrangements, eine erweiterte FISH-Analyse durchgeführt. Diese ergab keinen Hinweis auf eine kryptische Veränderung der untersuchten Subtelomere. Dennoch zeigte sich an einem der Chromosomen 22 ein auffälliger Befund. Für die mit den Subtelomersonden gleichzeitig hybridisierte Sonde der Kontrollregion 22q11.2 (*BCR*-Locus) ließen sich auf einem der beiden Chromosomen 22 keine spezifischen Signale darstellen. Zur Kontrolle dieses Ergebnisses wurden weitere molekularcytogenetische Analysen mit der LSI *BCR*-Sonde sowie Sonden der Region D22S75 (*TUPLE1*-Gen) durchgeführt. Die *TUPLE1*-Sonde zeigte in der FISH- Analyse ein Signal, das im Falle eines ‚regulären‘ VCFS/DGS mit deletierter TDR hätte deletiert sein müssen. Allerdings fehlte bei einem zweiten FISH- Test mit der *BCR*- Sonde das entsprechende Signal. Dieser Locus liegt ca. 1.8 Mb telomerisch der TDR und ist in VCFS/DGS typischerweise nicht betroffen. Dass keine der häufigsten 22q11 Deletionen (3.0-Mb bzw. 1.5-Mb Deletion) vorliegt, wurde zu diesem Zeitpunkt klar und der Hinweis auf ein atypisches Rearrangement, d.h. einer eventuellen Deletion am Chromosom 22 waren beim Indexpatienten somit gegeben. Diese wurde im Rahmen der Diplomarbeit detailliert untersucht.



**Abbildung 5. Ergebnisse vorausgegangener FISH- Untersuchungen.** Die LSI *TUPLE1*-Sonde, die innerhalb der TDR liegt war nicht deletiert (oranger Balken). Außerdem war in einer zweiten Untersuchung die *BCR*- Sonde (grüner Balken) telomerisch der TDR deletiert. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei der Abberation des Indexpatienten um eine atypische Deletion ausserhalb des DiGeorge- kritischen Bereichs handelt. Die in 90% der Fälle deletierte TDR erstreckt sich von LCR22-2 bis LCR22-4 (blauer Balken); die kürzere 1.5- Mb Deletion erstreckt sich von LCR22-3a bis LCR22-D (blauer Balken).

Zur molekularcytogenetischen Untersuchung und Eingrenzung der interstitiellen Deletion auf Chromosom 22q11 lagen vom Patienten Heparin- Blut und fixierte Zellen vor. Außerdem wurde aus EDTA-Blut des Patienten DNA extrahiert und zur molekulargenetischen Untersuchung verwendet. Bereits extrahierte Tumor- DNA lag von der Universität Marburg vor.



## B. Familienanamnese

### *Klinische Beschreibung der Eltern und des älteren Bruders*

Die Eltern und der bei Geburt des Indexpatienten 6- jährige Bruder waren klinisch unauffällig und gesund. Aus der Stammbaumuntersuchung ergibt sich bei der Mutter des Indexpatienten eine familiäre Belastung durch Bluthochdruck und koronare Herzkrankheiten. Außerdem sind bei der Mutter väterlicherseits Sprachprobleme (bei einem 6- jährigen Sohn einer Cousine der Mutter), und mütterlicherseits Sehstörungen und Entwicklungsretardierungen (5- jähriger Cousin der Mutter) bekannt. Die familiäre Belastung des Vaters schließt zystische Nierenerkrankungen väterlicherseits (Verwandtschaftsgrad des oder der Betroffenen nicht bekannt), sowie unterschiedliche Entwicklungsstörungen mütterlicherseits ein (Cousine mit Hydrozephalus, beidseitige Polydaktylie bei der Großmutter, Ohranhängsel beim Sohn einer Cousine, sowie *Situs inversus* beim Cousin der Mutter). Der 6- jährige Bruder des Indexpatienten wurde wegen anfänglicher Sprachstörungen logopädisch behandelt.

### *Cytogenetische und molekulargenetische Voruntersuchungen*

An der Universität Marburg wurden cytogenetische Untersuchungen der Eltern und des 6- jährigen Bruders durchgeführt. Diese offenbarten bei den drei untersuchten Familienmitgliedern reguläre, numerisch und strukturell unauffällige, weibliche (46,XX) bzw. männliche (46,XY) Karyotypen. Die mittels FISH untersuchten Regionen (*TUPLE1*, *BCR*) ließen sich darstellen und zeigten molekulargenetisch keinen Hinweis auf eine interstitielle Deletion im Bereich 22q11.

Zur molekulargenetischen Untersuchung der Eltern lagen EDTA- Blut und Methanol- Eisessig fixierte Zellen vor.

# III. Methoden

## A. Cytogenetische Aufarbeitung des Patientenmaterials

### Prinzip

Für Untersuchungen an den menschlichen Chromosomen werden, wegen ihrer einfachen Zugänglichkeit, am häufigsten die Zellkerne von weißen Blutzellen verwendet. Lymphozyten (weiße Blutzellen) lassen sich in einem Wachstumsmedium durch Zugabe pflanzlicher Glykoproteine, z.B. Phytohämagglutinin, zur Zellteilung anregen. Bis zu 3 Tage werden die Lymphozyten im CO<sub>2</sub>-Inkubator (5% CO<sub>2</sub>) kultiviert, und vermehren sich dabei ausreichend. Durch die Zugabe von Colcemid werden die sich bis dahin noch immer teilenden Zellen im Zustand der Metaphase angehalten. Colcemid® ist ein synthetisches Analog zu Colchizin, ein Alkaloid der Herbstzeitlose, und bewirkt das Absterben der Spindelfasern. Dadurch wird das Auseinanderweichen der Schwester-Chromatiden verhindert und die Zellen werden in der Mitose - dh mit kondensierten Chromosomen - arretiert. Nach einer kurzen Einwirkzeit (1-1,5 h) werden im nächsten Arbeitsschritt die Zellen in ein hypotones Medium gebracht. Durch osmotische Kräfte strömt Wasser in die Zellen ein und setzt diese unter große Spannung. Danach werden die Zellen in diesem aufgeblähten Zustand fixiert. Als Fixativ in diesem Konservierungsprozess fungiert ein Gemisch aus Methanol und Eisessig (3:1) und hat zur Aufgabe die Chromosomenstruktur in ihrer momentanen Form zu erhalten. Die Fixierung der Zellen sollte zu Beginn des Austausches von hypertoner Lösung mit dem Fixativ langsam erfolgen, um ein Zerbrechen der Metaphasezellen zu vermeiden, denn der gesamte Chromosomensatz sollte ja nach Möglichkeit erhalten bleiben. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen die Zellen in einem gespannten (durch Osmose), konservierten (durch Fixierung) Zustand vor. Diese Suspension wird nun auf einen sauberen Objektträger aufgetropft. Durch diesen Prozess, in dem starke physikalische Kräfte auf die soweit präparierten Zellen wirken, gelingt es, die Chromosomen in ihrer gewünschten Form, nämlich maximal gespreitet, auf den Objektträger zu bringen. Um die Wirkung der physikalischen Kräfte auf die fixierten Zellen zu maximieren, somit die Spreitung der Chromosomen auf dem Objektträger zu optimieren, sollte das Auftropfen aus großer Höhe (ca. 30 cm), auf schräg gehaltenen Objektträger erfolgen. Im Lichtmikroskop kann man einen ersten Eindruck über Qualität und Quantität der Metaphasen gewinnen. Die Objektträger werden danach für die Hybridisierungsexperimente verwendet.

### Durchführung

#### Kulturansatz

- 0,5 ml Heparin- Blut mit 5 ml PB-MAX™ versetzen
- 15 ml Harre-Röhrchen locker verschließen und 72h bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>- Atmosphäre im Brutschrank inkubieren (täglich 2-3 mal aufschütteln)

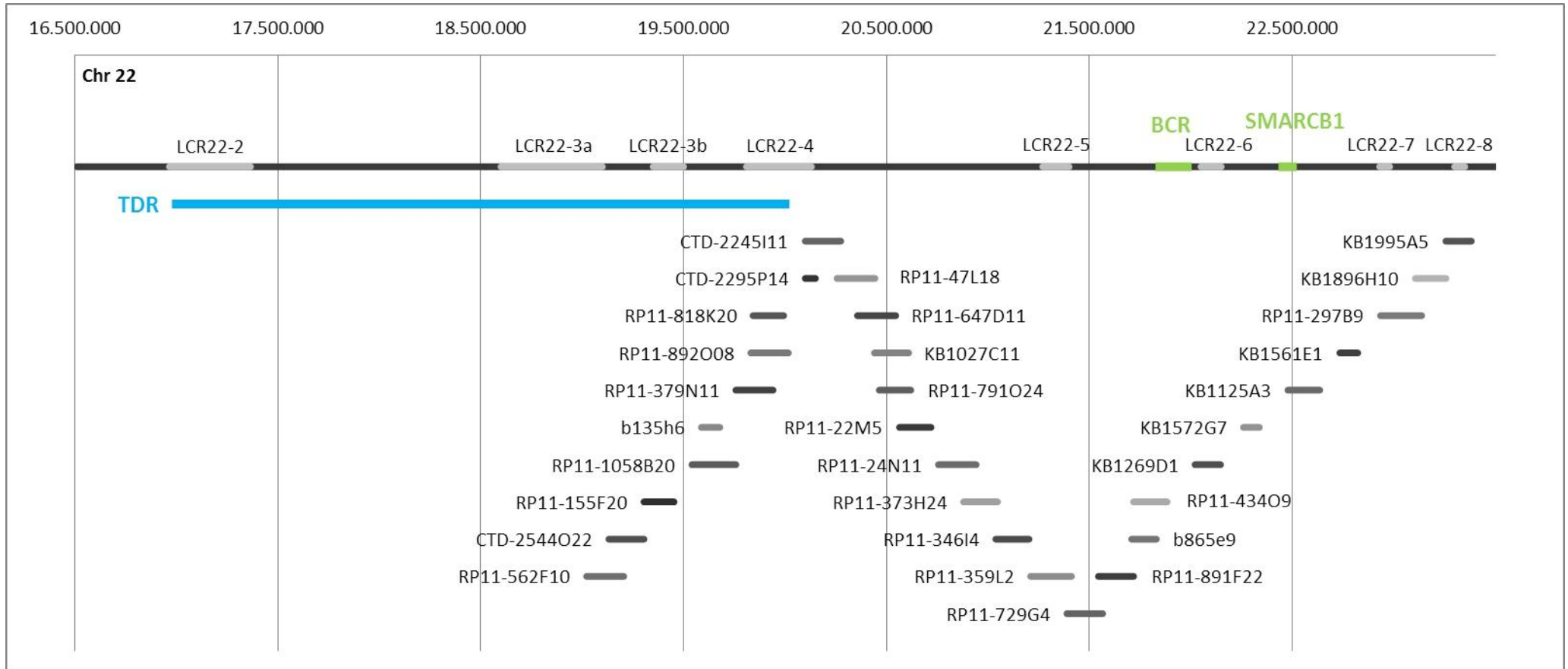
#### Aufarbeitung

- 100 µl Colcemid (10µg/ml) zugeben, mischen und 1 – 1.5 h bei 37°C (mit 5% CO<sub>2</sub>) inkubieren

- Nach abgelaufener Zeit, Kultur erneut mischen und in ein neues 15ml Harre- Röhrchen überführen
- 10 min bei 1000 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand bis auf 1 ml abnehmen und verwerfen
- Pellet durch Schütteln resuspendieren
- 10 ml 0,075 M KCl zügig zugeben und mit der Pasteurpipette kräftig mischen
- 40 min bei 37°C im Brutschrank (ohne CO<sub>2</sub>) inkubieren
- 10 min bei 1000 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand bis auf 1 ml abnehmen und verwerfen
- Pellet resuspendieren
- Erste Pasteurpipette (ca 5 ml) Fixativ (-20°C) sehr langsam zugeben, dann auf 10 ml auffüllen und kräftig mit der Pipette mischen
- 15 min bei 4°C
- 10 min bei 1000 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand bis auf 1 ml abnehmen und verwerfen
- Pellet resuspendieren
- Erneut 10 ml Fixativ (-20°C) auf einmal zugeben und mit der Pasteurpipette mischen
- 10 min bei 1000 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand bis auf 1 ml abnehmen und verwerfen
- Pellet resuspendieren
- Erneut 10 ml Fixativ auf einmal zugeben und mit der Pasteurpipette mischen
- 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Überstand bis auf 1 ml abnehmen und verwerfen
- Pellet resuspendieren
- Erneut 10 ml Fixativ zugeben und mit der Pasteurpipette mischen
- 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Überstand so weit wie möglich abnehmen
- Pellet mit Pipette resuspendieren und gegebenenfalls mit Fixativ verdünnen, um eine leicht milchige Trübung der Suspension zu erreichen
- Gekühlten Objektträger (4°C) aus dem kalten Wasser (ddH<sub>2</sub>O 4°C) nehmen und auf fusselfreiem Papier kräftig abschlagen, sofort 3 Tropfen der Suspension auftropfen
- Bei 42°C auf der Heizplatte trocknen
- Über Nacht bei 60°C altern
- Restliche Suspension im 15 ml Harre- Röhrchen bei -20°C lagern

## B. DNA- Sondenherstellung für Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Als Sonden für die FISH wurden BAC („Bacterial Artificial Chromosome“)- Klone verwendet. BACs sind künstliche Chromosomen, die aus dem single-copy F-Plasmid von *E. coli* entwickelt wurden. (O'Connor, et al. 1989) Sie enthalten bis zu 300-kb lange DNA- Abschnitte verschiedener Organismen, in diesem Fall *homo sapiens*, und befinden sich als Vektoren innerhalb von *E. coli* Bakterien. In der vorliegenden Untersuchung wurden 30 verschiedene BAC- Klone aus unterschiedlichen Bibliotheken verwendet. Klone mit dem Präfix ‚CTD-‘ stammen aus der *CalTech human BAC library D*, Klone mit dem Präfix ‚KB‘ von der *Keio University human BAC library* und Klone mit dem Präfix ‚RP11-‘ stammen aus der *RPCI human BAC library 11*. Klone mit dem Anfangsbuchstaben ‚b‘ kommen in mehreren Bibliotheken vor. Die vollständige Auflistung der verwendeten Klone folgt in Tabelle 1, die Lage der BAC- Klone am Chromosom 22 sind in Abbildung 6 dargestellt. Da es sich bei BAC-enthaltenden Bakterien um gentechnisch veränderte Organismen handelt sind alle Arbeiten unter Berücksichtigung des Gentechnikgesetzes (GTG) durchzuführen. Alle entstehenden Abfälle sind ohne Ausnahme vor der Entsorgung zu autoklavieren.



**Abbildung 6 Schematische Darstellung der Lage der BAC- Klone auf Chromosom 22.** Auf Chromosom 22 werden in grauen Balken die LCRs22 dargestellt. Der blaue Balken markiert die 3-Mb große Typically Deleted Region (TDR) bei VCFS/DGS. Die TDR reicht von LCR22-2 bis LCR22-4. Das BAC- Klon- Set deckt einen Bereich von ca. 4- Mb, von distalen Ende des LCR22-3a bis LCR22-8, ab. In Grün dargestellt werden die Gene BCR und SMARCB1.

**Tabelle 1 Übersicht der BAC- Klone die zur Kartierung der Deletion verwendet wurden.** Die letzte Spalte ‚Resistenz-Gen‘ gibt an mit welchem Antibiotikum der BAC- Klon selektiv gezüchtet wurde. Größenangaben und Lage der BAC- Klone Aus UCSC Genome Browser on Human July 2003 bzw. May 2004, sowie <http://mkweb.bcgsc.ca/bayarray/?view=clone%20libraries>

BAC Klon	Cytoband	bp START Position	bp ENDE Position	Länge (bp)	Resistenz	
1	RP11-562F10	22q11.21	19.022.375	19.204.954	182.580	Chloramphenicol 25 µg/ml
2	CTD-2544O22	22q11.21	19.132.152	19.304.852	172.701	Chloramphenicol 12,5 µg/ml
3	RP11-155F20	22q11.21	19.304.861	19.453.068	148.208	Chloramphenicol 25 µg/ml
4	RP11-1058B20	22q11.21	19.541.081	19.757.621	216.541	Chloramphenicol 25 µg/ml
5	b135h6 (AC002470)	22q11.21	19.587.769	19.678.560	90.792	Chloramphenicol 25 µg/ml
6	RP11-379N11	22q11.21	19.757.627	19.940.794	183.168	Chloramphenicol 25 µg/ml
7	RP11-892O08	22q11.21	19.831.348	20.016.535	185.188	Chloramphenicol 25 µg/ml
8	RP11-818K20	22q11.21	19.842.547	19.993.159	150.613	Chloramphenicol 25 µg/ml
9	CTD-2295P14	22q11.21	20.099.624	20.149.633	50.010	Chloramphenicol 12,5 µg/ml
10	CTD-2245I11	22q11.21	20.099.624	20.274.643	175.020	Chloramphenicol 12,5 µg/ml
11	RP11-47L18	22q11.21	20.256.349	20.442.904	186.555	Chloramphenicol 25 µg/ml
12	RP11-647D11	22q11.21-22q11.22	20.357.397	20.545.779	188.383	Chloramphenicol 25 µg/ml
13	KB1027C11	22q11.21-22q11.22	20.440.988	20.609.214	168.813	Chloramphenicol 25 µg/ml
14	RP11-791O24	22q11.21-22q11.22	20.464.869	20.619.784	154.916	Chloramphenicol 25 µg/ml
15	RP11-22M5	22q11.22	20.564.423	20.719.537	155.115	Chloramphenicol 25 µg/ml
16	RP11-24N11	22q11.22	20.756.141	20.941.659	185.519	Chloramphenicol 25 µg/ml
17	RP11-373H24	22q11.22	20.880.154	21.047.485	167.332	Chloramphenicol 25 µg/ml
18	RP11-346I4	22q11.22	21.039.150	21.202.147	162.998	Chloramphenicol 25 µg/ml
19	RP11-359L2	22q11.22	21.210.777	21.411.681	200.905	Chloramphenicol 25 µg/ml
20	RP11-729G4	22q11.22	21.389.433	21.565.251	175.819	Chloramphenicol 25 µg/ml
21	RP11-891F22	22q11.22	21.544.656	21.717.636	172.981	Chloramphenicol 25 µg/ml
22	b865e9 (AC000029)	22q11.22-22q11.23	21.708.487	21.830.046	121.560	Chloramphenicol 25 µg/ml
23	RP11-434O9	22q11.22-22q11.23	21.717.637	21.883.010	165.374	Chloramphenicol 25 µg/ml
24	KB1269D1	22q11.23	22.020.784	22.146.185	186.421	Chloramphenicol 25 µg/ml
25	KB1572G7	22q11.23	22.259.441	22.337.669	151.600	Chloramphenicol 25 µg/ml
26	KB1125A3	22q11.23	22.478.492	22.635.025	162.328	Chloramphenicol 25 µg/ml
27	KB1561E1	22q11.23	22.734.515	22.822.230	152.244	Chloramphenicol 25 µg/ml
28	RP11-297B9	22q11.23	22.935.054	23.137.648	202.595	Chloramphenicol 25 µg/ml
29	KB1896H10	22q11.23	23.106.750	23.257.221	173.785	Chloramphenicol 25 µg/ml
30	KB1995A5	22q11.23	23.257.222	23.382.275	163.795	Chloramphenicol 25 µg/ml

## C. *Reinigung von ‚Bacterial Artificial Chromosomes‘ (BACs)*

### Prinzip

Die Bakterienstämme mit enthaltener BAC- DNA werden in LB- Medium unter Zugabe von Antibiotikum (Chloramphenicol) selektiv angezüchtet, danach geerntet und unter alkalischen Bedingungen (NaOH-SDS) in Anwesenheit von RNase A lysiert. SDS lysiert die Zellmembran und der Zellinhalt wird freigesetzt. Im Lysat werden durch NaOH Proteine und gleichzeitig chromosomale sowie BAC-DNA denaturiert, die zugegebene RNase A spaltet freigesetzte RNA. Durch Zugabe von Kaliumacetat (pH 5,5) wird das Lysat neutralisiert und eine hohe Salzkonzentration führt dazu, dass denaturierte Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile in eine Salz- Detergenz-Matrix eingeschlossen werden und ausfallen. Im Gegensatz dazu renaturiert die kleinere BAC- DNA zu ihrer Ausgangsform und bleibt in Lösung. Die BAC- DNA wird danach mit Isopropanol gefällt, und erneut die eventuell noch vorhandene RNA mit RNase A abgebaut. Nach Ausfällen der RNase mit Ammoniumacetat wird die gereinigte BAC- DNA gefällt, gewaschen und in TE gelöst.

Die Konzentrationsabschätzung der BAC- DNA erfolgte auf einem 1%- Agarose- Gel. Dazu wurde ein bekanntes Volumen der DNA-Probe geladen und mit einem gleichzeitig aufgetragenen  $\lambda$ - DNA-Marker bekannter Konzentration (EcoRI/HindIII) verglichen. Lambda DNA welche mit EcoRI und HindIII verdaut wurde, besteht aus 13 Fragmenten von 564 bis 21226 bp Länge. Zusätzlich erkennt man auf einem 1%- Agarose- Gel noch eine 24756 bp Bande, die aus den hybridisierten (beide enthalten COS sites) Fragmenten 3530 bp und 21226 bp besteht. Das jeweilige molekulare Gewicht der Fragmente ist direkt proportional ihrer Länge. So kann durch Vergleich der Intensitäten von Probe (BAC- DNA) und den Intensitäten der aufgetrennten Banden ( $\lambda$ - DNA- Fragmente) die Konzentration der BAC- DNA geschätzt werden. Alternativ kann eine photometrische Messung bei 260 nm erfolgen. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g dsDNA/ml}$ .

### Durchführung

- BAC- Klone auf LB- Cam Platte ausstreichen (Cam- Konzentrationen siehe Tabelle 1)
- Platten ca. 16 h bei 37°C inkubieren
- 20 ml LB- Medium (+ 12.5 bzw 25  $\mu\text{g/ml}$  Cam; laut Tabelle 1) in einem sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben vorlegen und mit einer einzelnen Kolonie animpfen
- Kolben luftdurchlässig verschließen (z.B. mit Aluminiumfolie) und 16-18 h bei 300 rpm und 37°C anzüchten
- Nach abgelaufener Zeit weitere 30 ml Medium (mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Cam) und 20  $\mu\text{l}$  1M IPTG-Lösung zugeben
- 3-4 h bei 300 rpm und 37°C inkubieren
- Zellen in ein 50ml Oak Ridge High-Speed Polypropylen Zentrifugations-röhrchen (Nalgene) überführen und 20 min bei 6500 rpm und RT zentrifugieren

- Überstand möglichst vollständig abkippen (Rest mit einer Pipette absaugen) und (gemäß Gentechnik -Gesetz) autoklavieren
- Zellen vollständig in 4 ml Puffer I mit RNase (10 µg/ml Endkonzentration) durch vortexen resuspendieren
- 5 min bei RT stehen lassen
- 4 ml Puffer II zugeben und durch schüttelnde Bewegungen vorsichtig mischen
- Nach dem Mischen sofort 4 ml Puffer III (4°C) zugeben und vorsichtig mischen
- 20 min auf Eis stehen lassen, während dieser Zeit 2-3 mal mischen
- 30 min bei 13500 rpm abzentrifugieren
- Überstand in neues Oak Ridge High-Speed Polypropylen Zentrifugations- röhrcchen (Nalgene) kippen, ohne dass feste Teile mitgehen (dies kann mit einem dünnen Filterpapier vermieden werden)
- 0,7 Volumen (ca. 8,4 ml) Isopropanol zugeben und mischen
- 10 min auf -80°C stellen
- 15 min bei 13500 rpm und 4°C
- Überstand abnehmen und Pellet bei 37°C vollständig(!) trocknen, unvollständige Trocknung beeinflusst die BAC- Ausbeute negativ
- Pellet in 280 µl 0,2M Tris, 0,05M EDTA pH7,5 Lösung durch auf- und abpipettieren aufnehmen und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführen
- 30 µl RNase (10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O) zugeben
- 20 min bei 37°C inkubieren
- 75 µl Ammoniumacetat (10M) zugeben, mischen
- 10 min auf Eis stellen
- 5 min bei 13500 rpm abzentrifugieren
- Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
- 930 µl 96% Ethanol zugeben
- 10 min auf -80°C stellen
- 5 min bei 13500 rpm abzentrifugieren
- Waschen mit 70% Ethanol, abzentrifugieren wie im vorigen Schritt und anschließend trocknen bei 37°C
- Lösen des Pellets über Nacht in 100 µl 1x TE (nicht durch Gewalt lösen). Ist das Pellet über Nacht nicht zufriedenstellend gelöst auf 37°C bei 300rpm schütteln bis sich das Pellet löst
- DNA- Mengenschätzung auf 1% Agarose- Gel (1 µl DNA) oder Messung bei 260nm im Photometer



## D. Gel- Elektrophorese

### Prinzip

Zur Sichtbarmachung von DNA verwendet man Agarosegele, die mit Ethidiumbromid versetzt sind. Agarosegele wirken als Molekularsiebe durch welche Moleküle unter Anlegung eines elektrischen Feldes wandern. Moleküle unterschiedlicher Größe wandern durch die Gelmatrix mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und werden dadurch nach Größen getrennt. Negativ geladene Moleküle (z.B. DNA) wandern dabei in Richtung positive geladener Anode, positiv geladene Moleküle (z.B. Ethidiumbromid) wandern in Richtung negativ geladener Kathode. Nach Auftrennung der DNA- Fragmente im elektrischen Feld wird diese unter UV- Licht betrachtet. Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA- Struktur ist diese im UV- Licht sichtbar. Es ist unbedingt zu Beachten, dass Ethidiumbromid eine als ‚sehr giftig‘ eingestufte, mutagene und kanzerogene Substanz ist. Jeglicher Kontakt mit Ethidiumbromid ist zu vermeiden. Ein möglicher Schutz vor Haut- bzw. Schleimhautkontakt ist das Tragen von Nitrilhandschuhen(!) während der Arbeiten mit Ethidiumbromid, sowie die Verwendung eines Labor- Abzuges während des Gelgießens. Nach Zugabe von Ethidiumbromid die Dämpfe nicht mehr einatmen.

Der Trennbereich von Agarose- Gelen variiert mit der Agarose- Konzentration. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Trennbereiche.

Agarose- Konzentration [%]	Optimaler Trennbereich für lineare DNA- Fragmente [kb]
0,5	30 – 1
0,7	12 – 0,8
1,0	10 – 0,5
1,2	7 – 0,4
1,5	3 – 0,2
2,0	1 – 0,08

Tabelle 2. Agarose-Gel Konzentrationen und ihre Trennbereiche

### Durchführung Gelgießen

- Für 1 (2) % Agarosegel- Lösung 1 (2) g Agarose in 100 ml 0,5x TBE- Puffer im Mikrowellenherd unter mehrmaligem Schwenken kochen (4 min bei 650 W)
- Lösung bei Raumtemperatur unter Rühren auf ca. 60 °C abkühlen lassen
- 0,5 µl Ethidiumbromid (1%ig Lösung in H<sub>2</sub>O) pro 10 ml Agarosegel- Lösung zugeben
- Rühren, bis sich das Ethidiumbromid gleichmäßig verteilt hat und anschließend das Gel in die vom Hersteller vorhergesehenen Gelgießstände gießen (Gel- Kamm nicht vergessen!)
- Nach dem Festwerden des Gels den Kamm entfernen und Gel verwenden

## Durchführung Gellauf

- DNA Proben mit 6x Ladepuffer mischen (5 µl Probe mit 1 µl Ladepuffer)
- Agarose- Gel in 0,5x TBE-Laufpuffer legen, wobei das Gel vollständig mit TBE- Laufpuffer bedeckt sein muss und die Slots an der negativen Elektrode der Kammer liegen
- Proben in die Geltaschen laden
- 5 µl λ- DNA- Marker (EcoRI/HindIII) (100 ng/µl) laden
- 20 min bei 100 V elektrophoresieren
- Unter UV- Licht das Gel fotografieren und auswerten

### *E. Restriktionsverdau der BAC-DNA*

Um die Hybridisierung der BAC- DNA mit den DNA- Sequenzen der gespreiteten Metaphasechromosomen auf den Objektträgern zu erleichtern, wurden die BAC- DNAs vor der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen mit EcoRI verdaut. Beim Restriktionsverdau macht man sich die Eigenschaft von bakteriellen Enzymen (so genannten Restriktionsendonukleasen) zunutze, DNA an bestimmten Positionen schneiden zu können. Dadurch wird in dieser Anwendung die zirkuläre BAC- DNA linearisiert und eine Hybridisierung erleichtert.

## Durchführung

- 1 µg BAC- DNA auf 20 µl mit sterilem ddH<sub>2</sub>O verdünnen
- Ansatz Verdau:

20	µl	DNA (1µg)
10	µl	SuRE/Cut Buffer H
67	µl	steriles ddH <sub>2</sub> O
3	µl	EcoRI
<hr/>		
100	µl	Ansatz

- 2 h bis o/n (max. 16h) bei 37°C verdauen

Nach dem Verdau die BAC- DNA mit 2,5 Volumen 96% Ethanol und 0,1 Volumen Natriumacetat fällen, und in einem kleineren Volumen ddH<sub>2</sub>O wieder aufnehmen.

- Ansatz Fällung:

100 µl Ansatz (1µg BAC- DNA)

10 µl Natriumacetat 3 M

250 µl 96% Ethanol

- 30 min bei 13500 rpm und 4°C abzentrifugieren
- Pellet waschen mit 300 µl 70% Ethanol
- 5 min bei 13500 rpm abzentrifugieren
- Überstand mit Pipette möglichst vollständig abnehmen
- Pellet bei 37°C trocknen
- Pellet aufnehmen in 10 µl ddH<sub>2</sub>O (Endkonzentration 100 ng/µl)
- Zur Kontrolle der BAC- DNA- Konzentration 1 µl auf ein 1% Agarose- Gel auftragen und mit gleichzeitig geladenen 100 ng λ Hind/Eco Marker verglichen

#### F. DNA- Sonden- Markierung

Für die DNA- Markierung wurde der Nick Translation Kit der Firma Vysis entsprechend den Herstellerangaben verwendet. DNase I fügt der Doppelstrang- DNA (dsDNA) Einzelstrangbrüche zu, und entfernt durch ihre 5'→3' Exonuklease Aktivität mehrere Nukleotide aus einem Strang der dsDNA. Die entfernten Nukleotide werden durch Aktivität von *E.coli* DNA Polymerase I von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (dUTP, Spectrum Green bzw. Spectrum Orange) wieder ersetzt. Im Reaktions- Mix werden 50% des dTTP mit fluoreszenzmarkierten dUTPs substituiert, welche bei der Reaktion statt dTTP in die Sequenz eingebaut werden. Der Einbau von fluoreszenzmarkierten dUTPs im Endprodukt beträgt ungefähr 20% an dUTPs und liefert ein deutliches SONDENSIGNAL auf hybridisierten Metaphasechromosomen. Das Stoppen der Reaktion erfolgt durch Erhitzen auf 70°C, wodurch die Enzyme denaturiert werden. Zur Entfernung von überschüssigen, nicht eingebauten, fluoreszenzmarkierten Nukleotiden wird die abgestoppte Reaktion durch Zugabe von Ethanol und Natriumacetat gefällt, gewaschen und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Uninkorporierte dUTPs werden dabei entfernt. Gleichzeitig wurde in diesem Fällungsschritt zu den bereits markierten Sonden humane COT-1 DNA und gescherte, humane Plazenta- DNA zugegeben. Humane COT-1 DNA setzt sich aus 50 – 300 bp langen, stark mit repetitiven Elementen angereicherten DNA- Sequenzen zusammen. Humane Plazenta DNA besteht aus dem gesamten menschlichen Genom. Die extrahierte Plazenta DNA wird durch mechanisches Einwirken, z.B. durch Ultraschall, auf eine Länge von ca. 300 kb geschert. COT-1 DNA und mechanisch gescherte, humane Plazenta- DNA werden seit den Anfängen (Britten et al. 1974) molekularcytogenetischer Untersuchungen verwendet, um das Signal- Hintergrund- Verhältnis in FISH- Experimenten zu verbessern. Das menschliche, sowie andere eukaryotische Genome bestehen zum Einen aus einmaligen, ‚single copy‘ Sequenzen, und zum Anderen aus mittel- oder hochrepetitiven, ‚multi copy‘ Sequenzen. Möchte man einen spezifischen DNA- Abschnitt durch Hybridisierung nachweisen, enthält sowohl die nachzuweisende Sequenz, als auch die verwendete DNA- Sonde zwangsweise, je nach Länge, mehr oder weniger,

repetitive Abschnitte. Dies kann dazu führen, dass die markierten Sonden über das gesamte Genom verstreut Duplexe (Doppelstrang- Bildung zwischen Sonde und Ziel- DNA) bilden, und somit in der Auswertung unspezifische Signale liefert. Dadurch wird ein eindeutig interpretierbares Ergebnis unmöglich gemacht. Dem unspezifischen Hybridisieren von DNA- Sonden wirkt die Zugabe von COT-1 und gescherter, humaner Plazenta DNA entgegen. Kurze, repetitive DNA- Abschnitte von COT-1 DNA blockieren repetitive Elemente des gesamten Genoms. Gescherte, humane Plazenta DNA blockiert nicht nur repetitive Abschnitte sondern das gesamte Genom, worin auch die ‚Zielsequenzen‘ beinhaltet sind. In der Regel sind jedoch repetitive Elemente stärker betroffen als die Zielsequenzen, was die Verwendung von Plazenta- DNA dennoch gerechtfertigt. In der Blockierungs- Effizienz reicht humane Plazenta DNA nicht an COT-1 DNA heran. Nichtsdestotrotz sind in beiden Fällen repetitive DNA- Elemente des Gesamten Genoms blockiert, und damit unspezifische Signale weitgehend umgangen. (Trifonov, Vorobieva, & Rens, 2009)

Die BAC- Sonden werden zuerst an normalen Karyotypen (46,XX bzw. 46,XY) ausgetestet, um deren Funktionalität zu überprüfen und dadurch Patientenmaterial zu sparen. Sind die Signal/ Hintergrund- Verhältnisse nicht zufriedenstellend werden die Sonden mit humaner COT-1 und Plazenta DNA nachbearbeitet.

### Durchführung

- Markierungsansatz:

(17,5 - x) µl	nukleasefreies H <sub>2</sub> O (im Kit enthalten)
x µl	verdaute DNA (1 µg)
2,5 µl	0,2 mM Spectrum Green bzw. Spectrum Orange
5 µl	0,1 mM dTTP
10 µl	0,1 mM dNTP Mix
5 µl	10x Nick Translation Buffer
10 µl	Nick Translation Enzyme
<hr/>	
50 µl	

- Vortexen und kurz abzentrifugieren bei 13500 rpm
- 16 h bei 15°C (im Wasserbad)
- Reaktion stoppen durch 10 min bei 70°C im Wasserbad
- Lagern auf 4°C

### Ethanolfällung und Blockieren

- 50 µl Markierungsansatz vorlegen
- 10 µl humane COT-1 DNA 1 mg/ml, 4 µl gescherte humane Plazenta DNA 5 mg/ml und 36 µl ddH<sub>2</sub>O zugeben
- 0,1 Volumen (10 µl) 3 M NaAc und 2,5 Volumen (250 µl) 96% Ethanol zugeben

- Zum Ausfällen 15 min auf -20 °C stellen
- 15 min bei 13500 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand entfernen und Pellet mit 1ml 70% Ethanol waschen
- 5 min bei 13500 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand mit Pipette entfernen
- Pellet bei 37°C vollständig trocknen
- Resuspendieren in 3 µl ddH<sub>2</sub>O und 7 µl LSI/WCP Hybridization Buffer
- Lagern auf 4°C

### G. *Fluoreszenz in situ Hybridisierung*

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist eine Technik mit der man Chromosomen und Chromosomenabschnitte in hoher Auflösung darstellen kann. FISH- Untersuchungen können sowohl an Metaphasechromosomen als auch Interphasezellkernen durchgeführt werden, wobei die Auflösungsgrenze der FISH- Methode bei ca. 100 kb liegt. Für die meisten diagnostischen Anwendungen wird Methanol:Eisessig fixiertes Material verwendet. Zur Darstellung der interessanten genomischen Bereiche verwendet man bis zu 300 kb lange DNA- Sonden welche auf genomische Zielbereiche hybridisieren können. Die spezifische Bindung fluoreszenzmarkierter, einzelsträngiger DNA- Sonden an fixierte, chromosomale DNA werden mit Mikroskopen detektiert, die mit speziellen Filtern ausgestattet sind. Durch die Verwendung mehrerer unterschiedlicher Mikroskopfilter können mehrere DNA- Sonden gleichzeitig auf das Probenmaterial hybridisiert und ausgewertet werden. Die DNA- Sonden werden zu diesem Zweck mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, welche durch Anregung mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen (Filter) Licht verschiedener Wellenlängen emittieren. Der simultanen DNA- Hybridisierung sind dabei nur durch die Verfügbarkeit unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe Grenzen gesetzt. Im vorliegenden Fall wurden jeweils zwei DNA- Sonden unterschiedlich markiert und gleichzeitig auf das Patientenmaterial hybridisiert, d.h. aus den Einzelsonden wurden so genannte Sondenpaare zusammen gemischt. Die Verwendung von Sondenpaaren bringt wesentliche Vorteile gegenüber der Hybridisierung einer einzelnen DNA- Sonde. Werden zwei DNA- Sonden gleichzeitig hybridisiert kann man einerseits oft limitiertes Patientenmaterial effizienter nutzen und hat andererseits zu jeder hybridisierten DNA- Sonde gleichzeitig eine Kontrollsonde hybridisiert. Sind einzelne DNA- Sonden (z.B. *eine* von zwei DNA- Sonden eines Sondenpaares) auf dem untersuchten Material deletiert, liefert die Kontrollsonde ein Signal, welches in den untersuchten Bereichen hybridisiert und eine etwaige Deletion verifiziert. Die Signalmuster welche durch ein hybridisiertes Sondenpaar entstehen können sind im folgenden besprochen. Zuerst wenden wir uns den potentiellen Mustern *einer* hybridisierten Sonde zu. Metaphasechromosomen sind maximal verkürzte, verdoppelte Chromosomen die an der Äquatorialebene ausgerichtet sind. Jedes Chromosom besteht aus jeweils zwei Chromatiden, d.h. das genetische Material ist in 4- facher Ausführung vorhanden. In der FISH- Auswertung von *einer* hybridisierten Sonde ergibt das ein Signalmuster, das *zwei unmittelbar nebeneinander liegende, punktförmige Signale pro Chromosom* zeigt. Zwei FISH- Signale auf beiden homologen Chromosomen liefern also vier punktförmige Signale, wobei jeweils zwei Signale knapp

nebeneinander auf einem untersuchten Chromosom liegen. Bei der Untersuchung einer unbekanntes Deletion werden aus oben genannten Gründen jeweils zwei DNA- Sonden gleichzeitig hybridisiert. Das bedeutet, dass bei Verwendung von zwei Fluoreszenzfarbstoffen (im diesem Fall Spectrum Green bzw. Spectrum Orange, Firma Vysis) folgende FISH- Signalmuster entstehen können. Beide DNA- Sonden hybridisieren auf beiden Chromosomen, d.h. sie sind auf dem untersuchten Material nicht deletiert und ergeben somit vier FISH- Signale (2 Orange/2 Grün). Oder, die beiden DNA- Sonden hybridisieren wegen einer vorhandenen Deletion lediglich auf einem der beiden homologen Chromosomen, d.h. es fehlt jeweils das FISH- Signal auf einem Chromosom (1 Orange/ 1 Grün). Kombiniert man eine DNA- Sonde die deletiert, und eine DNA- Sonde die auf dem untersuchten Patientenmaterial nicht deletiert ist erhält man das FISH- Signalmuster 2 Orange/1 Grün bzw. 1 Orange/ 2 Grün, je nach Sondenmarkierung. In der vorliegenden Untersuchung wurden die DNA- Sonden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Spectrum Green bzw. Spectrum Orange der Firma Vysis markiert, welche ein grünes bzw. oranges Signal in der FISH- Auswertung liefern. Liegen beide FISH- Signale sehr knapp nebeneinander kann dies unter dem Mikroskop den Anschein erwecken, dass die Signale fast übereinander liegen. Dies erkennt man daran, dass das FISH- Signal als *ein* Signal erscheint und sich die farbliche Erscheinung von Orange und Grün in ein gemeinsames Gelb verlagert. Neben den speziellen DNA- Abschnitten, die mit den DNA- Sonden identifiziert werden, werden die Chromosomen selbst mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI angefärbt. DAPI bindet stark an DNA und färbt sowohl lebende, als auch tote Zellen indem es bis zur DNA in den Zellkern eindringt und bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Absorptionsmaximum bei 358 nm), Licht einer bestimmten Wellenlänge (Emissionsmaximum bei 461 nm an DNA gebunden) emittiert. Daher sind für alle Arbeiten mit DAPI Handschuhe empfohlen, da DAPI mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in den Zellen des Experimentators/der Experimentatorin mutagene Eigenschaften entfalten kann. (Murken, Grimm, & Holinski-Feder, 2006)

## Durchführung

### Prä- Hybridisierungsschritte:

Achtung: Zwischen den einzelnen Schritten der *FISH* dürfen die Objektträger unter keinen Umständen austrocknen. Daher die einzelnen Schritte möglichst zügig durchführen. Der Inhalt einer Glasküvette beträgt 70 ml.

- Glasküvette mit 2x SSC in einem Wasserbad auf 70 °C (die Temperatur des 2x SSC direkt in der Küvette messen) vorwärmen
- Objektträger 30 min bei 70°C in 2x SSC inkubieren (Wasserbad)
- Glasküvette aus dem Wasserbad nehmen und 30 min abkühlen lassen (auf ca. 37°C)
- Objektträger für 1 min in 0,1x SSC stellen
- Denaturieren der Metaphasen auf dem Objektträger in 0,07N NaOH für 1 min bei RT. Dieser Schritt ist entscheidend für qualitativ hochwertige Hybridisierungsergebnisse, die 1 min Denaturierung ist in jedem Fall genau einzuhalten

- Objektträger für 1 min in 0,1x SSC bei 0°C (Küvette in Eis) stellen
- Objektträger für 1 min in 2x SSC bei 0°C (Küvette in Eis) stellen
- Dehydrieren des Objektträgers in 30%, 50%, 70%, 96% Ethanol je 1 min
- Objektträger lufttrocknen lassen und auf eine 37°C Wärmeplatte legen

#### Sondenvorbereitung und Hybridisierung:

Für einen optimalen Zeitablauf sollte die Sondenbearbeitung 5 min nachdem die Glasküvette mit den Objektträgern aus dem 70°C Wasserbad genommen wurde gestartet werden. Pro Hybridisierung werden 10 µl für ein 22x22 mm<sup>2</sup> Deckglas verwendet, d.h. 5 + 5 µl pro hybridisiertes Sondenpaar. Auf einem Objektträger können, je nach Größe der verwendeten Deckgläser auch mehrere Sondenpaare nebeneinander hybridisiert werden.

- 10 µl Sonde (5 µl SpG markierter BAC + 5 µl SpO markierter BAC) in LSI/WCP Hybridization Buffer : H<sub>2</sub>O (7:3)
- 5 min bei 75°C denaturieren
- Kurz auf Eis stellen und abzentrifugieren
- 15 min bei 37°C inkubieren
- Falls die Sondenvorbereitung und die Prähybridisierungsschritte nicht gleichzeitig abgeschlossen sind, kann der Sondenmix bis zur Verwendung auf Eis stehen gelassen werden. Bessere Hybridisierungsergebnisse werden jedoch erreicht, wenn die parallel laufenden Arbeitsschritte, Sondenvorbereitung und Prähybridisierungsschritte gleichzeitig abgeschlossen werden und der Sondenmix direkt nach dem 37°C Inkubationsschritt auf den auf 37°C vorgewärmten Objektträger pipettiert werden
- 10 µl Sondenmix vorsichtig auf den getrockneten, auf 37°C vorgewärmten Objektträger (noch immer auf der Wärmeplatte befindlich) pipettieren, allfällige Luftblasen mit der Ecke des Deckglases anstechen und so zum Platzen bringen
- Deckglas luftblasenfrei auflegen und mit Klebstoff (Fixogum, Marabu) versiegeln (werden mehrere Sondenpaare auf einen Objektträger hybridisiert, wird das erste Sondenpaar aufpipettiert und das Deckglas aufgelegt, erst danach wird das nächste Sondenpaar aufpipettiert und wiederum das Deckglas aufgelegt usw. Erst wenn alle Deckgläser auf dem Objektträger liegen, werden diese mit Fixogum versiegelt.
- 12-16 h in einer Inkubationskammer für Objektträger bei 37°C inkubieren. Die Inkubationskammer wird mit befeuchteten Zellstoff ausgelegt. Die Objektträger sollten dabei nicht direkt mit dem Zellstoff in Berührung sein. Für die Inkubation über Nacht wird die Inkubationskammer mit einem Deckel verschlossen.

#### Post- Hybridisierungsschritte:

Das Wasserbad auf 70°C vorheizen und 2 Küvetten mit 2x SSC auf 70°C vorwärmen. Ausserdem 1 Küvette mit 1x PBD bei RT, sowie ein Küvette mit 1x PBS bei RT vorbereiten. Beim Auswaschen der

erhitzten Küvetten ist darauf zu achten, dass diese keinen raschen Temperaturänderungen ausgesetzt sind. Eine abrupte Temperaturänderung kann zu Sprüngen des Glasmaterials führen. Die Temperaturen des 2x SSC sind auch hier wieder direkt in der Küvette zu messen. Das Thermometer daher unbedingt vorher gründlich reinigen.

- Deckglas samt Klebstoff vorsichtig und gründlich entfernen, dazu den Klebstoff mit Pinzette entfernen und das Deckglas zur Seite schieben
- Objektträger 2 x 5 min 2x SSC bei 70°C waschen
- Objektträger 5 min in 1x PBD bei RT waschen
- Anschließend 100 µl DAPI- Lösung auf den Objektträger pipettieren und mit 24x60 mm<sup>2</sup> Deckglas bedecken
- 30 sek in Dunkelheit inkubieren
- Deckglas entfernen und Objektträger 2 min in 1x PBS waschen
- Objektträger heraus nehmen, die anhaftende Flüssigkeit an einem Papiertuch abtupfen und Objektträger an der Luft trocknen (bei Tageslicht) lassen
- 50 µl Vectrashield® auf Objektträger pipettieren und mit 24x60 mm Deckglas eindeckeln
- Lagerung im Dunkeln auf 4°C
- Auswertung erst ca. 2 h nach Beendigung der Durchführung starten, um die Intensität der DAPI- Färbung abklingen zu lassen. Die Unterseite des Objektträgers wird mit 70% Ethanol vor der Auswertung gereinigt.

Sind nach der zuerst durchzuführenden Kontrollhybridisierung an Metaphasen gesunder Probanden die Signal/ Hintergrundverhältnisse der markierten BAC- Klone nicht zufrieden stellend, kann durch Zugabe von Humane COT-1 und Plazenta DNA in LSI/WCP Hybridization Buffer:H<sub>2</sub>O (7:3) dieses Verhältnis verbessert werden. Dazu werden dem Sondenmix (10 µl) 0,1 Volumen (1 µl) Humane COT-1 und Plazenta DNA in LSI/WCP Hybridization Buffer:H<sub>2</sub>O (7:3) zugefügt. Ist diese Menge nicht ausreichend um ein verwertbares Signal/ Hintergrund- Verhältnis zu erzielen, kann eine weitere Zugabe von Humane COT-1 und Plazenta DNA in LSI/WCP Hybridization Buffer:H<sub>2</sub>O (7:3) im selben Ausmaß (0,1 Volumen) erfolgen, bis man zufrieden stellende Ergebnisse erhält.

#### *H. DNA- Isolierung aus Vollblut (nach Miller, S.A.)*

Bei der Isolierung von DNA aus peripherem Blut werden zuerst die Erythrozyten selektiv, durch Behandlung mit Lysispuffer und den darin enthaltenen Ionen, osmotisch zum Platzen gebracht. Die kernhaltigen Leukozyten werden gleichzeitig geschont. Nach der vollständigen Lyse der Erythrozyten werden die DNA- hältigen Leukozyten durch Zentrifugation angereichert und anschließend mit Kernlysispuffer sowie Proteinase K über Nacht bei 56 °C inkubiert. Dabei wird der Kerninhalt samt DNA freigesetzt und der ebenfalls frei werdende Proteinanteil der Probe enzymatisch verdaut. Anschließend wird der Proteinanteil der Probe mit NaCl selektiv ausgefällt und durch Zentrifugation abgeschieden. Die in Lösung befindliche DNA wird mittels Ethanol gefällt und kann für Untersuchungen verwendet werden. Die Lagerung von DNA-Proben erfolgt bei 4°C



## Durchführung

### Tag 1

- 10 ml EDTA- Vollblut in 50 ml Zentrifugenröhrchen schütten
- drei- bis vierfache Menge 1x Ery- Lysispuffer (eiskalt) zugeben
- Auf Eis bis zum Verschwinden der Trübung schwenken (15 bis 30 min)
- 10 min bei 4°C und 1500 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet mit 1x Lysispuffer waschen (kräftig schütteln)
- 10 min bei 4°C und 1500 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 3 ml Puffer A lösen
- 60 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugeben
- 150 µl 10% SDS zugeben
- Zentrifugenröhrchen fest verschließen und über Nacht bei 56°C im Wasserbad inkubieren

### Tag 2

- 2 ml 6 M (gesättigt) NaCl- Lösung zugeben und 15 sek vortexen
- 15 min bei 10000 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand in ein neues 15 ml Harre- Röhrchen überführen, Pellet verwerfen
- In das 15 ml Harre- Röhrchen 2 Volumen (10 ml) gekühlten 96% Ethanol (-20°C) zugeben
- Vorsichtig schwenken, bis sich ein DNA- Faden bildet
- Den DNA- Faden mit einem Glashaken herausfischen und 3 x in 1 ml 96% Ethanol/TE (8:2) waschen. Dazu je 1 ml 96% Ethanol/TE (8:2) in drei Stück 1,5 ml Eppendorfgefäßen vorlegen und den DNA Faden am Haken nach jeweils 1 min in ein neues Eppendorfgefäß transferieren
- Danach die DNA auf dem Glashaken trocknen (3 – 5 min)
- DNA- Faden in 1x TE durch schraubende Bewegungen vom Haken ablösen und DNA über Nacht lösen
- Lagerung bei 4°C

#### *I. PCR („polymerase chain reaction“) aus genomischer DNA*

Zum Nachweis der Mutation im INI1- Tumorsuppressor- Gen wurde eine PCR der am häufigsten mutierten Exons durchgeführt. Zur Amplifikation wurde die *Taq* DNA Polymerase (invitrogen™) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Primerpaare für die untersuchten Exons sind weiter unten angeführt. Als Templates für die PCR dienten (I) genomische DNA der Eltern des Indexpatienten, (II) genomische DNA des Indexpatienten, sowie (III) extrahierte, genomische DNA aus dem renalen Rhabdoid Tumor des Patienten.

## Primer

Die Primersequenzen wurden aus einer Arbeit von Grand et al. (1999) entnommen. Die Primer wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Konzentration der Primerstammlösungen beträgt 100 µM. Die Arbeitsverdünnungen der Primer haben eine Konzentration von 10 µM.

Exon 2 fwd 5'-GCTTGATGCAGTCTGCGCCA-3'

Exon 2 rev 5'-GCGAGTGGTTTTGAAACAGG-3'

Exon 4 fwd 5'-TCCCTGGAGCATTAGTTGAT-3'

Exon 4 rev 5'-TAAGGCGGAATCAGCACGGA-3'

Exon 5 fwd 5'-GTGCAGAGAGAGAGGCTGAA-3'

Exon 5 rev 5'-AGGCCAGCCAAGCCCGACT-3'

Exon 6 fwd 5'-TGCCCAAGCATGGTGCAATC-3'

Exon 6 rev 5'-AAGGCTCCAGTGCTGGGTGA-3'

Exon 7 fwd 5'-CCTGGGCTGCAAAAGCTCTA-3'

Exon 7 rev 5'-GGAGGGAGAGACTCATGCAT-3'

## **Durchführung**

- **PCR- Ansatz**

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x PCR Puffer minus Mg	2,5 µl	1x
10 mM dNTP	2 µl	0,2 mM pro dNTP
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75 µl	1,5 mM
Primer Mix (je 10 µM)	1,25 µl	0,5 mM
Template DNA (100 ng/µl)	1 µl	
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl	0.25 U
ddH <sub>2</sub> O	auf 25 µl	

- **Templates** je 1 µl

- I. Vater des Indexpatienten
- II. Mutter des Indexpatienten
- III. Indexpatient
- IV. Tumor DNA

- **PCR- Programm**

96°C	5 min	}	35 x
95°C	20 sek		
60°C	20 sek		
72°C	30 sek		
72°C	5 min		
4°C	∞		

Nach der Amplifikation wurde jeweils 5 µl PCR- Produkt mit 1 µl 6x Ladepuffer vermischt, und auf ein 2%- Agarose- Gel (siehe Kapitel III.D) aufgetragen. Zur Abschätzung der richtigen Länge der Amplikons wurden zusätzlich 5 µl eines 100 bp- DNA- Größenmarker (invitrogen™) geladen.

#### *J.      Aufreinigung der PCR- Produkte*

Die Aufreinigung der PCR- Produkte vor der Sequenzierung ist notwendig, um überschüssige Primer und nicht inkorporierte Nukleotide aus dem PCR- Ansatz zu eliminieren. Ansonsten würde, in Anwesenheit von zwei unterschiedlichen Primern, das PCR- Produkt sowohl in 5'→3', als auch in 3'→5' Richtung sequenziert, was im Endeffekt zu einer Überlagerung der beiden Sequenzen führen würde. Die Sequenz- Auswertung wird dadurch unmöglich. Mittels Zugabe von ExoSAP-IT® (usb, Products from Affimetrix) unter Beachtung der Herstellerangaben werden daher vor dem Sequenzieren die nicht verbrauchten PCR- Primer aus dem PCR- Ansatz entfernt.

#### **Durchführung**

- 5 µl PCR- Produkt
- 2 µl ExoSAP-IT®
- 15 min bei 37°C inkubieren
- 15 min bei 80°C behandeln zur Inaktivierung von ExoSAP-IT®

#### *K.      Sequenzierung der PCR- Produkte*

Die Sequenzierung der PCR- Produkte erfolgte mittels BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (AB Applied Biosystems) nach Herstellerangaben. Das Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit funktioniert nach dem Prinzip der Kettenabbruch- Synthese (nach Sanger). Diese Methode basiert auf dem Einbau von Nukleotidderivaten, die zum Abbruch einer Polymerasereaktion führen. Der Reaktionsansatz bei der Sequenzierung enthält neben einer Polymerase, einem Primer und den dNTPs auch ddNTPs (Didesoxyribonukleosidtriphosphate, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Wird bei

der Polymerasereaktion an einer Position anstelle eines dNTPs ein ddNTP eingebaut, kann die Polymerasereaktion dort nicht mehr fortgesetzt werden und die Reaktion bricht ab. Somit resultiert aus der Sequenzierreaktion eine Kollektion von unterschiedlich langen Fragmenten, mit ansteigender Länge im *ein*- basen Intervall. Um die einzelnen Fragmente detektierbar zu machen, sind die vier verwendeten Nukleotide mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Fragmente werden in Kapillaren auf eine Trägermatrix (POP-7™ Polymer, AB Applied Biosystems) aufgetragen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes, ihren Längen entsprechend, elektrophoretisch aufgetrennt. Am Ende ihrer Wanderung durch die Trägermatrix werden die eingebauten fluoreszenzmarkierten Nukleotide von geeigneten Laserstrahlen angeregt und die entsprechenden Emissionen aufgezeichnet. Somit erhält man für jedes Fragment ein eindeutiges Signal und somit die Art des letzten eingebauten Nukleotids in der Sequenz. Die Art des Nukleotides und die jeweilige Länge eines Fragments sind eindeutig zuordenbar und ergeben damit die komplette Nukleotidsequenz eines untersuchten DNA- Abschnittes. Überschüssige ddNTPs und andere Bestandteile des Reaktionsmixes werden nach Beendigung der Sequenzierreaktion durch eine Ethanol/NaAc- Fällung entfernt.

Als Sequenzierprimer wurden die PCR- Primer verwendet (siehe PCR aus genomischer DNA). Pro Reaktionsansatz darf nur ein Primer, entweder vorwärts (5'→3') oder reverse (3'→5'), verwendet werden. (siehe III.J)

## Durchführung

- Sequenzieransatz

10 - x	µl	nukleasefreies H <sub>2</sub> O
x	µl	PCR- Produkt (10-40 ng)
1	µl	Sequenzierprimer
1	µl	BigDye® Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer
1	µl	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction(RR)- Mix (im Kit enthalten)

- Sequenzierprogramm

93°C	4 min	} 25 x
92°C	12 sek	
55°C	5 sek	
60°C	2 min 15 sek	
15°C	1 min	
4°C	∞	

- Die Sequenzierreaktionen in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführen
- 40 µl Fällungsmix zugeben

- 10 min auf Eis (im Dunkeln, zur Schonung inkorporierter Fluoreszenzfarbstoffe)
- 20 min bei 13500rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 150 µl 70% Ethanol zugeben
- 5 min bei 13500 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand mit Pipette abnehmen und Pellet bei 98 °C 1 min trocknen
- 10 µl Hi-Di™ Formamide (AB Applied Biosystems) zugeben
- 5 min bei 95°C denaturieren
- 2 min auf Eis stellen
- Proben in eine 96- well Sequenzierplatte pipettieren und in den Kapillarsequencer stellen

Die Sequenzierung erfolgte auf einem 3130xl Genetic Analyser, AB Applied Biosystems, 16- Kapillar-Sequencer.

## IV. Resultate

### A. Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Material des Indexpatienten

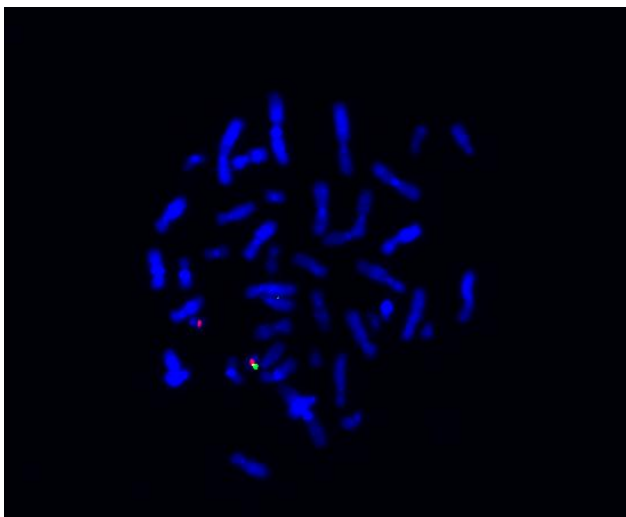
Für die Untersuchung der betroffenen Chromosomenbande 22q11 wurden 30 verschiedene BAC-Klone verwendet. Die bereits vor Beginn dieser Arbeit im Rahmen der Routinediagnostik in Marburg erhobenen molekularzytogenetischen Daten dienten als Basis für die Auswahl der Klone. Das BAC-Klon-Set deckt einen 4,356 Mb langen Bereich (19,022 Mb – 23,257 Mb) ab. Die einzelnen Klone überlappten teilweise.

Um das nur in limitierter Menge vorhandene Patientenmaterial möglichst effizient einzusetzen, wurden die mit SpG bzw. SpO markierten BAC-Sonden vor Verwendung an gesunden Probanden ausgetestet und nach Bedarf mit humaner COT-1 und humaner PlacentaDNA nachbearbeitet (siehe Kapitel III.G). Die Zusammenstellung der einzelnen, markierten BAC-Sonden in Sondenpaare erfolgte unter Berücksichtigung der jeweils vorangegangenen Teilergebnisse. Trotz des Anspruches, die Deletion möglichst effizient einzugrenzen, wurden in den anfänglichen Hybridisierungen Klonpaare zufällig gewählt. Danach erfolgte die Eingrenzung systematisch, erst in der telomerwärts dann in der centromerwärts liegenden Bruchpunktregion. Einzelne, gut funktionierende BAC-Klone (CTD-2544O22, RP11-1058B20, KB1027C11, KB1125A3) wurden in späteren Hybridisierungen häufig als Hybridisierungspartner (Kontrollklon) eingesetzt. Pro hybridisiertem Sondenpaar wurden mindestens 20 Metaphasen ausgewertet. In einzelnen Fällen ließ die Qualität der aufgetropften Metaphasechromosomen ein Probensample dieser Größe nicht zu, wodurch die Auswertung auf die maximal verfügbare Anzahl an Metaphasen beschränkt war. Es wurden stets mindestens 10 Metaphasen ausgewertet. War dies nicht möglich wurde die Hybridisierung wiederholt. Die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt von centromerisch nach telomerisch.

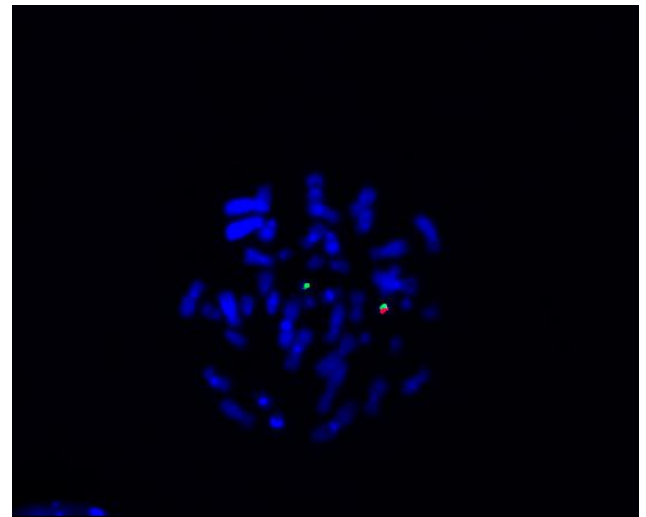
Der erste deletierte BAC-Klon ist CTD-2245I11 (20.099.624 – 20.274.643) und liegt am distalen Ende von LCR22-4. Der letzte deletierte BAC-Klon ist KB1561E1 (22.734.515 – 22.822.230) und liegt innerhalb LCR22-7. Bei der Deletion handelt es sich demnach um einen ca. 2.8-Mb großen Bereich. Von der Deletion betroffen sind sowohl das *BCR*- als auch das *SMARCB1*-Gen. Die 2.8-Mb Deletion liegt telomärwärts der TDR in VCFS/DGS. Die proximale Bruchpunktregion vorliegender Deletion fällt mit der distalen Bruchpunktregion der TDR in LCR22-4 zusammen.

Insgesamt wurden 1044 Metaphasen ausgewertet, davon 529 Metaphasen im deletierten Bereich und 515 Metaphasen im nicht deletierten Bereich. Von den 529 ausgewerteten Metaphasen des deletierten Bereiches waren in 457 (86,4%) Metaphasen die jeweils hybridisierten BAC-Klone deletiert. 48 (9,1%) der Metaphasen waren nicht auswertbar. In 24 (4,5%) Metaphasen waren die getesteten Klone im deletierten Bereich nicht deletiert, was einer genaueren Erläuterung bedarf. Speziell die innerhalb der 2.8-Mb Deletion liegenden BAC-Klone CTD-2295P14 (20.099.624 – 20.149.633) und RP11-359L2 (21.210.777 – 21.411.681) zeigen in ihren individuellen

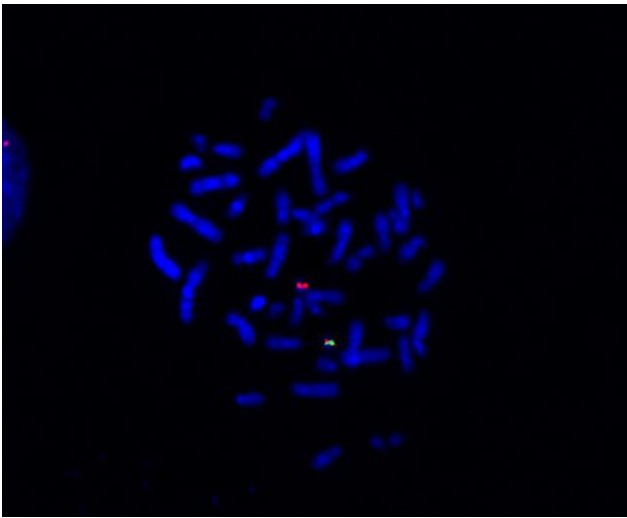
Hybridisierungsergebnissen ein ambivalentes Muster. Sie stechen aus jenen schlüssigen Ergebnissen heraus, die eine durchgängige 2,8- Mb Deletion bedeuten würden und gäben Hinweis auf eine unterbrochene Deletion im fraglichen Bereich. CTD-2295P14 war in 19 Metaphasen (76%) nicht deletiert, in 6 Metaphasen (24%) deletiert. Die Sequenz dieses 50,01 kb langen BAC- Klons ist partiell deckungsgleich mit dem ersten deletierten BAC- Klon CTD-2245I11. CTD-2245I11 war in 21 von 21 Metaphasen (100%) deletiert. Das bedeutet, trotz partieller Deckungsgleichheit zeigen diese beiden BAC- Klone unterschiedliche Ergebnisse. Ein Erklärungsversuch für diese Ambivalenz ist, dass der wesentlich kürzere BAC- Klon CTD-2295P14 (50,01 kb), der zur Gänze innerhalb von LCR22-4 liegt, durch Hybridisierung an homologe Sequenzen innerhalb anderer LCRs22 ‚falsch positive‘ Ergebnisse liefert. Der erste deletierte BAC- Klon CTD-2245I11 hingegen überragt LCR22-4 um ca. 125 kb und liegt somit zum Großteil ausserhalb von LCR22-4. So wäre es möglich, dass die komplette Lage von CTD-2295P14 innerhalb von LCR22-4 eine spezifische Hybridisierung des Klons verhindert. Eine komplette Logik ist hier jedoch nicht herstellbar, d.h. diese Betrachtung kann nur als Erklärungsversuch nicht als Fakt angegeben werden. Ähnlich verhält es sich mit BAC- Klon RP11-359L2. Dieser liegt innerhalb der 2,8- Mb Deletion und überspannt dort LCR22-5. RP11-359L2 war in 13 analysierten Metaphasen nicht deletiert und in weiteren 8 Metaphasen nicht auswertbar. Die hohe Übereinstimmung der Lage von RP11-359L2 mit LCR22-5 führte vermutlich auch in diesem Fall durch Hybridisierung an benachbarte LCRs22 zu einem ‚falsch positiven‘ Ergebnis. Die wesentlich größere Anzahl an Deletionen der unliegenden BAC- Klone würden diese Hypothese jedenfalls untermauern. Um mit einer weiteren Methode zu bestätigen, dass eine ununterbrochene 2,8- Mb Deletion vorliegt, wurde mit dem Patientenmaterial eine Array CGH durchgeführt. (siehe nächstes Kapitel)



**Abbildung 8** Die cohybridisierten BAC- Klone CTD-2245I11 (grün) und RP11-297B9 (rot). CTD-2245I11 ist der erste deletierte BAC- Klon (d.h. das proximale Ende der 2,8- Mb Deletion) und zeigt auf einem Chromosom 22 kein Signal (fehlender grüner Punkt). RP11-297B9 SpO liegt distal der 2,8- Mb Deletion und ist nicht deletiert. RP11-297B9 zeigt auf beiden Chromosomen 22 ein Signal (rote Punkte).



**Abbildung 7** Die cohybridisierten BAC- Klone RP11-379N11 (grün) und KB1561E1 (rot). KB1561E1 ist der letzte deletierte BAC- Klon (d.h. das distale Ende der 2,8- Mb Deletion) und zeigt auf einem Chromosom 22 kein Signal (fehlender roter Punkt). RP11-379N11 liegt proximal der 2,8- Mb Deletion und ist nicht deletiert. RP11-379N11 zeigt auf beiden Chromosomen 22 ein Signal (grüne Punkte).



**Abbildung 9** Die cohybridisierten BAC- Klone KB1125A3 (inkludiert SMARCB1- Gen) (grün) und KB1896H10 (rot). KB1125A3, der das SMARCB1- Gen enthält, ist deletiert und zeigt auf einem Chromosom 22 kein Signal (fehlender grüner Punkt). KB1896H10 liegt distal der 2.8-Mb Deletion und ist nicht deletiert. KB1896H10 zeigt auf beiden Chromosomen 22 ein Signal (rote Punkte).

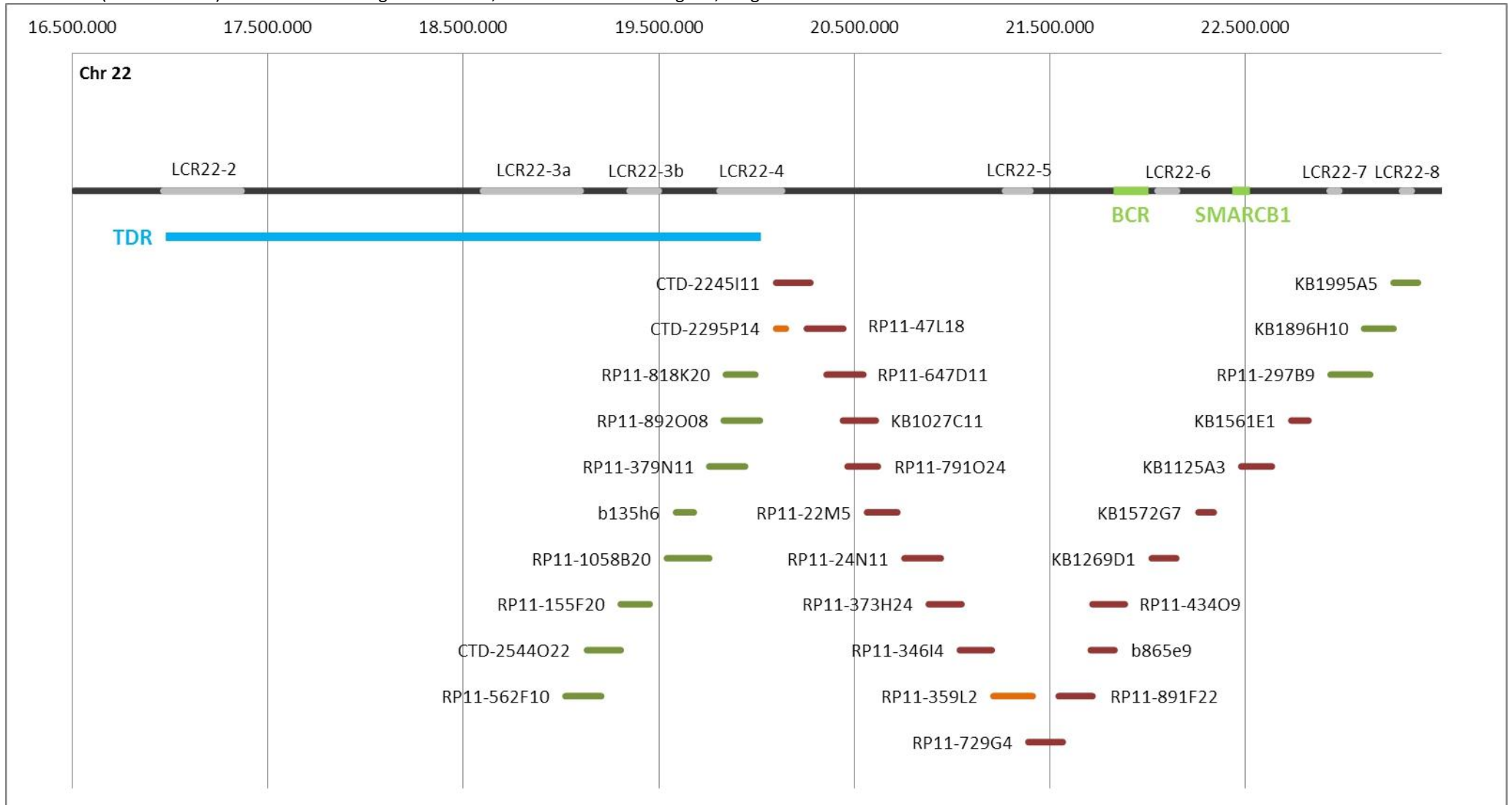


**Tabelle 3 Übersicht der FISH- Ergebnisse.** Die rot hinterlegten BAC- Klone stellen die auf einem Chromosom22-Homolog deletierten BAC- Klone dar. Die grün hinterlegten BAC- Klone waren auf beiden homologen Chromosomen vorhanden. Größen und Lage der BAC- Klone aus UCSC Genome Browser on Human July 2003 bzw. May 2004, sowie <http://mkweb.bcgsc.ca/bayarray/?view=clone%20libraries>

BAC Klon	Cytoband	bp START Position	bp ENDE Position	Länge (bp)	Anzahl der ausgewerteten Metaphasen	Anzahl der Metaphasen mit 2 Signalen*	Anzahl der Metaphasen mit 1 Signal	Anzahl der nicht auswertbaren Metaphasen
1 RP11-562F10	22q11.21	19.022.375	19.204.954	182.580	18	18 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
2 CTD-2544O22	22q11.21	19.132.152	19.304.852	172.701	119	105 (88,24%)	0 (0%)	14 (11,76%)
3 RP11-155F20	22q11.21	19.304.861	19.453.068	148.208	39	36 (92,31%)	1 (2,56%)	2 (5,13%)
4 RP11-1058B20	22q11.21	19.541.081	19.757.621	216.541	146	140 (95,89%)	4 (2,74%)	2 (1,37%)
5 b135h6 (AC002470)	22q11.21	19.587.769	19.678.560	90.792	20	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
6 RP11-379N11	22q11.21	19.757.627	19.940.794	183.168	22	20 (90,91%)	2 (9,09%)	0 (0%)
7 RP11-892O08	22q11.21	19.831.348	20.016.535	185.188	37	34 (91,89%)	1 (2,70%)	2 (5,41%)
8 RP11-818K20	22q11.21	19.842.547	19.993.159	150.613	20	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
9 CTD-2295P14	22q11.21	20.099.624	20.149.633	50.010	25	19 (76%)	6 (24%)	0 (0%)
10 CTD-2245I11	22q11.21	20.099.624	20.274.643	175.020	21	0 (0%)	21 (100%)	0 (0%)
11 RP11-47L18	22q11.21	20.256.349	20.442.904	186.555	31	0 (0%)	24 (77,42%)	7 (22,58%)
12 RP11-647D11	22q11.21-22q11.22	20.357.397	20.545.779	188.383	20	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)
13 KB1027C11	22q11.21-22q11.22	20.440.988	20.609.214	168.813	66	3 (4,55%)	50 (75,76%)	13 (19,70%)
14 RP11-791O24	22q11.21-22q11.22	20.464.869	20.619.784	154.916	26	0 (0%)	22 (84,62%)	4 (15,38%)
15 RP11-22M5	22q11.22	20.564.423	20.719.537	155.115	20	1 (5%)	18 (90%)	1 (5%)
16 RP11-24N11	22q11.22	20.756.141	20.941.659	185.519	20	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)
17 RP11-373H24	22q11.22	20.880.154	21.047.485	167.332	26	1 (3,85%)	25 (96,15%)	0 (0%)
18 RP11-346I4	22q11.22	21.039.150	21.202.147	162.998	21	0 (0%)	21 (100%)	0 (0%)
19 RP11-359L2	22q11.22	21.210.777	21.411.681	200.905	21	13 (61,90%)	0 (0%)	8 (38,10%)
20 RP11-729G4	22q11.22	21.389.433	21.565.251	175.819	40	0 (0%)	40 (100%)	0 (0%)
21 RP11-891F22	22q11.22	21.544.656	21.717.636	172.981	19	0 (0%)	19 (100%)	0 (0%)
22 b865e9 (AC000029)	22q11.22-22q11.23	21.708.487	21.830.046	121.560	30	3 (10%)	27 (90%)	0 (0%)
23 RP11-434O9	22q11.22-22q11.23	21.717.637	21.883.010	165.374	22	0 (0%)	20 (90,91%)	2 (9,09%)
24 KB1269D1	22q11.23	22.020.784	22.146.185	186.421	22	0 (0%)	22 (100%)	0 (0%)
25 KB1572G7	22q11.23	22.259.441	22.337.669	151.600	36	2 (5,56%)	30 (83,33%)	4 (11,11%)
26 KB1125A3	22q11.23	22.478.492	22.635.025	162.328	65	1 (1,54%)	55 (84,62%)	9 (13,85%)
27 KB1561E1	22q11.23	22.734.515	22.822.230	152.244	23	0 (0%)	23 (100%)	0 (0%)
28 RP11-297B9	22q11.23	22.935.054	23.137.648	202.595	25	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
29 KB1896H10	22q11.23	23.106.750	23.257.221	173.785	25	24 (96%)	0 (0%)	1 (4%)
30 KB1995A5	22q11.23	23.257.222	23.382.275	163.795	19	19 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

\* Einige BAC- Klone wurden in vielen Hybridisierungen als Kontrollklone verwendet. Aus diesem Grund sind von manchen BAC- Klonen unverhältnismäßig mehr Metaphasen in die Auswertung miteinbezogen worden (z.B. CTD2544O22 oder RP11-1058B20; je >100 Metaphasen)

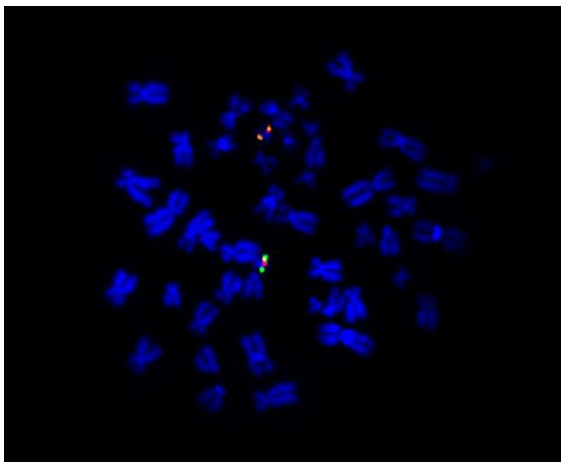
**Abbildung 10 Schematische Darstellung der Region 22q11, Lage der BAC- Klone und FISH- Ergebnisse.** In roten Balken dargestellt sind die auf einem der beiden homologen Chromosomen 22 deletierten BAC- Klone. In grünen Balken dargestellt sind die auf beiden Homologen vorhandenen BAC- Klone. Mit orangen Balken dargestellt die BAC- Klone die aufgrund ihrer Lage innerhalb von LCRs22 ein ambivalentes Ergebnis lieferten. Der erste deletierte Klon ist CTD-2245I11 (rot). Der letzte deletierte Klon ist KB1561E1 (rot). Die x- Achsenbeschriftung bezieht sich auf die Lage in bp vom Centromer des Chromosom 22. Die Gene BCR und SMARCB1 werden durch hellgrünen Balken dargestellt. Die TDR bei VCF5/DGS erstreckt sich von LCR22-2 bis LCR22-4 (blauer Balken). Die LCRs22 sind in grauen Balken, auf Chromosom 22 liegend, dargestellt.



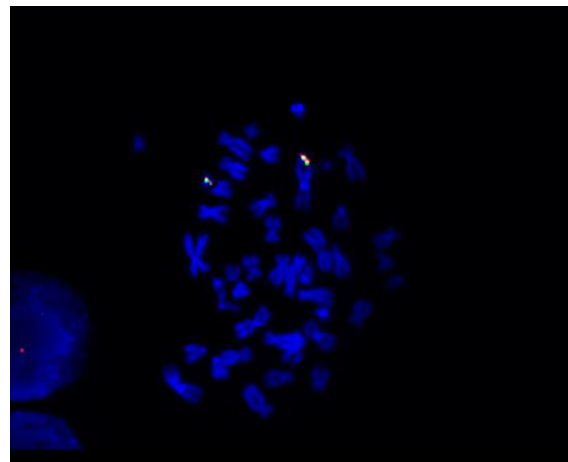
## B. Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Material der Eltern des Indexpatienten

Zur Feststellung, ob auch die Eltern von derselben 2,8- Mb Deletion betroffen sind, wurden mit vier ausgewählten, beim Patienten deletierten BAC- Klonen FISH- Experimente durchgeführt. Die hybridisierten Klone KB1027C11, b865e9, KB1125A3 sowie KB1995A5 wurden so gewählt, dass proximale und distale Bereiche der Deletion, sowie Bereiche ausserhalb der Deletion (Positivkontrollen) abgedeckt werden. Zudem wurde mit KB1125A3 derjenige BAC- Klon gewählt welcher das SMARCB1- Gen enthält.

Weder im maternalen (170 ausgewertete Metaphasen) noch im paternalen (165 ausgewertete Metaphasen) Genom konnte in diesen Experimenten eine Abberation der in Frage stehenden chromosomalen Region festgestellt werden. Die Eltern des Indexpatienten tragen die Deletion nicht. Demnach ist diese während der Keimzellenbildung eines der beiden Elternteile *de novo* entstanden. Dass das mutierte Chromosom 22 mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Vater vererbt wurde, konnte durch MitarbeiterInnen der Universität Marburg festgestellt werden. Im Rahmen einer Subtelomer- FISH konnte bei einem der beiden paternalen Chromosomen 22 ein Zentromerpolymorphismus gefunden werden, der auch bei dem von der Deletion betroffenen Chromosom 22 des Indexpatienten gefunden wurde. Das bedeutet, dass die Deletion während der männlichen Keimzellenreifung entstanden sein dürfte und weitervererbt wurde.



**Abbildung 12** Die auf paternales Patientenmaterial cohybridisierten BAC- Klone KB1125A3 (grün) und KB1995A5 (rot). KB1125A3 inkludiert das *SMARCB1*- Gen und ist nicht deletiert. (grüne Punkte) KB1995A5 wurde als positive Kontrolle hybridisiert und ist nicht deletiert. (rote Punkte)



**Abbildung 11** Die auf maternales Patientenmaterial cohybridisierten BAC- Klone KB1125A3 (grün) und KB1995A5 (rot). KB1125A3 inkludiert das *SMARCB1*- Gen und ist nicht deletiert. (grüne Punkte) KB1995A5 wurde als positive Kontrolle hybridisiert und ist nicht deletiert. (rote Punkte)

### C. *Array CGH an genomischer DNA des Indexpatienten und der Eltern des Indexpatienten zur Bestätigung der ununterbrochenen 2.8- Mb Deletion*

#### *Indexpatient und Eltern*

Zur Absicherung der FISH- Ergebnisse wurde DNA des Indexpatienten und dessen Eltern an Dr. Reinhard ULLMANN (Max- Planck Institut für molekulare Genetik, Berlin) versendet, um dort eine Array CGH durchführen zu lassen. Die Ergebnisse der Array CGH konnten die proximalen und die distalen Bruchpunktregionen des Indexpatienten bestätigen. Eine unterbrochene Deletion konnte nicht festgestellt werden. Die ‚falsch positiven‘ Ergebnisse der FISH konnten damit widerlegt werden. Es wurden jedoch noch weitere, interessante Ergebnisse gefunden. Die Array CGH des Indexpatienten brachte, neben der 2.8- Mb Deletion, eine Duplikation des 2,8- Mb großen, centromerwärts liegenden Bereiches zu Tage. Dieser duplizierte Bereich entspricht in Lage und Größe der TDR in VCFS/DGS, zwischen LCR22-2 und LCR22-4.

Die untersuchten DNA- Proben der Eltern zeigten auch bei der Array CGH keine Abberationen auf Chromosom 22.

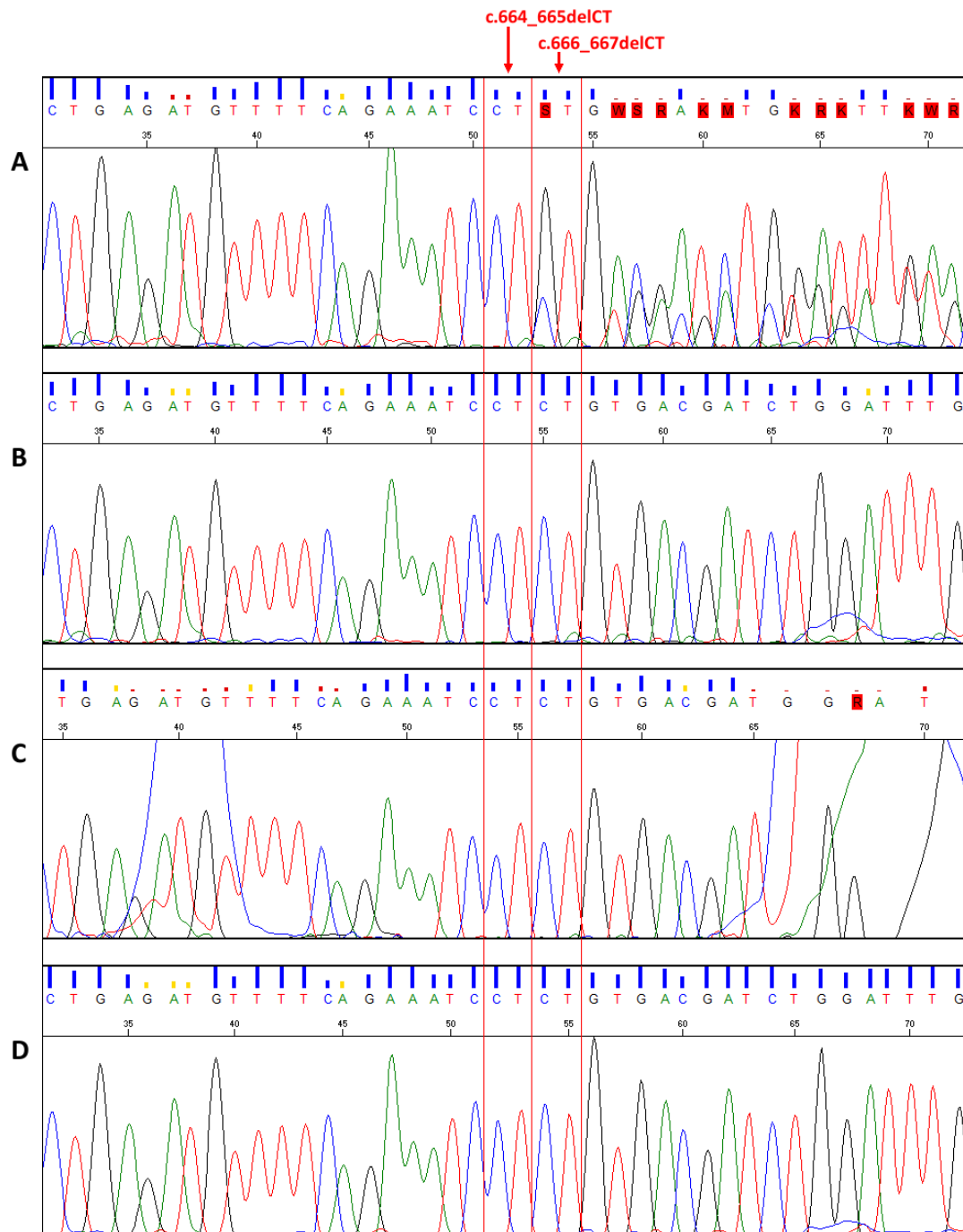
### D. *Mutationsanalyse SMARCB1 - Gen*

#### *Indexpatient und Eltern*

Die Deletion des Indexpatienten inkludiert auch das *SMARCB1*- Gen das bei Rhabdoidtumoren eine Rolle als Tumorsuppressorgen spielt. Um festzustellen, ob im Tumor das zweite Allel von *SMARCB1* mutiert ist, wurden die am häufigsten mutierten Exons 2, 4, 5, 6, 7 aus folgenden genomischen DNAs amplifiziert und sequenziert:

- I. Indexpatient
- II. Vater
- III. Mutter
- IV. DNA aus dem renalen Rhabdoid-Tumor des Indexpatienten (RT- DNA)

Im Exon 6 der RT- DNA fand sich eine 2- bp Deletion der Basen CT an der Position 664-665 (Codon 222) oder 666-667 (Codon 222-223), die zu einer frameshift- Mutation und in der Folge zu einem vorzeitigen Stop- Codon unmittelbar nach Codon 222 führt. Die Sequenzabfolge an der betroffenen Stelle ist CTCT. Durch bloße Analyse von Sequenzierdaten kann nicht unterschieden werden, welche der beiden Möglichkeiten wirklich zutrifft. Beide ergeben das gleiche Muster bei der Auswertung. In peripheren Blutzellen zeigten weder der Indexpatient noch die Eltern die c.664\_665delCT bzw. c.666\_667delCT Mutation. Das bedeutet, es handelt sich bei der Mutation des verbleibenden *SMARCB1*- Allels im Tumorgewebe um eine somatisch erworbene Veränderung.



**Abbildung 13 Sequenzierergebnisse des *SMARCB1*- Gens, Exon 6.** Der Indexpatient zeigt im renalen Tumorgewebe (A) eine 2- bp Deletion der Basen CT. Entweder handelt es sich dabei um die Mutation c.664\_665delCT oder c.666\_667delCT welche beide zur gleichen *frameshift*- Mutation und einem vorzeitigen STOP- Codon unmittelbar nach Codon 222 führen. Die Mutation konnte weder in peripheren Blutzellen des Index Patienten (B) noch in den DNA-Proben des Vaters (C) und der Mutter (D) gefunden werden. Abgebildet sind die forward Sequenzen, von 5' nach 3' zu lesen. Zu A ist anzumerken, dass bei Vorliegen reiner Tumor- DNA der Sequenzverlauf anders aussehen müsste. Die 2- bp *frameshift*- Mutation sollte auf einem Strang detektiert werden. Der zweite DNA- Strang dürfte auf Grund der 2.8- Mb Deletion nicht vorhanden sein. Dennoch ist ein solcher, zweiter DNA- Strang in der Auswertung zu sehen. Erklärt kann dies damit werden, dass die Tumor- DNA mit normaler renaler DNA verunreinigt war und diese amplifiziert und mitsequenziert wurde.

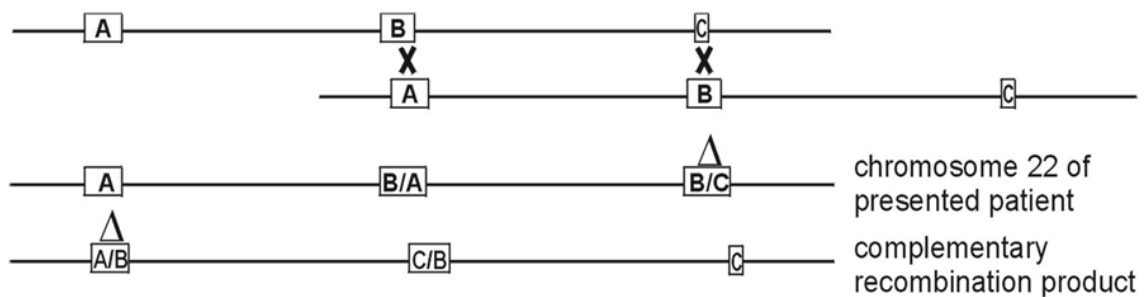
## V. Diskussion

Die sicherlich interessanteste Frage ist die nach den genetischen Grundlagen des phänotypischen Erscheinungsbildes des Patienten, d.h. welche Auswirkungen zeigen 2.8- Mb Deletion bzw. 2.8- Mb Duplikation auf seinen Phänotyp. Durch die vorliegende Duplikation sind mindestens 40 Gene oder vorhergesagte Gene in erhöhter Dosis – d.h. eineinhalb- fache Dosis zu einem normalen Karyotypen – vorhanden. Durch die telomerwärts liegende Deletion sind mindestens 50 Gene oder vorhergesagte Gene betroffen und damit auf einen haploiden Zustand reduziert, darunter auch das Tumor Suppressor Gen *SMARCB1*. Dass die 1.5- fache Dosiserhöhung der Gene im duplizierten Bereich schlußendlich auch eine phänotypische Auswirkung zeigt, kann nicht mit Sicherheit ein- bzw ausgeschlossen werden. Trotz erhöhter Gendosis auf DNA- Ebene könnten epigenetische Faktoren die Gendosis beeinflussen und, in diesem Fall, trotz Duplikation, die Menge an Genprodukt auf mRNA oder Proteinebene letztlich wieder herabsetzen. Somit würden die mehrfach vorhandenen Genen keinen bestimmenden Faktor im Phänotyp darstellen. Dasselbe gilt auch für die im haploiden Zustand vorliegenden Gene der deletierten Region. Sind diese haploiden Gene durch epigenetische Faktoren ausgeschaltet fehlen ihre Entsprechungen auf mRNA bzw Protein- Ebene gänzlich, was einen wesentlichen Einfluss auf das klinische Erscheinungsbild des Patienten hätte. Es ist des Weiteren durchaus möglich, dass einzelne Gene im duplizierten Bereich kaum oder nur schwach exprimiert und andere Gene in Gegensatz dazu sehr stark exprimiert werden, wobei letzteres wesentlich stärker Auswirkungen in den somatischen Zellen und somit im Phänotyp hätte.

Entstanden sind die genomischen Abberationen, d.h. Duplikation und Deletion, durch ein nicht allelisches homologes Rekombinationsereignis während der paternalen Meiose. In Abbildung 14 wird der wahrscheinlich vorliegende Mechanismus schematisch dargestellt. Der genomische Abschnitt A-B (beim Indexpatienten LCR22-2 bis LCR22-4, welcher mit der TDR überstimmt) wird durch das NAHR- Ereignis dupliziert, indem der Abschnitt B-C (beim Indexpatienten LCR22-4 bis LCR22-7) ersetzt, und damit deletiert wird. In den FISH- Untersuchungen zeigten FISH- Sonden die im duplizierten Bereich liegen häufig ein eindeutig stärkeres Signal auf genau jenem Chromosom 22, auf welchem auch die Deletion gefunden wurde. Dies war ein starkes Indiz, dass die Deletion und die Duplikation auf den gleichen Chromosom 22 liegen. Später wurde diese Annahme durch die Array- CGH bestätigt.

Im renalen Rhabdoid Tumor des Patienten war das haploide Allel des *SMARCB1* Gens durch eine 2- bp Deletion, und einer daraus resultierenden Stop- Mutation, homozygot inaktiviert. Die entscheidene Rolle des *SMARCB1* Gens in der Entwicklung von Rhabdoid Tumoren ist laut Literatur gesichert, d.h. ein Zusammenhang zwischen dem compound heterozygoten Verlust (d.h. die Ausschaltung zweier Allele *eines Genes* durch unterschiedliche Mutationen) von *SMARCB1* und malignen Rhabdoid- Tumoren ist auch in vorliegendem Fall sehr naheliegend. Wir können jedoch nicht ausschließen, dass diese 2- bp Deletion durch die prä-operative Chemotherapie entstanden ist. Weiters ist erwähnenswert, dass im Gegensatz zur klassischen Reihenfolge, d.h. einer vorausgehenden Punktmutation und anschließender Deletion eines Tumor Suppressor Gens in

einem Tumorgewebe, die Reihenfolge hier umgekehrt war, d.h. die Punktmutation erst *nach* der Deletion des Tumor Suppressor Gens aufgetreten ist.



**Abbildung 14 Schematische Darstellung des NAHR.** Die Fehlpaarung der LCRs22 während der Meiose führt zu einer veränderten Weitergabe von genetischem Material. Der Bereich zwischen B und C, auf dem ersten Strang dargestellt, wird durch den Abschnitt A-B des ‚fehlgepaarten‘ Stranges ersetzt. Dadurch ist A-B dupliziert und B-C deletiert.

In der Literatur wird von lediglich 8 weiteren Patienten berichtet, die von Keimbahnmutationen in *SMARCB1* betroffen sind. Von 3 dieser 8 Patienten liegen auch klinische Beschreibungen vor. (Kusafuka et al., 2004; Jackson, et al., 2007; Lafay-Cousin et al., 2009) Jackson et al. sowie Lafay-Cousin et al. berichten von insgesamt 3 Patienten, welche dieselbe 2.8- Mb atypische, distale Deletion wie der hier untersuchte Indexpatient aufweisen, und sich mit diesem, als auch untereinander, in ihrer klinischen Erscheinung auffällig überschneiden. Alle Patienten entwickelten vor dem 4. Lebensjahr einen malignen Rhabdoid Tumor in Niere bzw. Rückenmark. Die weiteren gemeinsamen klinischen Merkmale sind prä- aurikuläre Ohranhängsel, dysplastische Ohren, eine dünne Oberlippe mit langem Philtrum und nach unten geneigten Mundwinkeln, sowie Entwicklungsstörungen (Lafay-Cousin, Payne, Strother, Chernos, Chan, & Bernier, 2009). Zusätzliche Ähnlichkeiten des Indexpatienten mit den von Jackson et al. beschriebenen Patienten sind Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme (Gastrooesophagealer Reflux), auffällige Ohren, Ventrikel- Septum- Defekt, Hörverlust, Entwicklungsstörungen und Auffälligkeiten an den 5. Fingern (Klinodaktylie). Im Gegensatz zu den beschriebenen Patienten zeigte der Indexpatient keine Gaumenspalte. Außer der phänotypischen Überschneidung, scheint zusätzlich die Annahme abgesichert, dass der MRT durch die homozygote Inaktivierung des *SMARCB1* ausgelöst wurde. In einem Patienten (Jackson, et al., 2007) mit MRT wurde, wie im Indexpatienten, eine 2- bp Deletion in Exon 6 gefunden (c.667\_668delTG oder c.669\_670delTG). Eine Klärung der Mechanismen dieser auffällig ähnlichen Deletionen in Indexpatienten und genanntem Patienten, könnte ein interessanter Ansatz zu weiteren Erforschung der Rolle von *SMARCB1* in MRT sein.

Welchen Einfluss die 2.8- Mb Mikroduplikation auf den Phänotyp hat ist auf Basis der bisher beschriebenen Fälle ebenfalls vergleichbar. Der Indexpatient zeigt, wie 79.7% der 22q11.2 Mikroduplikationspatienten faciale Dysmorphien, Hörverlust (20%), Kardiovaskuläre Anomalien (15%). Da sich die klinischen Merkmale von VCFS/DGS, atypischen Deletionen und 22q11.2 Mikroduplikationen dennoch stark überschneiden ist eine genaue Klärung der Ursachen sehr schwierig. Wahrscheinlich sind beide Aberrationen, Deletion als auch Duplikation am auffälligen Phänotyp des Indexpatienten beteiligt. Um in Zukunft eine genauere Differenzierung der klinischen Merkmale von Patienten mit VCFS/DGS (typische und atypische Deletionen) und Patienten mit 22q11.2 Mikroduplikationssyndrom zu ermöglichen, gilt es weitere Untersuchungen durchzuführen.

## VI. Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit wird ein Patient mit mildem Phänotyp eines 22q11 Mikrodeletionssyndroms und einem malignen Rhabdoid Tumor in einer der beiden Nieren beschrieben. Der Patient zeigt ein angeborenes Rearrangement im Chromosomenband 22q11, welches in dieser Form noch nicht berichtet wurde. Es handelt sich um eine 2.8- Mb Mikroduplikation der bei VCFS/DGS typischerweise deletierten Region TDR. Dieser Duplikation ist eine unmittelbar telomerisch liegende Deletion von ebenfalls 2.8- Mb angeschlossen. Von der Deletion betroffen ist das Tumor Suppressor Gen *SMARCB1*, welches dadurch in den somatischen Zellen des Patienten in haploidem Zustand vorliegt. Die Eltern des Patienten zeigten einen normalen männlichen (46,XY) bzw. weiblichen (46,XX) Karyotyp. Mikrosatellitenanalysen bestätigten, dass sowohl die 2.8- Mb Duplikation, als auch die 2.8- Mb Deletion, *de novo* auf dem väterlich vererbten Chromosom entstanden sind. FISH und Array CGH Resultate zeigen übereinstimmend, dass die Bruchpunktregionen innerhalb der LCRs22 liegen, wodurch die Theorie unterstützt ist, dass nicht allelische homologe Rekombinationsereignisse (NAHR) während der väterlichen Meiose die Bildung dieses neuartigen Rearrangements mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgelöst haben. Im malignen Rhabdoid Tumor des Patienten wurde im zweiten Allel des Tumor Suppressor Gens *SMARCB1* eine 2- bp Deletion (c.664\_665delCT oder c.666\_667delCT) gefunden. Die dadurch entstandene Stop- Mutation führte zur homozygoten Inaktivierung von *SMARCB1* und trägt mit großer Wahrscheinlichkeit zur Entstehung des malignen Rhabdoid- Tumors bei. (Biegel et al., 1990; Biegel, 2006)



## VII. Bibliographie

- Babcock, M., Pavlicek, A., Spiteri, E., Kashork, C., Ioshikhes, I., Shaffer, L., et al. (2003). Shuffling of Genes Within Low-Copy Repeats on 22q11 (LCR22) by Alu-Mediated Recombination Events During Evolution. *Genome Research*, S. 2519-2532.
- Bailey, J., Gu, Z., Clark, R., Reinert, K., Samonte, R., Schwartz, S., et al. (2002). Recent segmental duplications in the human genome. *Science*, S. 1003-1007.
- Baumer, A., Dutly, F., Balmer, D., Riegel, M., Tükel, T., Krajewska-Walasek, M., et al. (1998). High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Human Molecular Genetics*, S. 887-894.
- Ben-Shachar, S., Ou, Z., Shaw, C., Belmont, J., Patel, M., Hummel, M., et al. (2008). 22q11.2 Distal Deletion: A Recurrent Genomic Disorder Distinct from DiGeorge Syndrome and Velocardiofacial Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 2421-2426.
- Biegel, J. (2006). Molecular Genetics of Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors. *Neurosurgical Focus*, E11.
- Biegel, J., Rorke, L., Packer, R., & Emanuel, B. (1990). Monosomy 22 in rhabdoid or atypical tumors of the brain. *Journal of Neurosurgery*, 710-714.
- Carlson, C., Sirotkin, H., Pandita, R., Goldberg, R., McKie, J., Wadey, R., et al. (1997). Molecular Definition of 22q11 Deletions in 151 Velo-Cardio-Facial Syndrome Patients. *Am J Hum Genet*, S. 620-629.
- Courtens, W., Schramme, I., & Laridon, A. (2008). Microduplication 22q11.2: A Benign Polymorphism or a Syndrome With a Very Large Clinical Variability and Reduced Penetrance? - Report of Two Families. *American Journal of Medical Genetics*, S. 758-763.
- De La Rochebrochard, C., Joly-Hélas, G., Goldenberg, A., Durand, I., Laquerrière, A., Ickowicz, V., et al. (2006). The intrafamilial variability of the 22q11.2 microduplication encompasses a spectrum from minor cognitive deficits to severe congenital anomalies. *American Journal of Medical Genetics Part A*, S. 1608-1613.
- DiGeorge, A. (1965). Discussions on a new concept of the cellular basis of immunology. *J Paediatr*, S. 907.
- Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B., Chisoe, S., Hunt, A., Collins, J., et al. (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*, S. 489-495.
- Ensenauer, R., Adeyinka, A., Flynn, H., Michels, V., Lindor, N., Dawson, D., et al. (2003). Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: Clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *American Journal of Human Genetics*, S. 1027-1040.
- Hoogendoorn, B., Coleman, S., Guy, C., Smith, S., O'Donovan, M., & Buckland, P. (2004). Functional analysis of polymorphisms in the promoter regions of genes on 22q11. *Human Mutation*, 35-42.
- Jackson, E., Shaikh, T., Gururangan, S., Jones, M., Malkin, D., Nikkel, S., et al. (2007). High-density single nucleotide polymorphism array analysis in patients with germline deletions of 22q11.2 and malignant rhabdoid tumor. *Human Genetics*, 117-127.
- Jerome, L., Papaioannou, V. (2001). DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nature Genetics*, 286-291.

- Kaplan, J., Aurias, A., Julier, C., Prieur, M., & Szajnert, M. (1987). Human chromosome 22. *Journal of medical Genetics*, S. 65-78.
- Kehrer-Sawatzki, H., Haussler, H., Krone, W., Bode, H., Jenne, D., Mehnert, K., et al. (1997). The second case of a t(17,22) in a family with neurofibromatose type 1: sequence analysis of the breakpoint regions. *Human Genetics*, S. 237-247.
- Klochender-Yeivin, A., Muchardt, C., & Yaniv, M. (2002). SWI/SNF chromatin remodelling and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, 73-79.
- Kobrynski, L., & Sullivan, K. (2007). Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*, 1443-1452.
- Kusafuka, T., Miao, J., Yoneda, A., Kuroda, S., & Fukuzawa, M. (2004). Novel germline deletion of SNF5/INI1/SMARCB1 gene in neonate presenting with congenital malignant rhabdoid tumor of kidney and brain primitive neuroectodermal tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 133-139.
- Lafay-Cousin, L., Payne, E., Strother, D., Chernos, J., Chan, M., & Bernier, F. (2009). Goldenhar Phenotype in a Child With Distal 22q11.2 Deletion and Intracranial Atypical Teratoid Rhabdoid Tumor. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2855-2859.
- Lindsay, E. (2001). Chromosomal Microdeletions: Dissecting Del22q11 Syndrome. *Nature Reviews Genetics*, S. 858-868.
- Maynard, T., Haskell, G., Lieberman, J., & LaMantia, A.-S. (15. April 2002). 22q11DS: genomic mechanisms and gene function in DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *Int J Devl Neuroscience*, S. 407-419.
- McDermid, H., & Morrow, B. (2002). Genomic Disorders on 22q11. *American Journal of Human Genetics*, S. 1077-1088.
- McDermid, H., Duncan, A., Brasch, K., Holden, J., & Magenis, E. (1986). Characterization of supernumerary chromosome in cat eye syndrome. *Science*, S. 646-648.
- Mikhail, F., Descartes, M., Piotrowski, A., Andersson, R., Diaz de Stahl, T., Komorowski, J., et al. (2007). A previously unrecognized microdeletion syndrome on chromosome 22 band q11.2 encompassing the BCR gene. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2178-2184.
- Murken, J., Grimm, T., Holinski-Feder, E. (2006). Humangenetik. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
- O'Connor, M., Peifer, M., & Bender, W. (1989). Construction of large DNA segments in Escherichia coli. *Science*, S. 1307-1312.
- Pavlicek, A., House, R., Gentles, A., Jurka, J., & Morrow, B. (2005). Traffic of genetic information between segmental duplications flanking the typical 22q11.2 deletion in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome. *Genome Research*, S. 1487-1495.
- Portnoi, M.-F. (2009). Microduplication 22q11.2: A new chromosomal syndrome. *European Journal of Medical Genetics*, 88-93.
- Rauch, A., Pfeiffer, R., Leipold, G., Singer, H., Tigges, M., & Hofbeck, M. (1999). A novel 22q11.2 microdeletion in DiGeorge syndrome. *American Journal of Human Genetics*, S. 659-666.
- Rauch, A., Zink, S., Zweier, C., Thiel, C., Koch, A., Rauch, R., et al. (2005). Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *Journal of Medical Genetics*, 871-876.
- Roberts, C., & Biegel, J. (2009). The role of SMARCB1/INI1 in development of rhabdoid tumor. *Cancer Biology & Therapy*, 412-416.

- Ryan, A., Goodship, J., Wilson, D., Philip, N., Levy, A., Seidel, H., et al. (1997). Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *Journal of Medical Genetics*, 798-804.
- Saitta, S., McGrath, J., Mensch, H., Shaikh, T., Zackai, E., & Emanuel, B. (1999). A 22q11.2 Deletion That Excludes UFD1L and CDC45L in a Patient with Conotruncal and Craniofacial Defects. *American Journal of Human Genetics*, S. 562-566.
- Shaikh, T., Kurahashi, H., & Emanuel, B. (2001). Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: An update and literature review. *Genetics in Medicine*, S. 6-13.
- Shaikh, T., Kurahashi, H., Saitta, S., O'Hare, A., Hu, P., Roe, B., et al. (2000). Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organisation and deletion endpoint analysis. *Human Molecular Genetics*, S. 489-501.
- Shaikh, T., O'Connor, R., Pierpoint, M., McGrath, J., Hacker, A., Nimmakayalu, M., et al. (2007). Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: Sequence analysis predicts breakpoint mechanism. *Genome Research*, S. 482-491.
- Shprintzen, R., Goldberg, R., Lewin, M., Sidoti, E., Berkman, M., Argamaso, R., et al. (1978). A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: Velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J*, S. 56-62.
- Trifonov, V., Vorobieva, N., & Rens, W. (2009). FISH With and Without COT1 DNA. In T. Liehr, *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Application Guide* (S. 99-109). Berlin: Springer.
- Versteeg, I., Sévenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M.-F., Ambros, P., Handgretinger, R., et al. (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*, 203-206.
- Yamagishi, H., & Srivastava, D. (2003). Unraveling the genetic and developmental mysteries of 22q11 deletion syndrome. *Trends in Molecular Medicine*, S. 383-389.
- Yobb, T., Somerville, M., Willatt, L., Firth, H., Harrison, K., MacKenzie, J., et al. (2005). Microduplication and triplication of 22q11.2: A highly variable syndrome. *American Journal of Human Genetics*, S. 865-876.
- Zackai, E., & Emanuel, B. (1980). Site-specific reciprocal translocation, t(11;22)(q23;q11), in several unrelated families with 3:1 meiotic disjunction. *American Journal of Medical Genetics*, S. 507-521.

## VIII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Chromosom 22.....	2
Abbildung 2 Schematische Darstellung von LCRs22 in 22q11 Chromosomen- Rearrangements.....	6
Abbildung 3 LCRs22-1 bis 8 und die Ausrichtung der BCRL-Module .....	7
Abbildung 4 Modell I und II zu NAHR- Ereignissen .....	8
Abbildung 5 Ergebnisse vorausgegangener FISH- Untersuchungen .....	12
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Lage der BAC- Klone auf Chromosom 22 .....	17
Abbildung 7 Die cohybridisierten BAC- Klone RP11-379N11 (grün) und KB1561E1 (rot).....	35
Abbildung 8 Die cohybridisierten BAC- Klone CTD-2245I11 (grün) und RP11-297B9 (rot).....	35
Abbildung 9 Die cohybridisierten BAC- Klone KB1125A3 (inkludiert SMARCB1- Gen) (grün) und KB1896H10 (rot) .....	36
Abbildung 10 Schematische Darstellung der Region 22q11, Lage der BAC- Klone und FISH- Ergebnisse .....	38
Abbildung 11 Die auf maternales Patientenmaterial cohybridisierten BAC- Klone KB1125A3 (grün) und KB1995A5 (rot) .....	39
Abbildung 12 Die auf paternales Patientenmaterial cohybridisierten BAC- Klone KB1125A3 (grün) und KB1995A5 (rot) .....	39
Abbildung 13 Sequenzierergebnisse des <i>SMARCB1</i> - Gens, Exon 6 .....	41
Abbildung 14 Schematische Darstellung des NAHR. ....	43

## IX. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der BAC- Klone die zur Kartierung der Deletion verwendet wurden. ....	18
Tabelle 2 Agarose-Gel Konzentrationen und ihre Trennbereiche .....	21
Tabelle 3 Übersicht der FISH- Ergebnisse.....	37

# Appendix A. Liste der verwendeten Chemikalien, Reagentien und Enzyme

Agarose, UltraPure™	Invitrogen no. 15510
Ammoniumacetat p.a. EMSURE® ACS	MERCK no. 1.01116
Ammoniumchlorid	SIGMA-ALDRICH no. A9434
BigDye® Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	AB Applied Biosystems no. 4336697
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	AB Applied Biosystems no. 4337455
Bromphenolblau	SIGMA-ALDRICH no. B0126
Chloramphenicol (Cam)	BioChemica, APPLICHEM no. A1806
DAPI	Roche Applied Science no. 236276
DNA Ladder, 100 bp	INVITROGEN no. 15628-050
dNTPs (dTTP, dCTP, dATP, dGTP)	Vysis no. 32-801300
dNTP Set, je 100 mM	FERMENTAS no. R0181
EcoRI	Roche no. 11 175 084 001
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure 2Na <sup>+</sup> 2H <sub>2</sub> O)	SIGMA-ALDRICH no. E5134
Ethanol absolut p.a. EMPROVE®	MERCK no. 1.00983
Ethidiumbromid (1%ige Lösung in H <sub>2</sub> O)	MERCK no. 111608
Essigsäure (Eisessig) 100%	MERCK no. 1.00063
ExoSAP-IT®	USB Affimetrix no. 78200
Glycerin	MERCK no. 1.04092
Hefeextrakt	MERCK no. 103753
Hi-Di™ Formamide	AB Applied Biosystems no. 4311320
Human COT-1 DNA® 1 mg/ml	INVITROGEN no. 15279-011
Humane Plazenta DNA	FLUKA no. 31167
IPTG für die Molekularbiologie	APPLICHEM no. A4773
Isopropanol (2-Propanol)	MERCK no. 109634
KaryoMAX®™ Colcemid® in HBSS (10µg/ml)	INVITROGEN no.15210-040
Kaliumchlorid	MERCK no. 1.04936
Kaliumdihydrogenphosphat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	SIGMA-ALDRICH no. P5655
Kaliumhydrogencarbonat	SIGMA-ALDRICH no P9144
LSI/WCP Hybridization Buffer	ABBOTT no. 06J67
λ-DNA- Marker (EcoRI/HindIII)	INVITROGEN no. 15612-013
Magnesiumchlorid MgCl <sub>2</sub> 50mM	in INVITROGEN no. 18038-018 enthalten
Methanol extra pure	MERCK no. 1.06008
Natriumacetat	SIGMA-ALDRICH no. S2889
Natriumchlorid, Suprapur®	MERCK no. 106404
Natriumhydroxid	SIGMA-ALDRICH no. S8045
di-Natriumhydrogenphosphat- Heptahydrat	SIGMA-ALDRICH no. 431478
Nick Translation Enzyme Mix	Vysis no. 32-801300
Nick Translation Buffer	Vysis no. 32-801300

Nukleasefreies Wasser	Vysis no. 32-801300
PB-MAX™ Karyotyping Medium	GIBCO no. 12557-013
PCR Puffer, 10x	in INVITROGEN no. 18038-018 enthalten
Pepton	MERCK no. 107213
Proteinase K	SIGMA-ALDRICH no. P6556
RNase A (DNase-frei)	APPLICHEM no. A3832
Salzsäure 32%	MERCK no. 100319
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SIGMA-ALDRICH no. S9627
SpectrumGreen dUTP	Vysis no. 30-803200
SpectrumOrange dUTP	Vysis no. 30-803000
SuRE/Cut Buffer H	Roche (im Lieferumfang von EcoRI enthalten)
<i>Taq</i> DNA Polymerase, Native	INVITROGEN no. 18038-018
Tri- Natriumcitrat- Dihydrat	SIGMA-ALDRICH no. W302600
Tris-HCl	SIGMA-ALDRICH no. T3253
Triton X	SIGMA-ALDRICH no. T9284
Trizma® base (Tris)	SIGMA-ALDRICH no. T6066
VECTRASHIELD® Mounting Media	VECTORLABS no. H-1000
Wasser, ultrapure, HPLC Grade	Alfa Aesar no. 22934

# Appendix B. Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien

DAPI Stammlösung 1 mg/ml (Lagern bei 4°C bis zu 2 Monate)

10 mg DAPI in 10 ml ddH<sub>2</sub>O lösen

DAPI Arbeitslösung 1 µg/ml

5 ml 1x PBS + 5 µl DAPI Stammlösung

dNTP Mix 0,1 mM für Sondenmarkierung

10 µl 0,3 mM dATP

10 µl 0,3 mM dCTP

10 µl 0,3 mM dGTP mischen

dTTP 0,1 mM

10 µl 0,3 mM dTTP mit 20 µl nukleasefreiem Wasser mischen

Ethanol 70%

72,9 ml 96% Ethanol mit 27,1 ml ddH<sub>2</sub>O mischen

Ethanol 50%

52,1 ml 96% Ethanol + 47,9 ml ddH<sub>2</sub>O mischen

Ethanol 30%

31,2 ml 96% Ethanol + 62,8ml ddH<sub>2</sub>O mischen

Erythrozyten-Lysepuffer

0.3 g Trizma® base

0.93 g EDTA

0,145 g Natriumchlorid

In 800 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, pH Wert mit 1 N NaOH auf 8.0 einstellen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen

Fällungsmix (pro zu fällender Probe)

1,5 µl 3 M Natriumacetat pH4.6

31,25 µl Ethanol 96%

7,25 µl ddH<sub>2</sub>O)

Fixativ: Methanol : Eisessig 3:1

150 ml Methanol mit 50 ml Eisessig mischen (Lagerung auf -20°C)



#### Humane COT-1 und Plazenta DNA in LSI/WCP Hybridization Buffer /H<sub>2</sub>O (7:3)

- 0,1 mg humane COT-1 DNA (100 µl) und 0,2 mg (40µl) Plazenta DNA mischen
- Mit 2,5 Volumen 96% Ethanol (350 µl) und 0,1 Volumen Natriumacetat 3M (14 µl) mischen.
- Zum Ausfällen 15 min auf -20°C stellen
- 15 min bei 13500 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand entfernen und Pellet mit 1ml 70% Ethanol waschen
- 5 min bei 13500 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand mit Pipette entfernen
- Pellet bei 37°C vollständig trocknen
- Resuspendieren in 3 µl ddH<sub>2</sub>O und 7 µl LSI/WCP Hybridization Buffer
- Lagern auf 4°C

#### Humane Plazenta DNA 5 mg/ml

5 mg Humane Plazenta DNA in 1000 µl nukleasefreiem Wasser lösen (kann bis zu 24 h dauern)

Anschließend im Ultraschallbad 2 x 15 min sonizieren, nach dieser Zeit die Humane Plazenta DNA auf ein 1% Kontrollgel auftragen und die durchschnittliche Fragmentgröße feststellen. Sind die Fragmente zu lang, kann die Ultraschallbehandlung fortgesetzt werden, bis die Fragmente in die gewünschte Länge vorliegen.

#### Kaliumchloridlösung 0,075 M

5,59 g KCl in 1000 ml lösen

#### λ-DNA-Marker (EcoRI/HindIII) 100 ng/µl

#### Ladepuffer 6x

50% (v/v) Glycerin

100 mM EDTA

0,01% (w/v) Bromphenolblau

#### LB- Cam Platten (Chloramphenicol)

500 ml LB- Medium + 7,5 g Agar autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen, für LB- Cam Platten Chloramphenicol zu einer Endkonzentration von 25 bzw 12,5 µg/ml (siehe Tabelle 1) zugeben, gießen

#### LB- Medium

10 g NaCl

5 g Hefe- Extrakt

5 g Pepton

In 800 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, mit 1 N NaOH pH- Wert auf 7.0 einstellen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen, anschließend autoklavieren

Natriumacetat 3 M

246 g Natriumacetat in 1000 ml ddH<sub>2</sub>O lösen. pH?

Natriumchlorid- Lösung gesättigt 6 M

350,66 g Natriumchlorid in 1000 ml ddH<sub>2</sub>O lösen

Natriumhydroxidlösung 1 N

40 g Natriumhydroxid- Pellets in 1000 ml ddH<sub>2</sub>O lösen

Natriumhydroxidlösung 0,07N

70 ml 1 N NaOH + 930 ml ddH<sub>2</sub>O mischen

Natriumacetat 3 M

246 g Natriumacetat in 1000 ml ddH<sub>2</sub>O lösen

PBD 10x

5 ml Triton X mit 995 ml 10x PBS mischen

PBD 1x

100 ml 10x PBD + 900 ml ddH<sub>2</sub>O (pH7.0 - 7.4)

PBS 10x

80 g Natriumchlorid

2 g Kaliumchlorid

21.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O

2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

in 800 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, mit 1 N HCl pH- Wert auf 7.4 einstellen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen

PBS 1x

100 ml 10x PBS + 900 ml ddH<sub>2</sub>O (pH7.0 - 7.4)

Proteinase K 10 mg/ml

10 mg Proteinase K in 1000 µl ddH<sub>2</sub>O lösen

Puffer I (Resuspension Buffer; Lagerung bei RT)

50 mM Tris- HCl pH 8.0

10 µg/ml RNase A (erst vor Verwendung zugeben)

Puffer II (Lysis Buffer; Lagerung bei RT) (vor Verwendung frisch zubereitet)

200 mM NaOH

1% SDS

Puffer III (Neutralization Buffer; Lagerung bei 4°C)

3,0 M KCl pH 5.5

Puffer A

41.45 g Ammoniumchlorid

5.006 g Kaliumhydrogencarbonat

0.186 g EDTA

In 800 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, pH Wert mit 1 N HCl auf 7.4 einstellen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen

RNase-A Stammlösung [10 mg/ml] (Lagerung bei -20°C)

100 mg RNase A in 10 ml ddH<sub>2</sub>O lösen

SDS 10% (w/v)

10 g SDS in 90 g ddH<sub>2</sub>O lösen

SpectrumGreen / SpectrumOrange dUTP 0,2 mM

10 µl 1 mM SpectrumGreen bzw. SpectrumOrange dUTP mit 40 µl nukleasefreiem Wasser mischen

SSC 20x (3,0M NaCl, 0.3M Natriumcitrat)

175,2 g Natriumchlorid

88,3 g Tri- Natriumcitrat- Dihydrat in 1000 ml ddH<sub>2</sub>O lösen

SSC 2x

100 ml 20x SSC + 900 ml ddH<sub>2</sub>O (pH7.0 - 7.4)

SSC 0.1x

5 ml 20x SSC + 995 ml ddH<sub>2</sub>O (pH7.0 - 7.4)

TE-Puffer 1x

10 mM Tris-HCl pH 7.4

1 mM EDTA pH 8.0

TBE-Puffer 10x

216 g Trizma® base (Tris)

110 g Borsäure

80 ml 0.5 M EDTA

Mit ddH<sub>2</sub>O auf 2000 ml auffüllen

TBE- Puffer 0.5x

50 ml 10x TBE mit 950 ml ddH<sub>2</sub>O mischen

# Appendix C. Liste der verwendeten Geräte

96-well Sequenzierplatte  
Begasungs-Brutschrank Heraeus Instruments BB 6220 CU  
Brutschrank Heraeus Instruments UT6060  
Dampfsterilisator Vapoklav Typ500  
Deckgläser  
DNA- Sequenzierer AB Applied Biosystems 3130xl 16 Kapillar Sequencer  
EasyPure LF compact ultrapure water system  
Elektrophorese- System Mupid®-exU TaKaRa Bio Inc.  
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan 2 Imaging System mit Isis Fluorescence Imaging System von  
Meta Systems  
Glasküvetten 70 ml  
Harre- Röhrchen 15 ml; AUG. HARRE - GmbH & Co. 168-101-G  
Heiz- und Kühlwasserbad Haake GH mit Thermostat Haake D8  
Inkubationskammer für Objektträger  
Inkubatorhaube Sartorius Certomat H  
Klebstoff Fixogum, Maruba  
Kühlzentrifuge Eppendorf 5415R  
Magnetrührer IKA Labortechnik RCTbasic  
Oak Rifge High-Speed Polypropylen Zentrifugationsröhrchen 50 ml  
Objektträger  
PCR Cycler ABI GeneAmp® PCR System 9700  
PCR Tubes und Deckel  
pH/mV-Meter WTW ProfiLab pH 597  
Rocking Platform Biometra WT15  
Schüttelwasserbad GFL 1083  
Schüttler Sartorius Certomat U  
Thermometer  
Thermomixer Eppendorf 5436  
Trockenschrank Heraeus Instruments B6120  
Ultraschallbad Elma® Transsonic T420  
Vortex Scientific Industries VortexGenie 2  
Wasserbad Memmert WB14  
Wärmeplatte Medax SP12 Nagel KG Kiel  
Zentrifuge Heraeus Instruments LaboFuge400  
Zentrifuge Heraeus Instruments Megafuge 2.0R mit Rotor BS 4402/A  
Zentrifugenröhrchen 50 ml



# Lebenslauf

---

## Persönliche Daten

Name: Galhuber  
Vorname: Markus Rudolf  
Anschrift: 3300 Amstetten, Parksiedlung 19/9  
Geburtstag: 18-11-1980  
Geburtsort: Gresten, NÖ  
Familienstand: ledig, 1 Kind (Julian 27-11-2004)

## Beruflicher Werdegang

2003 – heute Medizinische Universität Wien, Department für Humangenetik. Währinger Straße 10, 1090 Wien; MTA Teilzeit (bis Nov 2007 20 Wochenstunden; ab Dez 2007 10 Wochenstunden; tlw. Vollzeit)  
Jan 2002 – Dez 2002 Baxter AG, Industriestraße 67, 1220 Wien; Pharmazeutische Produktion  
Mai 2001 – Dez 2001 Bundesheer ABC- Abwehr

## Weiterbildungen und Kenntnisse

Dez 2007 – Dez 2011 Tutortätigkeit FH Biotechnologie  
Mai 2005 Vortrag bei der 18. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung, Semmering; *“Novel rearrangement of chromosome band 22q11.2 causing 22q11 microdeletion syndrome like phenotype and rhabdoid tumor of the kidney”*

## Ausbildung

2003 – heute Universität Wien. Studium Anthropologie, Fach Humangenetik  
2000 – 1995 Höhere Technische Bundeslehr- und Versuchsanstalt für chemische Industrie. Rosensteingasse 79, 1170 Wien  
1995 – 1991 Landeshauptschule Gresten. Schulstraße 18, 3264 Gresten  
1991 – 1987 Volksschule Gresten. Schulstraße 18, 3264 Gresten

## Publikationen

*Amplification of 1q21 Is Associated with Poor Outcome after Treatment with Bortezomib in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma.* International Myeloma Foundation. 2006 Dez. Drach J, Sagaster V, Odelga V, Kaufmann H, Ackermann J, Galhuber M, Zojer N, Küenburg E, Zielinski C, Wieser R.

*Novel rearrangement of chromosome band 22q11.2 causing 22q11 microdeletion syndrome like phenotype and rhabdoid tumor of the kidney.* Human Mutation. 2005 Aug; 26(2): 78-83. Wieser R, Fritz B, Ullmann R, Müller I, Galhuber M, Storlazzi CT, Ramaswamy A, Christiansen H, Shimizu N, Rehder H.