

Aus dem Institut für Humangenetik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Ortrud K. Steinlein

**Molekularzytogenetische Charakterisierung der
perizentrischen Inversion des Chromosoms 9**

-

Bruchpunktanalyse und zusätzliche Strukturaberrationen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marco Wettwer

aus Werdau

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein

Mitberichterstatter : Prof. Dr. Konstantin Strauch
: PD Dr. Peter Zill

Betreuung durch den
promovierten Mitarbeiter : PD Dr. rer. nat. Stefan Müller

Dekan : Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung : 19.10.2017

**In Dankbarkeit gewidmet
meinen Eltern, Großeltern und
Michael**

Vo solcando un mar crudele,
senza vele e senza sarte;
freme l'onda, il ciel s'imbruna,
cresce il vento e manca l'arte
e il voler della fortuna
son costretto a seguirar.

Infelice, in questo stato
son da tutti abbandonato;
meco sola è l'innocenza
che mi porta a naufragar.

Arbace
Akt 1, Szene 15
Leonardo Vinci, Artaserse (1730)

Quel sangue versato - al cielo s'innalza,
giustizia domanda, - reclama vendetta;
già l'angiol di morte - fremente v'incalza,
supplizio inaudito - entrambi v'aspetta;
sì vil tradimento - delitto sì reo,
clemenza non merta, - non merta pietà.
Nell'ultimo istante - volgetevi a Dio,
ei forse perdono - conceder potrà.

Tacete, mirate:
quel palco di sangue rosseggia,
è tutto di sangue quel serto bagnato,
un orrido spettro percorre la reggia,
tenendo nel pugno il capo troncato,
di gemiti e grida il cielo rimbomba,
pallente del giorno la luce si fe'.
Ov'era il mio trono s'innalza una tomba!
In quella discendo, fu schiusa per me.
Partite, lo voglio.
Dell'anglica terra sia Giacomo il re.

Elisabetta
Akt 3, Szene 9
Gaetano Donizetti, Roberto Devereux (1837)

Va', ritorna al tuo tiranno,
servi pur al tuo sovrano;
ma non dir che sei romano,
finché vivi in servitù.

Se al tuo cor non reca affanno
d'un vil giogo ancor lo scorno,
vergognar faratti un giorno
qualche resto di virtù.

Catone
Akt 2, Szene 2
Leonardo Vinci, Catone in Utica (1728)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Grundlagen struktureller chromosomaler Aberrationen	1
1.1.1	Balancierte Strukturaberrationen	1
1.1.2	Unbalancierte Strukturaberrationen	2
1.2	ISCN-Nomenklatur struktureller chromosomaler Aberrationen	2
1.3	Strukturelle chromosomale Aberrationen – ein Überblick	4
1.3.1	Translokationen	4
1.3.2	Insertionen	5
1.3.3	Duplikationen	6
1.3.4	Deletionen	7
1.3.5	Ringchromosomen	8
1.3.6	Isochromosomen	9
1.3.7	Markerchromosomen	10
1.3.8	Fragile Stellen (<i>fragile sites</i> ; brüchige Stellen)	11
1.3.9	Inversionen	12
1.3.10	Klinische Manifestationen von Inversionen und rekombinanten Chromosomen	15
1.4	Organisation von Zentromer und perizentromerischer Region	21
1.4.1	Satelliten-DNAs	21
1.4.1.1	Satelliten-DNA I (Sat-I-DNA)	23
1.4.1.2	Satelliten-DNA II (Sat-II-DNA)	24
1.4.1.3	Satelliten-DNA III (Sat-III-DNA)	24
1.4.1.4	Satelliten-DNA IV (Sat-IV-DNA)	24
1.4.1.5	α -Satelliten-DNA (α -Sat-DNA, Alphoid-DNA)	24
1.4.1.6	β -Satelliten-DNA (β -Sat-DNA)	25
1.4.2	Heterochromatin als höhere Organisationsform repetitiver DNA-Elemente	25
1.4.2.1	Konstitutives Heterochromatin	25
1.4.2.2	Funktion des konstitutiven Heterochromatins	26
1.5	Chromosomenvarianten, Normvarianten, Polymorphismen	28
1.5.1	Begrifflichkeiten	28
1.5.2	Heterochromatische Varianten	29
1.5.3	Euchromatische Varianten	29
1.5.4	<i>Copy number variations</i> , segmentelle Duplikationen und <i>low copy repeats</i>	30
1.6	Varianten des Chromosoms 9	31
1.6.1	Heterochromatische Längenvarianten des Chromosoms 9	31
1.6.2	Euchromatische Varianten des Chromosoms 9	32
1.6.2.1	Zusätzliche Bande in 9p12 (G- und C-Banden positiv)	32
1.6.2.2	Zusätzliche Bande in 9p12 (G-Banden positiv, C-Banden negativ)	32
1.6.2.3	Zusätzliche Bande in 9q12 (G- und C-Banden positiv)	32
1.6.2.4	Zusätzliche Bande in 9q12 (G-Banden positiv, C-Banden negativ)	33
1.6.2.5	Drei zusätzliche Banden in 9q12-q13	33
1.6.2.6	Zusätzliche Bande in 9q13-q21 (G-Banden positiv, C-Banden negativ)	33
1.6.2.7	Deletions-Variante 9p21.2-p22.1	34
1.6.2.8	Deletions-Variante 9q21.11	35
1.6.3	Perizentrische Inversion des Chromosoms 9 – Klinische Manifestationen	35
1.6.3.1	inv(9) und Infertilität	36
1.6.3.2	inv(9) und kongenitale Malformationen	36
1.6.3.3	inv(9) und Down-Syndrom	37
1.6.3.4	inv(9) und Friedreich-Ataxie	37
1.6.3.5	inv(9) und Schizophrenie (psychiatrische Erkrankungen)	38
1.6.3.6	inv(9) und neoplastische Erkrankungen	38
1.6.4	Bruchpunkte der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9	38

1.6.5	Invertiertes Duplikationssegment des Chromosoms 9	40
1.7	Zielsetzung der Arbeit	41
2.	Material und Methoden	42
2.1	Patientenkollektiv	42
2.2	Chromosomenpräparation	45
2.2.1	Ansatz und Kultivierung	46
2.2.2	Kulturabbruch (Aufarbeitung der Lymphozytenkulturen)	49
2.2.2.1	Hypotone Behandlung der Zellen	50
2.2.2.2	Fixierung der Zellen	50
2.3	Herstellung von Chromosomenpräparaten	51
2.3.1	Chromosomenpräparate für die GTG (<i>G-bands by trypsin using Giemsa</i>)-Färbung	52
2.3.2	Chromosomenpräparate für die DA/DAPI (<i>DAPI-bands by Distamycin A and 4',6-Diamidino-2-phenylindole</i>)-Färbung	53
2.3.3	Chromosomenpräparate für die FISH (Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung)-Analyse ..	53
2.4	GTG-Färbung	53
2.4.1	Durchführung der GTG-Färbung	54
2.4.2	Auswertung GTG-gefärbter Chromosomenpräparate	54
2.5	DA/DAPI-Färbung	55
2.5.1	Durchführung der DA/DAPI-Färbung	55
2.5.2	Auswertung DA/DAPI-gefärbter Chromosomenpräparate	55
2.6	Herstellung der DNA-Sonden für die FISH (Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung) ..	56
2.6.1	Verwendete DNA-Sonden	57
2.6.2	α -Satelliten- und BAC-DNA-Sonden	57
2.6.2.1	Übernacht-Kultur BAC-tragender <i>E. coli</i> aus Glycerol-Stocks und Archivierung	59
2.6.2.2	Isolierung der BAC-DNA mittels alkalischer Lyse	59
2.6.2.3	Amplifikation der α -Satelliten- und BAC-DNA mittels GenomiPhi™-Kit	60
2.6.2.4	Markierung der α -Satelliten- und BAC-DNA mittels Nicktranslation	61
2.6.2.5	Fällung der markierten α -Satelliten- und BAC-DNA-Sonden	62
2.6.3	DNA-Sonden aus PCR-Produkten	64
2.6.3.1	Markierungs-PCR für die β -Satelliten-DNA-Sonde	64
2.6.3.2	Markierungs-PCR für die Satellit-III-DNA-Sonde	65
2.6.3.3	DNase I-Verdau der PCR-Produkte	66
2.6.3.4	Fällung der PCR-Produkte	66
2.6.4	Kombination der DNA-Sonden in Sonden-Sets	67
2.7	Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung (FISH)	67
2.7.1	Vorbehandlung der Chromosomen-Präparate für die FISH	67
2.7.2	Vorbehandlung der DNA-Sonden und <i>in situ</i> -Hybridisierung	68
2.7.3	Nachweis der hybridisierten DNA-Sonden	68
2.7.3.1	Stringenzwaschung	69
2.7.3.2	Sondennachweis	69
2.7.3.3	Chromosomale Gegenfärbung	70
2.7.4	Auswertung der FISH	70
3.	Ergebnisse	72
3.1	Überblick über Techniken und untersuchte Individuen	72
3.2	Referenzmuster der FISH	72
3.3	Einzeluntersuchungen	75
3.3.1	Proband INV001	75
3.3.1.1	Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik	75
3.3.1.2	Molekulare Zytogenetik	75
3.3.2	Proband INV005	78
3.3.2.1	Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik	78
3.3.2.2	Molekulare Zytogenetik	78
3.3.3	Proband INV006	80
3.3.3.1	Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik	80
3.3.3.2	Molekulare Zytogenetik	82

3.3.4	Proband INV010	85
3.3.4.1	Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik	85
3.3.4.2	Molekulare Zytogenetik	86
3.3.5	Proband INV015	88
3.3.5.1	Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik	88
3.3.5.2	Molekulare Zytogenetik	89
3.3.6	Proband INV011	91
3.3.6.1	Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik	91
3.3.6.2	Molekulare Zytogenetik	91
3.3.7	Proband INV016	91
3.3.7.1	Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik	91
3.3.7.2	Molekulare Zytogenetik	92
3.4	Familienuntersuchungen	92
3.4.1	Probanden INV002, INV003 und INV004	92
3.4.1.1	Fallkasuistiken, Vorbefunde und klassische Zytogenetik	92
3.4.1.2	Molekulare Zytogenetik INV002	94
3.4.1.3	Molekulare Zytogenetik INV004	96
3.4.1.4	Molekulare Zytogenetik INV003	98
3.4.2	Probanden INV007, INV008 und INV009	100
3.4.2.1	Fallkasuistiken, Vorbefunde und klassische Zytogenetik	100
3.4.2.2	Molekulare Zytogenetik INV007	101
3.4.2.3	Molekulare Zytogenetik INV009	103
3.4.2.4	Molekulare Zytogenetik INV008	105
3.4.3	Probanden INV012, INV013 und INV014	107
3.4.3.1	Fallkasuistiken, Vorbefunde und klassische Zytogenetik	107
3.4.3.2	Molekulare Zytogenetik INV014	108
3.4.3.3	Molekulare Zytogenetik INV013	110
3.4.3.4	Molekulare Zytogenetik INV012	111
4.	Diskussion	113
4.1	Zytogenetische Analyse hochaufgelöster Chromosomen	113
4.2	Analyse von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin	115
4.3	Analyse des angrenzenden Euchromatins und Bruchpunktbestimmung	117
4.3.1	Eingesetzte BAC-Klone	117
4.3.2	Bestimmung der Bruchpunkte	118
4.3.3	Zusätzliche Strukturaberrationen	120
5.	Zusammenfassung und Ausblick	123
6.	Literaturverzeichnis	125
7.	Eidesstattliche Erklärung	140
8.	Lebenslauf	141
9.	Danksagung	142

1. Einleitung

1.1 Grundlagen struktureller chromosomaler Aberrationen

Unter einer strukturellen chromosomalen Aberration versteht man allgemein eine Veränderung im Aufbau eines Chromosoms. Diese entsteht entweder durch Verlust (Deletion), Verdopplung (Duplikation), Austausch (Translokation) oder Richtungsumkehr (Inversion) von chromosomalem Material. Findet diese Veränderung nur in einem Chromosom statt, so spricht man von einer intrachromosomalen Strukturaberration (alle Bruchpunkte auf einem Chromosom), sind zwei oder mehr Chromosomen von diesem Vorgang betroffen, bezeichnet man dies als interchromosomale Strukturaberration (Bruchpunkte auf mehr als einem Chromosom).

Auch wenn dem Begriff Aberration (von lat. *aberrare*, abweichen) ein eher negativ stigmatisierender Charakter zugeschrieben wird, so beschreibt er nichts anderes als eine vom zu erwartenden Bild verschiedene Erscheinung der Struktur eines oder mehrerer Chromosomen. Über die klinischen Konsequenzen für das betroffene Individuum wird allein durch den Begriff keine Wertung abgegeben.

Prinzipiell werden die strukturellen Aberrationen danach unterteilt, ob chromosomales Material während des Umbauprozesses (Rearrangement) verlorengegangen bzw. hinzugewonnen oder unverändert geblieben ist. Ist das chromosomale Material in seiner Gesamtheit erhalten geblieben, wird die Aberration als balanciert bezeichnet. Ergibt sich allerdings ein Verlust bzw. Zugewinn, so kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen bestimmten homologen Chromosomenabschnitten. Diesen Zustand bezeichnet man als unbalancierte Aberration.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass es neben den strukturellen Aberrationen auch Veränderungen in der Anzahl ganzer Chromosomen gibt, welche mit dem Oberbegriff numerische Aberrationen zusammengefasst werden. Bekanntestes Beispiel hierfür ist sicher die klinisch als Down-Syndrom bezeichnete Trisomie 21, bei der jede Zelle im klassischen Fall ein zusätzliches Chromosom 21 aufweist. Dadurch erhöht sich die Gesamtchromosomenzahl der Zelle von 46 auf 47 Chromosomen.

1.1.1 Balancierte Strukturaberrationen

Wie oben erwähnt, ist bei balancierten Strukturaberrationen der Gehalt an chromosomalem Material in der Zelle gleich, lediglich die Anordnung hat sich in bestimmten Abschnitten geändert. Insgesamt betrachtet haben betroffene Individuen mit keinen unmittelbaren Auswirkungen zu rechnen. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass nur ein sehr geringer Teil des Genoms aus kodierenden oder regulatorischen Sequenzen besteht. Die Wahrscheinlichkeit, bei einem Bruchereignis Gene oder deren regulatorische Sequenzen zu durchtrennen und so in ihrer Funktion zu beeinträchtigen, ist sehr gering.

Hinweisend auf die Trägerschaft einer balancierten Strukturaberration können Infertilität oder das gehäufte Auftreten von Fehlgeburten (habituelle Aborte) sein. Nicht selten werden derartige Aberrationen auch unbemerkt über mehrere Generationen vererbt wie im Falle von familiären Translokationen. Allerdings besteht hier für jede neue Generation die Gefahr des Auftretens eines unbalancierten Zustands, der dann gegebenenfalls schwerwiegende phänotypische Auswirkungen mit sich bringen kann. In untersuchtem Abortmaterial lässt sich dann mit hoher Wahrscheinlichkeit ein unbalancierter Zustand nachweisen.

1.1.2 Unbalancierte Strukturaberrationen

Der diesen Aberrationstyp definierende Verlust oder Zugewinn an chromosomalem Material führt regelmäßig zu phänotypischen Auffälligkeiten, bedingt durch die resultierende „unausgewogene“ Genexpression, die das fehlende oder überzählige Chromosomensegment verursacht. Klinisch manifestiert sich dies in Dysmorphie-Syndromen, mentaler Retardierung und kongenitalen Fehlbildungen.

1.2 ISCN-Nomenklatur struktureller chromosomaler Aberrationen

Zur einheitlichen Beschreibung eines Karyotyps wurde die sogenannte ISCN (*International System for Cytogenetic Nomenclature*) als ein international verbindliches System geschaffen (1978; BROTHMAN *et al.* 2009; SIMONS *et al.* 2013). Zunächst wird die absolute Zahl der vorhandenen Chromosomen angegeben, nach einem Komma folgt die Konstellation der Geschlechtschromosomen. Sollten sich in der analysierten Zelle numerische und/oder strukturelle Aberrationen finden, werden diese nach einem weiteren Komma unter Verwendung definierter Abkürzungen aufgeführt (2001).

Die ISCN regelt ebenfalls die generelle Nummerierung der Chromosomen, deren Unterteilung in kurze (p) und lange (q) Arme sowie die weitere Feingliederung der Arme in Regionen und Banden. Dies geschieht auf Grundlage des lichtmikroskopisch nach Trypsinbehandlung und Giemsa-Färbung sichtbaren Bandenmusters. Das zu erwartende Bandenmuster jedes Chromosoms ist in einem sogenannten Ideogramm (manchmal auch Idiogramm) dargestellt (SCHRECK *et al.* 2001), wie es beispielhaft in der Abbildung 1.1 für das Chromosom 9 zu sehen ist.

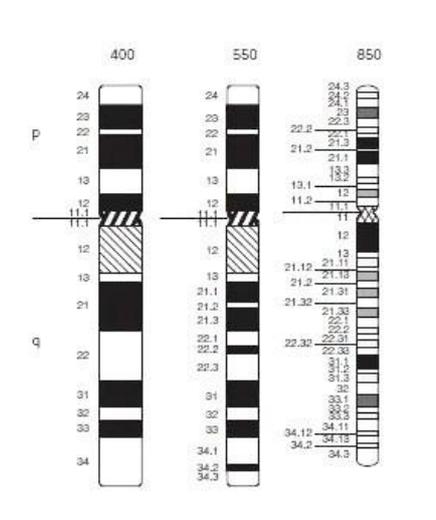


Abb. 1.1: Ideogramm des Chromosoms 9.

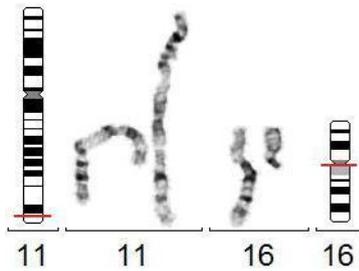
Dargestellt ist jeweils das Bandenmuster, welches bei einer Auflösung von 400, 550 und 850 bphs (*bands per haploid set*) zu erwarten ist (SCHRECK *et al.* 2001).

Nachfolgend ist eine Auswahl möglicher Abkürzungen zur Beschreibung struktureller Aberrationen gezeigt:

Abkürzung	Aberration	Beispiel
t	Translokation (balanciert)	46,XX,t(2;5)(q21;q31)
der	Translokation (nicht balanciert)	46,XX,der(1)t(1;3)(p22;q13.1)
inv	Inversion	46,XX,inv(3)(q21q26.2)
del	Deletion	46,XX,del(5)(q13q33)
dup	Duplikation	46,XX,dup(1)(q22q25)
rec	Rekombinantes Chromosom (parentaler Ursprung bekannt)	46,XX,rec(1)dup(1p)inv(1)(p36.3q42.3)mat
r	Ringchromosom	46,XX,r(7)(p22q36)
i	Isochromosom	46,XX,i(17)(q10)
ins	Insertion	46,XX,ins(5;2)(p14;q22q32)
fra	Fragile Stelle	46,X,fra(X)(q27.3)

Die beiden Beispiele der Abbildung 1.2 sollen das System der Karyotypformeln nach ISCN an einer balancierten und einer unbalancierten Translokation verdeutlichen (vergleiche hierzu auch Abschnitt 1.3).

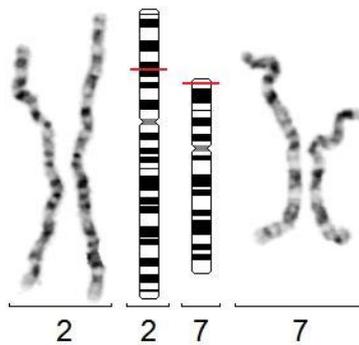
46,XY,t(11;16)(q25;q11.1)



Balancierte reziproke Translokation bei einem 32 Jahre alten Mann mit Azoospermie.

Insgesamt befinden sich in der analysierten Zelle 46 Chromosomen, das Geschlecht ist männlich (XY-Konstellation). Es liegt eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 11 und 16 vor. Der Bruchpunkt auf Chromosom 11 liegt im langen Arm in der Region 2, Bande 5. Auf Chromosom 16 befindet sich der Bruchpunkt ebenfalls im langen Arm in der Region 1, Bande 1, Subbande 1.

46,XX,der(7)t(2;7)(p16;p22)



Unbalancierte Translokation bei einem 1 Tag alten Mädchen mit Verdacht auf ein komplexes Fehlbildungssyndrom.

Insgesamt befinden sich in der analysierten Zelle 46 Chromosomen, das Geschlecht ist weiblich (XX-Konstellation). Neben zwei strukturell unauffälligen Chromosomen 2 und einem strukturell unauffälligen Chromosom 7 liegt ein derivatives Chromosom 7 vor, das aus einer Translokation zwischen einem Chromosom 2 (Bruchpunkt im kurzen Arm in der Region 1, Bande 6) und einem Chromosom 7 (Bruchpunkt im kurzen Arm in der Region 2, Bande 2) hervorgegangen ist. Zytogenetisch ergibt sich hieraus eine partielle Trisomie für den Abschnitt 2pter→2p16 und eine partielle Monosomie für den Abschnitt 7p22→7pter.

Abb. 1.2: Anwendung der ISCN zur Beschreibung von Karyotypen.

Wenn nicht anders angegeben, stammen die Beispielabbildungen aus dem Institut für Humangenetik am Klinikum der LMU.

1.3 Strukturelle chromosomale Aberrationen – ein Überblick

1.3.1 Translokationen

Bei einer Translokation kommt es zur Umlagerung von chromosomalem Material zwischen zwei oder mehr verschiedenen Chromosomen (Abbildung 1.3). Ereignen sich dabei weder Verluste noch Zugewinne, spricht man von einer balancierten Translokation. Sind bei dieser Umlagerung, wie in den Mehrzahl der Fälle, nur zwei Chromosomen beteiligt, wird die Translokation als reziprok bezeichnet. Die Träger einer solchen balancierten reziproken Translokation sind in der Regel phänotypisch unauffällig, sodass die Translokation über mehrere Generationen hinweg vererbt werden und unbemerkt bleiben kann. In einem solchen Fall spricht man auch von einer familiären Translokation (KOSKINEN *et al.* 1993). Entdeckt werden diese Translokationsträger häufig erst dann, wenn im Rahmen eines unerfüllten Kinderwunsches eine Chromosomenanalyse veranlasst bzw. eine Chromosomenanalyse zur Ursachenklärung von habituellen Aborten oder einem Dysmorphie-Syndrom bei einem geborenen

Kind durchgeführt wird. Die Wahrscheinlichkeit, Träger einer balancierten reziproken Translokation zu sein, beträgt etwa 1:500 in der Bevölkerung (VAN DYKE *et al.* 1983; JACOBS *et al.* 1992).

Bei unbalancierten Translokationen resultieren in Abhängigkeit von der Größe der chromosomalen Imbalancen und auch von deren genetischem Gehalt Karyotypen, die zu Fehl- und Totgeburten oder zu Kindern mit teils schwerwiegenden Dysmorphie-Syndromen führen. Das Risiko für das Auftreten eines durch eine Translokation bedingten Dysmorphie-Syndroms ist abhängig von den beteiligten Chromosomen bzw. genauer vom Bruchpunkt auf den jeweiligen Chromosomen und kann bei kleiner 1 Prozent bis in seltenen Fällen über 20 Prozent liegen.

Auch eine balancierte Translokation kann phänotypisch in Erscheinung treten, wenn im Bruchpunktbereich aktive Gene unterbrochen und somit in ihrer Funktionen verändert werden.

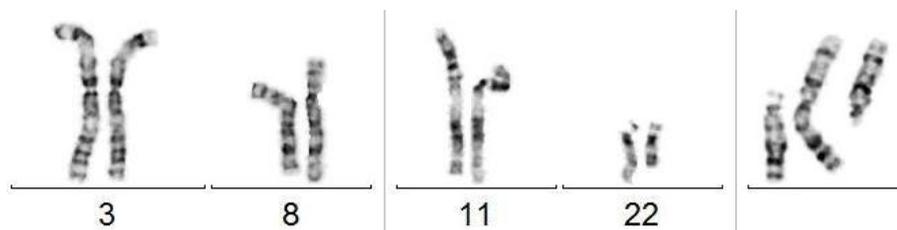


Abb. 1.3: Translokationen.

Links: $t(3;8)(p25;q24.3)$ bei einer 30 Jahre alten Frau, die sich wegen einer Fehlgeburt, einer früh verstorbenen Schwester und einem Kind mit Verdacht auf ein Dysmorphie-Syndrom zur genetischen Beratung vorstellte.

Mitte: $t(11;22)(q23.3;q11.2)$ bei einem etwa 3 Jahre altem Jungen mit Entwicklungsretardierung.

Rechts: Hierbei handelt es sich um eine sogenannte Robertsonsche Translokation $rob(13;14)(q10;q10)$ bei einer 35 Jahre alten Frau, deren Chromosomen nach zwei Frühaborten untersucht wurden, wobei einer der beiden Aborte dieselbe Translokation aufwies. Robertsonsche Translokationen betreffen definitionsgemäß ausschließlich akrozentrische Chromosomen und sind durch eine Fusion beider beteiligter Chromosomen im Zentromerbereich unter Verlust der Satellitenregionen gekennzeichnet.

1.3.2 Insertionen

Wird ein chromosomales Fragment innerhalb eines Chromosoms eingefügt, so spricht man von einer Insertion. Dies kann beispielsweise bei Umbauten im Rahmen von reziproken Translokationen geschehen. Analog zu den Translokationsträgern sind Insertionsträger phänotypisch in der Regel unauffällig, wobei auch hier die Gefahr der Entstehung unbalancierter Karyotypen während der Meiose besteht. Die Abbildung 1.4 zeigt eine dieser seltenen Aberrationen. Man nimmt an, dass interchromosomale Insertionen mit einer Häufigkeit von 1:80.000 auftreten (VAN HEMEL and EUSSEN 2000).

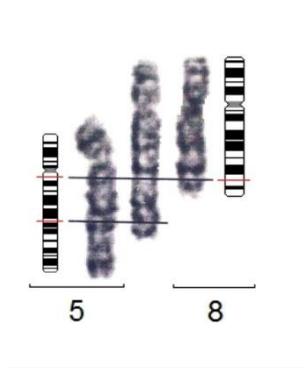


Abb. 1.4: Insertionen.

ins(8;5)(q24.1;q11.2q22) bei einem 4,5 Jahre alten Jungen mit Pulmonalatresie, Ventrikelseptumdefekt, Mikrozephalie und Entwicklungsretardierung bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen einer Mikrodeletion 22q11.2. Mittels M-FISH und der Hybridisierung regionspezifischer DNA-Sonden konnte das zusätzliche chromosomale Material im verlängerten langen Arm eines der beiden Chromosomen 8 als Teil des langen Arms von Chromosom 5 identifiziert werden, was zu einer partiellen Trisomie der Region 5q11.2→5q22 führt.

1.3.3 Duplikationen

Die Verdopplung eines Chromosomenabschnitts wird als Duplikation bezeichnet und führt zu einer partiellen Trisomie der betroffenen Region (Abbildung 1.5). Ursächlich dafür ist ein sogenanntes ungleiches *cross-over*, das zur Deletion des betreffenden Chromosomenabschnitts auf dem einen Chromosom und zur Insertion dieses Abschnitts auf dem anderen, homologen Chromosom führt. Begünstigt wird dieser Prozess häufig durch repetitive, also in vielen Kopien hintereinander vorliegende Sequenzen, wie sie über das gesamte Genom verteilt vorkommen, in besonders hoher Dichte jedoch in den heterochromatischen Regionen der Chromosomen (segmentelle Duplikationen und sogenannte *low copy repeats* der perizentromerischen und subtelerischen Regionen). Ein weiterer Mechanismus ist die Duplikation eines Chromosomenabschnitts beim Kind, welcher bei einem Elternteil in invertierter Form vorliegt. Dies ist beispielsweise für den kurzen Arm des Chromosoms 8 (GORINATI *et al.* 1991; TONK *et al.* 2001) oder den langen Arm des Chromosoms 14 (MCGEE *et al.* 1981) beschrieben. Wird der Abschnitt eines Chromosoms dupliziert, in dem die Zentromerregion liegt, kommt es zur Entstehung von isozentrischen Chromosomen mit zwei Zentromeren, wobei eines der beiden Zentromere in der Regel funktionell stillgelegt wird.

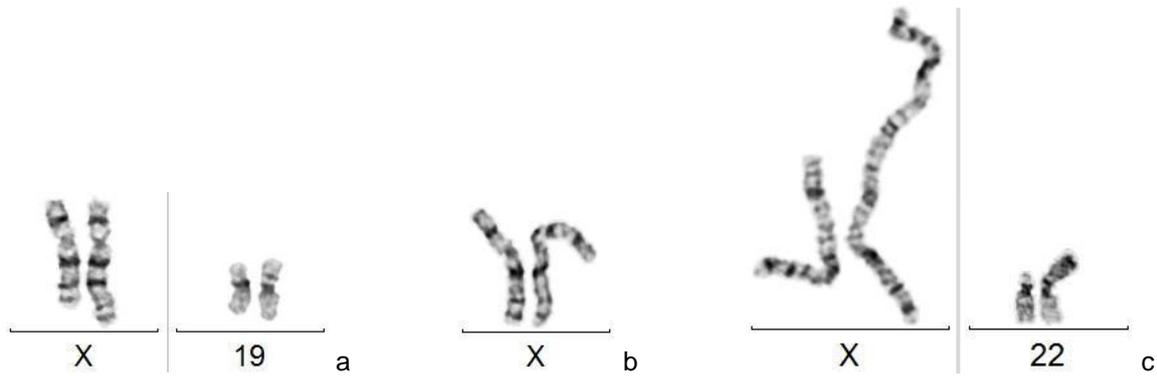


Abb. 1.5: Duplikationen.

a. Chromosomen mit einfachen Duplikationen.

Links: $\text{dup}(X)(q13.1q22.1)$ bei einer zum Beratungstermin 31 Jahre alten Frau, die sich zur Überprüfung eines anfangs der 1980er Jahre erhobenen Chromosomenbefundes mit nicht näher charakterisiertem derivativen X-Chromosom vorstellte. Der Grund für die damals im Alter von 7 Jahren durchgeführte Chromosomenanalyse war ein Kleinwuchs bei Schuleintritt.

Rechts: $\text{dup}(19)(p13.1p13.2)$ bei einem 7 Monate alten Jungen mit motorischer Entwicklungsretardierung und auffälliger Fazies (die Chromosomen wurden freundlicherweise von Gabi Lederer, die klinischen Angaben von Dr. rer. nat. Sabine Langer-Freitag, beide Institut für Humangenetik der TU München, zur Verfügung gestellt).

b. Chromosomen mit invertierten und duplizierten Bereichen.

$\text{inv dup}(X)(\text{pter} \rightarrow p11.2::p11.2 \rightarrow p22.3::p11.2 \rightarrow \text{qter})$ bei einem 2 Jahre alten Mädchen mit Entwicklungsretardierung, Minderwuchs und Muskelhypotonie. Die hier benutzte Schreibweise für die Aberration dient der detaillierten Beschreibung der Bruchpunkte sowie der Abfolge der Chromosomensegmente.

c. Chromosomen mit zwei Zentromeren.

Links: $\text{idic}(X)(p22.3)$, ein durch Duplikation entstandenes isozentrisches Chromosom X mit zwei vom selben Chromosom stammenden Zentromeren bei einer 42 Jahre alten Frau mit Verdacht auf primäre Ovarialinsuffizienz.

Rechts: Zum Vergleich ein $\text{dic}(Y;22)(p11.3;p13)$, ein durch Translokation entstandenes dizentrisches Chromosom mit zwei von verschiedenen Chromosomen (Y und 22) stammenden Zentromeren, bei einem 13 Jahre alten Mädchen mit dem klinischen Verdacht auf ein Ullrich-Turner-Syndrom. Es lag ein chromosomales Mosaik vor, bei dem etwa 3 % aller untersuchten Zellen das dizentrische Chromosom aufwiesen, welches molekularzytogenetisch bestätigt die PAR1- sowie die SRY-Region enthielt. Die restlichen 97 % der Zellen zeigten eine X0-Konstellation.

1.3.4 Deletionen

Deletionen (Abbildung 1.6) sind Verluste von chromosomalem Material entweder am Ende (terminale Deletion) oder innerhalb eines Chromosoms (interstitielle Deletion). Auch hier findet ungleiches *cross-over* statt, wobei anders als bei den Duplikationen eine Monosomie des betreffenden Chromosomenabschnitts resultiert.

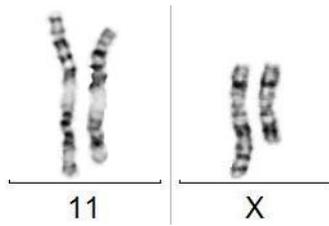


Abb. 1.6: Deletionen.

Links: del(11)(q23.3) bei einem 13 Tage alten männlichen Säugling, bei dem eine pränatal in kultivierten Amnionzellen gefundene terminale Deletion am langen Arm des Chromosoms 11 postnatal in einer Lymphozytenkultur bestätigt werden sollte.

Rechts: del(X)(q22) bei einer fast 15 Jahre alten Jugendlichen, deren Chromosomen wegen Kleinwuchs und ausbleibender Menarche bei Verdacht auf ein Ullrich-Turner-Syndrom untersucht wurden. Es fand sich ein chromosomales Mosaik, bestehend aus 25 % Zellen mit 45,X0 und 75 % Zellen mit 46,X,del(X)(q22).

Liegt die Größe der Deletion unter der lichtmikroskopischen Auflösungsgrenze von ca. 5 Megabasenpaaren, spricht man von einer submikroskopischen oder Mikrodeletion. Diese entsteht vorwiegend durch nicht homologe Rekombination zwischen repetitiven Sequenzen während der Meiose. Für einige Chromosomen sind Mikrodeletionen beschrieben, die mit charakteristischen Phänotypveränderungen einhergehen. In diesem Zusammenhang spricht man von Mikrodeletionssyndromen. Um diese nachzuweisen, bedient man sich Techniken wie der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH, siehe Abschnitt 2.6). Ein Beispiel für ein solches Mikrodeletionssyndrom ist das DiGeorge-Syndrom (SCAMBLER *et al.* 1991; DRISCOLL 2006), das durch interstitiellen Verlust von chromosomalem Material auf Chromosom 22 verursacht wird (Mikrodeletion 22q11.2, Abbildung 1.7). Als ursächlich für den Phänotyp konnten Veränderungen im TBX1-Gen identifiziert werden (ZWEIER *et al.* 2007; STEIN 2009).

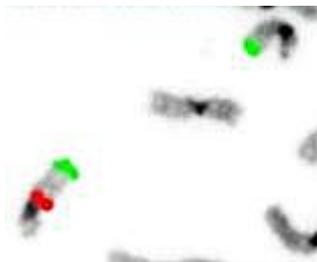


Abb. 1.7: Mikrodeletionen.

Mikrodeletion 22q11.2 bei einem 4 Monate alten Säugling mit klinischem Verdacht auf ein Mikrodeletionssyndrom. Auf einem der beiden Chromosomen 22 fehlt das Signal für die TUPLE1-Region (rot). Die ARSA-Kontrollregion (grün) ist dagegen auf beiden Chromosomen nachweisbar.

Betrifft eine Deletion mehrere hintereinander liegende Gene, wird auch von einem sogenannten *contiguous gene syndrome* gesprochen. Die dabei zu beobachtenden atypischen Phänotypen resultieren aus dem Zusammenspiel verschiedener monogener Erkrankungen. Kommt es beispielsweise in 8q24.1 zur Deletion der beiden nah benachbarten Gene EXT1 und TRPS1, folgt daraus die Bildung von multiplen kartilaginären Exostosen sowie von Zapfenepiphysen. Phänotypisch ergibt dies das Bild eines Giedion-Langer-Syndroms, eines klassischen *contiguous gene syndromes* (SHIN and CHANG 2001).

1.3.5 Ringchromosomen

Wie der Name sagt, bildet das betroffene Chromosom bei dieser Strukturaberration einen Ring (GUILHERME *et al.* 2012; GUILHERME *et al.* 2013). Dieses Phänomen der Ringbildung (Abbildung 1.8)

wird als Reparaturmechanismus verstanden, der bei Deletionen beider terminalen Regionen eines Chromosoms auftritt. Durch den Ringschluss wird ein weiterer Abbau von chromosomalem Material (und damit der Verlust von genetischer Information) an den ungeschützten Enden des Chromosoms durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme verhindert. Die klinische Relevanz eines Ringchromosoms hängt von der Größe, der Dichte und der Funktion der Gene („haploinsuffiziente Gene“) in der verlorengegangenen Chromosomenregion ab. Darüber hinaus erfolgt gegebenenfalls keine stabile Weitergabe des Ringchromosoms während der Mitose an die Tochterzellen. Somit wird der Phänotyp nicht allein durch die deletierte chromosomale Region bestimmt, sondern es kann auch zum Auftreten von Monosomien durch Verlust des Ringchromosoms kommen. Zu erwarten sind hier komplexe Dysmorphie-Syndrome und mentale Retardierung.

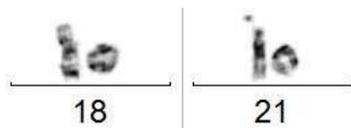


Abb. 1.8: Ringchromosomen.

Links: r(18)(p11.3q23) bei einem etwa 4,5 Jahre alten Jungen mit Verdacht auf Hypomelanosis Ito. Das Ringchromosom war Bestandteil eines chromosomalen Mosaiks: 85 % der analysierten Zellen zeigten einen unauffälligen Karyotyp, bei 3 % der Zellen fand sich eine Monosomie 18 und in 12 % der Zellen konnte das Ringchromosom nachgewiesen werden.

Rechts: r(21)(p11q22.3) bei einem etwa 2,5 Jahre alten Mädchen mit dem klinischen Verdacht auf ein Ullrich-Turner-Syndrom.

1.3.6 Isochromosomen

Zur Entstehung eines Isochromosoms kommt es, wenn statt der longitudinalen Teilung des Zentromers eine transversale Teilung erfolgt. In diesem Fall werden nicht die beiden Chromatiden eines Chromosoms getrennt, sondern dessen kurzer vom langen Arm. In den Tochterzellen wird dann der kurze bzw. lange Arm dupliziert, der jeweils andere Arm geht verloren. Das Ergebnis dieser Duplikation wird als Isochromosom, bestehend aus zwei am Zentromer zusammengehaltenen kurzen bzw. langen Armen, bezeichnet. Für den duplizierten Chromosomenabschnitt liegt dann eine partielle Trisomie, für den verlorengegangenen Abschnitt hingegen eine partielle Monosomie vor.

Häufig handelt es sich bei Isochromosomen um zwei lange Arme des X-Chromosoms (Abbildung 1.9), wobei dann in den betroffenen Zellen eine Monosomie für den kurzen Arm des X-Chromosoms besteht. Dieser Zustand äußert sich phänotypisch als Variante des Ullrich-Turner-Syndroms (JACOBS *et al.* 1997; BASU *et al.* 2013).

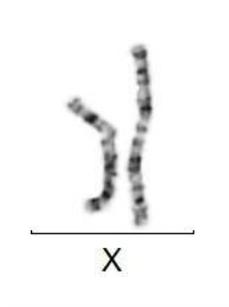


Abb. 1.9: Isochromosomen.

$i(X)(q10)$ bei einem 2 Jahre alten Mädchen mit dem klinischen Verdacht auf ein Ullrich-Turner-Syndrom.

1.3.7 Markerchromosomen

Markerchromosomen werden alle die Chromosomen genannt, die zunächst nicht eindeutig identifiziert werden können. Sie können prinzipiell von jedem der 24 menschlichen Chromosomen abstammen und werden durch Einsatz der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit DNA-Sonden oder unter Verwendung von Array-basierter vergleichender genomischer Hybridisierung (aCGH, *array-based comparative genomic hybridization*) charakterisiert. Mit einer Häufigkeit von 0,03 Prozent werden sie bei Neugeborenen gefunden, bei Individuen mit mentaler Retardierung findet man sie mit etwa 0,3 Prozent 10 mal so häufig (BUCKTON *et al.* 1985; BLENNOW *et al.* 1995).

Von klinischer Bedeutung sind vor allem die als *small supernumerary marker chromosomes* (sSMC) bezeichneten kleinen überzähligen Markerchromosomen, deren klinische Relevanz abhängig von ihrer Herkunft ist. Enthalten sie ausschließlich Heterochromatin und repetitive DNA-Sequenzen, verhalten sie sich klinisch stumm, während bei euchromatischen Anteilen in der Regel mit phänotypischen Auswirkungen aufgrund der chromosomalen Imbalancen zu rechnen ist. Der Phänotyp der betroffenen Individuen kann dabei selbst bei (molekular-)zytogenetisch gleich erscheinenden Markerchromosomen stark variieren, was unter anderem daran liegt, dass die Markerchromosomen häufig in Mosaiken vorliegen (BUCKTON *et al.* 1985; URIOSTE *et al.* 1994; CROLLA *et al.* 1997; BERGMAN and BLENNOW 2000). Als chromosomales Mosaik bezeichnet man das gleichzeitige Vorliegen von zwei oder mehr Zelllinien nebeneinander in einem Individuum (vergleiche hierzu auch die Abbildung 1.5c).

Fast die Hälfte aller beobachteten Markerchromosomen stammen von akrozentrischen Chromosomen ab, wobei Derivate des Chromosoms 15 mit etwa 30 Prozent den größten Anteil ausmachen (BLENNOW *et al.* 1995). Weitere etwa 17 Prozent sind Derivate des Chromosoms 22, wobei ein aus invertierten und duplizierten Anteilen von Chromosom 22 bestehendes überzähliges Markerchromosom ein eigenes Syndrom definiert, das sogenannte *cat eye*-Syndrom (MEARS *et al.* 1994; MEARS *et al.* 1995). Das Pallister-Killian-Syndrom ist ein weiteres, durch ein Markerchromosom verursachtes Syndrom, bei dem in Geweben epidermalen Ursprungs ein chromosomales Mosaik aus einer normalen Zelllinie und einer Zelllinie mit einem zusätzlichen Isochromosom, bestehend aus zwei kurzen Armen des Chromosoms 12, gefunden wird (SCHINZEL 1991). Die Abbildung 1.10 zeigt zwei Beispiele für Markerchromosomen.

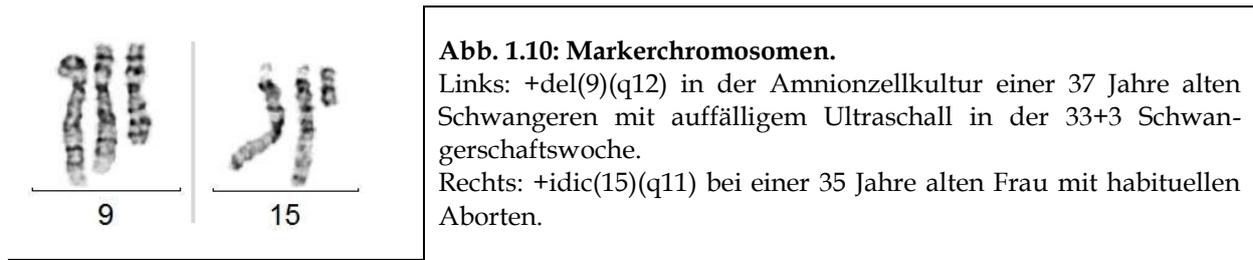


Abb. 1.10: Markerchromosomen.

Links: +del(9)(q12) in der Amnionzellkultur einer 37 Jahre alten Schwangeren mit auffälligem Ultraschall in der 33+3 Schwangerschaftswoche.

Rechts: +idic(15)(q11) bei einer 35 Jahre alten Frau mit habituellen Aborten.

1.3.8 Fragile Stellen (*fragile sites*; brüchige Stellen)

Als fragile Stelle wird eine chromosomale Region bezeichnet, in der eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Bruchereignisses besteht (Abbildung 1.11). Diese Region besteht aus repetitiven, sich in vielen hundert Kopien wiederholenden DNA-Sequenzen. Unter normalen Kulturbedingungen sind fragile Stellen nur selten lichtmikroskopisch zu beobachten, allerdings können sie durch besondere Kulturbedingungen induziert werden (Unterbrechung des Zellzyklus durch Hemmung der Dihydrofolatreduktase mittels Methotrexat, siehe auch Absatz 2.2.1). Mittlerweile sind über 50 solcher fragilen Stellen bekannt, wobei einige von ihnen an speziellen, klinisch relevanten Stellen auftreten.

Eine der häufigsten Ursachen für kongenitale mentale Retardierung im männlichen Geschlecht wird durch eine fragile Stelle auf dem X-Chromosom verursacht, das Fragile-X-Syndrom (WEINHAUSEL and HAAS 2001). Die fragile Stelle FRAXA befindet sich in Xq27.3 und besteht aus einer Wiederholungssequenz von CCG-Trinukleotiden im 5'-nicht-kodierenden Teil des FMR1-Gens (*fragile X mental retardation 1-Gen*). Je länger die Wiederholungssequenz des CCG-Trinukleotids ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Region durch Methylierung inaktiviert und das FMR1-Gen somit in seiner Funktion komplett stillgelegt wird.

Geht der distale Abschnitt des Chromosoms 11 durch Bruch in der als FRA11B bezeichneten fragilen Stelle in 11q23.3 verloren, manifestiert sich dieser Verlust phänotypisch als Jacobsen-Syndrom (MATTINA *et al.* 2009), zu sehen in Abbildung 1.6.

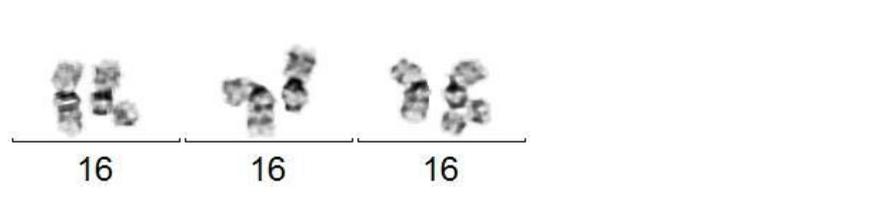


Abb. 1.11: Fragile Stellen (*fragile sites*).

fra(16)(q22) bei einem 16 Tage alten Säugling mit Dismorphie-Zeichen. Die fragile Stelle im langen Arm des Chromosoms 16 war zytogenetisch in 22 % aller analysierten Zellen nachweisbar.

Anmerkung: Das linke der drei Chromosomenpaare zeigt das noch mit dem Chromosom 16 verbundene Bruchfragment. Normalerweise geht es während der Zellteilung verloren, sodass nur noch ein deletiertes Chromosom nachgewiesen werden kann (mittleres Chromosomenpaar). Sollte das Bruchfragment während der Zellteilung weiterhin mit einer der beiden Chromatiden verbunden bleiben, wird es nachfolgend komplett repliziert und lässt sich – wie beim rechten Chromosomenpaar zu sehen – als kurios imponierendes Replikationsartefakt in der Tochterzelle nachweisen (Rarität).

1.3.9 Inversionen

Inversionen (von lat. *inversio*, Umstellung oder Umkehrung) sind durch zwei oder mehr Bruchereignisse innerhalb eines Chromosoms gekennzeichnet, was mindestens zu drei Chromosomenfragmenten führt. Anders als bei den Translokationen lagern sich diese Bruchstücke nicht mit Bruchstücken anderer Chromosomen zusammen, sondern verbinden sich wieder untereinander. Während Inversionen bei COLLODEL *et al.* (2006) mit einer Häufigkeit von 0,012 Prozent zu den seltener bei Neugeborenen gefundenen Aberrationen zählen, gibt SALIHU *et al.* (2001) ihre Häufigkeit mit 1 bis 2 Prozent an.

Von nur akademisch-theoretischem Interesse ist der Idealfall, bei dem sich die Bruchstücke in der ursprünglichen Reihenfolge wieder zusammenlagern. Unter der Voraussetzung, dass hierbei vor der Wiedervereinigung kein Verlust von genetischem Material an den Enden der Bruchfragmente stattgefunden hat, bleibt dieses Ereignis ohne Konsequenzen für das betroffene Individuum. Ein solches Ereignis ist im nachhinein nicht mehr nachweisbar, liefert aber interessante Ansätze für die *de novo*-Entstehung von beispielsweise submikroskopischen Aberrationen (Mikrodeletionen) und soll deshalb nicht unerwähnt bleiben.

Im Regelfall kommt es bei einer zytogenetisch nachweisbaren Inversion zum Einbau des mittleren der drei Bruchfragmente in umgekehrter Richtung. Bei dieser 180 Grad-Drehung eines Teils des Chromosoms wird der Gehalt an genetischer Information im Sinne eines Verlusts oder Zugewinns nicht verändert, weshalb Inversionen zu den balancierten Strukturaberrationen gerechnet werden. Mit Auswirkungen auf den Phänotyp eines Individuums muss wie bei den Translokationen immer dann gerechnet werden, wenn es zur funktionellen Beeinträchtigung von Genen im Bruchpunktbereich kommt. Außerdem spielt die Größe des Inversionssegments eine Rolle, die mindestens 30 Prozent der Chromosomenlänge betragen muss, um ein erhöhtes Risiko für die Entstehung aberranter Karyotypen bei den Nachkommen zu haben (TRUNCA and OPITZ 1977; WINSOR *et al.* 1978).

Inversionen werden bezogen auf ihre Lage zum Zentromer in zwei Gruppen eingeteilt. Liegen beide Bruchpunkte auf einer Seite des Zentromers, also im kurzen oder im langen Arm des betroffenen Chromosoms, so wird dies als parazentrische Inversion bezeichnet (von griech. *παρά*, neben). Findet sich dagegen je ein Bruchpunkt im kurzen und im langen Arm des Chromosoms und damit beidseits des Zentromers, spricht man von einer perizentrischen Inversion (von griech. *περί*, um ... herum).

Unabhängig von der Art der Inversion können während der Meiose gravierende chromosomale Umbauten stattfinden, die sowohl Keimzellen mit balancierten als auch mit unbalancierten Karyotypen zur Folge haben. Um eine Paarung homologer, also sich entsprechender Chromosomensegmente während der Meiose I zu gewährleisten, bildet sich unter Verdrehung des invertierten Chromosoms eine sogenannte Inversionsschleife aus (vergleiche hierzu die Abbildungen 1.13 und 1.15). Das im Bereich dieser Schleife stattfindende *cross-over* führt neben der Neuordnung der genetischen Information in der betroffenen chromosomalen Region auch zu unter Umständen schwerwiegenden, überaus komplexen Umbauprozessen wie Deletionen und/oder Duplikationen mit oder ohne Abbruch der Meiose. Die daraus resultierenden klinischen Folgen sind vielfältig (siehe weiter unten).

Wie eingangs erwähnt befinden sich bei den perizentrischen Inversionen die Bruchpunkte auf beiden Seiten des Zentromers. Bei der lichtmikroskopischen Chromosomenanalyse ergeben sich daraus zwei Möglichkeiten, eine solche Inversion zu entdecken. Sind die Bruchpunkte unterschiedlich weit vom Zentromer entfernt, so zeigt das aberrante Chromosom im Vergleich zum unveränderten Partnerchromosom eine veränderte Lage des Zentromers. Andererseits bleibt die Lage des Zentromers im Vergleich zum Partnerchromosom unverändert, wenn beide Bruchpunkte denselben Abstand zum Zentromer haben. In diesem Fall kann die Inversion nur aufgrund einer veränderten Reihenfolge des Bandenmusters identifiziert werden. Eine Aussage bezüglich der klinischen Relevanz lässt sich daraus nicht ableiten. Die Abbildung 1.12 zeigt drei Beispiele für perizentrische Inversionen.

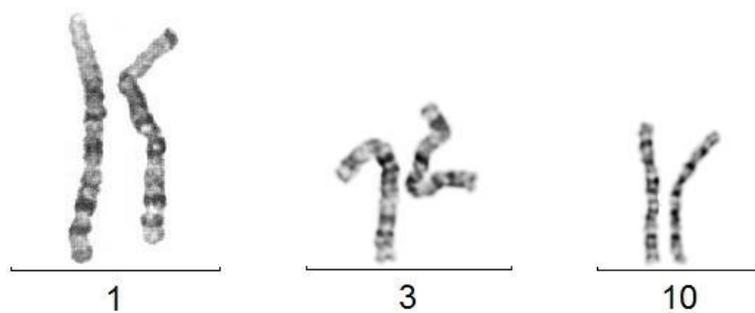


Abb. 1.12: Perizentrische Inversionen am Beispiel der Chromosomen 1, 3 und 10.

Links: $\text{inv}(1)(\text{p}36.3\text{q}42.3)$ bei einer 28 Jahre alten Frau, die Mutter zweier Kinder mit kongenitalen Malformationen ist.

Mitte: $\text{inv}(3)(\text{p}11\text{q}11)$ bei einer 44 Jahre alten Frau mit unerfülltem Kinderwunsch.

Rechts: $\text{inv}(10)(\text{p}11.2\text{q}21.2)$ bei einer 36 Jahre alten Frau mit unerfülltem Kinderwunsch.

(Die Chromosomenpräparate der Inversionen 3 und 10 bei Ratsuchenden mit unerfülltem Kinderwunsch wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Birgit Becker, die klinischen Angaben von Dr. med. Dr. rer. nat. Claudia Neviny-Stickel-Hinzpeter, beide MVZ Humane Genetik, synlab München, zur Verfügung gestellt.)

Während der ebenfalls bereits oben erwähnten Ausbildung der Inversionsschleife bei der ersten meiotischen Teilung und dem anschließenden *cross-over* kommt es zur Entstehung von vier theoretisch möglichen Arten von Keimzellen. In der Abbildung 1.13 ist zu erkennen, dass neben einer normalen Keimzelle und einer Keimzelle mit balanciertem Zustand (identisch mit der ursprünglichen Inversion) auch zwei Keimzellen mit unbalancierten Aberrationen entstehen können (vergleiche hierzu auch Absatz 1.3.10). Sofern diese Keimzellen überlebensfähig sind und nicht durch regulatorische Mechanismen bereits in diesem Stadium in die Apoptose getrieben werden, bilden sie den Ausgangspunkt für Zellen mit Karyotypen, die segmentelle Imbalancen im Sinne von Deletionen oder Duplikationen bestimmter Chromosomenregionen aufweisen werden (MOZDARANI *et al.* 2007). Einen entscheidenden Einfluss darauf, ob es zur Bildung von unbalancierten Keimzellen kommt, scheint die Größe der ursprünglichen Inversion zu haben (CAER *et al.* 2008; DESCIPIO *et al.* 2010). Desweiteren ist bei unbalan-

cierten Zuständen mit hoher Wahrscheinlichkeit von Auswirkungen auf den Phänotyp des betroffenen Individuums auszugehen.

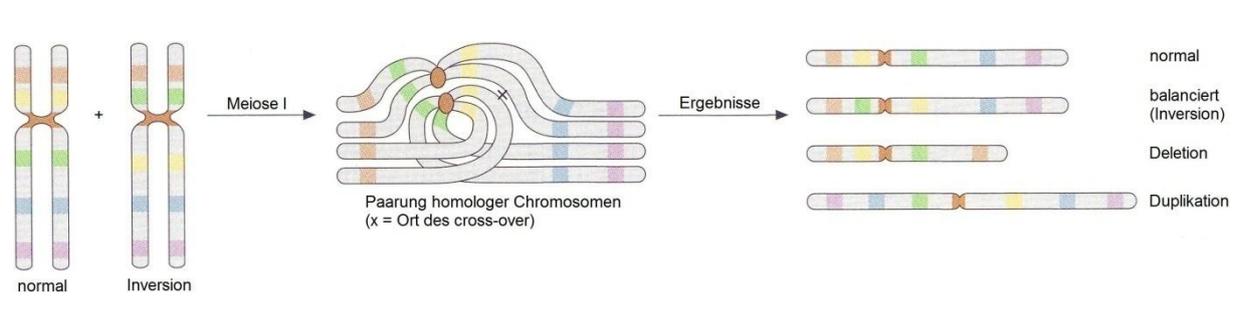


Abb. 1.13: Inversionsschleife während der Meiose I bei der perizentrischen Inversion und resultierende Aberrationen in Keimzellen (modifiziert aus: Taschenlehrbuch Humangenetik, 7. Auflage, Thieme Verlag).

Bei den parazentrischen Inversionen ist das Zentromer nicht Bestandteil des Inversionssegments, weshalb hier eine veränderte Position des Zentromers nicht als Indiz für das Vorliegen dieser Art von Aberration dienen kann. Die einzige lichtmikroskopische Möglichkeit zur Identifizierung von parazentrisch invertierten Chromosomenabschnitten besteht im Vergleich des Bandenmusters auf beiden homologen Chromosomen. Kommt es zur Inversion nur einer einzigen Bande, so kann dies mit den Mitteln der chromosomalen Bänderungstechnik nicht erkannt werden. In Abbildung 1.14 sind beispielhaft drei verschiedene parazentrische Inversionen den langen Arm des Chromosoms 7 betreffend dokumentiert.

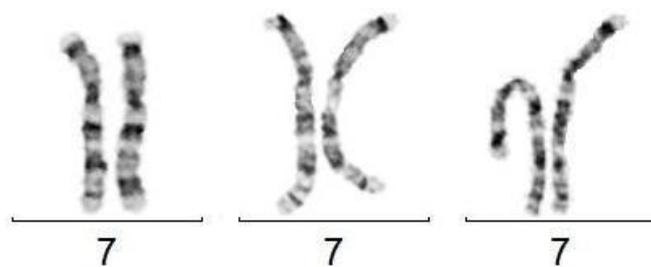


Abb. 1.14: Parazentrische Inversionen im langen Arm des Chromosoms 7.

Links: $inv(7)(q22q36)$ bei einer 36 Jahre alten Frau mit habituellen Aborten.

Mitte: $inv(7)(q11.23q22)$ bei einem 41 Jahre alten Mann, bei dem zum Ausschluss einer Chromosomentranslokation bei unerfülltem Kinderwunsch eine Chromosomenanalyse durchgeführt wurde.

Rechts: $inv(7)(q21.3q31.3)$ bei einem 5 Monate alten Mädchen, bei dem eine Trisomie 21 bei bestehender Leberzirrhose mit venöser okklusiver Leberkrankheit und akuter myeloischer Leukämie ausgeschlossen werden sollte.

Genau wie bei den perizentrischen Inversionen entstehen auch bei den parazentrischen Inversionen durch die Schleifenbildung und das anschließende *cross-over* unveränderte und balancierte Keimzellen

(Abbildung 1.15). Im Unterschied zu den perizentrischen Inversionen gehen bei den parazentrischen Inversionen zusätzlich dizentrische Chromosomen mit zwei Zentromeren sowie sogenannte azentrische Fragmente ohne Zentromer hervor (MADAN 1995). Beide werden in den späteren mitotischen Zellteilungen entweder gar nicht oder nur unregelmäßig auf die Tochterzellen verteilt und gehen infolge dessen verloren. Die so verursachte genetische Imbalance ist meist so groß, dass eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen Frühabort besteht (FRYNS *et al.* 1986; MADAN 1995).

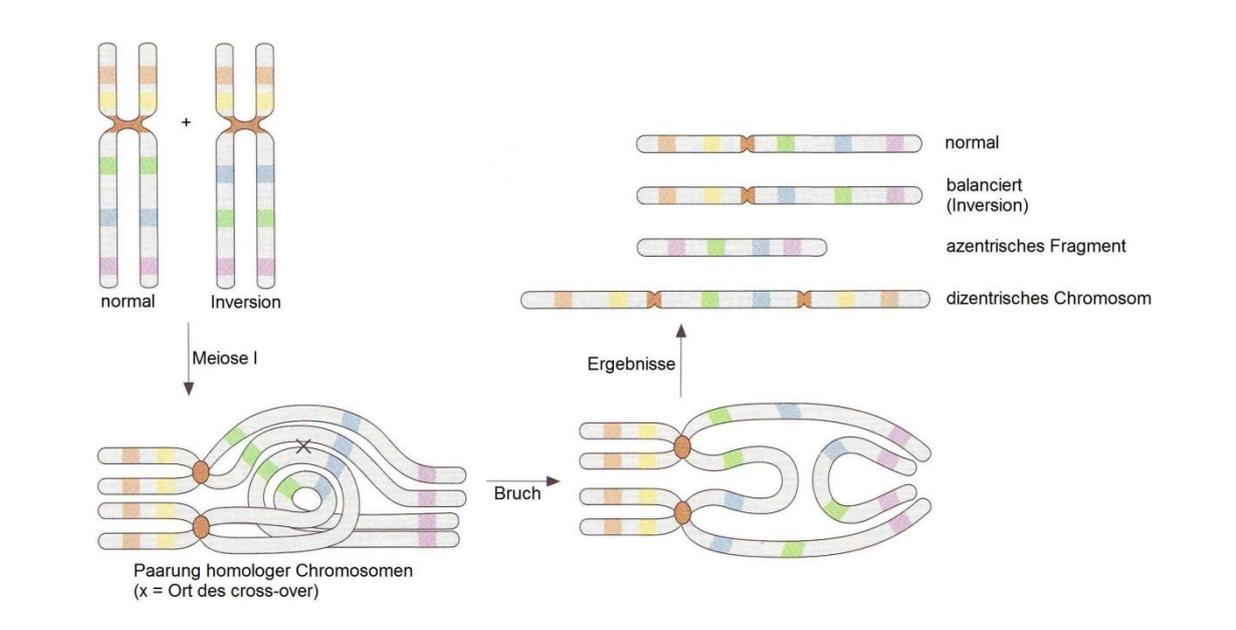


Abb. 1.15: Inversionsschleife während der Meiose I bei der parazentrischen Inversion und resultierende Aberrationen in Keimzellen (modifiziert aus: Taschenlehrbuch Humangenetik, 7. Auflage, Thieme Verlag).

1.3.10 Klinische Manifestationen von Inversionen und rekombinanten Chromosomen

Viele Individuen mit Inversionen sind phänotypisch unauffällig und werden erst im Rahmen von Chromosomenuntersuchungen bei Infertilität und unerfülltem Kinderwunsch entdeckt, wobei die Inversion auch dann nicht zwingend die Ursache für die Kinderlosigkeit sein muss. Für alle menschlichen Chromosomen lassen sich in der Fachliteratur Fallbeschreibungen von Inversionen in Verbindung mit Infertilität und unerfülltem Kinderwunsch finden, beispielsweise für Chromosom 1 bei GIRALDO *et al.* (1981), TOTH *et al.* (1982), GABRIEL-ROBEZ *et al.* (1986), JOHNSON *et al.* (1988), MESCHEDE *et al.* (1994), CHANTOT-BASTARAUD *et al.* (2007) und KIRKPATRICK *et al.* (2012), für Chromosom 2 bei DJALALI *et al.* (1986), DEVINE *et al.* (2000) und VUJISIC *et al.* (2005), für Chromosom 3 bei KASAI *et al.* (1985), für Chromosom 7 bei NAVARRO *et al.* (1993) und ICHIOKA *et al.* (2005), für Chromosom 8 bei HERVA AND DE LA CHAPELLE (1976), für Chromosom 13 bei BATEMAN *et al.* (1986), für Chromosom 19 bei DALLAPICCOLA *et al.* (1986) und D'ALESSANDRO *et al.* (1988), für Chromosom 20 bei JENDERNY *et al.*

(1992), für Chromosom 21 bei MALAN *et al.* (2006) und für das Y-Chromosom bei TOMOMASA *et al.* (2000) und KNEBEL *et al.* (2011).

Inversionen werden auch bei phänotypisch unauffälligen Feten beschrieben, deren Zellen nach Amniozentese untersucht werden, weil entweder eine Risikoschwangerschaft wegen erhöhtem mütterlichen Alter besteht wie beschrieben etwa bei KASSAM *et al.* (1984), MACDONALD and COX (1985), GRASS *et al.* (1987) und BELL *et al.* (1991), oder weil erhöhte Serumwerte im Triple-Test vorliegen wie beispielsweise nachzulesen bei COUZIN *et al.* (1986) und WENGER *et al.* (1999). Die Abschätzung des Risikos, ob eine solche Inversion bei einem ungeborenen Kind Auswirkungen auf den Phänotyp nach der Geburt haben wird, ist schwierig. Zunächst sollte durch Untersuchung der Chromosomen beider Eltern geklärt werden, ob die Inversion geerbt wurde oder ob sie neu entstanden ist. Liegt die Inversion bereits bei einem Elternteil vor, ist die Wahrscheinlichkeit für phänotypische Auffälligkeiten beim Kind als geringer einzuschätzen, jedoch kann dies nicht mit Sicherheit gesagt werden, wie die nachfolgenden zwei Beispiele zeigen sollen. Für eine Inversion des Chromosoms 19 beschrieb FAUTH *et al.* (2001) zwei bei Geburt phänotypisch unauffällige Zwillinge, die wegen erhöhtem mütterlichen Alter untersucht wurden. In den kultivierten Amnionzellen fand sich nur bei einem der beiden Feten die von der Mutter geerbte parazentrische Inversion. Andererseits beschrieben EINFELD and SMITH (1982) zwei Brüder mit identischem Phänotyp (Entwicklungsretardierung, Kleinwuchs, auffälliges Gesicht), von denen jedoch nur einer eine parazentrische Inversion eines Chromosoms 11 vom Vater geerbt hatte. Hier liegt nahe, dass die Inversion nicht als ursächlich für die Auffälligkeiten der Brüder anzusehen war bzw. dass weitere Faktoren wie etwa genomisches Imprinting eine Rolle spielten.

Sobald das X-Chromosom von einer Inversion betroffen ist, muss für eine mögliche Auswirkung auf den Phänotyp das Phänomen der X-Inaktivierung in die Beurteilung mit einbezogen werden. KEITGES *et al.* (1982) beschrieben adoptierte, zweieiige, 21 Jahre alte weibliche Zwillinge, die eine identische perizentrische Inversion des X-Chromosoms aufwiesen, sich allerdings hinsichtlich des Phänotyps und der X-Inaktivierung unterschieden. Während die betroffene Schwester Unregelmäßigkeiten im Menstruationszyklus, leicht grobe Gesichtszüge, eine Mikrokornea, leichte mentale Retardierung sowie leichte paranoide Züge (Therapie mit Trifluoperazin) zeigte, war ihre Zwillingsschwester völlig unauffällig. Bei der betroffenen Schwester war das invertierte X-Chromosom in 87 % der untersuchten Lymphozyten und 95 % der untersuchten Fibroblasten inaktiviert, wohingegen bei ihrer nicht betroffenen Zwillingsschwester nur in 37 % der untersuchten Lymphozyten das invertierte X-Chromosom inaktiviert war. In Abhängigkeit der Lage der Bruchpunkte bei Inversionen des X-Chromosoms kann es auch zur Diskrepanz zwischen dem phänotypischen und dem chromosomalen Geschlecht kommen. So berichteten XU *et al.* (2003) über ein Neugeborenes mit einem männlichen Chromosomensatz und einer maternal vererbten parazentrischen Inversion des X-Chromosoms, deren proximaler Bruchpunkt innerhalb des Androgenrezeptor-Gens in Xq11.2 lag und dieses so funktionell unwirksam machte. Das Kind zeigte bei Geburt unauffällige äußere weibliche Genitalien. Im Alter von drei Mona-

ten wurde im Rahmen einer Inguinalhernien-Operation histologisch Hodengewebe nachgewiesen. Nachfolgende Ultraschalluntersuchungen zeigten beidseits im Leistenkanal gelegene eiförmige Strukturen, die mit nicht deszendierten Hoden vereinbar waren. Im kleinen Becken ergab sich kein Hinweis auf das Vorhandensein eines Uterus. Diese Ultraschallbefunde in Verbindung mit unauffälligen Werten für Testosteron, Dihydrotestosteron, FSH und LH als Zeichen einer normalen hypophysären Funktion führten zur Diagnose eines kompletten Androgenrezeptor-Resistenz-Syndroms, dessen Ursache in der bereits erwähnten parazentrischen Inversion des X-Chromosoms lag.

Inversionen verschiedener Chromosomen sind auch in Zusammenhang mit definierten Krankheitsbildern und Syndromen gebracht wurden, wie die folgende Übersicht zeigt:

Ambras-Syndrom	inv(8)(p11.2q22)dn	TADIN-STRAPPS <i>et al.</i> (2004)
Angelman-Syndrom	inv(15)(q11.2q24.3)mat	GREGER <i>et al.</i> (1997)
Bardet-Biedl-Syndrom	inv(1)(p36.3q23)mat	TAYEL <i>et al.</i> (1999)
Beckwith-Wiedemann-Syndrom	inv(11)(p11.2p15.5)mat	NORMAN <i>et al.</i> (1992)
Benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe	inv(5)(p15q11)mat	CONCOLINO <i>et al.</i> (2002)
Brachio-otisches Syndrom	inv(8)(p22q13)dn	SCHMIDT <i>et al.</i> (2014)
FG-Syndrom (Opitz-Kaveggia-Syndrom)	inv(X)(q12q28)mat	BRIAULT <i>et al.</i> (1999)
Hermansky-Pudlak-Syndrom Typ 2	inv(5)(p15.1q13.3)mat, inv(5)(p15.1q13.3)?dn	JONES <i>et al.</i> (2013)
Kabuki-Syndrom	inv(4)(p12pter)mat	FRYNS <i>et al.</i> (1994)
Kardio-fazio-kutanen Syndrom	inv(7)(q21.1q31.2)mat	LOPEZ-RANGEL <i>et al.</i> (1993)
Kleidokranielle Dysplasie	inv(6)(p11q16)	NIENHAUS <i>et al.</i> (1993)
Möbius-Syndrom	inv(8)(q21.3q24.13)	KERSEY <i>et al.</i> (2006)
Muskeldystrophie Duchenne	inv(X)(p21.1q26)mat	SHASHI <i>et al.</i> (1996)
	inv(X)(p11.2p21.2)mat	BAXTER <i>et al.</i> (1997)
	inv(X)(p21.2q28)	TRAN <i>et al.</i> (2013)
Peters-Anomalie	inv(4)(q12q13.3)pat	NEILAN <i>et al.</i> (2006)
Peutz-Jeghers-Syndrom	inv(6)(p11.2q25.1)	MARKIE <i>et al.</i> (1996)
Polyzystische Nierenerkrankung	inv(7)(p22q22)mat	DEMIRHAN <i>et al.</i> (2008)
Rieger-Syndrom	inv(6)(p23q23.1)pat	WENSTROM <i>et al.</i> (1991)
Waardenburg-Syndrom Typ I	inv(2)(q35q37.3)dn	ISHIKIRIYAMA <i>et al.</i> (1989), TSUKAMOTO <i>et al.</i> (1992)
Weill-Marchesani-Syndrom	inv(15)(q13qter)dn	CHUNG <i>et al.</i> (2007)
Zellweger-Syndrom	inv(7)(p12q11.23)dn	NARITOMI <i>et al.</i> (1989)

Es bleibt jedoch unklar, ob die beschriebenen Inversionen tatsächlich ursächlich für das klinische Erscheinungsbild sind, oder ob es sich um unabhängig davon vorliegende Aberrationen handelt. Beispielsweise beschrieben CINGOZ *et al.* (2007) einen 5 Jahre alten Jungen konsanguiner Eltern mit klinischen Symptomen und laborchemischen Befunden eines 11 β -Hydroxylase-Mangels, bei dem eine paternal vererbte perizentrische Inversion des Chromosoms 3 gefunden wurde sowie eine als ursächlich für den Enzymmangel anzusehende Punktmutation im Codon 448 des CYP11B1-Gens (R448C-Mutation) im langen Arm des Chromosoms 8. Andererseits beschrieben JONES *et al.* (2013) ein Mädchen konsanguiner Eltern libanesischer Herkunft mit einem Hermansky-Pudlak-Syndrom Typ 2 und einer perizentrischen Inversion beider Chromosomen 5, bei der einer der beiden Bruchpunkte im AP3B1-Gen lag. Dieses Gen kodiert für die lysosomale AP-3 β 3A-Untereinheit, welche verantwortlich ist für

die Weiterleitung von Transportproteinen in die Lysosomen. Somit führte die Inversion direkt zur funktionellen Inaktivierung eines für das Syndrom verantwortlichen Gens und deckte so dessen Pathomechanismus auf. Über eine funktionelle Inaktivierung des DMD-Gens und die daraus resultierende klinische Erscheinung einer Muskeldystrophie vom Typ Duchenne berichteten sowohl SHASHI *et al.* (1996) als auch BAXTER *et al.* (1997) und TRAN *et al.* (2013). In allen drei Fällen fand sich einer der beiden Bruchpunkte im kurzen Arm des X-Chromosoms in der Bande p21, in der auch das DMD-Gen lokalisiert ist.

Der Phänotyp eines betroffenen Individuums kann nicht in jedem Fall hinreichend durch die gefundene Inversion erklärt werden. In solchen Fällen sind weitergehende Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung der Inversion und hier speziell der Bruchpunktbereiche notwendig. DEVILLARD *et al.* (2010) wiesen bei einem 14 Jahre alten Jungen eine parazentrische Inversion des Chromosoms 2 nach, die zytogenetisch identisch zur ebenfalls bei der Mutter vorliegenden Inversion erschien. Mit Hilfe von Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen und eines SNP-Arrays wurde die Inversion sowohl beim betroffenen Jungen als auch bei der Mutter weiter untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die zytogenetisch identisch präsentierenden Inversionen in zwei Punkten durch kryptische Aberrationen unterschieden: Einerseits zeigte sich im proximalen Bruchpunkt eine Duplikation von etwa 4,2 Megabasenpaaren, andererseits fand sich eine Deletion von etwa 3,5 Megabasenpaaren im distalen Bruchpunkt. Der Phänotyp des Jungen (u.a. Autismus, leichte faziale Dysmorphiezeichen, Kleinwuchs bei Wachstumshormonmangel) lässt sich somit am wahrscheinlichsten auf die durch segmentelle Imbalancen verursachten partiellen Monosomien bzw. Trisomien zurückführen. Einen weiteren Fall mit kryptischen Aberrationen bei einer *de novo*-Inversion des Chromosoms 14 beschrieben JIANG *et al.* (2008) bei einem Jungen mit Entwicklungsretardierung und leichten Dysmorphiezeichen. In beiden Bruchpunkten des parazentrisch invertierten Chromosoms 14 fanden sich in der aCGH Deletionen in der Größenordnung von 0,8 bzw. 0,9 Megabasenpaaren. Zusätzlich wurde eine 1,3 Megabasenpaare große Deletion im langen Arm des Chromosoms 16 entdeckt, sodass der Phänotyp des Kindes nicht nur allein auf die Deletionen im Bruchpunktbereich der Inversion auf dem Chromosom 14 zurückzuführen ist. Einen Fall von zwei kryptischen Deletionen außerhalb der Bruchpunktbereiche eines perizentrisch invertierten Chromosoms 4 beschrieben PIOVANI *et al.* (2006) bei einem 14 Jahre alten Jungen mit schwerer psychomotorischer Retardierung, bei dem sich eine Deletion von etwa 5 Megabasenpaaren distal des Bruchpunktes im kurzen Arm des Chromosoms 4 und eine zweite Deletion von etwa 2 Megabasenpaaren innerhalb des invertierten Segments fand. Sowohl die Inversion als auch die beiden Deletionen waren neu entstanden, Mikrosatellitenmarker wiesen einen paternalen Ursprung des derivativen Chromosoms nach.

In der Regel schwerwiegendere Phänotypen als durch die Inversionen selbst werden durch die unter Umständen in der nächsten Generation entstehenden rekombinanten Chromosomen mit ihren segmentellen Imbalancen verursacht. Wie oben bereits beschrieben, führen die bei der Paarung eines nor-

malen und eines invertierten Chromosoms entstehenden Derivatvchromosomen zu einer Kombination partieller Monosomien und Trisomien bestimmter Chromosomenabschnitte, wobei allgemein gesagt werden kann, dass die partiellen Monosomien einen entscheidenderen Einfluss auf den Phänotyp haben als die partiellen Trisomien. Das beobachtete Phänotypspektrum reicht hierbei von leichten bis hin zu schwersten, unter Umständen mit dem Leben nicht zu vereinbarenden, kongenitalen Malformationen. Häufig liegt auch eine in unterschiedlichem Schweregrad ausgeprägte mentale Retardierung vor. Für perizentrische Inversionen sind zwei rekombinante Derivatvchromosomen denkbar. Das erste mögliche Derivatvchromosom würde eine partielle Trisomie, also eine Duplikation für den Chromosomenabschnitt zeigen, der distal des Bruchpunktes im kurzen Arm des Chromosoms liegt. Gleichzeitig würde eine partielle Monosomie, also eine Deletion für den Chromosomenabschnitt vorliegen, der distal des Bruchpunktes im langen Arm des Chromosoms liegt. Nach ISCN würde der Karyotyp eines solchen rekombinanten Chromosoms aus einer maternalen perizentrischen Inversion des Chromosoms 1 mit den Bruchpunkten in p36.3 und q42.3 folgendermaßen beschrieben: $\text{rec}(1)\text{dup}(1\text{p})\text{inv}(1)(\text{p}36.3\text{q}42.3)\text{mat}$, zu sehen in Abbildung 1.16. Das zweite mögliche Derivatvchromosom würde die entgegengesetzten Imbalancen zeigen, nämlich eine partielle Monosomie für den Chromosomenabschnitt, der distal des Bruchpunktes im kurzen Arm des Chromosoms liegt, bei gleichzeitiger partieller Trisomie für den Chromosomenabschnitt, der distal des Bruchpunktes im langen Arm des Chromosoms liegt. Am Beispiel des Chromosoms 1 würde der Karyotyp nach ISCN folgendermaßen wiedergegeben: $\text{rec}(1)\text{dup}(1\text{q})\text{inv}(1)(\text{p}36.3\text{q}42.3)\text{mat}$.

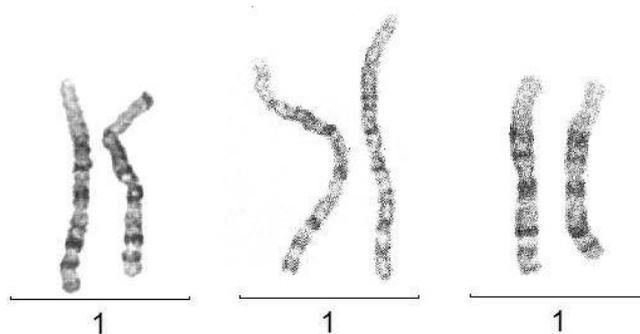


Abb. 1.16: Partielle Monosomie bzw. Trisomie aufgrund maternaler perizentrischer Inversion des Chromosoms 1.

Links: $\text{inv}(1)(\text{p}36.3\text{q}42.3)$ bei einer 28 Jahre alten Mutter zweier Kinder mit partieller Trisomie 1p und partieller Monosomie 1q.

Mitte und rechts: $\text{rec}(1)\text{dup}(1\text{p})\text{inv}(1)(\text{p}36.3\text{q}42.3)\text{mat}$ beim ca. 2,5 Jahre alten Sohn und der 2 Monate alten Tochter, bei denen der Verdacht auf ein Miller-Dieker-Syndrom bei Dysmorphiezeichen sowie Balkendysgenese und Pachygyrie bestand. Es liegt eine partielle Trisomie der Region 1p36.3→pter sowie eine partielle Monosomie der Region 1q42.3→qter vor.

Ob beide der möglichen Derivatvchromosomen innerhalb einer (entsprechend großen) Familie beobachtet werden können oder ob nur eines von beiden auftritt, hängt letztlich von der Vereinbarkeit mit dem Überlebens der betroffenen Individuen ab. ALLDERDICE *et al.* (1975) beschrieben das Auftre-

ten beider möglichen Derivatvchromosomen einer perizentrischen Inversion des Chromosoms 3 in einer großen Familie über sieben Generationen hinweg. Die Familiengeschichte war geprägt von habituellen Aborten und zahlreichen Fällen körperlicher und geistiger Behinderung, die auf segmentelle Imbalancen der rekombinanten Derivatvchromosomen 3 zurückzuführen waren. Vergleichbare Beschreibungen finden sich, wenn auch in weitaus geringerem Umfang, bei CIULADAITE *et al.* (2014) für das Chromosom 10 sowie bei VIANNA-MORGANTE *et al.* (1976) und VERMEULEN *et al.* (2005) für das Chromosom 18. Einen interessanten Fall präsentierten KARIMINEJAD *et al.* (2011), die über die Nachkommen eines konsanguinen Elternpaares berichteten. Beide Elternteile hatten jeweils eine perizentrische Inversion eines ihrer beiden Chromosomen 18. Ihr erstes Kind, ein Junge, zeigte im Alter von 5 Jahren nur minimale phänotypische Auffälligkeiten im Gesicht und eine leichte Anpassungsstörung mit zögerlichem bis ängstlichem Verhalten und Depression sowie ein Stottern. Die zytogenetische Untersuchung ergab das Vorliegen eines invertierten Chromosoms 18 sowie eines rekombinanten Chromosoms 18 mit partieller Monosomie 18p bzw. partieller Trisomie 18q. Eine Mikrosatellitenanalyse ergab, dass das invertierte Chromosom 18 vom Vater stammte, während das rekombinante Chromosom 18 mütterlichen Ursprungs war. Das zweite Kind des Paares, ein Mädchen, zeigte keinerlei phänotypische Auffälligkeiten. Bereits in der Schwangerschaft wurde eine Chromosomenanalyse aus kultivierten Amnionzellen durchgeführt, die das Nebeneinander beider möglicher Derivatvchromosomen aus der Inversion 18 der Eltern ergab. Durch Mikrosatellitenanalyse konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Chromosom 18 mit partieller Trisomie 18p und partieller Monosomie 18q maternalen, das rekombinante Chromosom 18 mit partieller Monosomie 18p und partieller Trisomie 18q dagegen paternalen Ursprungs war. Offensichtlich gleichten sich die Imbalancen insgesamt aus, sodass sich keine nachweisbare Auswirkung auf den Phänotyp des Kindes ergab.

Ähnlich wie bereits oben bei den einfachen Inversionen beschrieben, können auch die rekombinanten Derivatvchromosomen mit definierten Syndromen in Verbindung gebracht werden, wenn durch diese Derivatvchromosomen die phänotypischen Besonderheiten dieser Syndrome zumindest teilweise "imitiert" werden. Folgende Syndrom-Varianten können Ergebnis eines rekombinanten Derivatvchromosoms sein:

Miller-Dieker-Syndrom [interstitielle Deletion 17p13.3]	rec(17)dup(17q)inv(17)(p13.3q25.1)mat [partielle Monosomie 17p13.3→pter]	Greenberg <i>et al.</i> (1986)
	rec(17)dup(17q)inv(17)(p13.3q25.1)mat [partielle Monosomie 17p13.3→pter]	Kingston <i>et al.</i> (1996)
Trisomie 21 [Duplikation DSCR in 21q22]	rec(21)dup(21q)inv(21)(p11q22)mat [partielle Trisomie 21q22→qter]	Tardy <i>et al.</i> (1997)
	rec(21)dup(21q)inv21(p11q22)pat [partielle Trisomie 21q22→qter]	Ilgin Ruhi <i>et al.</i> (2001)
Wolf-Hirschhorn-Syndrom [interstitielle Deletion 4p16.3]	rec(4)dup(4q)inv(4)(p16q31.3)pat [partielle Monosomie 4p16→pter]	Mun <i>et al.</i> (2010)

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass neben dem Syndrom-typischen Phänotyp auch weitere Auffälligkeiten vorliegen können, die durch die segmentellen Imbalancen hervorgerufen werden.

1.4 Organisation von Zentromer und perizentromerischer Region

1.4.1 Satelliten-DNAs

Ein großer Teil der menschlichen DNA besteht aus sogenannten repetitiven Sequenzen, die sich in identischen oder nahezu identischen Kopien in unterschiedlichem Umfang wiederholen. Diese repetitiven Sequenzen, die sich bei allen Eukaryonten nachweisen lassen, sind über das gesamte Genom verteilt und finden sich besonders in den Bereichen in und um die Zentromere sowie in den Endbereichen der Chromosomen (Telomere). Man kann sie in Sequenzklassen mit wiederholt aufeinanderfolgenden Kopien (tandem-repetitive Sequenzen) und mit verstreut liegenden Kopien (dispers-repetitive Sequenzen) unterteilen. Die Tabelle 1.1 gibt einen Überblick darüber.

Die Satelliten-DNAs stellen eine besondere Art dieser tandem-repetitiven Sequenzen dar. Wird zu einer konzentrierten Salzlösung wie etwa Caesiumchlorid extrahierte DNA gegeben und anschließend eine Ultrazentrifugation (extrem hohe Drehzahlen über lange Zeit) des Gemischs durchgeführt, so lassen sich zwei Phänomene beobachten (JONES 1973). Zunächst einmal bildet sich nach einiger Zeit ein Dichtegradient innerhalb der Caesiumchlorid-Lösung aus. Infolge dessen wandert die DNA entsprechend ihrer eigenen Dichte innerhalb des Dichtegradienten der Salzlösung zu der Stelle, an der die Dichte der DNA und die Dichte der Salzlösung identisch sind. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem isopycnicen Gradienten, der Rückschlüsse auf die prozentuale Zusammensetzung der Basenpaare der DNA ermöglicht, speziell den Gehalt von Guanin und Cytosin. Jeder Abschnitt des Säugetiergenoms besteht zu etwa 40 Prozent aus Guanin/Cytosin, was sich bei der Ultrazentrifugation als größte DNA-Fraktion zeigt. Jede Abweichung der DNA bezüglich dieser prozentualen Zusammensetzung zeigt sich als schmale zusätzliche Fraktion oder Bande. DNA mit der Eigenschaft, diese zusätzlichen Banden zu bilden, wird als Satelliten-DNA bezeichnet. Man bezeichnet sie entsprechend der Dichte der Salzlösung, also in g/cm^3 , und bezieht diese Angabe auf die Dichte der Hauptfraktion. Die erste Satelliten-DNA wurde bei der Maus beschrieben und hatte eine Dichte von $1,691 \text{ g/cm}^3$ verglichen mit $1,700 \text{ g/cm}^3$ für die Hauptfraktion (KIT 1961). Die genauer untersuchten Satelliten-DNAs beim Menschen wurden mit römischen Ziffern von I bis IV bezeichnet und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chromosomalen Lokalisation (Abbildung 1.17) und ihrer Konzentration. Insgesamt machen diese Satelliten-DNAs jeweils bis zu 2 Prozent des Gesamtgenoms aus (JONES 1973).

Klasse	Länge in bp	Wiederholungen in bp	Beschreibung
tandem-repetitive Sequenzen			
Makrosatelliten			
α-Satelliten-DNA	171	bis zu mehreren 100.000	Chromosomale Lokalisation: Zentromer.
β-Satelliten-DNA	68		Chromosomale Lokalisation: perizentromerisches Heterochromatin.
Satelliten-DNA	5 - 48		
Minisatelliten	6 - 24	100 - 15.000	Chromosomale Lokalisation: alle Chromosomen (häufig im Telomerbereich). Wiederholungen innerhalb einer Population hochvariabel, stabile Vererbung (Verwendung als <i>variable number of tandem repeats</i> bzw. <i>VNTRs</i> für den genetischen Fingerabdruck).
Mikrosatelliten	1 - 4 (- 6)	bis 100	Chromosomale Lokalisation: alle Chromosomen. Variable Vererbung der Wiederholungszahl (Verwendung als <i>short tandem repeat polymorphisms</i> oder <i>STRPs</i> für den genetischen Fingerabdruck).
dispers-repetitive Sequenzen (Retrotransposons)			
SINEs (<i>short interspersed nuclear elements</i> , u.a. <i>Alu</i> -Familie)	ca.300	ca. 1.800.000	Chromosomale Lokalisation: Euchromatin (Giemsa-negative Banden). Etwa alle 4 Kilobasenpaare, häufig in nicht kodierenden Genabschnitten (Introns). Evolutionär vermutlich durch RNA-vermittelte DNA-Transposition entstanden. Hämophilie B bzw. Neurofibromatose beschrieben durch Einbau einer <i>Alu</i> -Sequenz in das Gen für Gerinnungsfaktor IX bzw. für Neurofibromatose Typ 1.
LINEs (<i>long interspersed nuclear elements</i> , u.a. <i>Kpn</i> -Familie)	ca. 7000	50.000 - 100.000	Chromosomale Lokalisation: Euchromatin (Giemsa-positive Banden). Etwa alle 50 Kilobasenpaare, häufig in nicht kodierenden Genabschnitten. Starke Sequenzähnlichkeiten mit bekannten Genen von Transposons, die für reverse Transkriptase kodieren, sowie für andere retrovirale Proteine. Hämophilie A beschrieben durch Einbau einer <i>Kpn</i> -Sequenz in ein Exon des Gens für Gerinnungsfaktor VIII.

Tab. 1.1: Übersicht über repetitive Sequenzen (modifiziert aus: Humangenetik, 2. Auflage, Springer Verlag und Taschenlehrbuch Humangenetik, 7. Auflage, Thieme Verlag).
bp = Basenpaare

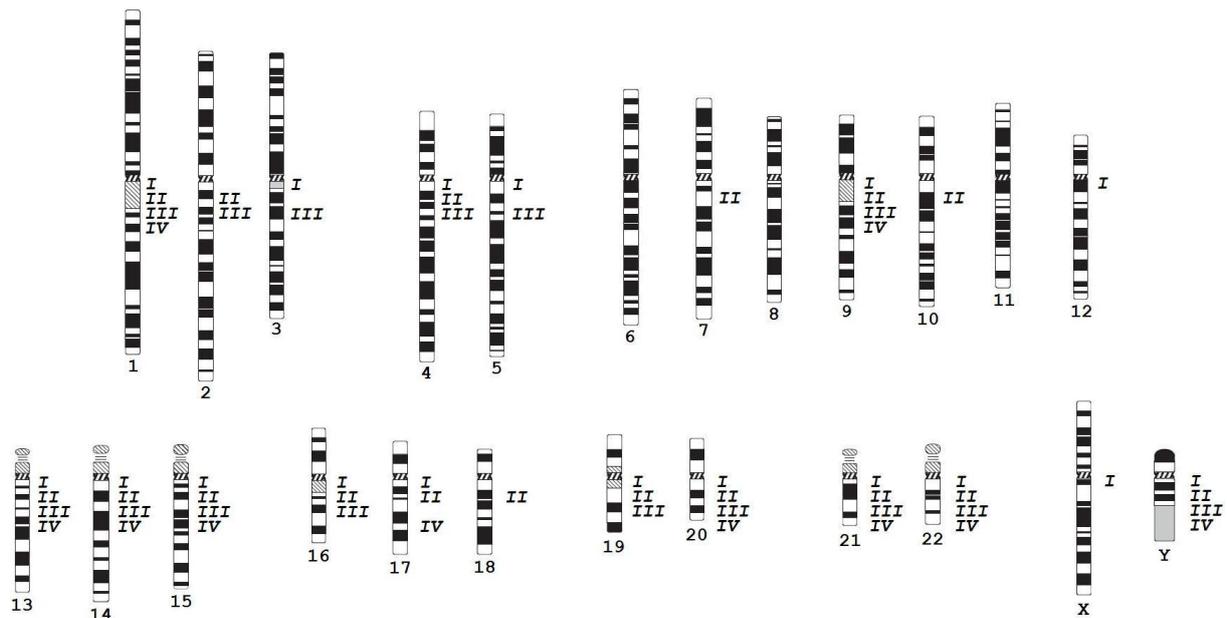


Abb. 1.17: Lokalisation der Satelliten-DNAs I, II, III und IV beim Menschen.

Die Angaben beruhen auf den Daten von JONES *et al.* (1974) und GOSDEN *et al.* (1975), die Ideogramme sind modifiziert aus SCHRECK *et al.* (2001) entnommen.

Zu den transkriptiven Eigenschaften der Satelliten-DNAs (vor allem der Satelliten-DNA III) siehe Absatz 1.4.2.2.

1.4.1.1 Satelliten-DNA I (Sat-I-DNA)

Die Satelliten-DNA I macht 0,5 bis 1 Prozent der Gesamt-DNA-Menge aus und besitzt einen isopycnicen Caesiumchlorid-Gradienten von 1,687 g/cm³ (JONES 1973; JONES *et al.* 1973; MITCHELL *et al.* 1979). Sie ist mit 72,4 Prozent einerseits die AT-reichste DNA-Fraktion des menschlichen Genoms, andererseits stellt sie den mengenmäßig kleinsten Teil der Satelliten-DNAs dar (JONES *et al.* 1974; GOSDEN *et al.* 1975; MITCHELL *et al.* 1979). Im Heterochromatinblock des Y-Chromosoms findet sich eine besonders hohe Konzentration der Sat-I-DNA, geringere Konzentrationen kommen auch im Zentromerbereich der Chromosomen 1, 3, 13, 14, 16 und 21 vor. Für den Zentromerbereich der Chromosomen 4, 5, 9, 12, 15, 16, 17, 19, 20, 21 und 22 wurden auch variable und nicht immer eindeutig nachweisbare Konzentrationen beschrieben (JONES *et al.* 1974). In einigen Fällen hat JONES *et al.* (1974) eine nach heutigem Wissenstand fragliche telomernahe Lokalisation von Sat-I-DNA auf den Chromosomen 3, 14 und X beschrieben.

1.4.1.2 Satelliten-DNA II (Sat-II-DNA)

Die Satelliten-DNA II macht 2 Prozent der Gesamt-DNA-Menge aus und besitzt einen isopycnischen Caesiumchlorid-Gradienten von 1,693 g/cm³ (JONES 1973; JONES *et al.* 1973; MITCHELL *et al.* 1979). In größeren Mengen kommt sie in den Heterochromatinblöcken der Chromosomen 1 und 16 vor, lässt sich aber auch in geringeren Konzentrationen im Heterochromatinblock des Chromosoms 9 sowie auf den akrozentrischen Chromosomen nachweisen. Chromosomenregionen, die Sat-II-DNA enthalten, zeigen strukturelle Varianten, die durch den vorliegenden DNA-Gehalt bestimmt werden. Aus evolutionärer Sicht ist die Sat-II-DNA jünger als die Satelliten-DNA III (JONES *et al.* 1973). Die *consensus sequence* für die Sat-II-DNA wurde festgelegt als [(atTCCATTcg)₂ + (atg)₁₋₂]_n (PROSSER *et al.* 1986; EYMERY *et al.* 2009a).

1.4.1.3 Satelliten-DNA III (Sat-III-DNA)

Die Satelliten-DNA III macht 1,5 Prozent der Gesamt-DNA-Menge aus und besitzt einen isopycnischen Caesiumchlorid-Gradienten von 1,696 g/cm³ (JONES *et al.* 1973) bzw. 1,697 g/cm³ (MITCHELL *et al.* 1979). Sie ist hauptsächlich auf dem Chromosom 9 lokalisiert und nimmt den größten Teil des zytogenetisch sichtbaren Heterochromatinblocks ein. In geringerem Maße lässt sie sich auch zentromernah bei den akrozentrischen Chromosomen nachweisen. Evolutionär betrachtet ist sie älter als die Satelliten-DNA II (JONES 1973; JONES *et al.* 1973). Die *consensus sequence* für die Sat-III-DNA wurde festgelegt als [(ATTCC)₇₋₁₃ + (ATTcgggttg)₁]_n (PROSSER *et al.* 1986; EYMERY *et al.* 2009a). Vor allem das in der *consensus sequence* enthaltene ATTCC-Motiv unterliegt teils extremen Duplikationen, aus denen die zytogenetisch sichtbaren Längenvarianten des Heterochromatinblocks des Chromosoms 9 resultieren. Diese Tandem-Duplikationen in Verbindung mit Sequenz-Konversion und ungleichem *cross-over* werden für die hohe Variabilität dieser heterochromatischen Region verantwortlich gemacht (MITCHELL *et al.* 1986; PROSSER *et al.* 1986; YUROV *et al.* 1987).

1.4.1.4 Satelliten-DNA IV (Sat-IV-DNA)

Die Satelliten-DNA IV macht 2 Prozent der Gesamt-DNA-Menge aus und besitzt einen isopycnischen Caesiumchlorid-Gradienten von 1,700 g/cm³ (JONES 1973; JONES *et al.* 1973; MITCHELL *et al.* 1979).

1.4.1.5 α -Satelliten-DNA (α -Sat-DNA, Alphoid-DNA)

Die α -Satelliten- oder Alphoid-DNA macht etwa 3 bis 5 Prozent der DNA jedes Chromosoms aus und bildet das Zentromer. Sie besteht aus monomeren Einheiten von 171 Basenpaaren (WILLARD and WAYE 1987), die sich tandemartig wiederholen und so Längen zwischen 0,2 bis 5 Megabasenpaaren erreichen können (WEVRICK and WILLARD 1989; OAKLEY and TYLER-SMITH 1990; WILLARD 1990;

MASUMOTO *et al.* 2004). Die Begriffe α -Satellit und Alphoid-DNA werden meist synonym verwendet, auch wenn streng genommen die α -Satelliten-DNA eine DNA darstellt, die für alle Chromosomen identisch ist und im Gegensatz zur Alphoid-DNA (Endung *-oid* als Zeichen für α -artig) keine Unterscheidung einzelnen Chromosomen zum Beispiel mit der Methode der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zulässt. Dieses Fehlen von Spezifität der α -Sat-DNA für ein bestimmtes Chromosom lässt allgemein auf gemeinsame Funktionen in der Zentromerregion aller menschlichen Chromosomen schließen (LUKE *et al.* 1992), speziell bei der Segregation (Verteilung) der Chromosomen während Meiose und Mitose, bei der Erkennung und Paarung homologer Chromosomen, beim Zusammenhalten der Chromatiden eines Chromosoms (Schwesterchromatiden) und als Bestandteil bei der Bildung des Kinetochors als Zielstruktur für die Spindelfasern (ALEXANDROV *et al.* 2001). Letztlich scheint die Grenze zwischen α -Sat- und Alphoid-DNA doch eher fließend zu sein. Bisher wurden über 30 verschiedene Unterarten von Alphoid-DNAs identifiziert. Einige von ihnen sind hochspezifisch für nur ein einziges Chromosom, andere kommen in den Zentromeren weniger verschiedener Chromosomen vor, und selbst das Vorhandensein verschiedener Unterarten von Alphoid-DNAs innerhalb des Zentromers eines Chromosoms konnte nachgewiesen werden (CHOO *et al.* 1991). Ergänzend sei noch erwähnt, dass das Zentromer noch andere Arten von Satelliten-DNA enthalten kann, so etwa γ -Satelliten-DNA und Sn5-Tandem-Wiederholungen (LIN *et al.* 1993; CHOO 1997).

1.4.1.6 β -Satelliten-DNA (β -Sat-DNA)

Die β -Satelliten-DNA findet sich vorwiegend in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen, aber auch in 3q12 sowie in den Heterochromatinblöcken 1q12, 9q12 und Yq11 (MENEVERI *et al.* 1985; AGRESTI *et al.* 1987; AGRESTI *et al.* 1989; MENEVERI *et al.* 1993). Für die β -Sat-DNA in der Bande 9q12 (Locus D9Z5) konnte gezeigt werden, dass sie aus monomeren Einheiten von 68 Basenpaaren besteht, die sich zu höheren Einheiten mit einer Größe von etwa 2,5 Kilobasenpaaren organisieren, welche ihrerseits in bis zu 100facher Wiederholung vorliegen (WAYE and WILLARD 1989; ROCCHI *et al.* 1991; GREIG and WILLARD 1992).

1.4.2 Heterochromatin als höhere Organisationsform repetitiver DNA-Elemente

1.4.2.1 Konstitutives Heterochromatin

Das konstitutive Heterochromatin ist aus verschiedenen Arten von Satelliten-DNAs aufgebaut und zeigt eine große Variabilität sowohl zwischen verschiedenen Individuen als auch zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen (JONES *et al.* 1973). Dieses hohe Maß an Variabilität stellt ein allgemeines Charakteristikum bei Eukaryonten dar (KURNIT 1979) und wurde sowohl bei Pflanzen (FUSSELL 1977),

Wirbellosen (KLAJSTERSKA *et al.* 1974) als auch höheren Organismen (CRAIG-HOLMES and SHAW 1971) beobachtet.

Beim Menschen findet sich das konstitutive Heterochromatin in der Nähe der Zentromere (perizentromerisches Heterochromatin), die einzige Ausnahme bildet hier das telomernahe konstitutive Heterochromatin im langen Arm des Y-Chromosoms (ARRIGHI and HSU 1971). Die meisten Pflanzen, Vögel und Wirbellosen sowie einige Säugetiere besitzen neben dem perizentromerischen Heterochromatin auch weitere Chromosomenregionen mit prominentem interstitiellen und telomernahen konstitutiven Heterochromatin (STACK *et al.* 1974; BEERMANN 1977).

Auch wenn sich das perizentromerische Heterochromatin mit den zytogenetischen Methoden der C-Banden- und Distamycin A/DAPI-Färbung als homogen gefärbter Block darstellt, so ist dieser Block keine einheitliche Struktur, sondern wie eingangs erwähnt ein aus verschiedenen Arten von Satelliten-DNAs hierarchisch geformtes Konstrukt. Auf dem Chromosom 9 nehmen die verschiedenen Satelliten-DNAs den gesamten zytogenetisch nachweisbaren Heterochromatinblock ein. Im Zentromer befindet sich die α -Satelliten- oder Alphoid-DNA. In Richtung q-Arm schließt sich unmittelbar daran die β -Satelliten-DNA an, gefolgt von der mengenmäßig am stärksten vertretenen Satellit-III-DNA. Alle drei Arten der Satelliten-DNAs schließen nahtlos aneinander an (LUKE *et al.* 1992). Dies unterscheidet die Organisation des Heterochromatins in 9q grundlegend von der Organisation der Heterochromatinblöcke in den langen Armen der Chromosomen 1 und 16 (ALEIXANDRE *et al.* 1987).

1.4.2.2 Funktion des konstitutiven Heterochromatins

Lange Zeit ging man davon aus, dass das genarme konstitutive Heterochromatin keine Funktion hat, was sich in seiner englischen Bezeichnung als *junk*-DNA niederschlug (OHNO 1972). Heute weiß man, dass die heterochromatischen Regionen Einfluss nehmen auf die Transkription benachbarter euchromatischer Bereiche (MILOT *et al.* 1996; KARPEN and ALLSHIRE 1997; LE BACCON *et al.* 2001), beispielsweise bei der Transkription von Tumorsuppressor-Genen, welche dadurch in ihrer Funktion gehemmt werden (BAILEY *et al.* 2001; HORVATH *et al.* 2001). Daneben fanden sich gehäuft Veränderungen im heterochromatischen Bereich bei Erkrankungen wie dem ICF-Syndrom (SAWYER *et al.* 1995) oder dem Roberts-Syndrom (BARBOSA *et al.* 2000).

Heute ist bekannt, dass auch im zentromernahen Heterochromatin Gene liegen, so beispielsweise das BAGE-Gen (*B melanoma antigen*-Gen). Bei BAGE handelt es sich um eine Genfamilie aus exprimierten Genen im perizentromerischen Bereich der Chromosomen 13 und 21 sowie um nicht exprimierte Genfragmente (Pseudogene) in den perizentromerischen Regionen zahlreicher anderer Chromosomen. RUAULT *et al.* (2002) zeigten, dass *BAGE-related sequences* in einer Entfernung von weniger als einem Megabasenpaar beidseits vom Zentromer des Chromosoms 21 liegen.

Im perizentromerischen Bereich des Chromosoms 1 fand sich mit BAGE2 (*B melanoma antigen 2*-Gen) ein weiteres Mitglied der BAGE-Genfamilie, zusätzlich konnte hier das Gen TPTE (*transmembrane phosphatase with tensin homology*-Gen) identifiziert werden. Beide Gene werden ausschließlich im

Hoden- und/oder Tumorgewebe transkribiert (RUAULT *et al.* 2002; BRUN *et al.* 2003). Bei einigen Patienten mit ICF-Syndrom konnte gezeigt werden, dass TPTE transkribiert wurde und nicht wie erwartet stillgelegt war (BRUN *et al.* 2011). Weitere Kopien beider Gene finden sich angrenzend an die Alphoid-DNA auf Chromosom 21, eine zusätzliche Kopie von TPTE konnte auf Chromosom 13 nachgewiesen werden (BRUN *et al.* 2003).

Zwei weitere im Heterochromatin lokalisierte Gene sind ein dicht am Zentromer des Chromosoms 15 liegende und ausschließlich beim Neuroblastom exprimiertes *NF1-related gene (neurofibromatosis type 1-related gene)* (LEGIUS *et al.* 1992) sowie das im Perizentromerbereich des Chromosoms 16 liegende und ausschließlich im Hodengewebe exprimierte Gen SLC6A10 (ein Kreatin-Transporter Typ 2-Pseudogen) (IYER *et al.* 1996; HORVATH *et al.* 2000).

Drei Gene konnten im Grenzbereich zwischen dem Satelliten-DNA-reichen, zentromernahen, interchromosomal duplizierten Bereich und dem chromosomenspezifischen Euchromatin auf Chromosom 10 identifiziert werden: ZNF11/33B (ein Zink-Finger-Protein), KIAA0187 (Gen mit unbekannter Funktion) und RET (Rezeptor-Tyrosinkinase-Protoonkogen) (GUY *et al.* 2000). Das RET-Protoonkogen wird beim Menschen während der frühen Embryonalentwicklung zwischen dem 23. und 42. Tag in der Niere, den Neuroblasten des späteren enterischen Nervensystems, den Ganglien der Hirnnerven VII, VIII, IX und X sowie den Motoneuronen des Rückenmarks exprimiert (ATTIE-BITACH *et al.* 1998).

Mehrere Autoren berichteten darüber, dass die Transkription von Satelliten-DNAs asymmetrisch erfolgt (RUDERT *et al.* 1995; RIZZI *et al.* 2004; VALGARDSDOTTIR *et al.* 2005; ENUKASHVILY *et al.* 2007; ENUKASHVILY *et al.* 2009; EYMERY *et al.* 2009b). Sie beobachteten, dass in unterschiedlichen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten entweder der *sense*- oder der *antisense*-Strang der DNA abgelesen und transkribiert wird. Die beiden Stränge unterscheiden sich hinsichtlich ihrem Gehalt der Basen Thymin und Adenin.

Während der Embryonalentwicklung der Maus wird die Richtung, in der die verschiedenen Satelliten-DNAs eines DNA-Strang abgelesen werden, sehr fein reguliert. Ein Wechsel in der Orientierung zwischen den beiden Strängen wurde zwischen dem Einzell- und dem Zweizellenstadium beobachtet (PROBST *et al.* 2010). An embryonalen Stammzellkulturen von Mäusen konnten ENUKASHVILY *et al.* (2009) zeigen, dass sich eine strangspezifische Transkription perizentromerischer Satelliten-DNA mit Hilfe von Retinsäure auch zu einem späteren Zeitpunkt erneut induzieren lässt. Zwischen dem 11. und 15. Tag nach der Befruchtung werden die Satelliten-DNAs bei Mäuseembryonen vor allem im zentralen Nervensystem vom *sense*-Strang transkribiert (RUDERT *et al.* 1995). Nur bei einer sehr geringen Zahl von Nervenzellen fand sich im gleichen Zeitraum eine Transkription vom *antisense*-Strang. Im Hodengewebe geschlechtsreifer Mäuse konnten RUDERT *et al.* (1995) eine Transkription perizentromerischer Satelliten-DNAs vom *antisense*-Strang nur bei unreifen Keimzellen zeigen, wohingegen in reifen Keimzellen die Transkription ausschließlich vom *sense*-Strang erfolgte.

Bei menschlichen Embryonen haben KUZNETZOVA *et al.* (2012, Artikel nur Russisch verfügbar) eine mit der Embryogenese bei Mäusen vergleichbare räumliche wie zeitliche Trennung der Transkription von Satelliten-DNA III bis zum Alter von 9 Wochen nachgewiesen, allerdings nie gleichzeitig vom *sense*-

und vom *antisense*-DNA-Strang. Bei sieben Wochen alten menschlichen Embryonen fand die Transkription vom *sense*-Strang in Medulla oblongata, Lunge, Darm und Chorion, die Transkription vom *antisense*-Strang in Herz und Nieren statt.

Diese bei Maus und Mensch beobachtete Selektivität bei der Auswahl der zu transkribierenden Richtung des DNA-Strangs ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass es Mechanismen geben muss, die gezielt zur Transkription von Satelliten-DNAs zu bestimmten Zeitpunkten und in bestimmten Geweben vom *sense*- oder *antisense*-Strang führen, und dass dies kein zufälliges Ereignis, sondern eine gerichtete Aktion während der Entwicklung darstellt (ENUKASHVILY and PONOMARTSEV 2013).

In Anbetracht der zahlreichen neuen Erkenntnisse, die in den letzten Jahren über die Funktion des Heterochromatins gewonnen wurden, wird in Anlehnung an die zwar (noch) nicht nachweisbare, aber an ihren Wirkungen definitiv erkennbare Dunkle Materie des Weltalls das Heterochromatin nicht mehr abwertend als *junk*-DNA, sondern als *genome dark matter* bezeichnet (PENNISI 2010).

1.5 Chromosomenvarianten, Normvarianten, Polymorphismen

1.5.1 Begrifflichkeiten

Bei der zytogenetischen Analyse von Chromosomen fällt immer wieder auf, dass in vielen Fällen die beiden Homologen eines Chromosomenpaares nie völlig identisch sind. Einerseits hat dies kultivierungs- und präparationsbedingte Ursachen, was sich auf den Kondensationsgrad, das Färbeverhalten und die Spreitung (Ausbreitung auf dem Objektträger) der Chromosomen auswirkt, andererseits besitzen alle Chromosomen eine gewisse Bandbreite an Variabilität, die sich in ihrer zytogenetischen Erscheinung niederschlägt. Diese Variabilität bezeichnet man häufig als Polymorphismus, auch wenn der Begriff in diesem Zusammenhang unkorrekt verwendet wird, da er für eine Variation bezüglich eines einzelnen Allels auf molekularer Ebene steht. Geeigneter ist der im angloamerikanischen Sprachraum gebräuchliche Begriff des Heteromorphismus beziehungsweise der neutrale Begriff Variante. Grundsätzlich können zytogenetisch sichtbare Varianten jeden Abschnitt eines Chromosoms betreffen, also sowohl das Heterochromatin als auch das Euchromatin, und sie können relativ häufig oder extrem selten (familiär) auftreten. Eine Definition von Varianten rein über ihre Häufigkeit ist daher unsinnig, weshalb auch der weit verbreitete Begriff der *Normvariante* ganz vermieden werden sollte. Am neutralsten lassen sich solche Veränderungen als Chromosomenvarianten beschreiben, da so weder eine Wertung hinsichtlich der Häufigkeit, der Lokalisation noch der klinischen Relevanz vorgenommen wird.

1.5.2 Heterochromatische Varianten

Heterochromatische Varianten sind seit den Anfängen der Chromosomenanalyse bekannt. Bereits an ungebänderten, nur mit Giemsa gefärbten Chromosomen konnte man Längenunterschiede bei den Chromosomen 1, 9, 16 und Y erkennen, die durch konstitutives Heterochromatin bedingt sind. Mit Hilfe von Techniken wie der C- und G11-Banden-Färbung (BOBROW *et al.* 1972; GAGNE and LABERGE 1972; KANDA 1978) konnte man bei den Chromosomen mit zentromernaher Lage des Heterochromatins (1, 9, 16) auch Varianten in Bezug auf die relative Lage des Heterochromatins zum Zentromer identifizieren. Findet man den Heterochromatinblock dieser Chromosomen zentromernah im kurzen statt im langen Arm des jeweiligen Chromosoms, spricht man von einer perizentrischen Inversion. Die häufigste dieser varianten Inversionen ist die perizentrische Inversion des Chromosoms 9 (siehe Absatz 1.6.3).

Die Varianten des konstitutiven Heterochromatins werden nach den Mendelschen Gesetzen vererbt (MULLER *et al.* 1975; VERMA and LUBS 1976; VAN DYKE *et al.* 1977). Ein meiotisches *cross-over* ist im Bereich des konstitutiven Heterochromatins sehr selten bzw. findet hier überhaupt nicht statt, was für einen mitotischen Ursprung der Variabilität dieser Regionen spricht (KURNIT 1979). Obwohl Varianten des konstitutiven Heterochromatins relativ häufig gefunden werden, scheint das ursprüngliche Ereignis, das zu diesen Veränderungen führt, selten aufzutreten. Dafür sprechen einerseits die Konservierung von Satelliten-DNAs zwischen nah verwandten Spezies sowie andererseits die Stabilität und der bereits erwähnte Mendelsche Vererbungsmechanismus (KURNIT 1979). Der Heterochromatinblock in 9q an sich entstand über einen langen Zeitraum hinweg während des menschlichen Evolutionsprozesses. Dieser Prozess setzte allerdings erst nach der Abspaltung der menschlichen Linie von deren gemeinsamen Vorfahren mit dem Schimpansen ein, weshalb der Heterochromatinblock im langen Arm des Chromosoms 9 humanspezifisch ist (KEHRER-SAWATZKI *et al.* 2005).

1.5.3 Euchromatische Varianten

Varianten im Euchromatin zeigen sich bei entsprechender Größe zytogenetisch als Deletionen oder Duplikationen. Eine Variante des Euchromatins bleibt definitionsgemäß ohne klinische Folgen für das betroffene Individuum. Dennoch ist die Aussage darüber schwierig, ob die gefundene Variante tatsächlich harmlos ist, und stellt Humangenetiker immer wieder vor Probleme bei der Beurteilung und Beratung. Letztlich findet man sie bei einem Individuum, bei dem es aus einem bestimmten Grund Anlass zur Analyse der Chromosomen gab. Die sichere Bewertung kann und soll daher nur im Zusammenhang mit der Analyse der Chromosomen von phänotypisch unauffälligen Verwandten (Eltern, Geschwister, Kinder) erfolgen.

Es sind mehrere Chromosomenregionen beschrieben, in denen zytogenetisch eine zusätzliche Bande als euchromatische Variante auftreten darf, drei davon befinden sich auf Chromosom 9: 9p12, 9q12 und 9q13 (Abbildung 1.19). Weitere Regionen liegen unter anderem in 8p23.1, 15q11.2 und 16p11.2.

Diese zusätzlichen Banden sind das zytogenetisch sichtbare Äquivalent amplifizierter DNA, bestehen nahezu ausschließlich aus Pseudogenen und sind ohne klinische Bedeutung (BARBER 2000).

1.5.4 *Copy number variations, segmentelle Duplikationen und low copy repeats*

Kommt es in einem Genom bezogen auf ein Referenzgenom zu Abweichungen hinsichtlich der Kopienanzahl eines bestimmten DNA-Abschnitts, so spricht man von *copy number variations* (CNVs). Beim Menschen sind gegenwärtig ca. 30.000 dieser CNVs bekannt, die verteilt über alle Chromosomen vorkommen und zusammengenommen eine Länge von etwa 360 Megabasenpaaren aufweisen, was 12 Prozent des Gesamtgenoms ausmacht (REDON *et al.* 2006; CONRAD *et al.* 2010).

Die Mehrzahl der CNVs wird stabil vererbt, allerdings können durch nicht allelische homologe Rekombination von „falschen“, aber stark strukturähnlichen chromosomalen Regionen während der Meiose neue CNVs entstehen. Daneben gibt es Hinweise auf weitere Entstehungsmechanismen. In Studien zeigten sich bemerkenswerte Unterschiede in den CNVs verschiedener Zellen eines Individuums, was auf eine postmeiotische Entstehung der CNVs schließen lässt (PIOTROWSKI *et al.* 2008; ABYZOV *et al.* 2012). Weiterhin können einige komplexe Rearrangements nicht zufriedenstellend mit der nicht allelischen homologen Rekombination erklärt werden, was zur Entwicklung des weiter gefassten MMBIR-Modells (*microhomology-mediated break-induced replication*) führte, welches auch die Entstehung von CNVs durch seltene Replikationsdefekte mit einschloss, bei denen es durch Bruch einer Replikationsgabel und der anschließenden Wiedervereinigung mit einer anderen zweiten Replikationsgabel zum *template switch* kommt (LEE *et al.* 2007; HASTINGS *et al.* 2009).

CNVs können sich auf ein einzelnes Gen beschränken oder mehrere benachbarte Gene betreffen (Genfamilien), was dazu führen kann, dass zu viel oder zu wenig eines bestimmten Genprodukts gebildet wird, sofern dosissensitive Gene betroffen sind (zum Beispiel Haploinsuffizienz, wenn statt zweier nur eine Genkopie vorhanden ist). Dies kann Auswirkungen auf das betroffene Individuum haben und zu Assoziationen mit bestimmten Erkrankungen führen (FREEMAN *et al.* 2006; REDON *et al.* 2006): Beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom wird eine Erhöhung der Kopienzahl von EGFR beobachtet (CAPPUZZO *et al.* 2005), eine Erhöhung der Kopienzahl von CCL3L1 geht mit einer reduzierten Infektionsgefahr für HIV-1 einher (GONZALEZ *et al.* 2005) und eine Erniedrigung der Kopienzahl von FCGR3B (CD16) wird in Verbindung mit einer erhöhten Anfälligkeit für Systemischen Lupus erythematoses und ähnlichen Autoimmunerkrankungen beschrieben (AITMAN *et al.* 2006). Auch in Bezug auf Autismus (SEBAT *et al.* 2007; COOK and SCHERER 2008; GAI *et al.* 2012) und Schizophrenie (COOK and SCHERER 2008; ST CLAIR 2009) gibt es beschriebene Assoziationen mit CNVs.

Unter segmentellen Duplikationen (SDs) werden DNA-Sequenzen verstanden, die definitionsgemäß eine Länge ab einem Kilobasenpaar bis mehrere Megabasenpaare aufweisen, die eine Sequenzübereinstimmung von mindestens 90 Prozent untereinander besitzen und die an mehreren verschiedenen Stellen des Genoms vorzufinden sind. Sie können sowohl tandemartig hintereinander als auch unterbrochen vorliegen und damit sowohl inter- als auch intrachromosomal nachgewiesen werden. Auf-

grund ihrer Größe und ihrer Sequenzähnlichkeit sind sie häufig an chromosomalen Umbauten beteiligt, können zu Genominstabilität führen und für bestimmte Erkrankungen prädisponieren (SAMONTE and EICHLER 2002; REDON *et al.* 2006). Segmentelle Duplikationen befinden sich häufig in der Nähe ancestraler Duplikationsstellen und zeigen sich durch ein als *duplication shadowing* bezeichnetes Phänomen, nach dem in einer chromosomalen Region, die eine Duplikation flankiert, eine zehnfach höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer weiteren Duplikation besteht verglichen mit einer beliebigen anderen Region (CHENG *et al.* 2005).

Besonders prädestiniert für die durch chromosomale Umbauten wie Duplikationen, Deletionen, Translokationen und Inversionen entstehenden CNVs sind die sogenannten *low copy repeats* (LCRs). Dabei handelt es sich um 10 bis 300 Kilobasenpaare große regionspezifische Wiederholungen eines DNA-Abschnitts mit mehr als 95 Prozent Sequenzähnlichkeit (LEE and LUPSKI 2006). Bei der Entstehung von Mikrodeletionssyndromen (und dementsprechend höchstwahrscheinlich auch bei der von Mikroduplikationssyndromen) spielt die nicht allelische homologe Rekombination in chromosomalen Regionen mit hoher LCRs-Dichte eine wichtige Rolle (SHAIKH *et al.* 2000; ZHANG *et al.* 2010). Ein Beispiel dafür ist die chromosomale Region 17p11 bis 17p12, die zu 27 Prozent aus LCRs aufgebaut ist. Hier kommt es durch nicht allelische homologe Rekombination zu Veränderungen im Genom, die unter anderem zur Entstehung des Smith-Magenis-Syndroms (SHAW *et al.* 2004), des Charcot-Marie-Tooth-Syndroms Typ 1a und der hereditären Neuropathie mit Neigung zu Drucklähmungen (tomakulöse Neuropathie) (INOUE *et al.* 2001) sowie des Potocki-Lupski-Syndroms (ZHANG *et al.* 2010) führen.

Am besten untersucht sind jene CNVs, die tandemartig angeordnet sind und wegen ihres Aufbaus aus drei Nukleotiden als Trinukleotidrepeats (TNRs) bezeichnet werden. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Erkrankungen wie dem Fragilen X-Syndrom, der Chorea Huntington oder der Myotonen Dystrophie, bei denen der Zeitpunkt der klinischen Manifestation und der Schweregrad der Erkrankung mit einer Längenzunahme der Trinukleotid-Wiederholungen korreliert. Es wurden auch Verkürzungen der TNRs beobachtet, diese jedoch wesentlich weniger häufig als die Verlängerungen und dann auch typischerweise bei paternaler Vererbung (PEARSON *et al.* 2005).

1.6 Varianten des Chromosoms 9

1.6.1 Heterochromatische Längenvarianten des Chromosoms 9

Der Heterochromatinblock im langen Arm des Chromosoms 9 zeigt eine bemerkenswerte Variabilität in seiner längenmäßigen Ausprägung (Abbildung 1.18). Das Spektrum reicht von zytogenetisch nicht nachweisbarem Heterochromatin, der 9qh-Minus-Variante (9qh-), bis hin zu einem extrem verlängerten Heterochromatinblock, der die Länge des halben q-Arms des Chromosoms 9 erreichen kann (GARCIA-PEIRO *et al.* 2011), die 9qh-Plus-Variante (9qh+). Während CODINA-PASCUAL *et al.* (2006) die

Häufigkeit für einen verlängerten Heterochromatinblock mit 6 bis 8 Prozent für die normale Bevölkerung angeben, finden andere Autoren (HSU *et al.* 1987; KIM *et al.* 1999b) diese Variante nur zu 0,27 Prozent, bedingt durch uneinheitliche Kriterien für die Bestimmung von 9qh-Plus-Varianten. Bezogen auf die ethnische Herkunft der hierzu untersuchten Individuen ergab sich eine Häufigkeitsverteilung von 0,26 Prozent bei Weißen, 0,28 Prozent bei Schwarzen und 0,35 Prozent bei Hispanics (iberisch-stämmige Amerikaner). Bei Asiaten konnte diese Variante nicht nachgewiesen werden (HSU *et al.* 1987).

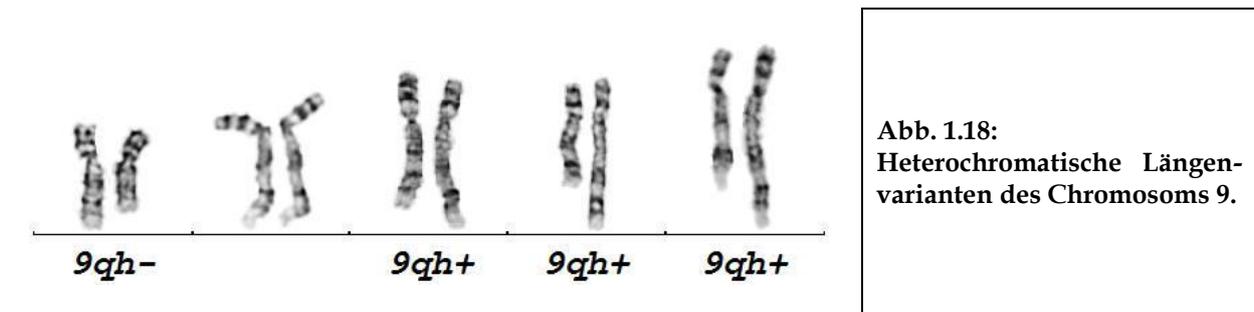


Abb. 1.18:
Heterochromatische Längenvarianten des Chromosoms 9.

1.6.2 Euchromatische Varianten des Chromosoms 9

1.6.2.1 Zusätzliche Bande in 9p12 (G- und C-Banden positiv)

SUTHERLAND and EYRE (1981) beschrieben bei einer Familie eine Variante im kurzen Arm des Chromosoms 9 (Abbildung 1.19a), bei der eine zusätzliche G- sowie C-Banden-positive Bande in der Region 9p12 auftritt. Vergleichbare Fälle berichteten auch LECCE *et al.* (2006) sowie WILLATT *et al.* (2007).

1.6.2.2 Zusätzliche Bande in 9p12 (G-Banden positiv, C-Banden negativ)

Die oben für 9p12 beschriebene Variante einer G-Banden-positiven Bande existiert auch in einer zweiten Form, bei der sich die zusätzliche Bande in der C-Banden-Färbung negativ darstellt (SUTHERLAND and EYRE 1981). Drei zytogenetisch vergleichbare Fälle wurden auch von DI GIACOMO *et al.* (2004) beschrieben, die sich allerdings bei der Analyse auf molekularzytogenetischer Ebene hinsichtlich der Bruchpunkte unterschiedlich darstellten (Abbildung 1.19a).

1.6.2.3 Zusätzliche Bande in 9q12 (G- und C-Banden positiv)

Am besten untersucht ist diese euchromatische Variante mit einer zusätzlichen G-Banden-positiven Bande im Heterochromatinblock in 9q12 (ROLAND *et al.* 1992) (Abbildung 1.19b), die etwa 1,4 Prozent der Bevölkerung besitzen (DOCHERTY and HULTEN 1985). Das zusätzliche Material stammt aus dem euchromatischen Bereich von 9p12 (WOJISKI *et al.* 1997). Die plausibelste Erklärung für die Harmlosigkeit der duplizierten 9p12-Region ist, dass der in die heterochromatische Region 9q12 eingebettete euchromatische Chromosomenabschnitt aus 9p12 funktionell in Heterochromatin umgewandelt (C-Ban-

den positiv, ‚heterochromatization‘) und so funktionell stillgelegt wurde (FERNANDEZ *et al.* 1994). Dies kann als Beispiel für einen Positionseffekt dienen (MACERA *et al.* 1995) und die regulatorische Funktion des konstitutiven Heterochromatins untermauern.

1.6.2.4 Zusätzliche Bande in 9q12 (G-Banden positiv, C-Banden negativ)

Das Auffinden dieser Variante bei der zytogenetischen Analyse scheint stark abhängig von der Präparation und der Auflösung der Chromosomen zu sein (MADAN 1978), was nicht bedeutet, dass sie als Artefakt zu werten ist. In 3 bis 50 Prozent aller zytogenetisch untersuchten Mitosefiguren zeigte sich im verlängerten Heterochromatinblock eines der beiden Chromosomen 9 diese zusätzliche Bande (Abbildung 1.19c). Als Erklärung für dieses Phänomen wären sowohl der Kondensationsgrad des Heterochromatins selbst als auch eine regulatorische Funktion des Heterochromatins in Bezug auf die Kontrolle von Genen denkbar. Mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung unter Verwendung einer *whole chromosome paint* Sonde für das Chromosom 9 zeigte die zusätzliche Bande im Gegensatz zum umgebenden Heterochromatin ein deutliches Fluoreszenzsignal (VON BEUST and BINK 1999) (Abbildung 1.19d).

Unklar ist auch der Ursprung der zusätzlichen Bande. Hier wären ebenfalls zwei Möglichkeiten denkbar. Einerseits kann es nach Insertion eines euchromatischen Chromosomenabschnitts durch seine Einbettung in den Heterochromatinblock zu einer Inaktivierung (‚heterochromatization‘) gekommen sein (MADAN 1978). Andererseits kann ein Teil des im Heterochromatinblock liegenden Materials in Euchromatin umgewandelt worden sein (‚euchromatization‘), wie es bereits für den sogenannten nicht fluoreszierenden Teil des konstitutiven Y-Heterochromatins diskutiert wurde (BUHLER 1977).

1.6.2.5 Drei zusätzliche Banden in 9q12-q13

Bei der zytogenetischen Analyse einer Amniozentese fanden sich drei zusätzliche Banden im Heterochromatinblock eines der beiden Chromosomen 9 (Abbildung 1.19e), die maternal vererbt wurden (TONK and KRISHNA 1997). Die mittlere dieser drei Banden war sowohl G- als auch C-Banden-negativ, wohingegen sich die beiden flankierenden Banden sowohl als G- als auch C-Banden-positiv darstellten.

1.6.2.6 Zusätzliche Bande in 9q13-q21 (G-Banden positiv, C-Banden negativ)

Es wurde eine Variante im langen Arm des Chromosoms 9 beschrieben, bei der eine zusätzliche G-Banden-positive, aber C-Banden-negative Bande in der Region 9q13-q21 auftrat (JALAL *et al.* 1990; KNIGHT *et al.* 1993; JOSEPH-GEORGE *et al.* 2011) (Abbildung 1.19f). Diese Variante scheint häufiger - vor allem in der koreanischen Bevölkerung - als bisher angenommen vorzukommen (CHO *et al.* 2011). Eine zytogenetische Analyse von 11.890 Amniozentesen ergab in 28 Fällen diese Variante, was auf eine

Häufigkeit von etwa 2,4 : 1000 in der (koreanischen) Bevölkerung schließen lässt. Untersuchungen der betroffenen Individuen mit aCGH (*Agilent 244 K Whole Human Genome CGH Microarray*) ergab keine Veränderungen in der betreffenden Region des Chromosoms 9, woraus die Autoren auf einen heterochromatischen Ursprung des Bandenmaterials schlossen.

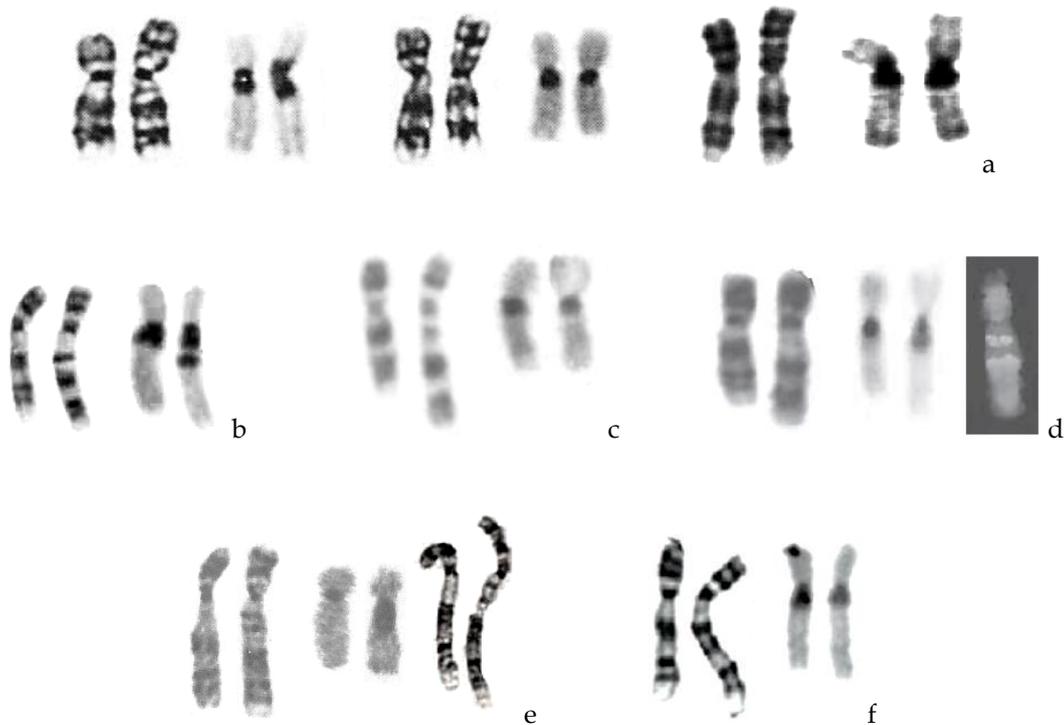


Abb. 1.19: Zusätzliche Banden als euchromatische Varianten des Chromosoms 9.

- a. Zusätzliche Bande in 9p12 (links: G- und C-Banden positiv; Mitte: G-Banden positiv, C-Banden negativ) aus SUTHERLAND and EYRE (1981) und aus DI GIACOMO *et al.* (2004) (rechts: G-Banden positiv, C-Banden negativ).
- b. Zusätzliche Bande in 9q12 (G- und C-Banden positiv) aus ROLAND *et al.* (1992).
- c, d. Zusätzliche Bande in 9q12 (G-Banden positiv, C-Banden negativ) aus MADAN (1978) sowie aus VON BEUST and BINK (1999).
- e. Drei zusätzliche Banden in 9q12-q13, links aus TONK and KRISHNA (1997), rechts aus WILLATT *et al.* (2007).
- f. Zusätzliche Bande in 9q13-q21 (G-Banden positiv, C-Banden negativ) aus CHO *et al.* (2011).

1.6.2.7 Deletions-Variante 9p21.2-p22.1

Neben den zusätzlichen Banden wurde für den kurzen Arm des Chromosoms 9 auch eine euchromatische Deletions-Variante ohne phänotypische Auswirkungen bei einem unauffälligen Kind und einem Elternteil beschrieben (BARBER 2000). Hier lag eine Deletion im Bereich 9p21.2-p22.1 vor. Zu beachten ist, dass diese Variante außerhalb des heterochromatischen Bereichs liegt, der Vollständigkeit halber aber trotzdem erwähnt werden soll.

1.6.2.8 Deletions-Variante 9q21.11

Auch für den langen Arm des Chromosoms 9 ist bereits eine Deletions-Variante ohne erkennbare phänotypische Konsequenzen beschrieben wurden (Abbildung 1.20), die ebenfalls außerhalb des heterochromatischen Bereichs liegt (WILLATT *et al.* 2007).



Abb. 1.20: Deletions-Variante.
Deletion der Bande 9q21.11 aus WILLATT *et al.* (2007).

1.6.3 Perizentrische Inversion des Chromosoms 9 – Klinische Manifestationen

Die perizentrische Inversion des Chromosoms 9 ist die am häufigsten gefundene perizentrische Inversion beim Menschen (DANA and STOIAN 2012). Trotz oder gerade wegen dieser Tatsache herrscht bis heute keine endgültige Einigkeit darüber, ob diese Inversion als harmlose Variante oder – wenn auch nicht als ursächlich – als zumindest prädisponierende Aberration anzusehen ist. Immer wieder wird sie bei Patienten, bei denen keine andere genetische Ursache für ihren Phänotyp ausgemacht werden kann, in Zusammenhang gebracht mit Infertilität und habituellen Aborten, kongenitalen Fehlbildungen und erhöhter Chromosomenbrüchigkeit, psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie und bipolaren Störungen sowie Tumorerkrankungen (KO *et al.* 1992; UEHARA *et al.* 1992; DAYA 1994; LEE *et al.* 1998; MCCANDLESS *et al.* 1998; LOURENCO *et al.* 2007; DANA and STOIAN 2012). In Einzelfallberichten wird sie auch in Verbindung gebracht mit Dysmorphie-Syndromen wie dem oculo-auriculo-vertebralem (OAV-) oder Goldenhar-Syndrom (STANOJEVIC *et al.* 2000), dem Walker-Warburg-Syndrom (BALTACI *et al.* 1999; ZENKER and DORR 2000) oder dem Cornelia-de Lange-Syndrom (BABU *et al.* 1985), mit der myotonen Dystrophie (MIYAZAKI *et al.* 1991), mit Veränderungen der Geschlechtsorgane wie dem Sertoli-cell-only Tubuli-Syndrom (TOMARU *et al.* 1994), der Ventralkrümmung des Penis ohne Hypospadie (TATENO *et al.* 1994) oder Entwicklungsstörungen der inneren weiblichen Organe (KIRILLOVA *et al.* 1979), sowie mit nach heutigem Wissensstand eher abwegigen Dingen wie Persönlichkeitsstörungen (KUMAR *et al.* 1989) und Homosexualität (MANOLOV *et al.* 1985).

Bezüglich der Häufigkeit der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 schwanken die meisten Literaturangaben zwischen 0,8 und 4 Prozent für die normale Bevölkerung (FERGUSON-SMITH 1974; HSU *et al.* 1987; TAWN and EARL 1992; AMIEL *et al.* 2001; COLLODEL *et al.* 2006), wobei es Unterschiede sowohl hinsichtlich des Geschlechts als auch der ethnischen Herkunft des Inversionsträgers gibt

(Tabelle 1.2). Bei Frauen wird die perizentrische Inversion bis zu sieben Mal häufiger als bei Männern gefunden (KIM *et al.* 1999a; JEONG *et al.* 2010).

Ethnische Herkunft	Häufigkeit inv(9)	Quelle
Weißer	0,73 %	Hsu <i>et al.</i> (1987)
Weißer	0,85 %	TAWN and EARL (1992)
Europäer	0,85 %	SERRA <i>et al.</i> (1990)
Griechen	4,17 %	METAXOTOU <i>et al.</i> (1978)
Türken	1,01 %	DEMIRHAN <i>et al.</i> (2008)
Schwarze	3,57 %	Hsu <i>et al.</i> (1987)
Hispanics*	2,42 %	Hsu <i>et al.</i> (1987)
Asiaten	0,26 %	Hsu <i>et al.</i> (1987)
Japaner	1,95 %	YAMADA (1992)
Taiwanesen	1,2 %	KO <i>et al.</i> (1992)
Singaporlesen	1,2 %	TEO <i>et al.</i> (1995)
Koreaner	1,7 %	KIM <i>et al.</i> (1999b)
Koreaner	1,9 %	JEONG <i>et al.</i> (2010)

Tab. 1.2: Häufigkeiten der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 innerhalb verschiedener ethnischer Gruppen (*Hispanics: Amerikaner mit spanisch/portugiesischen [iberischen] Vorfahren).

1.6.3.1 inv(9) und Infertilität

Die Angaben zur Häufigkeit der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 bei Infertilität sind nicht eindeutig. Einige Autoren haben eine erhöhte Häufigkeit von bis zu 6,7 Prozent gegenüber einer fertilen Kontrollgruppe gefunden (UEHARA *et al.* 1992; COLLODEL *et al.* 2006; DEMIRHAN *et al.* 2008), während andere Autoren keinen signifikanten Unterschied nachweisen konnten (DANA and STOIAN 2012). Ebenso ungewiss sind die Angaben darüber, ob es innerhalb eines Kollektivs infertiler Individuen eine Verschiebung der Häufigkeit zu einem der beiden Geschlechter hin gibt. MOZDARANI *et al.* (2007) fanden die perizentrische Inversion überdurchschnittlich häufig bei Männern, was sich mit den Ergebnissen von COLLODEL *et al.* (2006) deckt.

SASAGAWA *et al.* (1998) wiesen bei allen von ihnen untersuchten infertilen Männern eine abnormale Antwort des Plasma-Gonadotropins auf die Gabe von LH-RH (Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon) nach, was auf eine Störung in der Hormonachse zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Hoden schließen lässt. Dies führte zu der Vermutung, dass die perizentrische Inversion Effekte auf die Fertilität der betroffenen Männer hat. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten auch COLLODEL *et al.* (2006), die allerdings den Verdacht äußerten, dass der jeweilige Bruchpunkt der perizentrischen Inversion Einfluss auf die Spermatogenese hat.

1.6.3.2 inv(9) und kongenitale Malformationen

Für Feten mit auffälligem pränatalen Ultraschall geben UEHARA *et al.* (1992) eine Häufigkeit von 3 Prozent für das Vorliegen einer perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 an. Die Häufigkeit bei Kin-

dern mit Dymorphie-Zeichen liegt bei etwa 1,9 Prozent (KISS and OSZTOVICS 1981; JEONG *et al.* 2010). In einer großen Studie an 431 koreanischen Neugeborenen mit angeborenen Fehlbildungen konnten JEONG *et al.* (2010) keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Häufigkeit der Inversion gegenüber der normalen Bevölkerung finden. Die untersuchten Neugeborenen zeigten unter anderem Polydaktylie, Klumpfüße, Taubheit, Gesichtasymmetrie, Meckelsche Divertikel, Pulmonalstenose, Veränderungen im Verdauungssystem, Herzfehlbildungen, intrauterine Wachstumsretardierung und Oligohydramnion. Durch die Untersuchung beider Elternteile konnte gezeigt werden, dass alle gefundenen perizentrischen Inversionen des Chromosoms 9 nicht von einem der beiden Elternteile geerbt wurden und somit *de novo* entstanden waren (JEONG *et al.* 2010).

1.6.3.3 *inv*(9) und Down-Syndrom

Einige Autoren (WANG and HAMERTON 1979; SERRA *et al.* 1990) beobachteten ein gehäuftes Auftreten der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 bei Eltern von Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zur übrigen Bevölkerung. Sie entwickelten daraus die Theorie, dass die Inversion Einfluss auf die Segregation (Verteilung) anderer Chromosomen während der Meiose nimmt und so zu einer Erhöhung der Aneuploidierate in den Keimzellen führen könnte. Auch wenn dieser interchromosomale Effekt von anderen Autoren (SCHINZEL *et al.* 1992) nicht bestätigt werden konnte, so gelang es doch, eine Interaktion zwischen der Satelliten-DNA III besonders des Heterochromatins von Chromosom 9 mit der Satelliten-DNA III der akrozentrischen Chromosomen während der Meiose zu zeigen (GAGNE and LABERGE 1972; STAHL *et al.* 1975; SERRA *et al.* 1990). Laut UEHARA *et al.* (1992) beträgt die Häufigkeit einer perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 bei Neugeborenen mit Down-Syndrom 3,7 Prozent.

1.6.3.4 *inv*(9) und Friedreich-Ataxie

Die Friedreich-Ataxie ist eine autosomal-rezessiv vererbte, degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, die sich häufig schleichend bereits vor dem 25. Lebensjahr manifestiert, dann progredient mit teilweise über Jahre stabilen Episoden fortschreitet und häufig durch eine sich entwickelnde Kardiomyopathie infaust verläuft. Als ursächlich wurde das Gen FXN im Chromosomenabschnitt 9q13-q21.1 identifiziert (CHAMBERLAIN *et al.* 1988; RAIMONDI *et al.* 1991), welches für das in den Mitochondrien lokalisierte Protein Frataxin codiert. Darüber hinaus kann eine Mutation des Gens FRDA2 im Chromosomenabschnitt 9p11-p23 die ataktischen Symptome imitieren (CHRISTODOULOU *et al.* 2001).

1.6.3.5 inv(9) und Schizophrenie (psychiatrische Erkrankungen)

Gelegentlich findet sich in der Literatur der Hinweis auf eine Assoziation zwischen dem Auftreten einer Schizophrenie und dem Vorliegen einer perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 (NANKO 1993; TOYOTA *et al.* 2001; DEMIRHAN and TASTEMIR 2003). Die Angaben beziehen sich fast ausschließlich auf japanische Männer und nennen eine Häufigkeit für die Inversion von 3 bis 4 Prozent (LEE *et al.* 1998; KUNUGI *et al.* 1999). Über eine Häufigkeit der Inversion von 9,7 Prozent bei Skandinaviern mit paranoider Psychose berichten AXELSSON and WAHLSTROM (1984).

1.6.3.6 inv(9) und neoplastische Erkrankungen

Von einer perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 als erworbener Aberration bei neoplastischen Erkrankungen wurde bisher nur sehr selten im Zusammenhang mit Essentieller Thrombozythämie (WAN *et al.* 2000) und akuter myeloischer Leukämie berichtet (BETZ *et al.* 2005; UDAYAKUMAR *et al.* 2009). Auch wenn sich ererbte und erworbene Inversionen im perizentromerischen Bereich des Chromosoms 9 zytogenetisch gleich darstellen, könnte es doch Unterschiede hinsichtlich der Lage der Bruchpunkte geben. So wurde die Theorie aufgestellt, dass die erworbene Form der Inversion durch Durchtrennung eines der zahlreichen in 9p liegenden Onkogene die Entstehung von Tumoren begünstigt (PELLET *et al.* 1991; BETZ *et al.* 2005). In diesem Zusammenhang wird in der Literatur von einem prädisponierenden Effekt der Inversion für die Entstehung solider Tumoren wie des Larynxkarzinoms (MILAN and LAMBERTI 1996) und des Ovarialkarzinoms (YASUHARA *et al.* 2005) berichtet, außerdem gibt es diesbezügliche Hinweise für die Entstehung der akuten biphänotypischen Leukämie (LE CONIAT *et al.* 1982), der akuten lymphatischen Leukämie bei Kindern (PETKOVIC *et al.* 1991) sowie der akuten myeloischen Leukämie (KEUNG *et al.* 2003b). Von besonderer klinischer Relevanz für Patienten mit Leukämie-Erkrankungen ist die Beobachtung, dass Knochenmark- oder Stammzellspenden von Spendern mit einer perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 ein schlechteres Anwachsen der Spenderzellen beim Empfänger zeigen als Spenderzellen von Spendern ohne Inversion. Auch hier ist anzumerken, dass dieses Phänomen nicht in allen Studien nachweisbar war (IMASHUKU *et al.* 2002; KEUNG *et al.* 2002; KEUNG *et al.* 2003a; KEUNG *et al.* 2003b; MANOLA *et al.* 2006).

1.6.4 Bruchpunkte der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9

Die Bruchpunkte der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 liegen im kurzen Arm in 9p12 und im langen Arm in 9q13-q21.1, weniger häufig auch in 9q12 (SAMONTE *et al.* 1996). Bei einem Bruch innerhalb der Region 9q12 wird nur ein Teil des zytogenetisch sichtbaren Heterochromatinblocks in den kurzen Arm verlagert, was zu einer partiellen Inversion führt (MATTEI *et al.* 1981; NERI *et al.* 1982). Untersuchungen zur Organisation des Heterochromatins in der perizentromerischen Region des

Chromosoms 9 haben gezeigt, dass es strukturelle Ähnlichkeiten im Aufbau der Chromosomenregionen 9p11-p12 und 9q13-q21.1 gibt. Man bezeichnet diese beiden Regionen zusammen als dupliziertes Inversionssegment (vergleiche hierzu auch Absatz 1.6.5) und vermutet, dass dessen spezielle Beschaffenheit wesentlich an dem Mechanismus beteiligt ist, der zur Entstehung der perizentrischen Inversion führt (STARKE *et al.* 2002). Zusätzlich wird der Satelliten-DNA III des Heterochromatins eine besondere Bedeutung bei der Entstehung der perizentrischen Inversion zugemessen, da es innerhalb dieses Bereichs genau wie bei den Robertsonschen Translokationen zum Bruchereignis und zur anschließenden Wiedervereinigung kommt (ASSUM *et al.* 1993; RAMESH and VERMA 1996). Unterstützt wird dies auch durch die Beteiligung der Satelliten-DNA III bei der für myeloproliferative Erkrankungen spezifischen Translokation t(1;9) (SAMBANI *et al.* 2005). Spekulationen darüber, ob statt der perizentrischen Inversion ein sogenanntes Neozentromer in 9q13 mit gleichzeitiger Inaktivierung der Zentromerregion 9q10 entstanden sein könnte, konnten experimentell nicht untermauert werden (GUTIERREZ-ANGULO *et al.* 2001). Unter einem solchen Neozentromer versteht man ein neu gebildetes Zentromer, welches sich an einer anderen Stelle eines Chromosoms als das ursprüngliche Zentromer formiert und in der Regel keine nachweisbare α -Satelliten-DNA besitzt, in der C-Banden-Färbung negativ ist, aber essentielle Zentromerproteine für die Ausbildung eines funktionsfähigen Kinetochors als Angriffspunkt für die Spindelfasern bindet (AMOR and CHOO 2002).

In einem einzigen Fall wurden bisher abweichende Bruchpunkte in 9p13 und 9q11 bei einem phänotypisch unauffälligem Mann und weiteren seiner Familienangehörigen (Schwester, Kinder) beschrieben (MARTIN and ABRISQUETA 1983).

Die Abbildung 1.21 zeigt schematisch die bisher beobachteten perizentrischen Inversionen des Chromosoms 9 auf Grundlage der (molekular-)zytogenetischen Untersuchungsdaten aus den Publikationen von RAMESH and VERMA (1996), SAMONTE *et al.* (1996), STARKE *et al.* (2002) und NERI *et al.* (1982). Zur eindeutigen Beschreibung wurde für die vorliegende Arbeit eine einfache, einheitliche und jederzeit erweiterbare Nomenklatur entwickelt, die beginnend im p-Arm die Abfolge der Satelliten-DNAs in Richtung q-Arm aufzählt. Dabei stehen α für die α -Satelliten-, β für die β -Satelliten- und III für die Satellit-III-DNA. Somit wird ein nicht invertiertes Chromosom 9, bezogen auf die Satelliten-DNAs, beschrieben als p- $\alpha\beta$ III-q, die als klassisch bezeichnete komplette perizentrische Inversion des Chromosoms 9 als p-III $\beta\alpha$ -q.

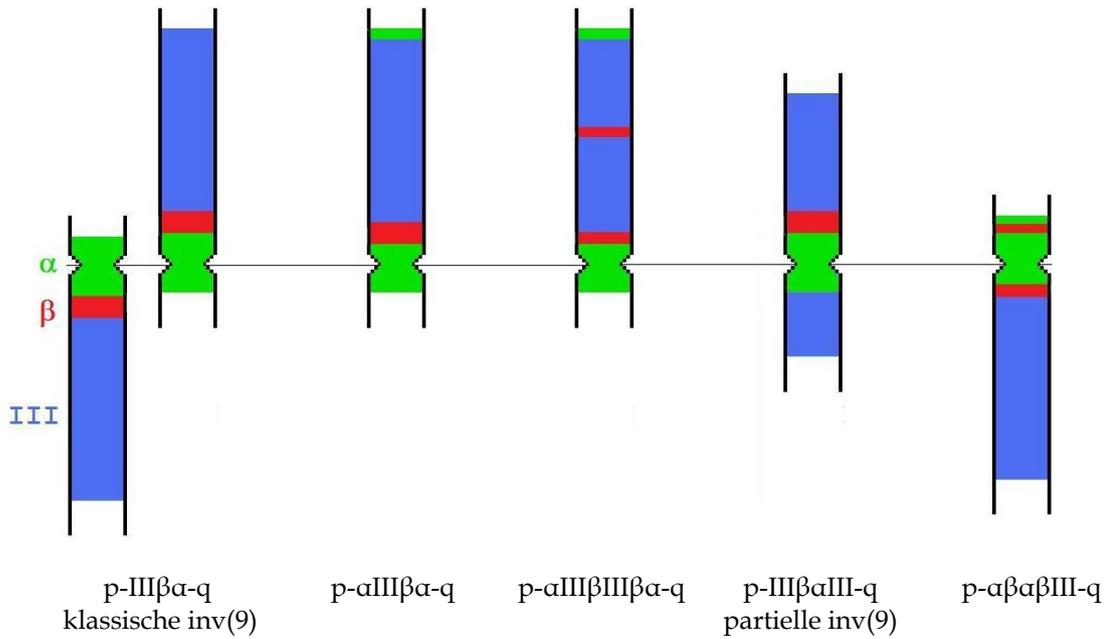


Abb. 1.21: Molekulargenetische Präsentation der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 auf Grundlage des Verteilungsmusters von α -, β - und Sat-III-DNA.

Um die aus verschiedenen Publikationen (NERI *et al.* 1982; RAMESH and VERMA 1996; SAMONTE *et al.* 1996; STARKE *et al.* 2002) stammenden Daten einheitlich und vergleichbar darzustellen, wurden einerseits einheitliche Farben verwendet (die auch den im Ergebnisteil dieser Arbeit verwendeten Falschfarben entsprechen), andererseits wurde eine einheitliche Nomenklatur zur Beschreibung der Abfolge der Satelliten-DNAs entworfen. Beginnend im p-Arm wird in Richtung des q-Arms die Reihenfolge der Satelliten-DNAs durch α (α -Satelliten-DNA), β (β -Satelliten-DNA) und III (Satellit-III-DNA) angegeben.

1.6.5 Invertiertes Duplikationssegment des Chromosoms 9

Als invertiertes Duplikationssegment wird eine bestimmte, evolutionär durch verschiedene Umbau- und Austauschprozesse entstandene Region beidseits des perizentromerischen Heterochromatins bezeichnet, die selbst aus euchromatischem Material besteht und große Strukturähnlichkeiten zwischen dem kurzen und dem langen Arm des Chromosoms 9 aufweist (PARK *et al.* 1998; HORVATH *et al.* 2000a; HORVATH *et al.* 2003; HUMPHRAY *et al.* 2004). Zytogenetisch lokalisieren die Segmente etwa zwischen den Banden 9p13.1 (Position etwa 38.710.000) und 9q21.11 (Position etwa 71.110.000) (WILLATT *et al.* 2007; JOSEPH-GEORGE *et al.* 2011).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die an der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 beteiligte Chromosomenregion mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung untersucht werden. Neben der Analyse von Zentromer und Heterochromatinblock soll speziell der Übergang zwischen Heterochromatin und Euchromatin an beiden Enden des sogenannten invertierten Duplikationssegments genauer charakterisiert werden. Dabei sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Ist es möglich, an hochaufgelösten Chromosomen durch eine Synchronisation der Lymphozytenkulturen mit Methotrexat und dem Einsatz des Interkalators Echinomycin bei der klassischen Chromosomenanalyse zusätzliche Informationen hinsichtlich der invertierten Region zu gewinnen?
2. Welche chromosomalen Umbauten lassen sich im Bereich von Zentromer und Heterochromatinblock molekularzytogenetisch nachweisen?
3. Welche Informationen lassen sich hinsichtlich chromosomaler Umbauten innerhalb der von der Inversion betroffenen Chromosomenregion durch Einsatz speziell ausgewählter BAC-Klone molekularzytogenetisch gewinnen?
4. Wo liegen die Grenzen der perizentrischen Inversion bzw. wie groß ist die von der Inversion betroffene Chromosomenregion tatsächlich?
5. Gibt es molekularzytogenetische Unterschiede bezüglich der Umbauprozesse bei Individuen mit unerfülltem Kinderwunsch und bei Individuen mit kongenitalen Fehlbildungen?
6. Lassen sich molekulargenetische Unterschiede hinsichtlich der perizentrischen Inversion feststellen bei Kindern mit kongenitalen Fehlbildungen und dem phänotypisch unauffälligen Elternteil, von dem die Inversion geerbt wurde?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die Rekrutierung geeigneter Probanden für die vorliegende Arbeit erfolgte aus dem Patientengut des Instituts für Humangenetik am Klinikum der LMU München (Abbildung 2.1) und umfasste sowohl Individuen mit unerfülltem Kinderwunsch als auch Kinder mit kongenitalen Fehlbildungen. Hierfür wurde das Befundarchiv der Abteilung Zytogenetik der Jahre 2000 bis 2011 nach Patienten mit perizentrischer Inversion eines der beiden Chromosomen 9 durchsucht. Innerhalb dieses 11 Jahre umfassenden Zeitraums ergab die klassische Chromosomenanalyse bei insgesamt 41 Patienten (Tabelle 2.1) eine solche perizentrische Inversion. Zu allen diesen 41 Patienten wurde versucht Kontakt aufzunehmen, was bei 16/41 Patienten (39 %) nicht gelang (unbekannt verzogen). 3/41 Patienten (7 %) hatten kein Interesse an einer Teilnahme, da sich deren Kinderwunsch in der Zwischenzeit entweder erfüllte bzw. aufgegeben wurde. Von den Eltern einer möglichen Probandin war zu erfahren, dass ihre Tochter bereits zwei Jahre vor Beginn dieser Arbeit an einem im Rahmen ihres unbekanntes Dysmorphie-Syndroms bestehenden Herzfehlers verstorben war. Somit verringerte sich die Anzahl potentieller Teilnehmer an der vorliegenden Arbeit auf 21 Patienten (51 %). Von diesen 21 Patienten übersandten letztlich nach gründlicher Aufklärung über die Zielsetzung der Arbeit und die Gewährung einer individuellen Bedenkzeit 10 Patienten eine Blutprobe zur Analyse. So konnten 10 der ursprünglich 41 in Betracht kommenden Patienten (24 %) als Probanden gewonnen werden.

Bei den 3 als Probanden teilnehmenden Kindern stellten die Eltern ebenfalls je eine Probe ihres Blutes für die Analyse zur Verfügung, was die Probandenanzahl auf 16 erhöhte.

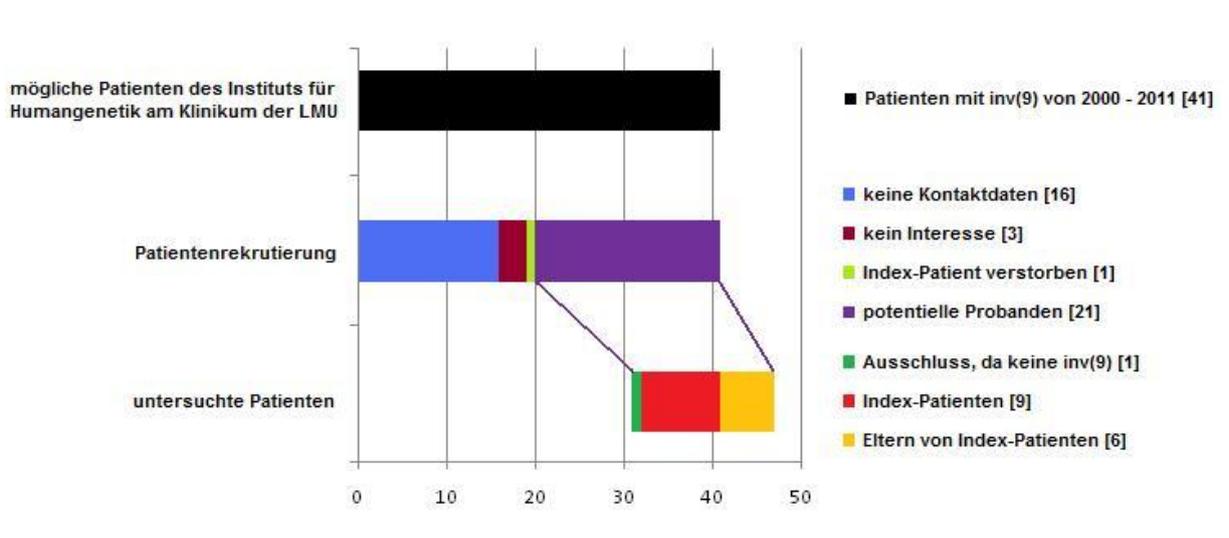


Abb. 2.1: Rekrutierung geeigneter Probanden.

Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, dass die bei Proband INV011 gefundene fragliche perizentrische Inversion eines der beiden Chromosomen 9 mittels Sonden-Set 3 (siehe Absatz 3.3.6) nicht bestätigt werden konnte. Da INV011 dadurch nicht mehr das Einschlusskriterium für die vorliegende Arbeit erfüllte, wurden die Blutprobe und alle daraus gewonnenen Kulturen vernichtet und keine weiteren Analysen durchgeführt.

Darüber hinaus zeigten die Kulturen von Proband INV016 trotz wiederholter Kultivierung keine Mitosefiguren, weshalb auch INV016 aufgrund eines Kulturversagens ungeklärter Ursache aus der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden musste.

Nr.	Jahr	m/w	Geb.-Jahr	Indikation	Diagnose	Bemerkung
1	2000	w	1997	V.a. Williams-Beuren-Syndrom	---	a)
2	2000	m	1968	2 Fehlgeburten der Partnerin (1x Abbruch wegen Fehlbildungen)	---	a)
3	2001	w	2001	V.a. Trisomie 21	Trisomie 21	
4	2001	m	1967	habituelle Aborte der Partnerin, Partnerin mit rob(15;22)	---	INV010
5	2001	m	1999	V.a. Dysmorphie-Syndrom	---	a)
6	2001	w	1986	V.a. Dysmorphie-Syndrom	---	a)
7	2001	w	1967	habituelle Aborte	---	
8	2001	w	1983	V.a. Ullrich-Turner-Syndrom	---	a)
9	2001	m	1963	2 Fehlgeburten der Partnerin	---	
10	2001	m	2001	V.a. Dysmorphie-Syndrom	---	a)
11	2002	m	1966	2 Fehlgeburten der Partnerin	---	
12	2002	w	1967	1 Kind mit Veränderung in 6q	---	a)
13	2002	m	1964	2 Fehlgeburten der Partnerin (1x Tetraploidie)	---	INV001
14	2003	w	2001	V.a. Dysmorphie-Syndrom	---	a)
15	2003	m	1964	Schwester mit Trisomie 21	---	
16	2003	m	1982	V.a. Klinefelter-Syndrom	chromosomale Umbauten in 44 % der analysierten Metaphasen	INV006
17	2004	m	1985	Mutter mit t(4;6)(q24;pter), Vater mit inv(9)	---	
18	2004	w	1971	2 Fehlgeburten	---	
19	2004	m	1961	habituelle Aborte der Partnerin	---	a)
20	2005	m	1972	Kinderwunsch, Trisomie 21 in der Verwandtschaft	---	a)
21	2005	m	1973	habituelle Aborte der Partnerin, 1 gesunder Sohn	---	b)
22	2006	w	2006	Fallot-Tetralogie	---	c)
23	2006	w	1976	2 Fehlgeburten	---	INV005
24	2006	m	2006	V.a. Dysmorphie-Syndrom	---	a)
25	2006	m	1991	V.a. Klinefelter-Syndrom, Pubertas tarda	---	
26	2006	m	1964	2 früh verstorbene Geschwister, 1 Todgeburt bei der Mutter, heterozygoter $\Delta F508$ -Mutationsträger	---	a)
27	2006	w	1973	Kinderwunsch, Bruder mit Trisomie 21	---	INV016

28	2006	m	1970	Tochter mit UPD6	---	INV015
29	2006	m	1968	2 Fehlgeburten der Partnerin	---	
30	2007	m	2007	V.a. Dysmorphie-Syndrom	---	INV002
31	2007	w	1979	unerfüllter Kinderwunsch	---	
32	2008	m	1983	Sohn mit Autismus und inv(9)	---	a)
33	2008	m	2008	V.a. Trisomie 21	---	INV014
34	2009	w	1992	z.A. Ullrich-Turner-Syndrom bei familiärem Kleinwuchs	---	a)
35	2009	w	2007	V.a. Trisomie 21	Trisomie 21	a)
36	2010	w	1976	2 Fehlgeburten, 1 gesundes Kind aus früherer Partnerschaft	---	INV011
37	2010	w	2004	V.a. Dysmorphie-Syndrom	---	
38	2010	m	2002	Autismus, Vater mit inv(9)	fraX-Syndrom (FMR1-Vollmutation)	a)
39	2011	m	2009	Entwicklungsretardierung, Makrozephalie	---	INV007
40	2011	m	1958	multiple Zahnfehlanlagen, V.a. Ektodermale Dysplasie	---	b)
41	2011	w	1981	V.a. Lafora-Myoklonusepilepsie	---	b)

Tab. 2.1: Übersicht über Patienten mit perizentrischer Inversion eines der beiden Chromosomen 9 im Zeitraum von 2000 bis 2011 des Instituts für Humangenetik am Klinikum der LMU.

m/w = Geschlecht (männlich/weiblich). V.a. = Verdacht auf.

Patient Nr. 32 ist der Vater von Patient Nr. 38.

Bemerkungen: a) keine Kontaktdaten. b) kein Interesse. c) verstorben.

Die Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Probanden. Nach Vorgabe der Ethikkommission (Projekt-Nummer 339-10) wurden alle zur Verfügung gestellten Patientenproben pseudonymisiert. Hierfür erhielt jede Blutprobe entsprechend ihres Eingangsdatums im Labor eine fortlaufende dreistellige Nummer, beginnend mit ‚INV‘, zur eindeutigen Zuordnung zu der vorliegenden Arbeit.

Pseudonym	Index-Patient	Geschlecht	Geb.-Jahr	Bemerkung
INV001	ja	männlich	1964	
INV002	ja	männlich	2007	
INV003	nein	weiblich	1982	Mutter von INV002
INV004	nein	männlich	1971	Vater von INV002 → inv(9)-Träger
INV005	ja	weiblich	1976	
INV006	ja	männlich	1982	chromosomale Umbauten in 44 % der analysierten Metaphasen
INV007	ja	männlich	2009	
INV008	nein	weiblich	1977	Mutter von INV007
INV009	nein	männlich	1965	Vater von INV007 → inv(9)-Träger
INV010	ja	männlich	1967	Partnerin mit rob(15;22)
INV011	ja	weiblich	1976	keine Inversion nachweisbar!
INV012	nein	weiblich	1977	Mutter von INV014
INV013	nein	männlich	1965	Vater von INV014 → inv(9)-Träger
INV014	ja	männlich	2008	
INV015	ja	männlich	1970	
INV016	ja	weiblich	1973	Kulturversagen trotz wiederholter Kultivierung

Tab. 2.2: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Probanden.

Probanden in durchgestrichenen Zeilen sind während der Durchführung der vorliegenden Arbeit ausgeschieden (siehe oben). Als Index-Patient sind die Studienteilnehmer bezeichnet, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik im Institut für Humangenetik am Klinikum der LMU aufgrund einer klinischen Fragestellung bereits eine Inversion 9 nachgewiesen wurde.

2.2 Chromosomenpräparation

Für die Gewinnung von Chromosomen wurde jedem Probanden eine heparinisierte Blutprobe von etwa 2 mL entnommen. Diese wurde unmittelbar nach Eingang im Labor entsprechend der Vorgaben der Ethikkommission pseudonymisiert und eventuelle Reste direkt nach Abschluss der Kultivierung vernichtet.

Alle für die Arbeiten im Kulturbereich verwendeten Reagenzien sind selbstverständlich steril bzw. wurden nach der Herstellung zum Einsatz in der Zellkultur sterilfiltriert (Sterilfilter Firma Brand, Porengröße 0,2 µm). Deionisiertes Wasser (A. dest.) stammt aus eigener Herstellung im Institut für Humangenetik am Klinikum der LMU, HPLC-Wasser (A. bidest.) wurde von der Firma Sigma (9S304-2.SL) bezogen.

2.2.1 Ansatz und Kultivierung

Reagenzien:

- PB-MAX Komplettmedium (Gibco, 12557)
- RPMI-1640 Kulturmedium (Gibco, 52400)
- Interleukin-2
 - 50 µg Interleukin-2 (Biochrom, W1505950050) gelöst in 500 µL 100 mM Essigsäure, danach Zugabe von 4,5 mL RPMI-1640
 - Stammlösung 100 mM Essigsäure: 10 mL A. dest. mit 57 µL Eisessig (Merck, 1.00063) mischen
- Methotrexat (Endkonzentration 10^{-5} M bzw. $2,2 \cdot 10^{-5}$ M) (w/v)
 - Stammlösung: 50 mg Methotrexat (Enzo Life Sciences, 440-045-M050) gelöst in 2 mL 1 M NaOH, danach Zugabe von 23 mL A. dest.
 - Stammlösung 1 M NaOH: 2 g NaOH (Merck, 1.06482) gelöst in 50 mL A. dest.
- Thymidin (Endkonzentration 10^{-5} M) (w/v)
 - Stammlösung: 10 mg Thymidin (Sigma, T1895) gelöst in 25 mL A. dest.
- Echinomycin (Endkonzentration 1,4 µg/ml) (w/v)
 - Stammlösung: 1 mg Echinomycin (Enzo Life Sciences, ALX-380-201) gelöst in 5 mL sterilem DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma, D2650)

Für jeden Probanden wurden insgesamt 4 Kulturen angelegt:

- (1) zwei P-Kulturen zur Erzeugung von Prophase-/Prometaphase-Chromosomen für die hochauflösende Analyse der perizentrischen Region des Chromosoms 9
- (2) eine F-Kultur zur Überprüfung einer möglicherweise vorhandenen erhöhten Brüchigkeit (*fragile site*) in der perizentrischen Region des Chromosoms 9
- (3) eine B-Kultur nach Standard-Kultivierungsprotokoll für eventuell zusätzliche Untersuchungen

Die P- und F-Kulturen erfolgten nach modifizierten Protokollen für die Gewinnung von Prophase-Chromosomen (YUNIS *et al.* 1978; SAWYER 1995), die B-Kultur nach dem Standard-Kultivierungsprotokoll für die Gewinnung von Metaphase-Chromosomen des Instituts für Humangenetik am Klinikum der LMU. Die Abbildung 2.2 gibt einen schematischen Überblick über die Komponenten der einzelnen Kulturen und den zeitlichen Ablauf der Kultivierung.

Zu jedem Kulturröhrchen, welches 10 mL PB-MAX Komplettmedium enthielt, wurden 300 µL der gut durchmischten, heparinisierten Probandenblutprobe pipettiert. Um die Teilung der T-Lymphozyten noch zusätzlich zu stimulieren, wurden den P- und F-Kulturen am Ansatzstag je 120 µL Interleukin-2 zupipettiert (HARCOMBE *et al.* 1994). Alle Kulturen wurden 3 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet.

Beiden P-Kulturen wurde am zweiten Kultivierungstag zum Zwecke der Synchronisierung je 24 µL Methotrexat (YUNIS *et al.* 1978) zupipettiert. Auf diese Weise wurde erreicht, dass sich die zur Teilung angeregten T-Lymphozyten durch Blockade des für den Zellzyklus notwendigen Enzym Dihydrofolatreduktase im Stadium der S-Phase arretierten. Exakt 17 Stunden nach Zugabe des Methotrexats wurde dieses durch zweimaliges Waschen mit RPMI-1640 aus den Kulturen entfernt und die Kulturen mit frischem PB-MAX Komplettmedium auf 10 mL aufgefüllt. Die Blockade der Dihydrofolatreduktase wurde durch Zugabe von 74 µL Thymidin aufgehoben. Die T-Lymphozyten setzten daraufhin

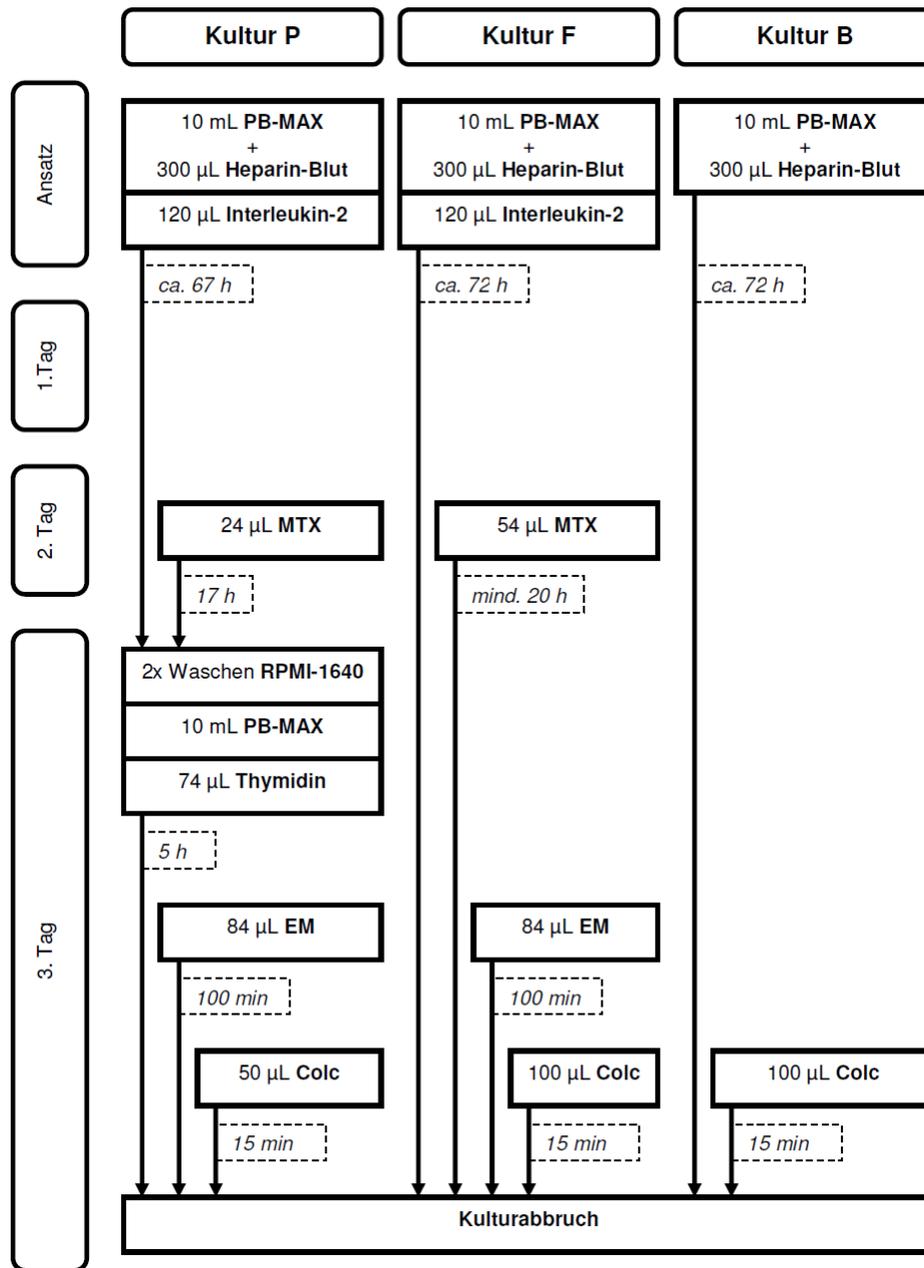


Abb. 2.2: Übersicht über die Komponenten der einzelnen Kulturen sowie den zeitlichen Verlauf der Kultivierung.

Die in den gestrichelten Kästchen an den Pfeilen angegebenen Zeiten zeigen die jeweiligen Inkubationszeiten an. MTX = Methotrexat. EM = Echinomycin. Colc = Colcemid.

alle synchron von der S-Phase aus ihre Zellteilung fort. Der Sinn dieser Prozedur liegt darin, zum späteren Zeitpunkt des Kulturabbruchs eine möglichst hohe Anzahl von Zellen im Teilungsstadium der Prophase/Prometaphase vorliegen zu haben.

Vom Zeitpunkt der Thymidin-Zugabe bis zum Kulturabbruch verblieben die Kulturen genau 5 Stunden 10 Minuten im Brutschrank. Diese sowie alle folgenden Inkubationszeiten bei der Kultivierung

peripherer T-Lymphozyten ergaben sich aus umfangreichen, im Vorfeld durchgeführten Versuchsreihen zur Optimierung der Ausbeute von Zellen im Stadium der Prophase/Prometaphase.

Um dem physiologischen Kondensationsprozess der Chromosomen während des Durchlaufens der Mitose entgegen zu wirken, wurden pro Kulturröhrchen 84 μL Echinomycin als Interkalator 90 min vor Kulturabbruch zugesetzt (SAWYER 1995).

Echinomycin gehört zur Gruppe der Quinoxalin-Antibiotika, wurde ursprünglich aus *Streptomyces* isoliert und findet als Chemotherapeutikum Anwendung in der Medizin (VAN DYKE and DERVAN 1984). Aufgrund seiner in Abbildung 2.3 dargestellten planaren Struktur ist es in der Lage, sich in die kleine Kurve der DNA-Doppelhelix einzulagern und diese dadurch „aufzuspannen“. Auf diese Weise wird es möglich, Chromosomen mit hoher Auflösung von bis zu 2000 bps zu gewinnen. Echinomycin hat auch einen indirekten positiven Effekt auf die GTG-Färbung der mit ihm behandelten Chromosomen. Da Echinomycin eine höhere Affinität zu GC-reichen als zu AT-reichen DNA-Abschnitten hat (VAN DYKE and DERVAN 1984; FOX and KENTEPE 1990; FOX *et al.* 1991), werden die GC-reichen DNA-Abschnitte, die sich in der GTG-Färbung als hell erscheinende Chromosomenregionen darstellen, stärker „aufgespannt“ als die dunkel erscheinenden AT-reichen Regionen. Auf diese Weise erhält man eine deutlichere, weil schärfere Trennung zwischen hellen und dunklen Chromosomenbanden, wodurch auch feine Banden deutlicher sichtbar werden. Zur Verdeutlichung zeigt die Abbildung 2.4 dies am Beispiel des Chromosoms 11.

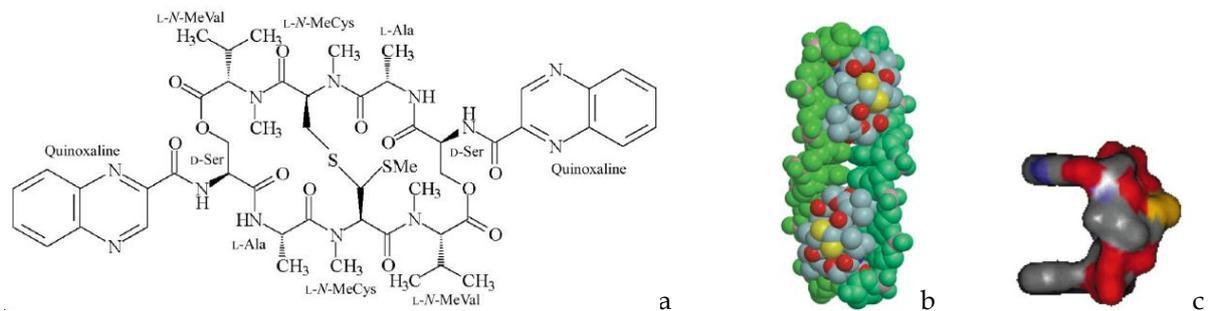


Abb. 2.3: Echinomycin.

- a. Strukturformel von Echinomycin (CUESTA-SEIJO and SHELDRIK 2005).
- b. Kugelmodell-Darstellung der Interkalation von Echinomycin in die kleine Kurve DNA-Doppelhelix (CUESTA-SEIJO and SHELDRIK 2005).
- c. Struktur des Echinomycin-Moleküls im wässrigen Milieu. Die beiden grauen nach links weisenden Strukturen repräsentieren die Quinoxalin-Ringsysteme, das gelbe Areal auf der rechten Seite des Moleküls steht für die Schwefelbrücke (LENG *et al.* 2003).

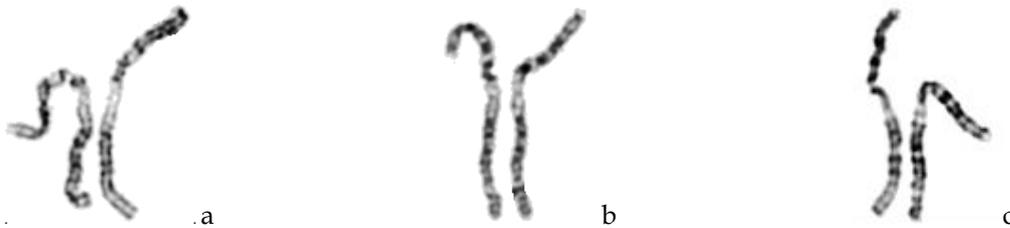


Abb. 2.4: Verbesserung des Kontrasts zwischen hellen und dunklen Banden in der GTG-Färbung am Beispiel des Chromosoms 11.

- a. und b. Chromosomen aus einer Versuchsreihe zur Optimierung der Colcemid-Inkubationszeit. Dabei wurden die Chromosomen zum Zwecke der Auflösungserhöhung mit CRA (*Chromosome Resolution Additive*, Fa. Genial Genetics) behandelt, welches ein unspezifischer Interkalator ist und vergleichbare Ergebnisse wie das toxische Ethidiumbromid liefert.
- c. Dieses Paar des Chromosoms 11 stammt aus einer Lymphozytenkultur, die 90 min vor Kulturabbruch mit Echinomycin inkubiert wurde. Wegen der höheren Affinität von Echinomycin zu GC-reichen DNA-Abschnitten (helle Regionen) kondensieren die AT-reichen DNA-Abschnitte (dunkle Regionen) stärker, was zu einer höheren Kontrastierung zwischen hellen und dunklen Chromosomenregionen führt.

Die F-Kultur erhielt am zweiten Kultivierungstag 54 μ L Methotrexat, welches nicht wieder aus der Kultur ausgewaschen wurde (SUTHERLAND 1979; BARBI *et al.* 1984). Analog zu den P-Kulturen erfolgte 90 Minuten vor Kulturabbruch die Zugabe des Interkalators Echinomycin.

Die B-Kultur erfolgte nach dem Standard-Kultivierungsprotokoll des zytogenetischen Labors des Instituts für Humangenetik am Klinikum der LMU. Es wurden weder Interleukin-2 noch Methotrexat, Thymidin oder Echinomycin verwendet.

2.2.2 Kulturabbruch (Aufarbeitung der Lymphozytenkulturen)

Reagenzien:

- Colcemid (Gibco, 15210-057)
- 0,42 % KCl-Lösung (w/v)
 - 4,2 g KCl (Merck, 1.04936) gelöst in 1000 mL A. dest.
- 100 % Methanol (Merck, 1.06009)
- L-Fixativ (Leichtes Fixativ; Vorfixierung)
 - 46 mL A. dest. mit 2,5 mL Eisessig (Merck, 1.00063) und 1,5 mL Methanol (Merck, 1.06009) mischen
- C-Fixativ (Carnoy-Fixativ)
 - 750 mL Methanol (Merck, 1.06009) mit 250 mL Eisessig (Merck, 1.00063) mischen

Der Kulturabbruch wurde durch Zugabe des synthetischen Spindelgifts Colcemid eingeleitet. Colcemid lagert sich an die Enden der Spindelfasern an und verhindert so deren fortschreitende Polymerisation. Somit unterbleibt der für die Trennung der Chromatiden notwendige Kontakt zwischen Spindelfaser und Chromosom (Kinetochor). Da sowohl die Konzentration als auch die Länge der Inkubationszeit des Colcemids in der Kultur Einfluss auf den Kondensationsgrad der Chromosomen nehmen, wurden nach ebenfalls umfangreichen Vorversuchen die folgenden Parameter für die einzelnen

Kulturen ermittelt: P-Kulturen 50 µL Colcemid für 15 min, F- und B-Kulturen 100 µL Colcemid für 15 min. Nach erfolgter Inkubation wurden die Kulturen zur Sedimentation der Zellen 5 min bei 440 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und verworfen.

2.2.2.1 Hypotone Behandlung der Zellen

Im nächsten Schritt der Aufarbeitung wurden die Zellen einer hypotonen Behandlung unterzogen. Hierfür wurden die nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes übriggebliebenen Zellpellets auf dem Vortexer aufgewirbelt und tropfenweise unter weiterem Vortexen mit 10 mL einer auf 37 °C vorgewärmten, 0,42 %igen KCl-Lösung versetzt. Diese Prozedur hat einerseits die osmotische Lyse und somit die erwünschte Entfernung der in den Kulturen enthaltenen Erythrozyten zur Folge, andererseits bewirkt das hypotone Milieu eine Quellung der Lymphozyten. Dieser simultane Lyse- und Quellungsschritt erfolgte während einer Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für 30 min. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 440 g für 5 min.

Die hypotone Behandlung stellt den ersten kritischen Schritt bei der Aufarbeitung der Kulturen dar. Ist die Behandlung zu kurz, ist die Quellung der Lymphozyten zu gering und es kommt nur zu einer unzureichenden Trennung der Chromosomen voneinander. Außerdem verbleiben zu viele intakte Erythrozyten in der Suspension, die die anschließenden Untersuchungen deutlich erschweren. Werden die Zellen zu lange dem hypotonen Milieu ausgesetzt, kommt es zwar zur erwünschten kompletten Lyse aller enthaltenen Erythrozyten, allerdings besteht dann auch die Gefahr der Überquellung und Zerreißung der Lymphozyten, was eine Freisetzung der Chromosomen in die Suspension zur Folge hat.

2.2.2.2 Fixierung der Zellen

Der durch die hypotone Behandlung jetzt stark hämolytische Überstand wird abgesaugt und verworfen. Das auf dem Vortexer aufgewirbelte, jetzt fast ausschließlich aus gequollenen Lymphozyten bestehende Pellet wird vorsichtig und unter ständigem Vortexen tropfenweise mit 5 mL auf 4 °C gekühltem L-Fixativ versetzt (sogenannte Präfixierung). Dieser Schritt dient der Fixierung der Lymphozytenmembran und stellt den zweiten kritischen Schritt im gesamten Aufarbeitungsprozess dar. Findet hier eine ungenügende Fixierung statt, ist die Lymphozytenmembran zu labil und reißt noch in der Suspension, was die wahllose Durchmischung der Chromosomen verschiedener Zellen zur Folge hat. Wird die Fixierung zu schnell durchgeführt, kommt es zur Verklumpung der Zellen im Pellet. Dieser Prozess ist nicht umkehrbar und führt bei der späteren Präparation der Chromosomen auf dem Objektträger zu Zellklumpen und nicht verwertbaren Mitosefiguren. Direkt im Anschluss an die Zugabe des L-Fixativs wurde die Suspension bei 440 g für 5 min abzentrifugiert.

Der jetzt durch einen Oxidationsprozess des Hämoglobins bräunlich erscheinende Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das auf dem Vortexer aufgewirbelte Zellpellet wurde langsam mit 5 mL

100 % Methanol versetzt und anschließend erneut bei 440 g für 5 min abzentrifugiert. Die Behandlung mit Methanol dient einerseits als Waschschrift und hat andererseits einen dehydrierenden Effekt als Vorbereitung für die nachfolgende endgültige Fixierung.

Nach der Zentrifugation stellt sich der Überstand klar und weitestgehend farblos dar, das Zellpellet erscheint weiß und „flauschig“. Nach Absaugen und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet auf dem Vortexer aufgewirbelt und unter ständigem Vortexen vorsichtig und tropfenweise mit 5 mL auf -18 °C gekühltem C-Fixativ versetzt. Dies stellt den eigentlichen Fixierungsschritt bei der Aufarbeitung dar, wie er routinemäßig in zytogenetischen Laboren durchgeführt wird. Das oben beschriebene zeitaufwendigere Verfahren der Präfixierung mit L-Fixativ und anschließender Methanol-Waschung ist eine schonendere Methode der Fixierung und trägt zur Steigerung der Qualität bei der Präparation besonders hochaufgelöster Chromosomen bei. Nach Zugabe des C-Fixativs erfolgte eine Inkubation der Suspensionen bei -18 °C für mindestens 20 min. Der Fixierungsprozess, bei dem es zum Ausfallen nukleärer Proteine kommt, lässt sich durch eine Übernacht-Inkubation bei -18 °C optimieren. Nach erfolgter Inkubation wurden die Suspensionen bei 440 g für 5 min abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden danach noch 2 Mal mit C-Fixativ gewaschen.

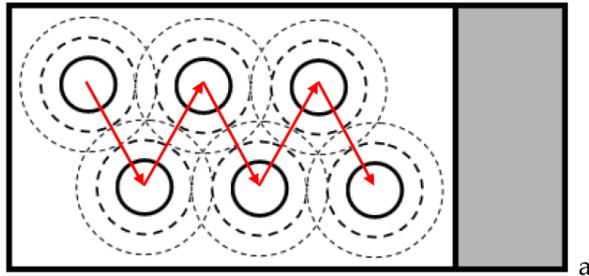
Nach dem letzten Waschschrift wurden die Suspensionen mit C-Fixativ aufgefüllt und bei -18 °C gelagert.

2.3 Herstellung von Chromosomenpräparaten

Reagenzien:

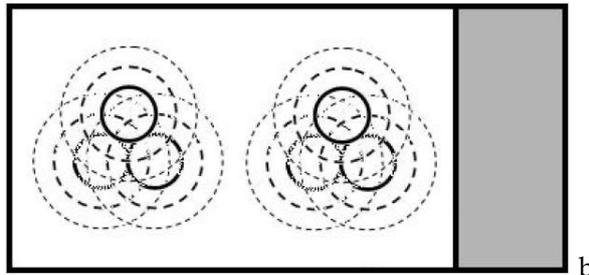
- 50 % Essigsäure
 - 50 mL A. dest. mit 50 mL Eisessig (Merck, 1.00063) mischen
- 70 % Ethanol
 - 70 mL Ethanol (Merck, 1.00983) gemischt mit 30 mL A. dest.
- 100 % Methanol (Merck, 1.06009)

Die für die Herstellung von Chromosomenpräparaten verwendeten SuperFrost-Objektträger (Menzel, AA00008232E) wurden zunächst mit 70 %igem Ethanol entfettet, anschließend luftgetrocknet und bis zur Verwendung in einer mit 50 %iger Essigsäure gefüllten Küvette bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Abbildung 2.5 gibt einen schematischen Überblick über das Auftropfmuster für die einzelnen Chromosomenpräparationen.



GTG-Färbung.

6 Tropfen fixierte Zellsuspension wurden versetzt von links nach rechts aus ca. 10 cm Höhe auf den Essigsäure-feuchten Objektträger getropft.



DA/DAPI-Färbung und FISH.

Jeweils 3 Tropfen fixierte Zellsuspension wurden auf eine oder beide Hälften des Essigsäure-feuchten Objektträgers getropft.

Abb. 2.5: Auftropfmuster der fixierten Zellsuspension für verschiedenen Untersuchungen.

Der senkrechte graue Balken symbolisiert den Mattrand des Objektträgers, die konzentrischen Kreise die sich auf dem Objektträger ausbreitenden Suspensionstropfen.

2.3.1 Chromosomenpräparate für die GTG (*G-bands by trypsin using Giemsa*)-Färbung

Nach der GTG-Methode zu färbende Chromosomenpräparate wurden sowohl aus einer der P- als auch aus der F-Kultur angefertigt. In der Regel waren zwei Objektträger für die Auswertung ausreichend.

Zunächst wurden die wie unter Absatz 2.2.2 beschrieben hergestellten und bei -18 °C gelagerten Suspensionen erneut bei 440 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand bis auf einen Rest von etwa 1 mL verworfen. Das Zellpellet wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette im verbliebenen Fixativ gründlich resuspendiert. Auf einen gefrorenen Kühlakku wurde ein wie oben beschrieben vorbereiteter, mit einem dünnen Film 50 %iger Essigsäure benetzter Objektträger waagrecht gelegt. Sechs Tropfen der Zellsuspension wurden aus der Pasteurpipette aus etwa 10 cm Höhe zügig von links nach rechts auf den Objektträger getropft. Zur optimalen Spreitung der Chromosomen wurde der Objektträger sofort nach dem Auftropfen der Suspension in eine feuchte Kammer gegeben. Die feuchte Kammer bestand aus einer kleinen Metallbox, die auf einer 60 °C warmen Heizplatte stand und in der ein feuchtes Papiertuch lag. Nach etwa 3 Minuten war die Flüssigkeit auf dem Objektträger verdunstet. Der Objektträger wurde aus der feuchten Kammer entnommen und zum Entfernen von Essigsäureresten in 100 % Methanol durch vorsichtiges Schwenken gründlich gespült. Ein unzureichendes bzw. gar kein Spülen des Objektträgers wirkt sich nachteilig auf die Chromosomenmorphologie aus. Nach der Spülung in Methanol wurde der Objektträger 30 min luftgetrocknet, bevor er zur sogenannten

Alterung für 90 min auf eine 80 °C warme Heizplatte gelegt wurde. Dies dient der Vorbereitung der Chromosomen für die sich später anschließende GTG-Färbung.

2.3.2 Chromosomenpräparate für die DA/DAPI (*DAPI-bands by Distamycin A and 4',6-Diamidino-2-phenylindole*)-Färbung

Nicht bei allen für die vorliegende Arbeit untersuchten Probanden war im Vorfeld bekannt, ob eine perizentrische Inversion an einem der beiden Chromosomen 9 vorliegt. Zur Anwendung kam die DA/DAPI-Färbung deshalb bei bisher noch nicht untersuchten Eltern, um zu klären, ob die perizentrische Inversion maternalen oder paternalen Ursprungs ist. Der Ursprung der perizentrischen Inversion ist von besonderem Interesse, da in der vorliegenden Arbeit ein Vergleich der Inversionssegmente bei verwandten Individuen erfolgen soll.

Für die DA/DAPI-Färbung wurde die B-Kultur verwendet. Es war ausreichend, einen Tropfen Zellsuspension auf eine Hälfte des Objektträgers zu geben. Sonst verlief die Herstellung der Chromosomenpräparate analog der unter Absatz 2.3.1 beschriebenen Prozedur. Auf eine Alterung der Chromosomenpräparate wurde verzichtet.

2.3.3 Chromosomenpräparate für die FISH (*Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung*)-Analyse

Bei der Herstellung der Chromosomenpräparate für die FISH-Analyse aus einer der beiden P-Kulturen wurde wie unter Absatz 2.3.1 beschrieben vorgegangen. Zwei kleine Modifikationen wurden aus Gründen der Praktikabilität durchgeführt. Erstens wurden je 3 Tropfen Zellsuspension jeweils auf die linke und rechte Hälfte eines ersten und nochmals 3 Tropfen Zellsuspension auf eine Hälfte eines zweiten Objektträgers gegeben (entspricht den späteren Hybridisierungsarealen), und zweitens wurde die Dauer der thermischen Alterung der Chromosomen bei 80 °C auf der Heizplatte auf 10 min reduziert.

2.4 GTG-Färbung

In den Anfangszeiten der Chromosomenanalyse waren nur numerische Aberrationen erkennbar, so wurden als erstes die Trisomie 21 als zugrunde liegende Veränderung beim Down-Syndrom (LEJEUNE *et al.* 1959) und das Fehlen eines Geschlechtschromosoms beim Ullrich-Turner-Syndrom (FORD *et al.* 1959) beschrieben. Zwar waren zu dieser Zeit bereits Varianten vor allem im Heterochromatin-Bereich des Chromosoms 1 bekannt, eine genauere Struktur der Chromosomen konnte aber noch nicht beurteilt werden. Dies gelang erst durch Einführung einer speziellen Färbetechnik (CASPERSSON *et al.* 1968;

CASPERSSON *et al.* 1970; CASPERSSON *et al.* 1972), die zur Entstehung sich abwechselnder heller und dunkler Regionen auf den Chromosomen führte, der sogenannten Banden.

Auf die Arbeiten von SEABRIGHT (1971) geht die noch heute in der Routinediagnostik verwendete sogenannte GTG-Färbung zurück. Hierbei werden die Chromosomenpräparate zunächst mit dem Enzym Trypsin behandelt und anschließend mit dem Farbstoff Giemsa gefärbt. Dabei ergibt sich ein reproduzierbares Muster von hellen und dunklen Banden, welches charakteristisch für jedes Chromosom ist. GTG steht in diesem Fall für *G-bands by trypsin using Giemsa*.

2.4.1 Durchführung der GTG-Färbung

Reagenzien:

- Trypsin-Lösung
 - 32 mL A. dest. und 1 mL Trypsin 0,25 % (w/v) in PBS (Biochrom, L2123) mischen
- 80 % Ethanol
 - 80 mL Ethanol (Merck, 1.00983) gemischt mit 20 mL A. dest.
- 0,9 % NaCl-Lösung (w/v)
 - 9 g NaCl (Merck, 1.06404) und 1000 mL A. dest. mischen
- Giemsa-Lösung
 - 4,5 mL Giemsa (Sigma, GS500) mit 44 mL Sörensen-Puffer mischen
- Sörensen-Puffer
 - 50 mL di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, 1.06587) und 50 mL Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, 1.04875) mischen

Auf ein Deckglas wurden 2 bis 3 Tropfen der Trypsin-Lösung aufgebracht. Man ließ das Deckglas an ein wie unter Absatz 2.3.1 beschrieben hergestelltes Chromosomenpräparat ansaugen und das Trypsin für 11 Sekunden auf die Chromosomen einwirken. Danach wurde das Deckglas abgeschüttelt und der Objektträger zum Abbruch der enzymatischen Reaktion 1 Minute in 80 %igem Ethanol gespült. Nach Entfernung des Ethanols durch Spülen des Objektträgers in 0,9 %iger NaCl-Lösung erfolgte die Färbung für 7 Minuten in der Giemsa-Lösung. Überschüssige Farbe wurde im Anschluss durch jeweils 5 Sekunden Spülen des Objektträgers in Sörensen-Puffer und A. dest. entfernt.

2.4.2 Auswertung GTG-gefärbter Chromosomenpräparate

Von allen Probanden wurden hochaufgelöste Chromosomenpräparationen GTG-gefärbt. Es sollte geklärt werden, ob mit Hilfe der Standard-Bänderungstechnik bei hoher Auflösung eine genauere Charakterisierung des Inversionssegments möglich ist. Es wurden mindestens fünf Prophasen/Prometaphasen durchlichtmikroskopisch mit Hilfe der Software IKAROS der Firma MetaSystems aufgenommen und analysiert.

2.5 DA/DAPI-Färbung

Mit Hilfe der Distamycin A/DAPI-Färbung lassen sich die heterochromatischen Regionen der Chromosomen 1, 9, 15, 16 und Y selektiv darstellen. Sie wurde erstmals von SCHWEIZER *et al.* (1978) beschrieben. Distamycin A ist ein Antibiotikum ohne eigene fluoreszierende Eigenschaften, welches stabile Bindungen mit AT-reichen DNA-Abschnitten eingeht, dabei aber nicht interkaliert (ZIMMER *et al.* 1971; LIN *et al.* 1977). Auch wenn der eigentliche Mechanismus dieser Färbung unbekannt ist, wird angenommen, dass Distamycin A repetitive Sequenzen in der DNA absättigt und sie auf diese Weise für DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) unzugänglich macht. Durch den hohen Gehalt von repetitiven Sequenzen in den heterochromatischen Regionen ist diese Sättigung hier nur unvollständig, was letztlich zur fluoreszenzmikroskopischen Nachweisbarkeit dieser Regionen führt.

2.5.1 Durchführung der DA/DAPI-Färbung

Reagenzien:

- Distamycin A-Lösung (von PD. Dr. rer. nat. Stefan Müller zur Verfügung gestellt)
- PBS pH 7,0
 - 1 PBS-Tabletten (Sigma, P4417) in 150 mL A. dest. lösen, auf pH 7,0 einstellen und mit A. dest. auf 200 mL auffüllen
- Vectashield Antifade Eindeckmedium mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; Vector Laboratories, H-1200)

Auf ein wie unter Absatz 2.3.1 beschrieben hergestelltes Chromosomenpräparat wurden 150 µL Distamycin A-Lösung pipettiert, der Objektträger wurde mit einem Deckglas abgedeckt und für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Deckglas entfernt und der Objektträger 15 Sekunden in PBS gewaschen. Nachdem der Waschpuffer durch Schrägstellen des Objektträgers abgelaufen war, wurde das Chromosomenpräparat mit 2 Tropfen Vectashield Antifade Eindeckmedium mit DAPI versehen und erneut mit einem Deckglas eingedeckt. Bis zur Auswertung wurden die Präparate dunkel bei 2 bis 8 °C im Kühlschrank gelagert.

2.5.2 Auswertung DA/DAPI-gefärbter Chromosomenpräparate

Zur Identifizierung des Elternteils, welches die Inversion an das Kind weitergegeben hat, wurden Chromosomenpräparationen mit der Distamycin A/DAPI-Methode gefärbt. Zur Beurteilung waren 2 bis 3 Mitosefiguren ausreichend, die fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe der Software ISIS der Firma MetaSystems aufgenommen und analysiert wurden.

2.6 Herstellung der DNA-Sonden für die FISH (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung)

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung – kurz FISH – ist eine Methode, mit der sowohl ganze Chromosomen (CREMER *et al.* 1988) als auch nur bestimmte Chromosomenregionen (LANDEGENT *et al.* 1985; CREMER *et al.* 1986) dargestellt und nachgewiesen werden können. Dies geschieht *in situ*, das heißt in der „physiologischen Umgebung“ der nachzuweisenden Region direkt auf den präparierten Chromosomen bzw. in den Interphasekernen. Auf diese Weise ist eine Beurteilung der Zielstruktur im Zusammenhang mit den umliegenden Regionen möglich.

Je nach Fragestellung bedient man sich spezieller Arten von Sonden, um die zu charakterisierende bzw. nachzuweisende Region darzustellen:

- a) WCP-Sonden (*whole chromosome painting/probe*): Sonden zur Darstellung ganzer Chromosomen
- b) PCP-Sonden (*partial chromosome painting/probe*): Sonden zur Darstellung von Chromosomenarmen oder einzelner Chromosomenbanden
- c) LSI-Sonden (*locus specific identifier*): Sonden zur Darstellung und zum Nachweis von euchromatischen Regionen, zum Beispiel für Genloci für die Mikrodeletions- und Subtelomerdiagnostik
- d) CEP-Sonden (*centromere enumeration painting/probe*): Sonden zur Darstellung von Zentromeren (beispielsweise zum Nachweis von Gonosomen in Interphasekernen)

Durch Kombination mehrerer Sonden einer Art bzw. Sonden verschiedener Arten lässt sich ein Zugewinn an Information und/oder eine Erhöhung der Auflösung erzielen. Ein Beispiel für einen Zugewinn an Informationen hinsichtlich der Chromosomenstruktur ist die Kombination einer Reihe von PCP-Sonden beim sogenannten *chromosomal barcode* (MULLER *et al.* 1997), siehe Abbildung 2.6.

Das Prinzip, welches hinter der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung steht, ist unabhängig von der Art der eingesetzten Sonde: Eine bekannte Zielsequenz wird durch eine komplementäre, direkt oder über ein Hapten mit einem Reportermolekül markierte DNA-Sonde spezifisch erkannt. Durch die beim Hybridisierungsprozess herrschenden Bedingungen liegen die Zielsequenz (DNA der präparierten Chromosomen) und die DNA-Sonde als Einzelstränge vor, wodurch eine komplementäre Bindung ermöglicht wird.

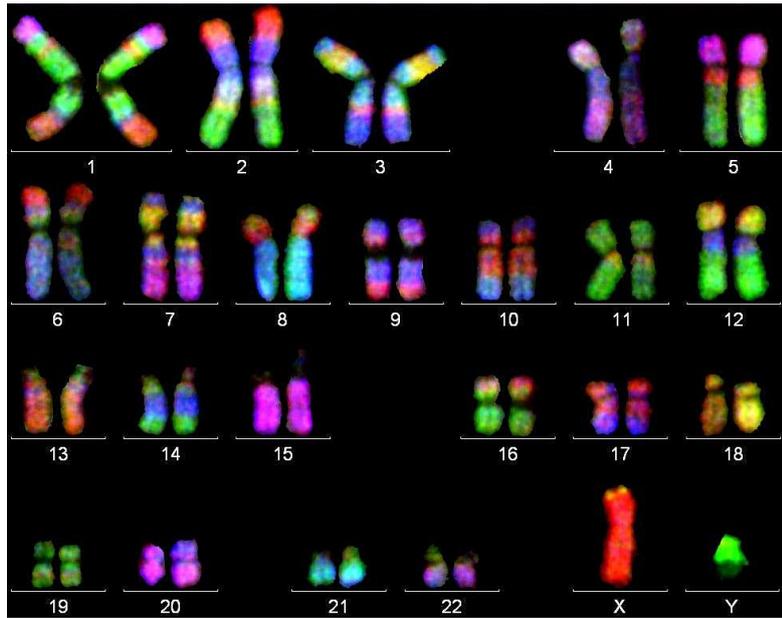


Abb. 2.6: Chromosomal barcode nach Rx-FISH (cross-species colour painting).

Entstehung eines Bandenmusters durch Kombination verschiedener PCP-Sonden vom Gibbon mit unterschiedlichen Markierungen, die auf menschliche Chromosomen hybridisiert wurden. Durch evolutionäre Umbauten kommt es zur unterschiedlichen Zuordnung auf den menschlichen Chromosomen und somit zur Entstehung eines Bandenmusters, wie hier bei der Metaphase eines männlichen Kontroll-Probanden.

2.6.1 Verwendete DNA-Sonden

Die nachfolgende Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die verwendeten DNA-Sonden.

interne Bezeichnung	Herkunft	Lokalisation	Referenz
α -Sat	Plasmid	9cen	ROCCHI <i>et al.</i> (1991)
β -Sat	PCR-Produkt ^a	9q12	CARDONE <i>et al.</i> (2004)
	PCR-Produkt ^a	9q12	CARDONE <i>et al.</i> (2004)
	PCR-Produkt ^a	9q12	CARDONE <i>et al.</i> (2004)
	PCR-Produkt ^a	9q12	CARDONE <i>et al.</i> (2004)
Sat-III	PCR-Produkt ^a	9q12	HASEGAWA <i>et al.</i> (1995)
	PCR-Produkt ^a	9q12	HASEGAWA <i>et al.</i> (1995)
310	BAC	9p13.1	BALLIF <i>et al.</i> (2007), UCSC, NCBI
311	BAC	9p13.1	UCSC, NCBI
312	BAC	9p11.1-p11.2	UCSC, NCBI
314	BAC	9q12	UCSC, NCBI
315	BAC	9q21.11	UCSC, NCBI
316	BAC	9q21.11	BALLIF <i>et al.</i> (2007), UCSC, NCBI
331	BAC	9p13.1-p13.2	UCSC, NCBI

Tab. 2.3: Verwendete DNA-Sonden.

UCSC-Datenbank: <http://genome-euro.ucsc.edu>; NCBI-Datenbank: www.ncbi.nlm.nih.gov

^a Sequenzen siehe Tabelle 2.5

2.6.2 α -Satelliten- und BAC-DNA-Sonden

Der Plasmid mit einklonierter, Chromosom 9-spezifischer α -Satelliten-DNA, bestehend aus kurzen, hochrepetitiven DNA-Sequenzen, wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mariano Rocchi (Department für Biologie der Universität Bari, Italien) zur Verfügung gestellt (ROCCHI *et al.* 1991).

Bei *bacterial artificial chromosomes* oder kurz BACs handelt es sich um sogenannte *large-insert* Vektoren, die zur Klonierung und Amplifizierung von definierten DNA-Fragmenten im Bakterium *E. coli* verwendet werden. Sie sind vergleichbar mit den natürlich in *E. coli* vorkommenden F-Plasmiden. Im Unterschied zu den F-Plasmiden findet sich aber pro Bakterium nur ein einziger BAC. Die Insertgröße liegt zwischen 100 und 300 Kilobasenpaaren, durchschnittlich beträgt sie um die 150 Kilobasenpaare. Die verwendeten BAC-Klone stammen alle vom BACPAC Resources Center (Oakland Research Institute, California, USA; <http://bacpac.chori.org>).

Die Tabelle 2.4 gibt einen Überblick über die zur Herstellung von DNA-Sonden verwendeten BAC-Klone. Die in der Tabelle gemachten Angaben bezüglich chromosomaler Lokalisation und Größe beziehen sich auf die Angaben der UCSC- und NCBI-Datenbanken (GRCh37/hg19) mit Stand vom 10.06.2014. Einzige Ausnahmen ist die Angabe für das Kreuzhybridisierungssignal des Klons RP11-101E5, die vom 18.11.2013 stammt, da sie zum späteren Zeitpunkt nicht mehr verzeichnet war.

BAC-Klon	intern	chromosomale Lokalisation	Größe in Basenpaaren
RP11-113O24	331	9p13.1-p13.2 38.271.091 – 38.437.288	166.198
RP11-99D24	310	9p13.1 38.518.698 – 38.672.411	153.714
RP11-1021H7	311	9p13.1 38.778.670 – 39.014.372	235.703
		9q13 67.349.883 – 67.586.046	236.163
RP11-211P14 (AL953854)	312	9p11.1-p11.2 47.160.134 – 47.317.679	157.546
		9q12 65.647.281 – 65.664.071	16.791
RP11-101E5	314	9q12 65.467.784 – 65.639.435	171.652
		9p11.2-p12 41.285.359 – 43.897.861	2.612.502
RP11-151I14	315	9q21.11 70.850.699 – 71.031.447	180.749
		9p ---	---
RP11-876N18	316	9q21.11 71.641.920 – 71.846.939	205.020

Tab. 2.4: Für die Herstellung von DNA-Sonden verwendete BAC-Klone.

Bei den Klonen 311, 312, 314 und 315 ist in der jeweils zweiten Zeile der Spalten ‚chromosomale Lokalisation‘ und ‚Größe in Basenpaaren‘ das Kreuzhybridisierungssignal auf dem jeweiligen anderen Chromosomenarm angegeben. Die auf anderen Chromosomen beobachteten Kreuzhybridisierungssignale waren für die vorliegende Arbeit nicht von Interesse und werden deshalb nicht erwähnt.

2.6.2.1 Übernacht-Kultur BAC-tragender *E. coli* aus Glycerol-Stocks und Archivierung

Reagenzien:

- LB-Medium
 - 10 g Pepton (Fluka, 70172), 5 g Bacto-yeast Extrakt (Fluka, 70161) und 10 g NaCl (Merck, 1.06404) in 900 mL A. dest. lösen, pH auf 7,0 einstellen und mit A. dest. auf 1000 mL auffüllen, danach Autoklavieren
- Chloramphenicol (Endkonzentration 20 mg/mL) (w/v)
 - 20 mg Chloramphenicol (Sigma, C7795) in 1 mL Ethanol (Merck, 1.00983.1011) lösen
- 50 % Glycerol, autoklaviert (Sigma, G5516)

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 7 BAC-Klone für die Entwicklung von Sonden-Sets präpariert (vergleiche Tabelle 2.4).

Aus den gelieferten Agar-Stabs wurde mit Hilfe steriler Pipettenspitzen Bakterienmaterial entnommen und in Kulturröhrchen mit 8 mL LB-Medium überführt. Dem LB-Medium wurde das Antibiotikum Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 20 mg/mL zugegeben (8 µL pro Kultur), da die BAC-Klone alle über eine Chloramphenicol-Resistenz verfügen. Die Kultivierung der BAC-tragenden *E. coli* erfolgte für 17 Stunden (über Nacht) bei 37 °C auf einem Schüttler mit 210 Umdrehungen pro Minute.

Aus den Übernacht-Kulturen wurden zur dauerhaften Aufbewahrung der BACs sogenannte Glycerol-Stocks hergestellt. Dazu wurden 500 µL 50 %iges Glycerol und 500 µL Übernacht-Kultur gründlich gemischt und für eine Stunde auf Eis inkubiert, damit das Glycerol über die Bakterienzellwand ins Bakterieninnere penetrieren konnte. Danach war ein dauerhaftes Einfrieren der Glycerol-Stocks bei -80 °C möglich.

2.6.2.2 Isolierung der BAC-DNA mittels alkalischer Lyse

Reagenzien:

- P1-Lösung
 - 750 µL 1 M Tris pH 8,0 mit 1000 µL 0,5 M EDTA (beides zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Müller) mischen und mit A. dest. auf 50 mL auffüllen
- P2-Lösung
 - 2 mL 1 M NaOH und 1 mL 10 % SDS mit 7 mL A. dest. mischen
 - Stammlösung 1 M NaOH: 2 g NaOH (Merck, 1.06482) gelöst in 50 mL A. dest.
 - Stammlösung 10 % SDS: 10 g SDS (Natriumdodecylsulfat; Sigma, L3771) in 100 mL A. dest. lösen
- P3-Lösung
 - 14,7 g Kaliumacetat (Merck, 1.04820) in 30 mL A. dest. lösen, mit Eisessig (Merck, 1.00063) auf pH 5,5 einstellen und mit A. dest. auf 50 mL auffüllen, anschließend autoklavieren
- Isopropanol (Merck, 1.07022)
- 70 % Ethanol
 - 70 mL Ethanol (Merck, 1.00983.1011) gemischt mit 30 mL A. dest.
- HPLC-Wasser

Die DNA der BAC-Klone wurde durch alkalische Lyse isoliert. Diese Standard-Methode ist zur Isolierung von DNA aus Plasmiden, PACs und BACs geeignet und kann unter <http://bacpac.chori.org/bacpacmini.htm> eingesehen werden. Es wurden weiterhin Elemente von <http://www.rzpd.de/general/html/glossary/protocols/BACMiniprep.shtml> übernommen sowie leichte Modifikationen nach PD Dr. rer. nat. Stefan Müller. Bei dieser Methode kann eine DNA-Menge von 0,5 bis 2 µg erwartet werden.

Zunächst wurden je 7 mL der Übernacht-Kulturen mit 3000 g für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 500 µL P1-Lösung auf dem Vortexer resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Cup überführt, mit 500 µL P2-Lösung versetzt und durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Dabei kam es zur Lyse der Bakterien und die Suspension wurde opaleszent. Bei diesem Schritt darf das Mischen nicht mit dem Vortexer erfolgen, da es sonst durch Scheerungsprozesse in der Suspension zur Verunreinigung der BAC-DNA mit der Bakterien-DNA kommt. Nachfolgend wurden 500 µL P3-Lösung zupipettiert und das Eppendorf-Cup nach mehrmaligem Invertieren zwecks Durchmischung für 5 Minuten auf Eis gestellt. Dabei bildete sich ein weißes Präzipitat aus Bakterien-DNA und Proteinen.

Nach erfolgter Präzipitation wurde die Suspension für 10 Minuten bei 4 °C und 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die BAC-DNA befand, wurde vorsichtig in zwei Portionen zu je 750 µL abpipettiert und auf zwei neue Eppendorf-Cups aufgeteilt. Hierbei ist besonders vorsichtig zu arbeiten, da weder das Pellet noch die auf dem Überstand liegende schleimig-klebrige Schicht in die neuen Eppendorf-Cups überführt werden dürfen. Pro 750 µL Überstand wurden 650 µL eiskalter Isopropanol zugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Dadurch kam es zur Präzipitation der BAC-DNA, da der Isopropanol der DNA die Hydrathülle entzog. Zur optimalen Präzipitation wurden die Eppendorf-Cups über Nacht bei -18 °C inkubiert.

Die über Nacht ausgefallene DNA wurde bei 15.000 g und 4 °C für 15 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Zugabe von eiskaltem 70 %igem Ethanol und mehrmaligem Schwenken gewaschen. Anschließend wurde erneut für 5 Minuten bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert, bevor der Überstand vorsichtig und möglichst komplett abpipettiert wurde. Das Pellet wurde im offenen Eppendorf-Cup für 5 Minuten bei 37 °C getrocknet, wobei es sich von weiß nach opaleszent verfärbte. Das trockene Pellet wurde in 30 µL HPLC-Wasser resuspendiert und die beiden Suspensionen eines BACs zu einem 60 µL-Ansatz vereinigt. Bei einem zu erwartenden DNA-Gehalt von 0,5 bis 2 µg entspricht dies einer DNA-Konzentration von 8 bis 33 ng/µL.

2.6.2.3 Amplifikation der α-Satelliten- und BAC-DNA mittels GenomiPhi™-Kit

Reagenzien:

- GenomiPhi™ DNA Amplification Kit (Amersham Biosciences, 25-6600-01)

Um ausreichende Mengen von DNA zur Generierung von DNA-Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zu gewinnen, bedient man sich einer sogenannten *whole genome amplification* (WGA).

Mit dem GenomiPhi™-Kit steht hierfür ein praktikables, kommerzielles Produkt zur Verfügung. Die in diesem Kit enthaltenen Hexamer-Primer binden zufällig an vielen Stellen der eingesetzten, zuvor denaturierten DNA (*template DNA*) und ermöglichen der ebenfalls im Kit enthaltenen Phi29-DNA-Polymerase (gewonnen aus dem *Phagen Phi29* von *Bacillus subtilis*) den simultanen Replikationsstart an diesen Stellen. Während der Synthese kommt es zur Strangverdrängung, was zu neuen DNA-Einzelsträngen und damit zu neuen Bindungsstellen für die Hexamer-Primer führt. Während der Replikation bilden sich wieder doppelsträngige DNA-Fragmente. Bei einem Einsatz von 1 µL DNA mit einer Konzentration von 10 bis 40 ng/µL erhält man 6 bis 10 µg Amplifikat in einem Reaktionsvolumen von 20 µL.

Die Durchführung der WGA mittels GenomiPhi™-Kit wurde für die Vervielfältigung von α-Satelliten- und BAC-DNA auf identische Weise durchgeführt. Für einen Amplifikationsansatz mit einem Endvolumen von 20 µL wurde folgendermaßen vorgegangen: 9 µL *sample buffer* und 1 µL DNA wurden zusammenpipettiert und bei 95 °C für 3 Minuten denaturiert. Währenddessen wurde ein frischer Ansatz aus 9 µL *reaction buffer* und 1 µL *enzyme mix* hergestellt und nach Ablauf der Denaturierungszeit zur DNA pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 30 °C für 90 Minuten (Amplifikationsreaktion). Die Amplifikationsreaktion wurde durch eine Inkubation des Ansatzes bei 65 °C für 10 Minuten gestoppt. Durch Vorversuche war bekannt, dass die DNA-Konzentration nach erfolgter Amplifikation unter den genannten Bedingungen etwa 500 ng/µL beträgt.

Bis zur Weiterverarbeitung wurde die amplifizierte DNA bei -18 °C gelagert.

2.6.2.4 Markierung der α-Satelliten- und BAC-DNA mittels Nicktranslation

Reagenzien:

- 10x Reaktionspuffer für DNA-Polymerase I aus *E. coli* (Fermentas, EP0042)
- dNTP-Mix (2 mM dATP/dCTP/dGTP, 0,5 mM dTTP)
 - 2 mM Arbeitslösungen: je 10 µL 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP mit 490 µL A. dest. mischen (Fermentas, R0141/R0151/R0161/R0171)
 - dNTP-Mix: 250 µL 2 mM dATP, 250 µL 2 mM dCTP und 250 µL 2 mM dGTP mit 50 µL 2 mM dTTP und 200 µL A. dest. mischen
- DNA-Polymerase I aus *E. coli* (Fermentas, EP0042)
- DNase I (Fermentas, EN0521)
- Biotin-dUTP, Digoxigenin-dUTP, TexasRed-dUTP und DEAC-dUTP (von PD. Dr. rer. nat. Stefan Müller zur Verfügung gestellt)
- A. bidest.

Um die α-Satelliten- und BAC-DNA für ihren Einsatz als DNA-Sonden bei die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zu markieren, wurde als Methode die Nicktranslation gewählt (RIGBY *et al.* 1977). Hierbei werden durch das Enzym DNase I Einzelstrangbrüche (sogenannte *nicks*) im DNA-Molekül erzeugt, welche anschließend durch die DNA-Polymerase I repariert werden. Da im zugegebenen dNTP-Mix ein Mangel an dTTP vorlag, kam es an dessen Stelle zum Einbau von dUTP, an das Biotin, Digoxigenin oder TexasRed als Reportermolekül gekoppelt wurde.

Pipettierschema des Nicktranslationsansatzes für die α -Satelliten-DNA mit 150 μ L-Endvolumen:

	Ansatz	Bemerkung
amplifizierte DNA	12 μ L	entspricht 6 μ g Alphoid-DNA
Aqua bidest.	96 μ L	
10x Reaktionspuffer	15 μ L	
dNTP-Mix	15 μ L	
X-dUTP (X = Biotin)	6 μ L	
DNA-Polymerase I	3 μ L	
DNase I (1:100)	3 μ L	

Pipettierschema des Nicktranslationsansatzes für die BAC-DNAs mit 250 μ L-Endvolumen:

BAC	310	311	312	314	315	316	331
amplifizierte DNA	20 μ L						
Aqua bidest.	160 μ L						
10x Reaktionspuffer	25 μ L						
dNTP-Mix	25 μ L						
X-dUTPs	Biotin	10 μ L	---	---	---	10 μ L	---
	Digoxygenin	---	---	10 μ L	---	---	10 μ L
	TexasRed	---	10 μ L	---	10 μ L	---	---
	DEAC	---	---	---	---	---	10 μ L
DNA-Polymerase I	5 μ L						
DNase I (1:100)	5 μ L						

Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert. Die Markierungsreaktion lief im Anschluss für 100 Minuten bei 15 °C ab und wurde durch eine Inkubation des Ansatzes bei 70 °C für 10 Minuten gestoppt. Bis zur Weiterverarbeitung lagerten die Ansätze bei -18 °C.

2.6.2.5 Fällung der markierten α -Satelliten- und BAC-DNA-Sonden

Reagenzien:

- Lachssperma-DNA 10 mg/mL (Sigma, D9156)
- Cot-1 DNA 1 mg/mL (Roche, 11581074001)
- 100 % Ethanol (Merck, 1.00983.1011)
- HPLC-Wasser
- LSI-Hybridisierungspuffer (Abbott Molecular, 06J67-011)

Den durch Nicktranslation mit verschiedenen Reporter-molekülen markierten α -Satelliten- und BAC-DNA-Sonden wurde Lachssperma-DNA zugegeben, welche bei der Fällung mit Ethanol als Träger für die Sonden-DNA fungiert. Die nur zu den BAC-DNAs im Überschuss zugegebene, unmarkierte Cot-1 DNA bindet die in den BAC-DNAs vorhandenen repetitiven Sequenzen, wodurch diese doppelsträngig vorliegen und nicht mehr während der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an chromosomale DNA hybridisieren können. Dies erhöht die Spezifität der BAC-DNA-Sonden. Die Eigenschaft der Cot-1 DNA, unspezifische repetitive Sequenzen zu maskieren, ist der Grund, weshalb BAC-DNA-Sonden nicht mit Satelliten-DNA-Sonden gemischt werden dürfen.

Pipettierschema für die Fällung der α -Satelliten-DNA-Sonde:

	Ansatz	Bemerkung
Lachssperma-DNA	5 μ L	
α -Satelliten-DNA	100 μ L	
100 % Ethanol	262,5 μ L	2,5x DNA-Volumen, -18 °C kalt

Für die Fällung wurde zur Lachssperma-DNA die markierte α -Satelliten-DNA pipettiert sowie das 2,5fache Volumen an eisgekühltem 100 %igem Ethanol. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und über Nacht bei -18 °C inkubiert. Während dieser Zeit präzipitierte die enthaltene DNA. Danach wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 4 °C mit 15.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet für 10 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Auf das trockene Pellet wurden vorsichtig 13,5 μ L HPLC-Wasser pipettiert und der Ansatz für 10 Minuten bei 600 Umdrehungen pro Minute und 37 °C auf dem Thermomixer resuspendiert. Anschließend wurden 31,5 μ L CEP-Hybridisierungspuffer zupipettiert und der Ansatz über Nacht zur vollständigen Resuspendierung der Alphoid-DNA-Sonde bei 600 Umdrehungen pro Minute und 37 °C auf dem Thermomixer inkubiert. Die fertige α -Satelliten-Sonde wurde bei -18 °C gelagert.

Allgemeines Pipettierschema für die Fällung der BAC-DNA-Sonden:

	Ansatz	Bemerkung
Lachssperma-DNA	5 μ L	
Cot-1 DNA	15 μ L	
BAC-DNA	250 μ L	
100 % Ethanol	675 μ L	2,5x DNA-Volumen, -18 °C kalt

Für die Fällung wurde zur Lachssperma-DNA die Cot-1 DNA und anschließend die markierte BAC-DNA pipettiert sowie das 2,5fache Volumen an eisgekühltem 100 %igem Ethanol. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und über Nacht bei -18 °C inkubiert. Während dieser Zeit präzipitierte die enthaltene DNA. Danach wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 4 °C mit 15.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet für 10 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Auf das trockene Pellet wurden vorsichtig 10 μ L HPLC-Wasser pipettiert und der Ansatz für 10 Minuten bei 600 Umdrehungen pro Minute und 37 °C auf dem Thermomixer resuspendiert. Anschließend wurden 24 μ L LSI-Hybridisierungspuffer zupipettiert und der Ansatz über Nacht zur vollständigen Resuspendierung der BAC-DNA-Sonde bei 600 Umdrehungen pro Minute und 37 °C auf dem Thermomixer inkubiert. Die fertigen BAC-DNA-Sonden wurden bei -18 °C gelagert.

2.6.3 DNA-Sonden aus PCR-Produkten

In der nachfolgenden Tabelle 2.5 sind die einzelnen PCR-Primer sowie deren Sequenzen aufgeführt, die zur Generierung der DNA-Sonden für den Nachweis von β -Satelliten- bzw. Satellit-III-DNA benutzt wurden.

Bezeichnung		Sequenz
intern	Eurofins	
β aF	b-satdist F	5' - ATA AGC TTT GGC AAG AGT TGC ATC ACC T - 3'
β aR	b-satdist R	5' - TGA AGC TTT GCC TAC AGG GGA TTG TGA C - 3'
β bF	b-satprox F	5' - CAA AGC TTA GAC AAG AGT TAC ATC ACC T - 3'
β bR	b-satprox R	5' - TGA AGC TTT CCT AGA GGC ACA TTG GGA C - 3'
Sat-III F	Sat III F	5' - TGG GAA TTC AAT AGA ATG GAA TGG TAT - 3'
Sat-III R	Sat III R	5' - TGC AAT AGA ATG GAA TGG AAT CAA CTC - 3'

Tab. 2.5: Für die Herstellung von DNA-Sonden verwendete PCR-Primer.

2.6.3.1 Markierungs-PCR für die β -Satelliten-DNA-Sonde

Reagenzien:

- 10x PCR-Puffer E mit $MgCl_2$ (Genaxxon, M3456)
- dNTP-Mix (2 mM dATP/dCTP/dGTP, 0,5 mM dTTP)
 - 2 mM Arbeitslösungen: je 10 μ L 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP mit 490 μ L A. dest. mischen (Fermentas, R0141/R0151/R0161/R0171)
 - dNTP-Mix: 250 μ L 2 mM dATP, 250 μ L 2 mM dCTP und 250 μ L 2 mM dGTP mit 50 μ L 2 mM dTTP und 200 μ L A. dest. mischen
- Digoxigenin-dUTP (zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Müller)
- W1 Detergenz (zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Müller)
- Tag-Polymerase S25 Units, 5 Units/ μ L (Genaxxon, M3185.0500)
- A. bidest.
- Referenz-DNA männlich (zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Müller)

Mit Hilfe der PCR (*polymerase chain reaction*) können DNA-Zielsequenzen vervielfältigt werden. Durch Einbau von Reporter-molekül-gekoppelten dUTPs wird gleichzeitig das neu synthetisierte DNA-Stück für spätere Analysen markiert (*labeling PCR*).

Für die Markierung der β -Satelliten-DNA wurde Digoxigenin als Reporter-molekül verwendet. Die beiden eingesetzten PCR-Primer-Paare (CARDONE *et al.* 2004) lokalisieren am proximalen bzw. am distalen Ende der β -Satelliten-DNA-Konsensus-Sequenz, wodurch später ein kompletter Nachweis der gesamten Region möglich ist.

Pipettierschema für einen *labeling*-PCR-Ansatz mit je 25 µL-Endvolumen:

	Ansatz			
	β aF	β aR	β bF	β bR
PCR-Primer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
10x PCR Puffer E	2,5 µL		2,5 µL	
dNTP-Mix	1,5 µL		1,5 µL	
X-dUTP (X = Digoxigenin)	2 µL		2 µL	
W1 Detergenz	1,25 µL		1,25 µL	
Tag-Polymerase	0,5 µL		0,5 µL	
Aqua bidest.	14,25 µL		14,25 µL	
Referenz-DNA (♂)	1 µL		1 µL	

Ablauf der β-Sat-*labeling*-PCR:

	Bedeutung	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	
2	Denaturierung	94 °C	1 min	Schritte 2 bis 4: 30 Zyklen
3	Annealing	56 °C	1 min	
4	Elongation	72 °C	2 min	
5	Endelongation	72 °C	8 min	

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die PCR-Produkte bei -18 °C gelagert.

2.6.3.2 Markierungs-PCR für die Satellit-III-DNA-Sonde

Reagenzien:

- 10x PCR-Puffer E mit MgCl₂ (Genaxxon, M3456)
- dNTP-Mix (2 mM dATP/dCTP/dGTP, 0,5 mM dTTP)
 - 2 mM Arbeitslösungen: je 10 µL 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP mit 490 µL A. dest. mischen (Fermentas, R0141/R0151/R0161/R0171)
 - dNTP-Mix: 250 µL 2 mM dATP, 250 µL 2 mM dCTP und 250 µL 2 mM dGTP mit 50 µL 2 mM dTTP und 200 µL A. dest. mischen
- TexasRed-dUTP (zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Müller)
- W1 Detergenz (zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Müller)
- Tag-Polymerase S 25 Units, 5 Units/µL (Genaxxon, M3185.0500)
- A. bidest.
- Referenz-DNA männlich (zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Müller)

Für die Markierung der Satellit-III-DNA wurde TexasRed als Reportermolekül verwendet.

Pipettierschema für einen Sat-III-labeling-PCR-Ansatz mit 25 µL-Endvolumen:

	Ansatz	
	Sat-III F	Sat-III R
PCR-Primer	1 µL	1 µL
10x PCR Puffer E	2,5 µL	
dNTP-Mix	1,5 µL	
X-dUTP (X = TexasRed)	2 µL	
W1 Detergenz	1,25 µL	
Tag-Polymerase	0,5 µL	
Aqua bidest.	14,25 µL	
Referenz-DNA (♂)	1 µL	

Ablauf der Sat-III-labeling-PCR:

	Bedeutung	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	
2	Denaturierung	94 °C	1 min	Schritte 2 bis 4: 30 Zyklen
3	Annealing	37 °C	1 min	
4	Elongation	72 °C	2 min	
5	Endelongation	72 °C	8 min	

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die PCR-Produkte bei -18 °C gelagert.

2.6.3.3 DNase I-Verdau der PCR-Produkte

Reagenzien:

- DNase I (Roche, 104159)

Die mit Hilfe der PCR erzeugten Produkte sind für die Verwendung als DNA-Sonde bei der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zu groß. Aus diesem Grund mussten die PCR-Produkte für genau 10 Minuten bei Raumtemperatur mit DNase I verdaut werden, um kleinere Fragmente zu erhalten. Die Inkubationszeit beruht auf empirischen Erfahrungswerten des Instituts für Humangenetik für diese Prozedur. Die enzymatische Spaltungsreaktion wurde durch Inkubation bei 70 °C für weitere 10 Minuten abgebrochen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die verdauten PCR-Produkte bei -18 °C gelagert.

2.6.3.4 Fällung der PCR-Produkte

Reagenzien:

- Lachssperma-DNA 10 mg/mL (Sigma, D9156)
- 100 % Ethanol (Merck, 1.00983)
- HPLC-Wasser
- CEP-Hybridisierungspuffer (Abbott Molecular, 07J36-001)

Die Fällung sowie die anschließende Aufnahme der Sonden in HPCL-Wasser und CEP-Puffer wurde wie unter Absatz 2.6.2.5 beschrieben durchgeführt.

Pipettierschema für die Fällung der Sonden aus PCR-Produkten:

	Ansatz	Bemerkung
Lachssperma-DNA	25 µL	
PCR-Produkt	450 µL	
100 % Ethanol	1187,5 µL	2,5x DNA-Volumen, -18 °C kalt

2.6.4 Kombination der DNA-Sonden in Sonden-Sets

Sonden-Set	BAC/DNA	Markierung	Antikörper	Falschfarbe
Set 1	RP11-99D24 (310)	Biotin	Avidin-Alexa488	grün
	RP11-211P14 (312)	Digoxygenin	Maus-anti-Digoxygenin-Cy3	blau
	RP11-101E5 (314)	TexasRed	direkt markiert	türkis
Set 2	RP11-1021H7 (311)	TexasRed	direkt markiert	rot
	RP11-151I14 (315)	Biotin	Avidin-Alexa488	gelb
	RP11-876N18 (316)	Digoxygenin	Maus-anti-Digoxygenin-Cy3	pink
Set 3	α-Satellit-DNA	Biotin	Avidin-Alexa488	grün
	β-Satellit-DNA	Digoxygenin	Maus-anti-Digoxygenin-Cy3	rot
	Satellit-III-DNA	TexasRed	direkt markiert	blau
Sonde 331	RP11-113O24 (331)	DEAC	direkt markiert	lila

Die Lagerung der Sonden-Sets erfolgte lichtgeschützt bei -18 °C.

2.7 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

2.7.1 Vorbehandlung der Chromosomen-Präparate für die FISH

Reagenzien:

- Pepsin-Gebrauchslösung
 - 50 mL A. dest. mit 500 µL 1 N HCl mischen und 25 µL Pepsin-Stock 10 % dazugeben
 - 1 N HCl: 8,3 mL HCl (Merck, 100317) und 91,7 mL A. dest. mischen
 - Pepsin-Stock 10 %: 1 g Pepsin (Sigma, P6887) in 10 mL 0,1 N HCl lösen
 - 0,1 N HCl: 1 mL 1 N HCl und 9 mL A. dest. mischen
- PBS pH 7,0
 - 5 PBS-Tabletten (Sigma, P4417) in 800 mL A. dest. lösen, auf pH 7,0 einstellen und mit A. dest. auf 1000 mL auffüllen
- aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 % Ethanol)
 - 70 %: 70 mL Ethanol (Merck, 1.00983.1011) gemischt mit 30 mL A. dest.
 - 90 %: 90 mL Ethanol (Merck, 1.00983.1011) gemischt mit 10 mL A. dest.

Die wie unter Absatz 2.3.3 beschrieben hergestellten Chromosomenpräparate wurden einem Pepsin-Verdau unterzogen, um eventuell störende Zytoplasmareste zu entfernen. Dabei erfolgte eine Inkuba-

tion der Präparate in einer auf 37 °C erwärmten Pepsin-Lösung im Wasserbad für 5 Minuten. Im Anschluss erfolgte zum Abbruch der enzymatischen Reaktion eine Waschung der Präparate für 2 x 5 Minuten in PBS bei Raumtemperatur. Nach erfolgter Dehydrierung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 % und 100 % Ethanol) für je 1 Minute und Lufttrocknung waren die Präparate bereit für die Hybridisierung.

2.7.2 Vorbehandlung der DNA-Sonden und *in situ*-Hybridisierung

Die eingesetzten Sonden-Sets wurden zunächst bei 75 °C für 5 Minuten denaturiert, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Danach wurden 8 µL des denaturierten Sonden-Sets auf das entsprechende Areal des Chromosomenpräparats pipettiert und mit einem Deckglas (22 x 22 mm) abgedeckt. Die Ränder des Deckglases wurden luftdicht mit Fixogum versiegelt, das Präparat in den Hybrite (Hybridisierungsgerät) gelegt und das als Programm 1 hinterlegte Hybridisierungsverfahren gestartet. Das Gerät inkubierte die Präparate zunächst für 2 Minuten bei 72 °C, bevor die Hybridisierung bei 37 °C für mindestens 17 Stunden über Nacht erfolgte.

2.7.3 Nachweis der hybridisierten DNA-Sonden

Reagenzien:

- 0,1x SSC (v/v)
 - 5 mL 20x SSC und 995 mL A. dest. mischen
 - Stammlösung 20x SSC pH 5,3: 66 g SSC (Abbott Molecular, 02J10-032) in 200 mL A. dest. lösen, mit 1 N HCl auf pH 5,3 einstellen und mit A. dest. auf 250 mL auffüllen
 - 1 N HCl: 8,3 mL HCl (Merck, 100317) und 91,7 mL A. dest. mischen
- 2x SSCT: 2x SSC/0,3 % Tween (v/v)
 - 100 mL 20x SSC pH 5,3 und 850 mL A. dest. mischen, mit 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, mit A. dest. auf 1000 mL auffüllen und 3 mL Tween20 (Merck, 8.22184) zugeben
 - 1 N NaOH: 2 g NaOH (Merck, 1.06482) in 50 mL A. dest. lösen
- 1 % BSA/4x SSCT (w/v)
 - 1 g BSA Fraktion V (*Bovines Serum-Albumin*; Sigma, A7906) in 100 mL 4x SSC/0,1 % Tween lösen
 - Stammlösung 4x SSC/0,1 % Tween: 200 mL 20x SSC pH 5,3 und 850 mL A. dest. mischen, mit 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, mit A. dest. auf 1000 mL auffüllen und 1 mL Tween20 (Merck, 8.22184) zugeben
- 3 % BSA/4x SSCT (w/v)
 - 3 g BSA Fraktion V (*Bovines Serum-Albumin*; Sigma, A7906) in 100 mL 4x SSC/0,1 % Tween lösen
- Avidin-Alexa488
 - 1 mg Avidin-Alexa488-Konjugat (Molecular Probes, A-21370; Vertrieb über MoBiTec) in 500 µL Glycerol (Sigma, G5516) und 500 µL PBS lösen
 - Stammlösung PBS pH 7,0: 1 PBS-Tablette (Sigma, P4417) in 150 mL A. dest. lösen, auf pH 7,0 einstellen und mit A. dest. auf 200 mL auffüllen
- Maus-anti-Digoxigenin-Cy3-Antikörper
 - 1 mg Maus-anti-Digoxigenin-Cy3-Antikörper (Dianova, 200-162-156) in 250 µL Glycerol (Sigma, G5516) und 250 µL PBS lösen

- Vectashield Antifade Eindeckmedium mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; Vector Laboratories, H-1200)

2.7.3.1 Stringenzwaschung

Die sogenannte Stringenzwaschung, die in der Regel 15 bis 20 °C unter der Schmelztemperatur der DNA durchgeführt wird, dient der Entfernung von unspezifisch gebundenem Sondenmaterial. Auf diese Weise bestimmt die Stringenz den Prozentsatz korrekter Bindungen zwischen der eingesetzten Sonde und der komplementären chromosomalen Sequenz, die sie nachweisen soll (Spezifität). Einfluss darauf haben vor allem die Temperatur, die Ionenkonzentration und eingesetzte Reagenzien wie Formamid, die destabilisierend auf den DNA-Doppelstrang wirken.

Nach erfolgter Hybridisierung über Nacht wurden zunächst das Fixogum und danach vorsichtig die Deckgläser von den Chromosomenpräparaten entfernt. Nach kurzer Äquilibrierung der Präparate in 2x SSCT bei Raumtemperatur erfolgte die Stringenzwaschung für 2 x 7 Minuten in 0,1x SSC bei 60 °C.

2.7.3.2 Sondennachweis

Nach der Stringenzwaschung wurden die Chromosomenpräparate erneut für 1 Minute in 2x SSCT bei Raumtemperatur eingestellt. Anschließend wurden auf die waagrecht in einer Metallbox liegenden Präparate pro Objektträger 800 µL 3 % BSA/4x SSCT-Blockierungslösung pipettiert, um unspezifische Antikörper epitope für die nachfolgende Antikörperreaktion zu maskieren. Der Blockierungsschritt lief für 20 Minuten bei 37 °C in einer im Wasserbad schwimmenden Metallbox ab.

Während der Blockierungsreaktion wurde eine frische Avidin-Antikörper-Arbeitslösung aus Stammlösungen hergestellt, mit der im nächsten Schritt Hapten-markierte DNA-Sonden über Avidin- bzw. Antikörper-gekoppelte Fluorochrome detektiert werden konnten.

Pro Präparat wurde folgender 200 µL-Ansatz durchgeführt:

Stammlösung	Hapten	Ansatz	Endverdünnung
1 % BSA/4x SSCT	---	198 µL	
Avidin-Alexa488	Biotin	1 µL	1:200
Maus-anti-Digoxigenin-Cy3	Digoxigenin	1 µL	1:200

Überschüssige Blockierungslösung wurde durch kurzes Einstellen der Präparate in 2x SSCT bei Raumtemperatur entfernt. Es wurden 190 µL der Avidin-Antikörper-Arbeitslösung pro Präparat aufpipettiert und mit einem Deckglas (24 x 60 mm) abgedeckt. Daraufhin wurden die Präparate wieder in die Metallbox überführt und eine Inkubation bei 37 °C für 45 Minuten durchgeführt, wobei es zur Bindung von Avidin an Biotin bzw. des Maus-Antikörpers an Digoxigenin kam. Nach erfolgter Reaktion wurden die Deckgläser entfernt und die Präparate 2 x 7 Minuten bei 42 °C in 4x SSCT gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.

Während aller Schritte des Sondennachweises war darauf zu achten, dass die Präparate nicht übermäßiger Lichteinstrahlung ausgesetzt wurden. Neben den hier hinzukommenden Fluorochromen Alexa488 und Cy3 befanden sich bereits die Fluorochrome TexasRed und DEAC auf den Präparaten, welche nicht ausbleichen durften.

2.7.3.3 Chromosomale Gegenfärbung

Nach kurzer Lufttrocknung wurden die Präparate mit einem Tropfen *Vectashild* je Hybridisierungsareal versehen und mit einem Deckglas (24 x 60 mm) luftblasenfrei eingedeckt. *Vectashild* schützt einerseits die Fluorochrome vor dem Ausbleichen, was die Präparate bei einer Lagerung im Dunkeln und bei 4 °C über Monate hinweg auswertbar macht, andererseits erzeugt der enthaltene Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) eine blau fluoreszierende Färbung der Chromosomen. Diese beruht vorrangig auf der Anlagerung von DAPI an AT-reiche Sequenzen und ermöglicht eine gute Identifikation der einzelnen Chromosomen.

2.7.4 Auswertung der FISH

Die Auswertung der aus BAC-Klonen und PCR-Produkten hergestellten DNA-Sonden beruht auf der Beurteilung

- 1) ihrer Lage bezüglich des Zentromers,
- 2) ihrer relativen Lage zueinander,
- 3) der relativen Größe und Intensität des beobachteten Fluoreszenzsignals,
- 4) dem direkten Vergleich von Größe und Intensität des beobachteten Fluoreszenzsignals der Sonde an ihrer Hybridisierungs- sowie ihrer Kreuzhybridisierungslokalisation und
- 5) dem Vergleich gleicher Hybridisierungs- und Kreuzhybridisierungssignale einer Sonde beim Probanden mit einem Referenzmuster (siehe Abschnitt 3.2).

Auf diese Weise war es möglich, verlässliche Aussagen hinsichtlich des bei der Inversion beteiligten Chromosomenabschnitts zu treffen sowie Aussagen über zusätzliche Aberrationen innerhalb einzelner Chromosomenregionen zu machen (Duplikationen, Triplikationen etc.).

Zur Beurteilung wurden mindestens zehn Mitosefiguren mit geringem Kondensationsgrad (Prophasen/Prometaphasen) am Auflichtfluoreszenzmikroskop Axioplan 2 der Firma Zeiss analysiert (verwendete Filter und damit detektierbare Fluoreszenzfarbstoffe siehe Tabelle 2.6), wobei eine HBO 100 Watt Quecksilber-Hochdrucklampe als Lichtquelle diente. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 100x Objektiv (Planapochromat) unter Verwendung einer CCD Kamera (Photometrics Sensys, ausgerüstet mit einem KAF 400-Chip). Die Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte mit den Programmen *SmartCapture2* (Digital Scientific, Cambridge, UK) oder *ISIS* (MetaSystems, Altlussheim, Deutschland).

Die weitere Bildbearbeitung zur optimierten Falschfarbendarstellung erfolgte mit Hilfe der Programme *Corel Paint Shop Pro Photo X2 Version 12* (Corel Corporation) sowie *Paint* (Windows Vista).

Filter	maximale Anregung (nm)	Emissionsfilter (nm)	Fluorochrom
DAPI	350 ± 25	470 ± 20	DAPI
FITC	471 ± 19,5	522 ± 20	Alexa488
Cy3	530 ± 15	565 ± 9	Cy3
TR	602 ± 6,5	631 ± 11,5	TexasRed
DEAC	438 ± 12	483 ± 16	DEAC

Tab. 2.6: Eigenschaften der verwendeten Filter (www.chroma.com bzw. www.ahf.de) und die damit detektierbaren verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

3. Ergebnisse

3.1 Überblick über Techniken und untersuchte Individuen

In der vorliegenden Arbeit wurden einerseits Individuen mit unerfülltem Kinderwunsch/Fertilitätsstörungen untersucht, andererseits Kinder mit körperlicher und/oder geistiger Behinderung sowie deren Eltern (vergleiche Tabelle 2.2).

Für alle untersuchten Individuen wurden hochauflösende Chromosomenpräparationen hergestellt und mittels GTG-Bänderung zytogenetisch analysiert. Ziel hierbei war es herauszufinden, ob die standardmäßige GTG-Bänderung bei Erhöhung der Auflösung einen Beitrag zur genaueren Charakterisierung des Inversionssegments (Bruchpunkte und zusätzliche strukturelle Aberrationen) liefern kann. Erwartungsgemäß zeigten sich eine hohe Zahl von Subbanden auf den Chromosomen, die über die in der ISCN beschriebene Auflösung von 850 bphs (*bands per haploid set*) hinaus gingen. Durch DA/DAPI-Färbung wurden die Chromosomen 9 hinsichtlich des Vorhandenseins einer perizentrischen Inversion voruntersucht. Mit Hilfe von speziell für diese Arbeit generierten Sonden-Sets für die heterochromatische Region des Chromosoms 9 sowie für den Übergangsbereich zwischen Hetero- und Euchromatin wurden bei allen untersuchten Individuen beiden Chromosomen 9 molekularzytogenetisch charakterisiert. Durch Einsatz eines Mangelmediums wurde die perizentrische Region hinsichtlich des Auftretens von „Sollbruchstellen“ (*fragile sites*) untersucht, die die Entstehung einer perizentrischen Inversion begünstigen könnten. Allerdings fanden sich in allen ausgewerteten Mitosefiguren der untersuchten Individuen keine Bruchereignisse in der für diese Arbeit relevanten Region, weshalb auf eine detaillierte Darstellung dieser Ergebnisse weiter unten verzichtet wurde.

3.2 Referenzmuster der FISH

Um die bei den untersuchten Probanden beobachteten Hybridisierungsmuster beurteilen und miteinander vergleichen zu können, wurde durch Testhybridisierungen ein Referenzmuster für die generierten BAC-DNA-Sonden etabliert. Dabei berücksichtigt wurden sowohl die in den UCSC- und NCBI-Datenbanken (<http://genome-euro.ucsc.edu> bzw. www.ncbi.nlm.nih.gov, Stand 10.06.2014) aufgeführten Angaben bezüglich ihrer Position von Hybridisierungs- und Kreuzhybridisierungssignal (Abbildung 3.1) sowie ihre auf repräsentativen Chromosomen 9 beobachteten Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.2).

Die bei den Testhybridisierungen beobachteten Hybridisierungsmuster wurden als „einfache“ Hybridisierungsmuster festgelegt, das heißt ein einzelnes Fluoreszenzsignal wurde als singuläre Lokalisation des entsprechenden BAC-Klons interpretiert, ein doppeltes Fluoreszenzsignal dagegen nicht als Duplikation des entsprechenden BAC-Klons, sondern als gesplittete singuläre Lokalisation, welche

erst aufgrund der erhöhten chromosomalen Auflösung sichtbar wurde. Alle bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Probanden von der technischen Kontrolle abweichenden Hybridisierungsmuster im Sinne einer Vermehrung oder Verminderung der entsprechenden BAC-Klon-Signalintensität sind Ausdruck von *copy number variations* (CNVs) und stellen ein molekularzytogenetisches Korrelat eines 9qh+ oder 9qh- bzw. einer Chromosomenvariante dar (vergleiche hierzu die Abschnitte 1.5 und 1.6).

Die Tabelle 3.1 beschreibt die als Referenz festgelegten Hybridisierungssignale, die in Abbildung 3.3 zusammenfassend schematisch dargestellt sind.

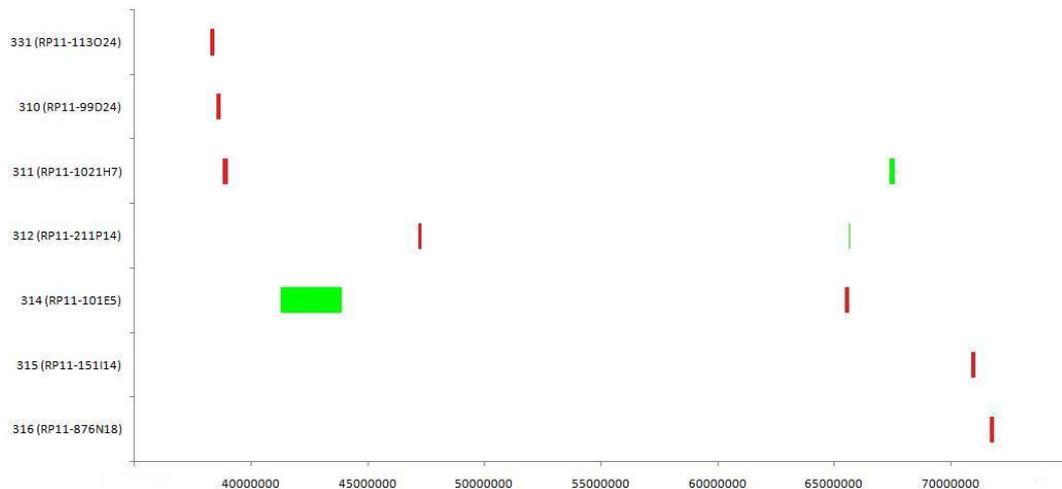


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Position der aus BAC-Klonen hergestellten DNA-Sonden. Rot: Hybridisierungssignal. Grün: Kreuzhybridisierungssignal. Angabe der Positionen in Basenpaaren. Zu beachten ist, dass aufgrund fehlender Angaben in den Datenbanken die Position des Kreuzhybridisierungssignals von Klon 315 (RP11-151I14) nicht angegeben werden konnte.

Klon	Hybridisierungsmuster		Vergleich Signale in p- und q-Arm
	p-Arm	q-Arm	
331 (RP11-113O24)	1 Signal	kein Signal	---
310 (RP11-99D24)	2 Signale im Sinne eines Doppelsignals, das proximale etwas prominenter als das distale ($p_{\text{proximal}} \sim 1,5x p_{\text{distal}}$)	kein Signal	---
311 (RP11-1021H7)	1 Signal	1 Signal	$p \sim q$
312 (RP11-211P14)	2 Signale im Sinne eines Doppelsignals, das distale wesentlich prominenter als das proximale ($p_{\text{distal}} \sim \text{mind. } 2x p_{\text{proximal}}$)	1 Signal	$p_{\text{proximal}} \sim q$
314 (RP11-101E5)	1 Signal	1 Signal	$p > q$ ($p \sim 2x q$)
315 (RP11-151I14)	1 Signal	1 Signal	$p < q$ ($q \sim 1,5x p$)
316 (RP11-876N18)	kein Signal	1 Signal	---

Tab. 3.1: Hybridisierungssignale des Referenzmusters für die BAC-DNA-Sonden in der FISH.

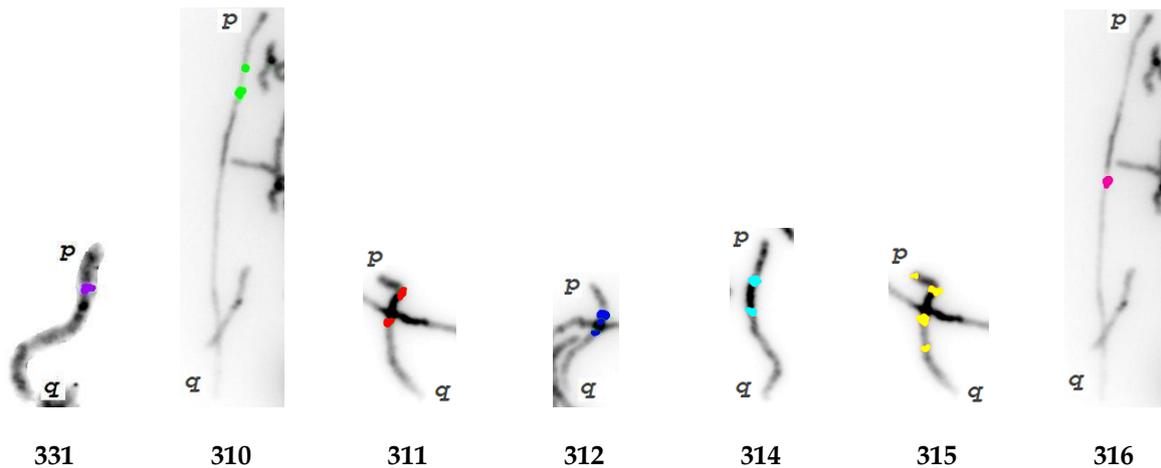


Abb. 3.2: Signalmuster der aus BAC-Klonen generierten DNA-Sonden auf repräsentativen Chromosomen 9.

Die Farben dieser Testhybridisierungen entsprechen den später für die Sonden-Sets verwendeten Falschfarben.

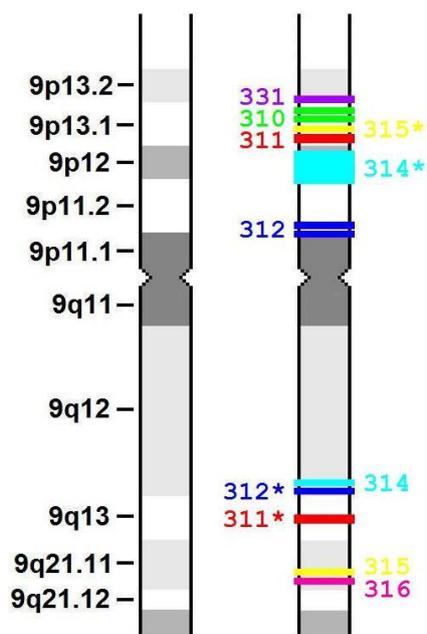


Abb. 3.3: Referenzmuster der Positionen der verwendeten DNA-Sonden in Korrelation zu den zytopenetischen Banden.

Die Farben entsprechen den im Ergebnisteil verwendeten Falschfarbendarstellungen. Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

Sonden-Set	BAC/DNA	Markierung	Antikörper	Falschfarbe
Set 1	RP11-99D24 (310)	Biotin	Avidin-Alexa488	grün
	RP11-211P14 (312)	Digoxygenin	Maus-anti-Digoxygenin-Cy3	blau
	RP11-101E5 (314)	TexasRed	direkt markiert	türkis
Set 2	RP11-1021H7 (311)	TexasRed	direkt markiert	rot
	RP11-151I14 (315)	Biotin	Avidin-Alexa488	gelb
	RP11-876N18 (316)	Digoxygenin	Maus-anti-Digoxygenin-Cy3	pink
Set 3	α -Satellit-DNA	Biotin	Avidin-Alexa488	grün
	β -Satellit-DNA	Digoxygenin	Maus-anti-Digoxygenin-Cy3	rot
	Satellit-III-DNA	TexasRed	direkt markiert	blau
Sonde 331	RP11-113O24 (331)	DEAC	direkt markiert	lila

3.3 Einzeluntersuchungen

3.3.1 Proband INV001

3.3.1.1 Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik

INV001 stellte sich im Alter von 37 Jahren gemeinsam mit seiner Partnerin (28 Jahre alt) zur genetischen Beratung vor. Grund hierfür war ein unerfüllter Kinderwunsch nach zwei Fehlgeburten der Partnerin jeweils etwa in der 10. Schwangerschaftswoche. Bei der zytogenetischen Untersuchung des zweiten Aborts wurde eine als ursächlich zu betrachtende Tetraploidie festgestellt.

Bei der Chromosomenanalyse beider Partner aus peripheren Blutlymphozyten ergab sich für INV001 ein numerisch unauffälliger, strukturell auffälliger männlicher Chromosomensatz mit einer perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9 (Abbildung 3.4), für die Partnerin von INV001 ein numerisch und strukturell unauffälliger weiblicher Chromosomensatz (Chromosomen der Partnerin im Rahmen dieser Arbeit nicht noch einmal analysiert).

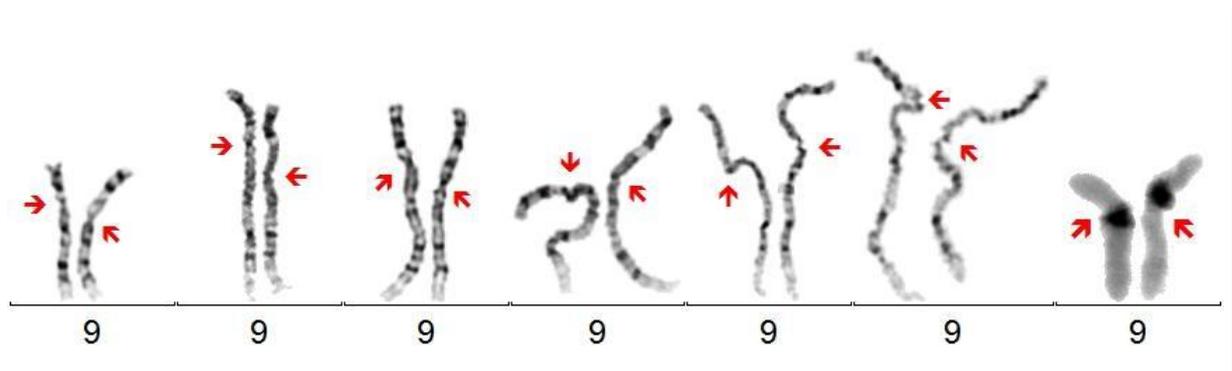


Abb. 3.4: Chromosomen 9 von INV001 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

3.3.1.2 Molekulare Zytogenetik

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) für die Sonde 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.5).

Im p-Arm fand sich nur ein sehr schwaches Signal für die Kreuzhybridisierungsregion der Sonde 315, welches etwa der Hälfte der Referenz entsprach. Im q-Arm lag dagegen ein Signal mit etwa dreifacher Intensität bezogen auf die Referenz vor. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster. Es liegen somit zwei CNVs der Sonde 315 vor: Eine Triplikation in 9q und eine partielle Deletion der Kreuzhybridisierungsregion in 9p (Abbildung 3.6).

Das invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer kompletten Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-III β -q) für die Sonden 311, 312, 314 und 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.5).

Die Sonden 312 und 314 zeigten eine Inversion ihrer Signale im p- bzw. q-Arm. Für die Sonde 311 fand sich im p-Arm ein in Bezug auf die Referenz nur etwa halb so großes Signal wie im q-Arm. Für die Sonde 315 ergab sich ein Doppelsignal im q-Arm von etwa der doppelten Größe der Referenz. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Es liegen mehrere Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten vor. Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment liegt distal der Kreuzhybridisierungsregionen der Sonden 312 und 314 mit Bruchpunkten in 9p13.1 und 9q13. Bezogen auf das für den Klon 311 beobachtete Signalmuster kann mit der durchgeführten Methode keine Unterscheidung hinsichtlich einer partiellen Inversion des Klons oder dem Vorliegen einer CNV vorgenommen werden. Es ergeben sich zwei Möglichkeiten (Abbildung 3.6). Erstens könnte eine partielle Inversion des Klons 311 vorliegen, wobei sich der Bruchpunkt im p-Arm innerhalb der Hybridisierungsregion von 311 befinden würde. Im q-Arm würde sich dann ein Bruchpunkt distal der Kreuzhybridisierungsregion von 312 und proximal in der Nähe der Kreuzhybridisierungsregion von 311 ergeben, um das beobachtete Signalmuster zu erzeugen. Bei der zweiten Möglichkeit würde der Bruchpunkt im p-Arm distal der Kreuzhybridisierungsregion von 314 und proximal der Hybridisierungsregion von 311 liegen, wohingegen der Bruchpunkt im q-Arm distal der Kreuzhybridisierungsregion von 312 und proximal der Kreuzhybridisierungsregion von 311 lokalisiert wäre. In diesem Falle würde sich das gefundene Hybridisierungsmuster für die Sonde 311 nur durch das Vorliegen zweier CNVs erklären lassen, nämlich durch eine partielle Deletion in 9p und eine zumindest partielle Duplikation in 9q. Unabhängig von beiden dargestellten Möglichkeiten liegen die Bruchpunkte des Inversionssegments in 9p13.1 und 9q13. Für die Sonde 315 fand sich eine CNV im Sinne einer Duplikation für die Hybridisierungsregion in 9q (Abbildung 3.6).

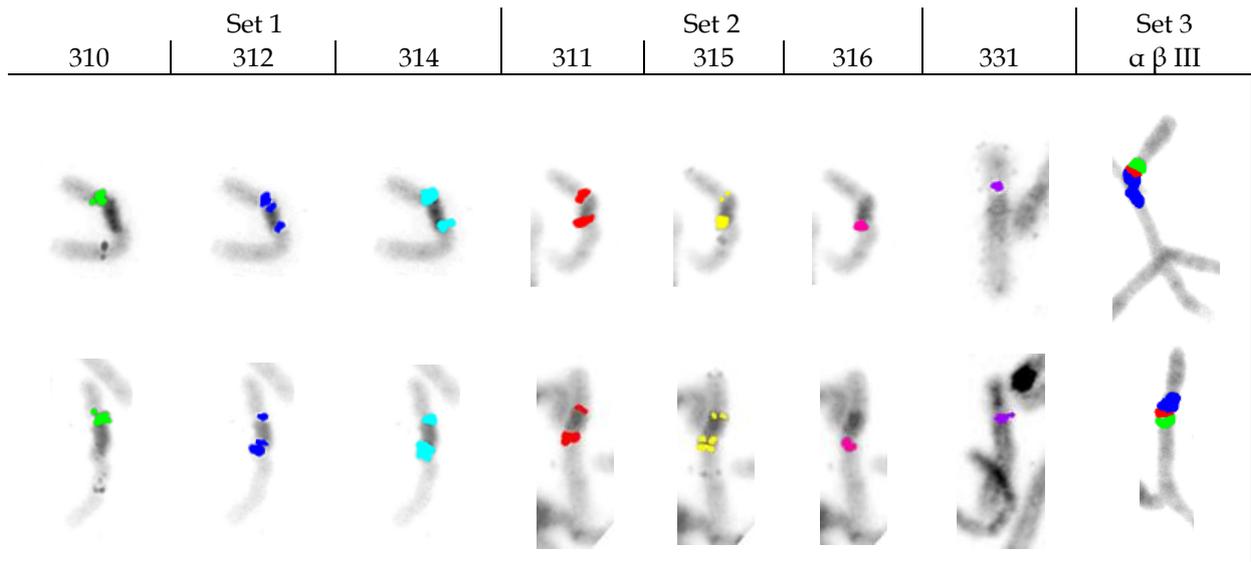


Abb. 3.5: Hybridisierung INV001.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

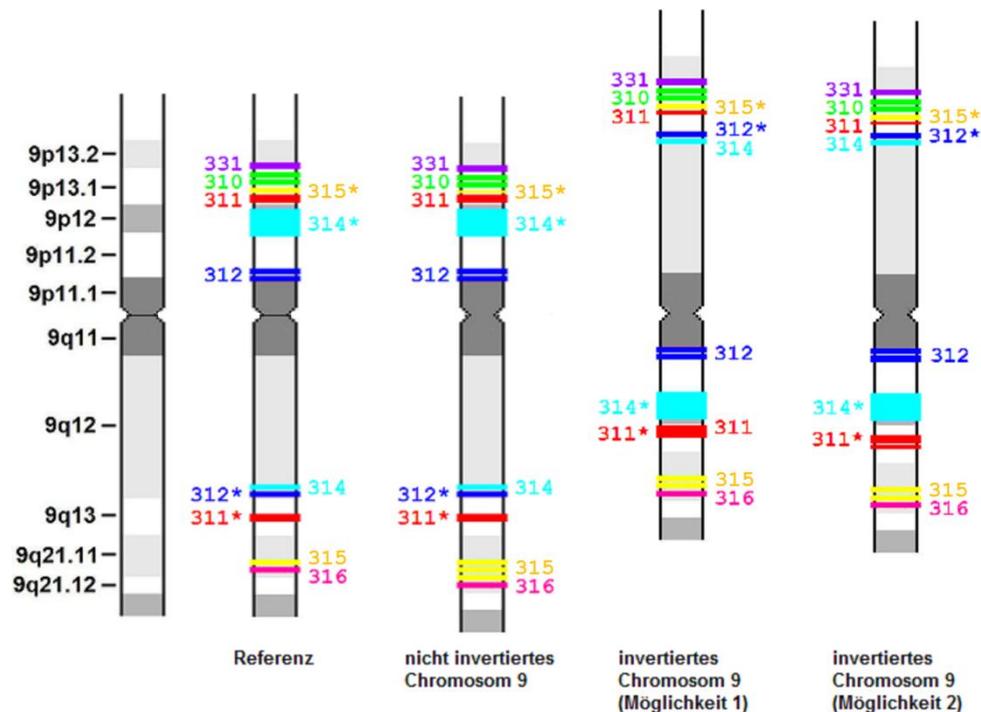


Abb. 3.6: Ideogramme INV001.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Partielle Deletion von 315* in 9p, Triplikation von 315 in 9q.

Invertiertes Chromosom 9 (Möglichkeit 1): Bruchpunkt 9p in 311 (Klon partiell invertiert), Bruchpunkt 9q distal von 312* und proximal von 311*. Zytogenetisch ergibt sich damit eine $inv(9)(p13.1q13)$. Duplikation von 315 in 9q.

Invertiertes Chromosom 9 (Möglichkeit 2): Bruchpunkt 9p distal von 314* und proximal von 311, Bruchpunkt 9q distal von 312* und proximal von 311*. Zytogenetisch ergibt sich damit eine $inv(9)(p13.1q13)$. Duplikation von 315 in 9q, partielle Deletion von 311 in 9p, partielle Duplikation von 311* in 9q.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.3.2 Proband INV005

3.3.2.1 Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik

INV005 stellte sich im Alter von 29 Jahren gemeinsam mit ihrem Partner (32 Jahre alt) zur genetischen Beratung wegen unerfülltem Kinderwunsch vor. Bei der Ratsuchenden wurde bereits ein Polyzystisches Ovarialsyndrom diagnostiziert, welches mit Prednisolon behandelt wird. Weiterhin waren eine Hypothyreose und ein arterieller Hypertonus bekannt, die beide medikamentös gut eingestellt sind. Der Partner von INV005 ist im wesentlichen gesund. Es liegen keine genetisch relevanten Erkrankungen in den Familien des Paares vor, ebenso ergibt sich kein Hinweis auf ein gehäuftes Auftreten von Aborten. Das Paar ist nicht blutsverwandt.

In der Vergangenheit kam es bei INV005 und ihrem Partner zu zwei Frühaborten in der 6. bzw. 8. Schwangerschaftswoche. Gewebe des zweiten Aborts wurde untersucht und zeigte einen numerisch unauffälligen, weiblichen Chromosomensatz mit einer perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9. Diese Inversion liegt auch bei INV005 vor (Abbildung 3.7). Ansonsten ergab die zytogenetische Untersuchung von INV005 und ihrem Partner keine weiteren numerischen und/oder strukturellen Auffälligkeiten (Chromosomen des Partners im Rahmen dieser Arbeit nicht noch einmal untersucht).

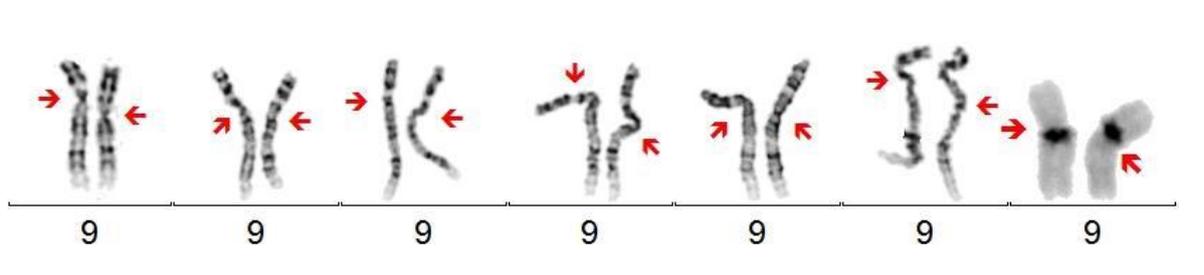


Abb. 3.7: Chromosomen 9 von INV005 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

3.3.2.2 Molekulare Zytogenetik

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) für die Sonden 311 und 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.8).

Für die Sonde 311 fand sich im p-Arm ein im Vergleich zur Referenz doppeltes Signal, für die Sonde 315 ebenfalls im p-Arm ein Signal von etwa 1,5facher Intensität der Referenz. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Für die Sonden 311 und 315 liegen CNVs vor: Für die Hybridisierungsregion der Sonde 311 im p-Arm ergibt sich eine Duplikation, für die Kreuzhybridisierungsregion der Sonde 315 im p-Arm eine zumindest partielle Duplikation (Abbildung 3.9).

Das invertierte Chromosom 9 zeigte lediglich eine komplette Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-IIIβα-q), für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.8).

Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment liegt damit proximal der Hybridisierungsregionen der Sonden 312 und 314 mit Bruchpunkten in 9p11.1 und 9q13 (Abbildung 3.9).

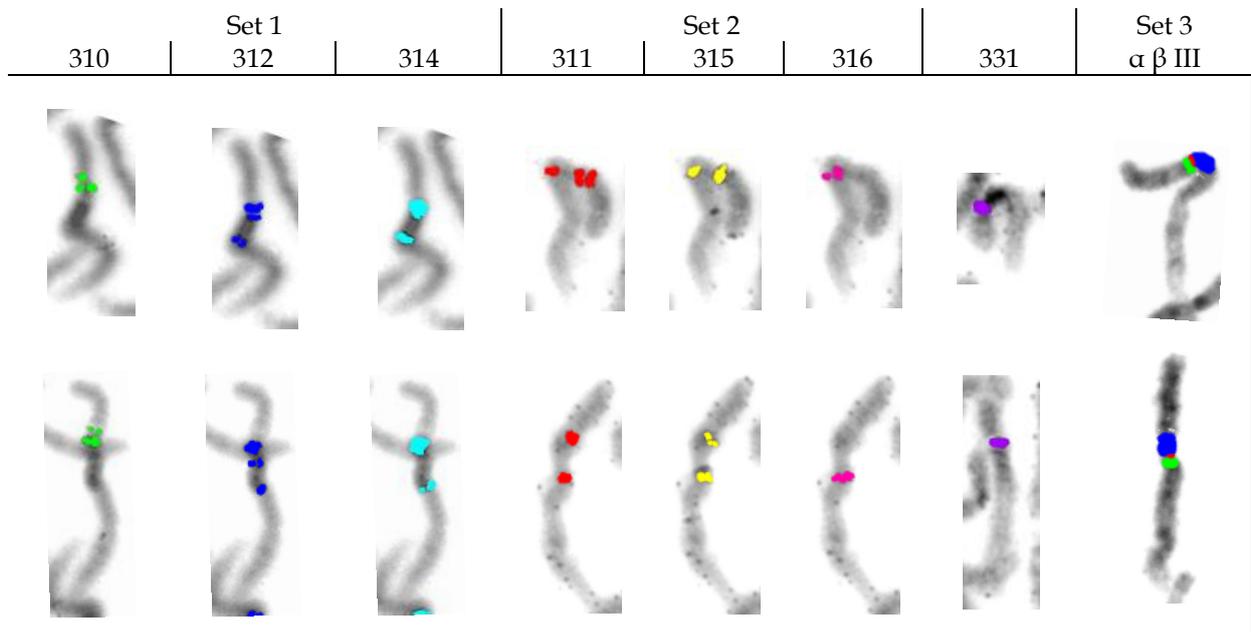


Abb. 3.8: Hybridisierung INV005.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

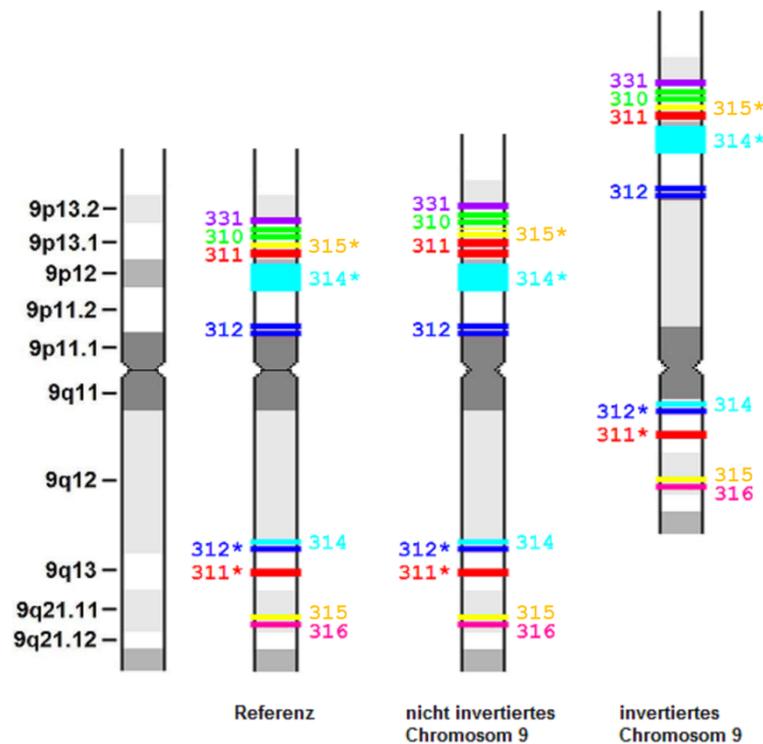


Abb. 3.9: Ideogramme INV005.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Duplikation von 311 in 9p, zumindest partielle Duplikation von 315* in 9p.

Invertiertes Chromosom 9: Bruchpunkt 9p proximal von 312, Bruchpunkt 9q proximal von 314. Zytogenetisch ergibt sich damit eine $inv(9)(p11.1q13)$.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.3.3 Proband INV006

3.3.3.1 Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik

INV006 wurde im Alter von 20 Jahren im Rahmen eines Konsils in der Medizinischen Klinik IV der LMU vorgestellt. Wegen der Kombination aus Adipositas und Hypogonadismus wurde der Verdacht auf das Vorliegen eines Klinefelter-Syndroms geäußert. Die durchgeführte Chromosomenanalyse ergab keinen Hinweis auf eine gonosomale Aberration, die diesen Verdacht untermauern würde. In allen analysierten Metaphasen fand sich eine perizentrische Inversion eines der beiden Chromosomen 9 (Abbildung 3.10). Besonders bemerkenswert war, dass sich bei der Strukturanalyse in 11 von insgesamt 25 untersuchten Metaphasen diverse chromosomale Umbauten fanden. Hierfür konnte klinisch kein Auslöser gefunden werden (Medikamente, Strahlenbelastung). Ebenso wurde klinisch kein Hinweis auf ein Chromosomenbrüchigkeitssyndrom gefunden. Um so erstaunlicher war es, dass sich bei

der Nachuntersuchung von INV006 im Rahmen dieser Arbeit erneut multiple, zum Teil komplexe chromosomale Umbauten nachweisen ließen (siehe unten).

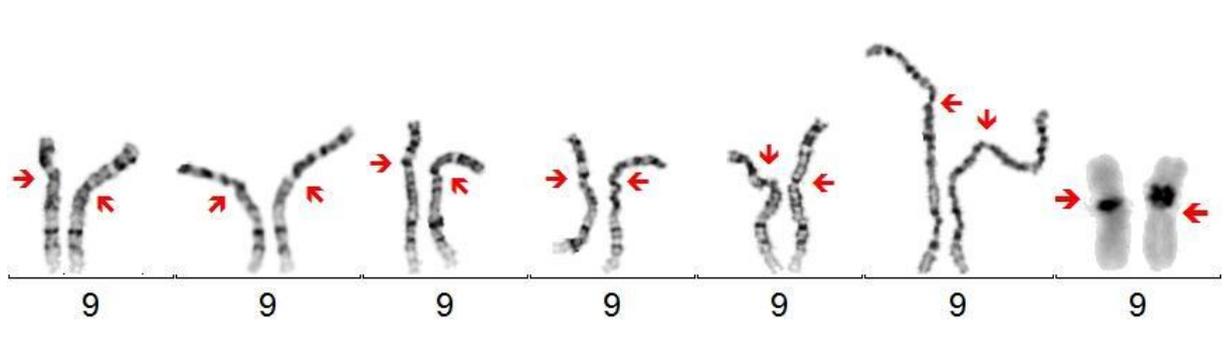


Abb. 3.10: Chromosomen 9 von INV006 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

Bei der zytogenetischen Analyse im Jahre 2003 waren in 11 von 25 (44 %) untersuchten Metaphasen unterschiedliche chromosomale Umbauten aufgefallen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Chromosomenanalyse wiederholt, wobei sich in 27 von 112 GTG-gebänderten Metaphasen (24 %) und in 8 von 40 mittels M-FISH analysierten Mitosefiguren (20 %) ebenfalls zum Teil multiple Aberrationen fanden (Abbildung 3.11). Diese Aberrationen beinhalteten Translokationen (zum Teil komplex oder mit gonosomaler Beteiligung), Robertsonsche Translokationen, peri- und parazentrische Inversionen, Deletionen, Isochromosomen, dizentrische Chromosomen, nicht näher charakterisierbare Derivativchromosomen mit teilweise additivem Material sowie Markerchromosomen. Eine Metaphase zeigte einen tetraploiden Chromosomensatz. Keine dieser Veränderungen war identisch in den Vorbefunden beschrieben. Dies lässt vorsichtig darauf schließen, dass die chromosomalen Umbauten zufällige, wenn auch gehäufte Ereignisse darstellen, deren Ursache unklar bleibt. Augenscheinlich haben sie aber keinen gravierenden Einfluss auf den Phänotyp von INV006.

In Bezug auf die Brüchigkeit der Chromosomen von INV006 ist ebenfalls keine eindeutige Aussage zu treffen. In normalem Kulturmedium fand sich in 1 von 70 Metaphasen (1,4 %) ein Bruchereignis, in einer Mangelmediumkultur waren Brüche in 8 von 42 Metaphasen (19 %) zu beobachten. Insgesamt liegt die Häufigkeit für Bruchereignisse damit bei ca. 8 % und ist nicht höher als bei anderen gleichaltrigen Individuen (intern angelegte Vergleichskulturen). An den Bruchereignissen waren die Chromosomen 2, 3, 5, 6, 7, 14 und 16 beteiligt. Nur der beobachtete Bruch in 6p23 ist als seltene fragile Stelle in Mangelmedien beschrieben (SUTHERLAND *et al.* 1983).

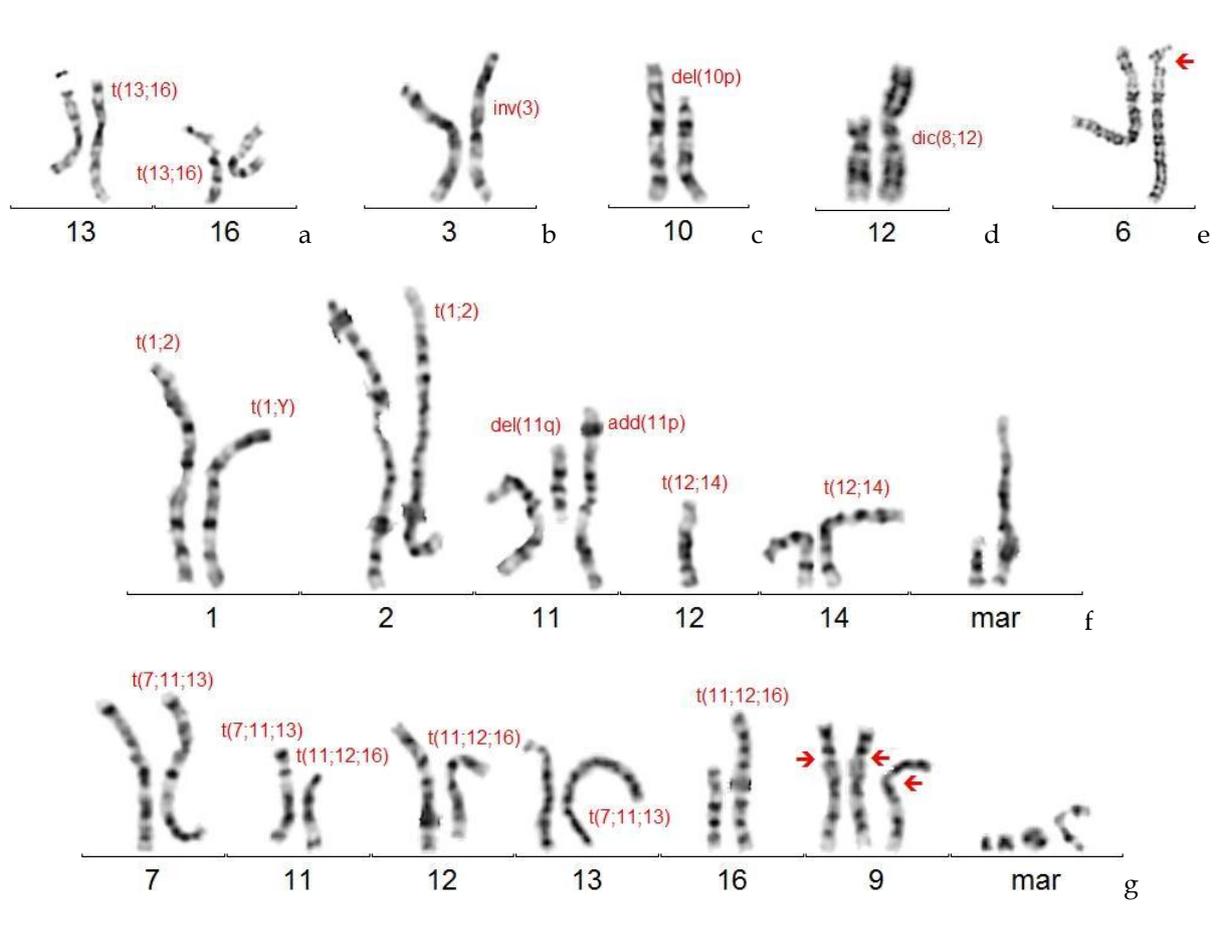


Abb. 3.11: Beispiele struktureller Chromosomenaberrationen bei INV006 in der GTG-Färbung.

- Translokation zwischen den Chromosomen 13 und 16.
- Inversion des Chromosoms 3.
- Deletion des kurzen Arms von Chromosom 10.
- Dizentrisches Chromosom, bestehend aus den Chromosomen 8 und 12.
- Seltene fragile Stelle fra(6)(p23) im Mangelmedium.
- Prometaphase mit komplexem Rearrangement, das Translokationen (mit gonosomaler Beteiligung), eine Deletion, additives Material unbekanntem Ursprungs und Markerchromosomen enthält.
- Prometaphase mit komplexem Rearrangement, das neben komplexen Translokationen und Markerchromosomen ein zusätzliches Chromosom 9 enthält.

3.3.3.2 Molekulare Zytogenetik

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) das der Referenz entsprechende Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.12).

Das invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer kompletten Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-III β α -q) für die Sonden 311, 312 und 314 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.12).

Die Sonden 312 und 314 zeigten eine Inversion ihrer Signale im p- bzw. q-Arm. Zusätzlich ergab sich für die Sonde 312 eine zumindest partielle Duplikation der nach Inversion jetzt im q-Arm lokalisierten Region, da sich hier im Vergleich zur Referenz neben dem Doppelsignal ein weiteres Einzelsignal von etwa halber Signalintensität nachweisen ließ. Für die Sonde 311 fand sich im p-Arm ein in Bezug auf die Referenz nur etwa halb so großes Signal wie im q-Arm (Abbildung 3.12). Die übrigen Sonden zeigten ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Es liegen mehrere Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten vor. Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment liegt distal der Kreuzhybridisierungsregionen der Sonden 312 und 314 mit Bruchpunkten in 9p13.1 und 9q13. Bezogen auf das für den Klon 311 beobachtete Signalmuster kann mit der durchgeführten Methode keine Unterscheidung hinsichtlich einer partiellen Inversion des Klons oder dem Vorliegen einer CNV vorgenommen werden. Es ergeben sich zwei Möglichkeiten (Abbildung 3.13). Erstens könnte eine partielle Inversion des Klons 311 vorliegen, wobei sich der Bruchpunkt im p-Arm innerhalb der Hybridisierungsregion von 311 befinden würde. Im q-Arm würde sich dann ein Bruchpunkt distal der Kreuzhybridisierungsregion von 312 und proximal in der Nähe der Kreuzhybridisierungsregion von 311 ergeben, um das beobachtete Signalmuster zu erzeugen. Bei der zweiten Möglichkeit würde der Bruchpunkt im p-Arm distal der Kreuzhybridisierungsregion von 314 und proximal der Hybridisierungsregion von 311 liegen, wohingegen der Bruchpunkt im q-Arm distal der Kreuzhybridisierungsregion von 312 und proximal der Kreuzhybridisierungsregion von 311 lokalisiert wäre. In diesem Falle würde sich das gefundene Hybridisierungsmuster für die Sonde 311 nur durch das Vorliegen zweier CNVs erklären lassen, nämlich durch eine partielle Deletion in 9p und eine zumindest partielle Duplikation in 9q. Unabhängig von beiden dargestellten Möglichkeiten liegen die Bruchpunkte des Inversionssegments in 9p13.1 und 9q13. Für die Sonde 312 fand sich eine CNV im Sinne einer partiellen Duplikation für die in den q-Arm translozierte Hybridisierungsregion (Abbildung 3.13).

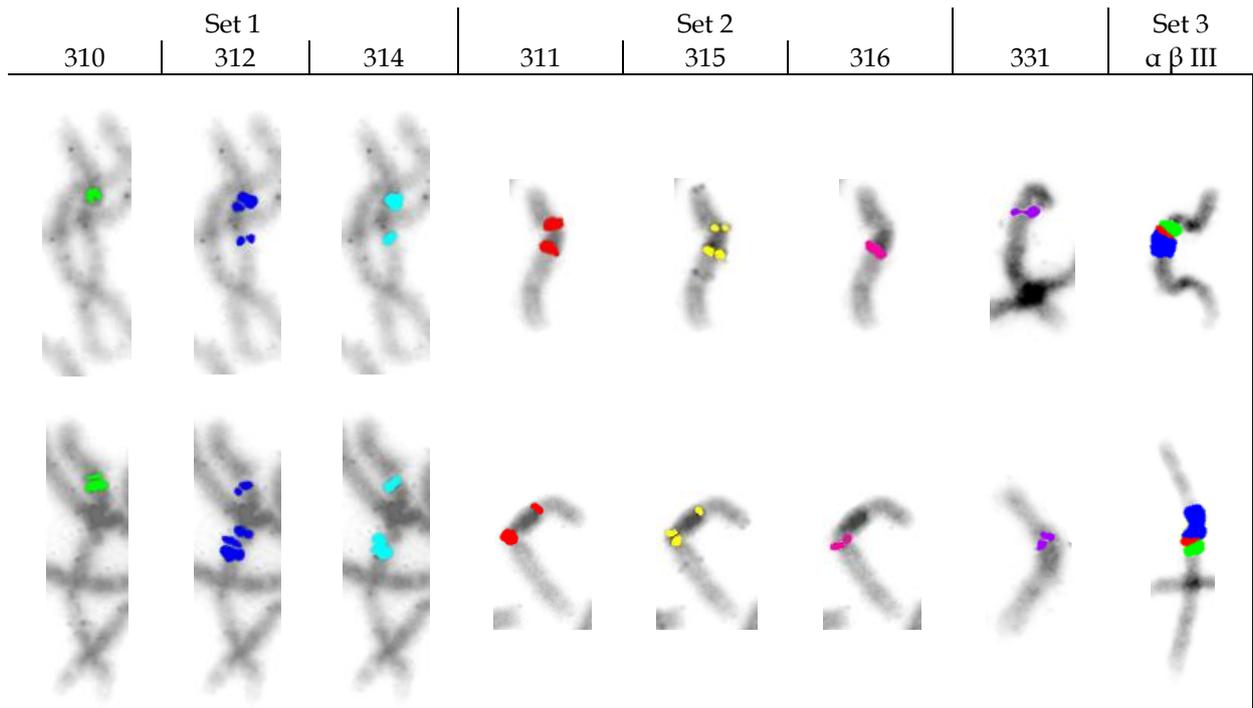


Abb. 3.12: Hybridisierung INV006.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

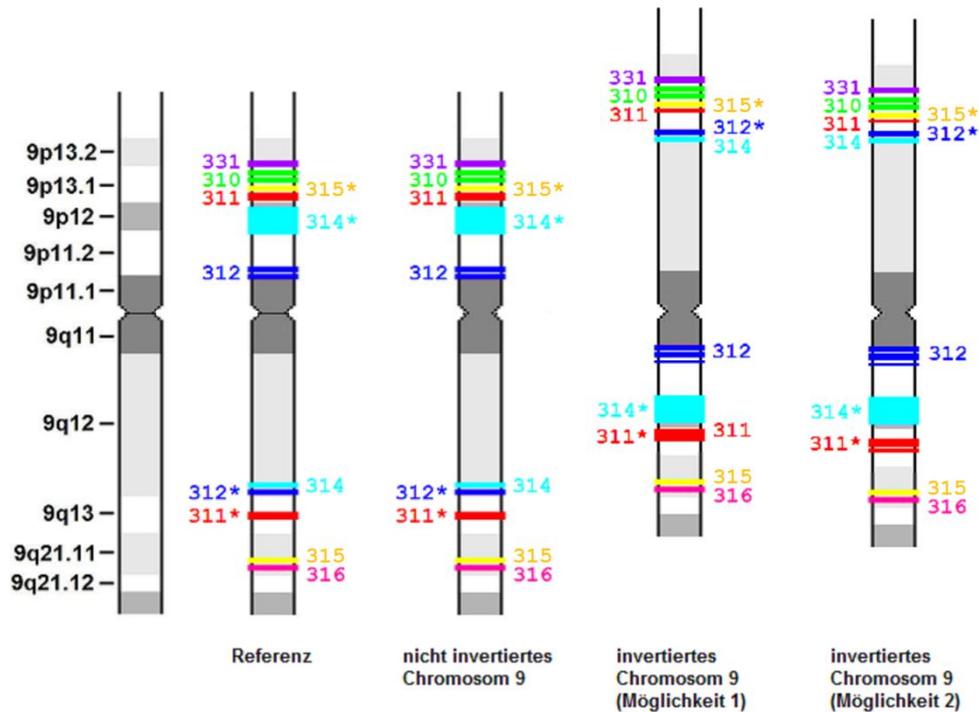


Abb. 3.13: Ideogramme INV006.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Entspricht der Referenz.

Invertiertes Chromosom 9 (Möglichkeit 1): Bruchpunkt 9p in 311 (Klon partiell invertiert), Bruchpunkt 9q distal von 312* und proximal von 311*. Zytogenetisch ergibt sich damit eine *inv(9)(p13.1q13)*. Partielle Duplikation von 312 in 9q.

Invertiertes Chromosom 9 (Möglichkeit 2): Bruchpunkt 9p distal von 314* und proximal von 311, Bruchpunkt 9q distal von 312* und proximal von 311*. Zytogenetisch ergibt sich damit eine *inv(9)(p13.1q13)*. Partielle Duplikation von 312 in 9q, partielle Deletion von 311 in 9p, partielle Duplikation von 311* in 9q.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.3.4 Proband INV010

3.3.4.1 Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik

INV010 stellte sich im März 2001 im Alter von 33 Jahren gemeinsam mit seiner Partnerin (36 Jahre alt) zur genetischen Beratung vor. Der Grund hierfür war ein unerfüllter Kinderwunsch nach drei Fehlgeburten der Partnerin in der Frühschwangerschaft (8. bis 11. Schwangerschaftswoche). Die Chromosomenanalyse ergab für INV010 einen numerisch unauffälligen, strukturell auffälligen männlichen Chromosomensatz mit einer perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9 (Abbildung 3.14). Bei der Partnerin wurde in allen analysierten Metaphasen eine Robertsonsche Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 22 nachgewiesen, welche die Aborte durch Bildung unbalancierter Keimzellen erklären könnte (Chromosomen der Partnerin im Rahmen dieser Arbeit nicht noch ein-

mal untersucht). Zusätzlich wurde bei INV010 wegen des gehäuften Auftretens von Apoplexen in der Familie eine molekulargenetische Analyse des Faktor V-Gens durchgeführt, wobei sich die Faktor V-Leiden-Mutation Arg506Gln in heterozygoter Form fand.

Im August 2001 kam es zu einer erneuten Vorstellung, da die Partnerin von INV010 in der 15. Woche schwanger war. Aufgrund der Vorbefunde und des erhöhten mütterlichen Alters wurde eine Amniozentese durchgeführt, bei der sich ein numerisch unauffälliger, strukturell auffälliger weiblicher Chromosomensatz mit einer perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9 zeigte. Wegen des erhöhten Risikos durch die Robertsonsche Translokation der Mutter, eine uniparentale Disomie 15 und damit ein Prader-Willi-Syndrom beim ungeborenen Kind zu erzeugen, wurde eine DNA-Analyse an Fruchtwasserzellen durchgeführt, die keinen Hinweis auf das Vorliegen einer unimaternalen Disomie 15 ergab. Über den Ausgang der Schwangerschaft liegen keine Informationen vor.

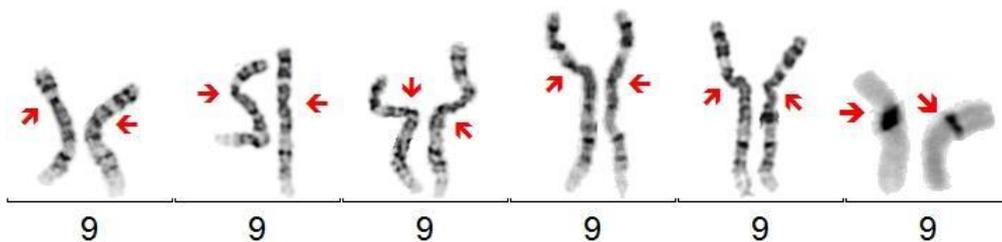


Abb. 3.14: Chromosomen 9 von INV010 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

3.3.4.2 Molekulare Zytogenetik

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) das der Referenz entsprechende Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.15).

Das invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer kompletten Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-III β α -q) für die Sonden 311 und 312 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.15).

Die Sonde 311 zeigte sowohl in ihrer Hybridisierungsregion im p-Arm als auch in ihrer Kreuzhybridisierungsregion im q-Arm im Vergleich zur Referenz jeweils ein zusätzliches Signal. Die Sonde 312 zeigte ein zusätzliches Signal gleicher Intensität wie das der Referenz im q-Arm. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Es liegen mehrere Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten vor. Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment liegt proximal der Hybridisierungsregionen der Sonden

312 und 314 mit den Bruchpunkten in 9p11.1 und 9q12. Da die Sat-III-DNA-Sonde keinen Hinweis auf eine nur partielle Inversion ergab und der Übergang zwischen perizentromerischer Sat-III-DNA und angrenzendem Euchromatin keine scharf definierte Grenze darstellt, ist ein Bruchpunkt im q-Arm in 9q13 anzunehmen, da die Sonde 314 genau in dieser Grenzregion lokalisiert (Abbildung 3.16).

Für die Sonden 311 und 312 liegen CNVs vor: Für die Sonde 311 ergibt sich eine Duplikation sowohl der Hybridisierungsregion in 9p als auch der Kreuzhybridisierungsregion in 9q, für die Sonde 312 ergibt sich eine Duplikation der Kreuzhybridisierungsregion in 9q (Abbildung 3.16).

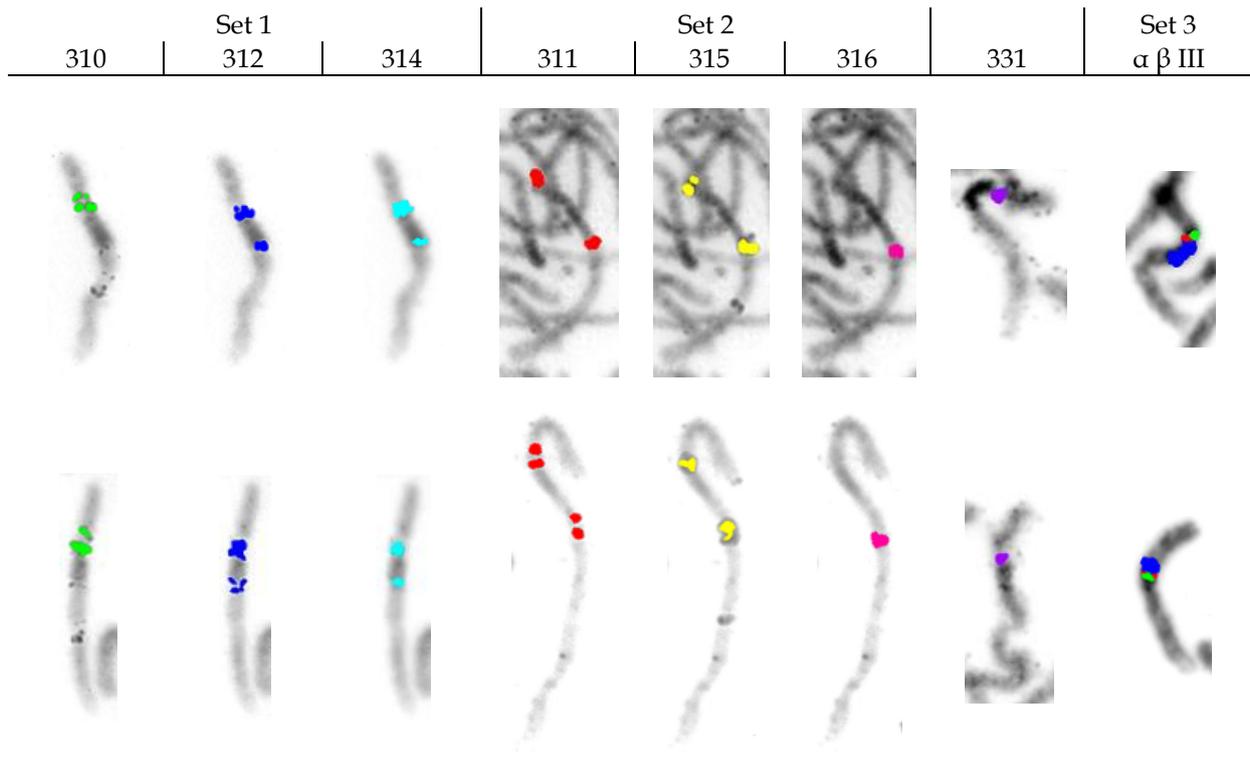


Abb. 3.15: Hybridisierung INV010.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

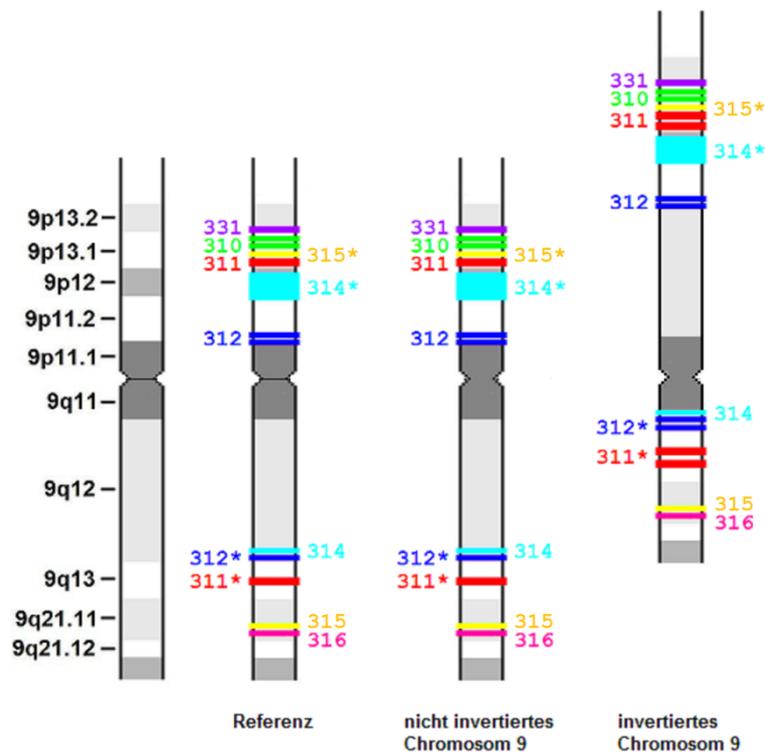


Abb. 3.16: Ideogramme INV010.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Entspricht der Referenz.

Invertiertes Chromosom 9: Bruchpunkt 9p proximal von 312, Bruchpunkt 9q proximal von 314. Zytogenetisch ergibt sich damit eine $inv(9)(p11.1q13)$. Duplikation von 311 in 9p, Duplikation von 311* in 9q und Duplikation von 312* in 9q.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.3.5 Proband INV015

3.3.5.1 Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik

INV015 ist Vater zweier Töchter und stellte sich im Alter von 36 Jahren zur genetischen Beratung vor. Bei der jüngeren Tochter war direkt nach der Geburt ein Kleinwuchs in Verbindung mit einer Makroglossie sowie stark schwankenden Blutzuckerwerten im Sinne eines neonatalen Diabetes aufgefallen. Als genetische Ursache wurde eine paternale uniparentale Isodisomie des Chromosoms 6 (UPiD6) nachgewiesen. Da weiterer Kinderwunsch bei INV015 und seiner Partnerin bestand, erfolgte eine genetische Beratung hinsichtlich des Wiederholungsrisikos für eine UPiD6 sowie über die Möglichkeiten einer Pränataldiagnostik. Zum Ausschluss einer erblichen Ursache der UPiD6 wurde bei INV015 eine Chromosomenanalyse durchgeführt, die einen numerisch unauffälligen, strukturell auffälligen männlichen Chromosomensatz mit einer perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9 ergab (Abbildung 3.17).

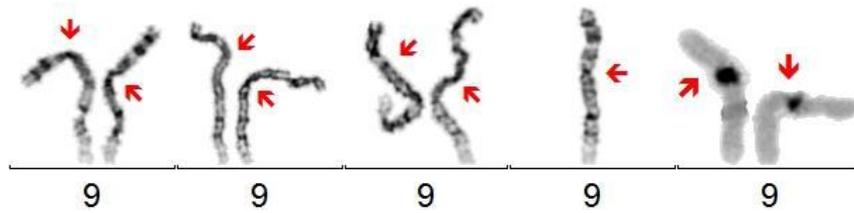


Abb. 3.17: Chromosomen 9 von INV015 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

3.3.5.2 Molekulare Zytogenetik

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) das der Referenz entsprechende Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.18).

Das invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer kompletten Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-III β α -q) für die Sonden 311 und 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.18).

Die Sonde 311 zeigte für ihre Hybridisierungsregion im p-Arm ein Signal doppelter Intensität im Vergleich zur Referenz. Die Sonde 315 zeigte für ihre Hybridisierungsregion und ihre Kreuzhybridisierungsregion jeweils ein Signal gleicher Intensität. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Es liegen mehrere Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten vor. Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment liegt proximal der Hybridisierungsregionen der Sonden 312 und 314 mit den Bruchpunkten in 9p11.1 und 9q12. Da die Sat-III-DNA-Sonde keinen Hinweis auf eine nur partielle Inversion ergab und der Übergang zwischen perizentromerischer Sat-III-DNA und angrenzendem Euchromatin keine scharf definierte Grenze darstellt, ist ein Bruchpunkt im q-Arm in 9q13 anzunehmen, da die Sonde 314 genau in dieser Grenzregion lokalisiert.

Für die Sonden 311 und 315 liegen CNVs vor: Für die Hybridisierungsregion der Sonde 311 im p-Arm ergibt sich eine Duplikation, für die Kreuzhybridisierungsregion der Sonde 315 im p-Arm eine partielle Duplikation (Abbildung 3.19).

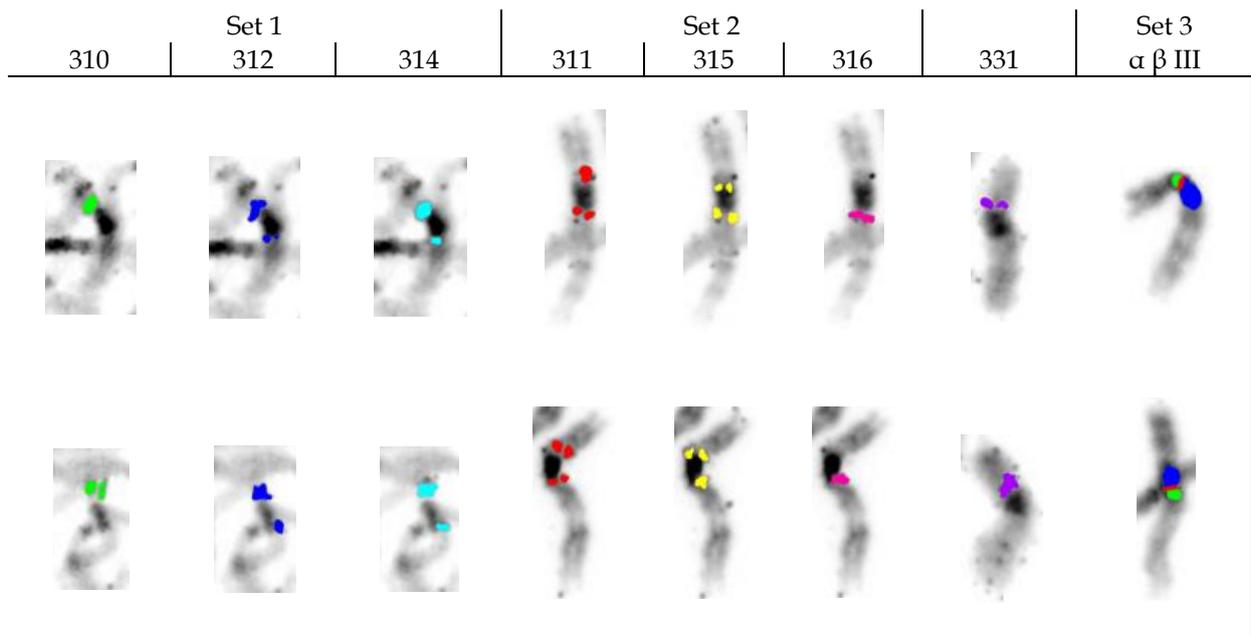


Abb. 3.18: Hybridisierung INV015.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

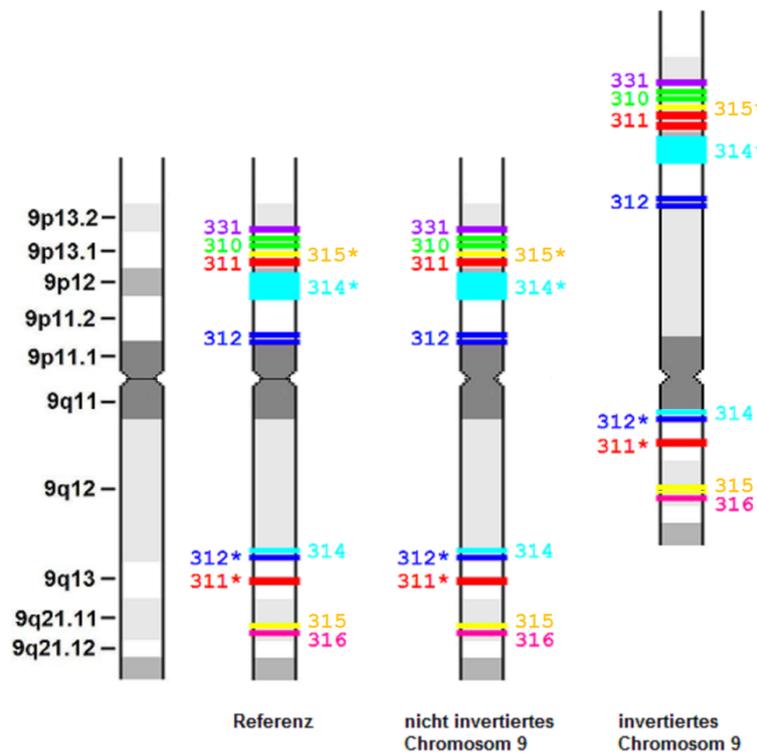


Abb. 3.19: Ideogramme INV015.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Entspricht der Referenz.

Invertiertes Chromosom 9: Bruchpunkt 9p proximal von 312, Bruchpunkt 9q proximal von 314. Zytogenetisch ergibt sich damit eine $inv(9)(p11.1q13)$. Duplikation von 311 in 9p, partielle Duplikation von 315* in 9p.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

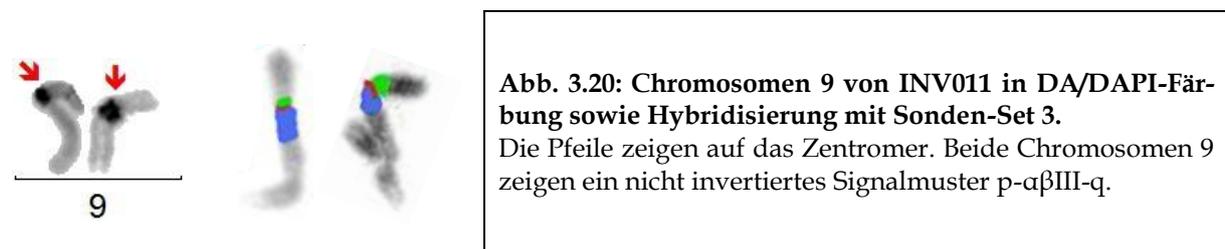
3.3.6 Proband INV011

3.3.6.1 Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik

INV011 stellte sich im Alter von 34 Jahren gemeinsam mit ihrem Partner (30 Jahre alt) zur genetischen Beratung vor. Der Grund hierfür war ein unerfüllter Kinderwunsch nach zwei Fehlgeburten in der Frühschwangerschaft (6. und 9. Schwangerschaftswoche). Die Chromosomenanalyse ergab für INV011 einen numerisch unauffälligen, strukturell auffälligen weiblichen Chromosomensatz mit einer fraglichen perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9. Bei der molekulargenetischen Thrombophilie-Diagnostik konnte weder eine Faktor V-Leiden-Mutation (Arg506Gln-Mutation) noch eine Prothrombin-20210G>A-Mutation nachgewiesen werden. INV011 leidet an einer Schilddrüsenunterfunktion, welche mit L-Thyroxin behandelt wird. Daneben verwendet sie wegen eines allergischen Asthmas bei Bedarf ein Inhalationsspray. INV011 hat bereits einen gesunden Sohn aus einer vorangegangenen Partnerschaft. Die Chromosomenanalyse des jetzigen Partners von INV011 ergab einen numerisch und strukturell unauffälligen männlichen Chromosomensatz (Chromosomen des Partners im Rahmen dieser Arbeit nicht noch einmal untersucht).

3.3.6.2 Molekulare Zytogenetik

Sowohl bei der DA/DAPI-Färbung als auch bei der Analyse mit dem Sonden-Set 3 ergab sich kein Hinweis auf das Vorliegen einer partiellen oder kompletten perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9 (Abbildung 3.20). Da somit die Einschlusskriterien für die vorliegende Arbeit nicht mehr erfüllt waren, wurden keine weiteren Untersuchungen an den Chromosomenpräparationen von INV011 durchgeführt und das gesamte Untersuchungsmaterial vernichtet.



3.3.7 Proband INV016

3.3.7.1 Fallkasuistik, Vorbefunde und klassische Zytogenetik

INV016 stellte sich im Alter von 33 Jahren zur genetischen Beratung vor. Bei ihrem jüngeren Bruder wurde ein Down-Syndrom diagnostiziert, weshalb sie sich bei bestehendem Kinderwunsch über das

eigene Risiko, ein Kind mit Down-Syndrom zu bekommen, beraten lassen wollte. Die Chromosomenanalyse ergab einen numerisch unauffälligen, strukturell auffälligen weiblichen Chromosomensatz mit einer perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9. Es fand sich kein Hinweis auf eine Trisomie 21.

3.3.7.2 Molekulare Zytogenetik

Eine (molekular-)zytogenetische Analyse der im Vorbefund beschriebenen perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9 war nicht möglich. In keiner der angelegten Kulturen fand sich auch nach wiederholtem Ansatz ein Zellwachstum.

3.4 Familienuntersuchungen

Es wird zunächst das Kind beschrieben, danach das Elternteil mit der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 und zum Schluss das Elternteil ohne Inversion. Aus diesem Grund folgt die INV-Nummerierung nicht immer der natürlichen Zahlenfolge.

3.4.1 Probanden INV002, INV003 und INV004

3.4.1.1 Fallkasuistiken, Vorbefunde und klassische Zytogenetik

INV002 ist das 2. Kind gesunder, nicht blutsverwandter Eltern. Die Geburt erfolgte in der 37. Schwangerschaftswoche *per sectio*, nachdem die Mutter verminderte Kindsbewegungen *in utero* wahrgenommen hatte. Die Mutter (INV003) war bei der Geburt 25 Jahre alt, der Vater (INV004) 35 Jahre, beide waren im wesentlichen gesund. Bei INV004 fand sich in der Chromosomenanalyse ein numerisch unauffälliger, strukturell auffälliger männlicher Chromosomensatz mit einer perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9 (Abbildung 3.22), der Chromosomensatz von INV003 war numerisch und strukturell unauffällig (Abbildung 3.23).

Das Geburtsgewicht von INV002 lag bei 3060 g (10. – 25. Perzentile), die Größe bei 48 cm (3. – 10. Perzentile) und der Nabelschnur-pH-Wert bei 7,23. Das Kind zeigte keine postpartalen Adaptionsschwierigkeiten.

INV002 wurde mit einer Analstenose, einem seit der Geburt bestehenden inspiratorischen Stridor, einer Retrognathie sowie einer Mikrozephalie im Alter von 11 Wochen im Rahmen eines Konsils im Dr. von Haunerschen Kinderspital vorgestellt. Die syndromologische Untersuchung ergab folgende Besonderheiten: Weit offene vordere Fontanelle; Mikrozephalie; volles, struppiges Haar; breite Nase mit breiter Nasenwurzel; lateral abfallende Augenlider; relativ langes Philtrum; kleiner Mund; Retro-

gnathie; große, abstehende Ohrläppchen; stark gefäustelte Hände mit eingeschlagenen Daumen und Ulnardeviation der Finger. Weiterführende körperliche und apparative Untersuchungen lieferten folgende Ergebnisse: Schlechtes Trinkverhalten mit wiederholtem Erbrechen; rasche Ermüdbarkeit; starkes kaltschweißiges Schwitzen; starke Unruhe; Fußrückenödeme beidseits; Kontrakturen der oberen und unteren Extremitäten; erhöhter Beugetonus; muskulärer Hypertonus; abgeflachte Trachea im Sinne einer Tracheomalazie mit erhaltenem Restlumen, insgesamt liegt eine Laryngotracheomalazie vor; unauffälliges Neugeborenen-Schreening; unauffälliger Schweißtest; kein Hinweis auf Morbus Hirschsprung; konzentrische Hypertrophie des Myokards bei auffälligem EKG mit als pathologisch zu bewertenden Q-Zacken in den Ableitungen V5, V6, aVF, II und III; auffälliges EEG mit altersentsprechender Grundaktivität, aber vor allem im Schlaf zentral beidseits auftretenden betonten Spikes, Polyspikes und irregulär konfigurierten Spike-Wave-Komplexen als Hinweis auf eine erhöhte zerebrale Erregbarkeit. Therapie mit 5 mg/kg Phenobarbital i.v. täglich, die zu einer insgesamt deutlichen Besserung von Allgemeinzustand und Atemsituation führte. Im Alter von etwa 3 Jahren gedeiht INV002 nach telefonischen Angaben der Mutter besser und besucht einen Kindergarten für Kinder mit geistiger Behinderung, allerdings kann INV002 bisher weder selbstständig stehen noch laufen. Die durchgeführte Chromosomenanalyse im Alter von 11 Wochen ergab einen numerisch unauffälligen männlichen Chromosomensatz mit einer perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9 (Abbildung 3.21). Die Eltern stellten INV002 in den letzten Jahren bei einer Reihe von Kinderärzten und Humangenetikern vor. Nach fernmündlicher Mitteilung durch die Mutter wurde im Alter von etwa einem Jahr eine Muskelbiopsie bei Verdacht auf eine Mitochondriopathie durchgeführt, die eine grenzwertige mtDNA-Depletion ergeben habe. Im Alter von etwa 3 Jahren erfolgte eine Wiederholung der Muskelbiopsie zur Überprüfung dieses Befundes, wobei sich keine Veränderung mehr gefunden hätte. Eine ebenfalls zu diesem Zeitpunkt durchgeführte Array-CGH-Analyse habe keine Auffälligkeiten gezeigt.

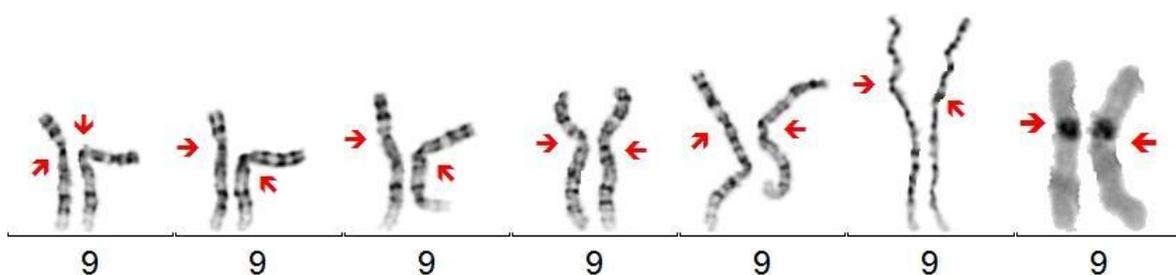


Abb. 3.21: Chromosomen 9 von INV002 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

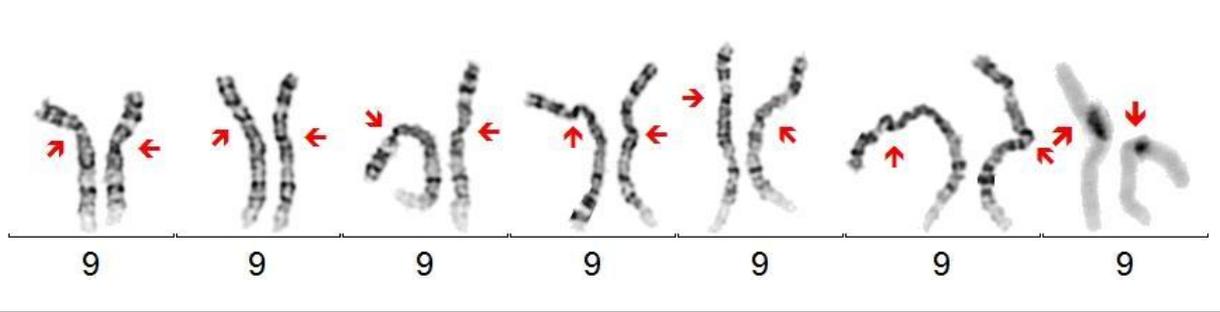


Abb. 3.22: Chromosomen 9 von INV004 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

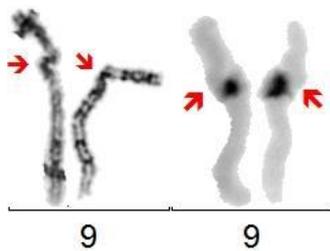


Abb. 3.23: Chromosomen 9 von INV003 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

3.4.1.2 Molekulare Zytogenetik INV002

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) für die Sonde 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.24).

Im q-Arm fanden sich zwei Signale, die etwa der doppelten Intensität der Referenz entsprachen. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Es liegt somit eine CNV der Sonde 315 im Sinne einer Duplikation der Hybridisierungsregion in 9q vor (Abbildung 3.25). Diese Veränderung ließ sich nicht bei der Mutter (INV003) von INV002 nachweisen, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass diese Veränderung neu entstanden ist (siehe Absatz 3.4.1.4).

Das invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer kompletten Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-III β α -q) für die Sonden 311 und 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.24). Beide Sonden zeigten jeweils drei Signale im p-Arm, die etwa die dreifache Intensität der jeweiligen Referenz aufwiesen. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Es liegen mehrere Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten vor. Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment liegt proximal der Hybridisierungsregionen der Sonden 312 und 314 mit den Bruchpunkten in 9p11.1 und 9q12. Da die Sat-III-DNA-Sonde keinen Hinweis auf eine nur partielle Inversion ergab und der Übergang zwischen perizentromerischer Sat-III-DNA und

angrenzendem Euchromatin keine scharf definierte Grenze darstellt, ist ein Bruchpunkt im q-Arm in 9q13 anzunehmen, da die Sonde 314 genau in dieser Grenzregion lokalisiert (Abbildung 3.25).

Für die Sonden 311 und 315 liegen CNVs vor: Sowohl für die Hybridisierungsregion der Sonde 311 als auch für die Kreuzhybridisierungsregion der Sonde 315 ergibt sich eine Triplikation im p-Arm (Abbildung 3.25).

Alle beobachteten Veränderungen des invertierten Chromosoms 9 von INV002 ließen sich auch bei dessen Vater (INV004) nachweisen und sich somit als vererbt anzusehen (siehe Absatz 3.4.1.3).

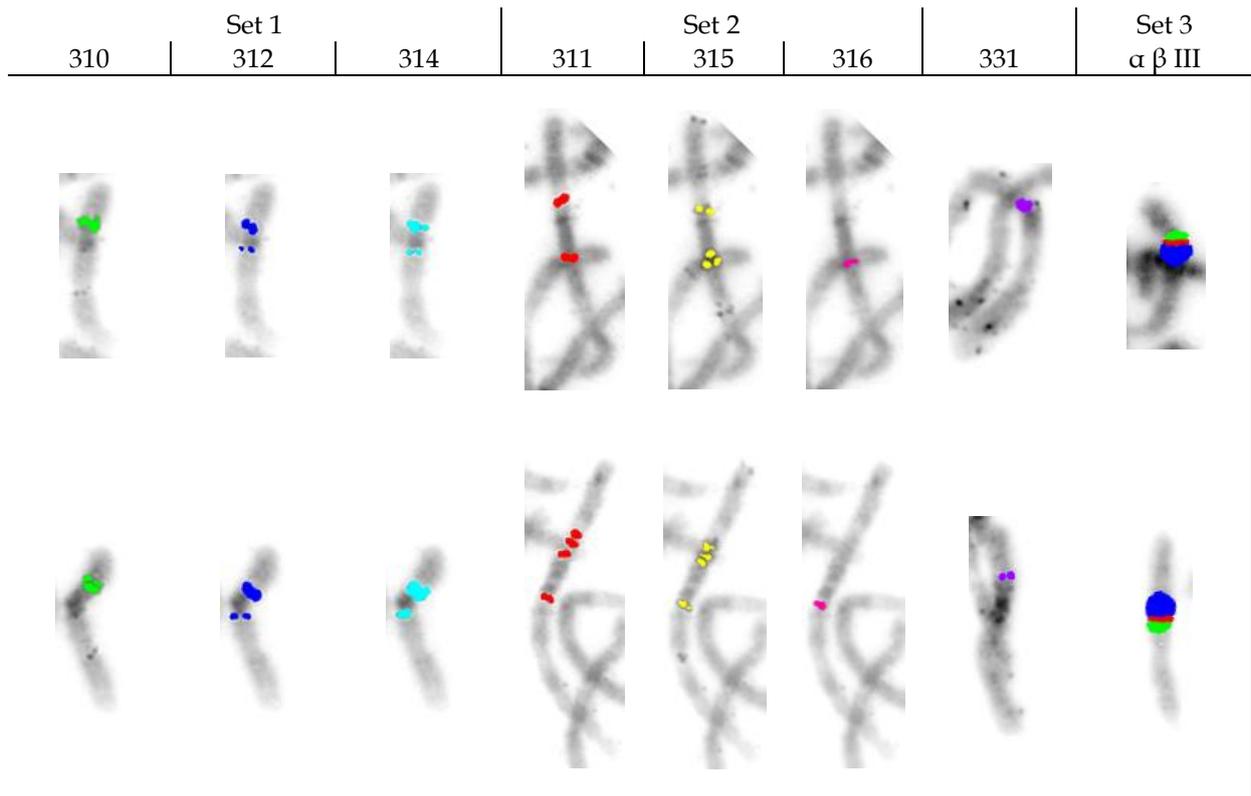


Abb. 3.24: Hybridisierung INV002.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

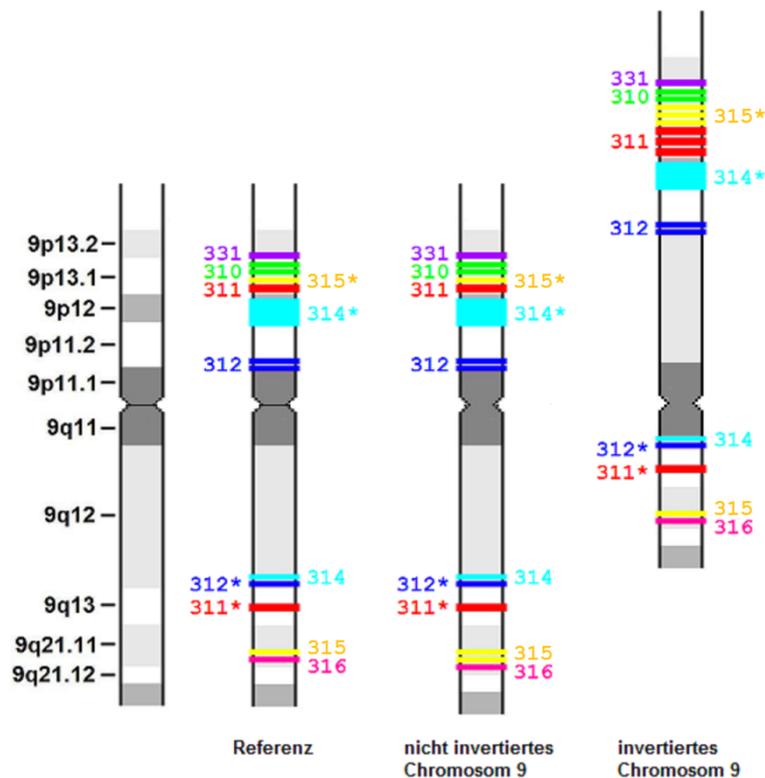


Abb. 3.25: Ideogramme INV002.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Duplikation von 315 in 9q.

Invertiertes Chromosom 9: Bruchpunkt 9p proximal von 312, Bruchpunkt 9q proximal von 314. Zytogenetisch ergibt sich damit eine *inv(9)(p11.1q13)*. Triplikation von 311 in 9p, Triplikation von 315* in 9p.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.4.1.3 Molekulare Zytogenetik INV004

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) für die Sonde 311 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.26). Im p-Arm fand sich im Vergleich zur Referenz ein doppeltes Signal, was auf eine Duplikation der entsprechenden Hybridisierungsregion im Sinne einer CNV hinweist (Abbildung 3.27). Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Das invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer kompletten Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-III β -q) für die Sonden 311 und 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.26). Beide Sonden zeigten jeweils drei Signale im p-Arm, die etwa die dreifache Intensität der jeweiligen Referenz aufwiesen. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Es liegen mehrere Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten vor. Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment liegt proximal der Hybridisierungsregionen der Sonden 312 und 314 mit den Bruchpunkten in 9p11.1 und 9q12. Da die Sat-III-DNA-Sonde keinen Hinweis auf eine nur partielle Inversion ergab und der Übergang zwischen perizentromerischer Sat-III-DNA und angrenzendem Euchromatin keine scharf definierte Grenze darstellt, ist ein Bruchpunkt im q-Arm in 9q13 anzunehmen, da die Sonde 314 genau in dieser Grenzregion lokalisiert (Abbildung 3.27).

Für die Sonden 311 und 315 liegen CNVs vor: Sowohl für die Hybridisierungsregion der Sonde 311 als auch für die Kreuzhybridisierungsregion der Sonde 315 ergibt sich eine Triplikation im p-Arm (Abbildung 3.27).

Alle beobachteten Veränderungen des invertierten Chromosoms 9 von INV004 ließen sich auch bei dessen Kind (INV002) nachweisen (siehe Absatz 3.4.1.2).

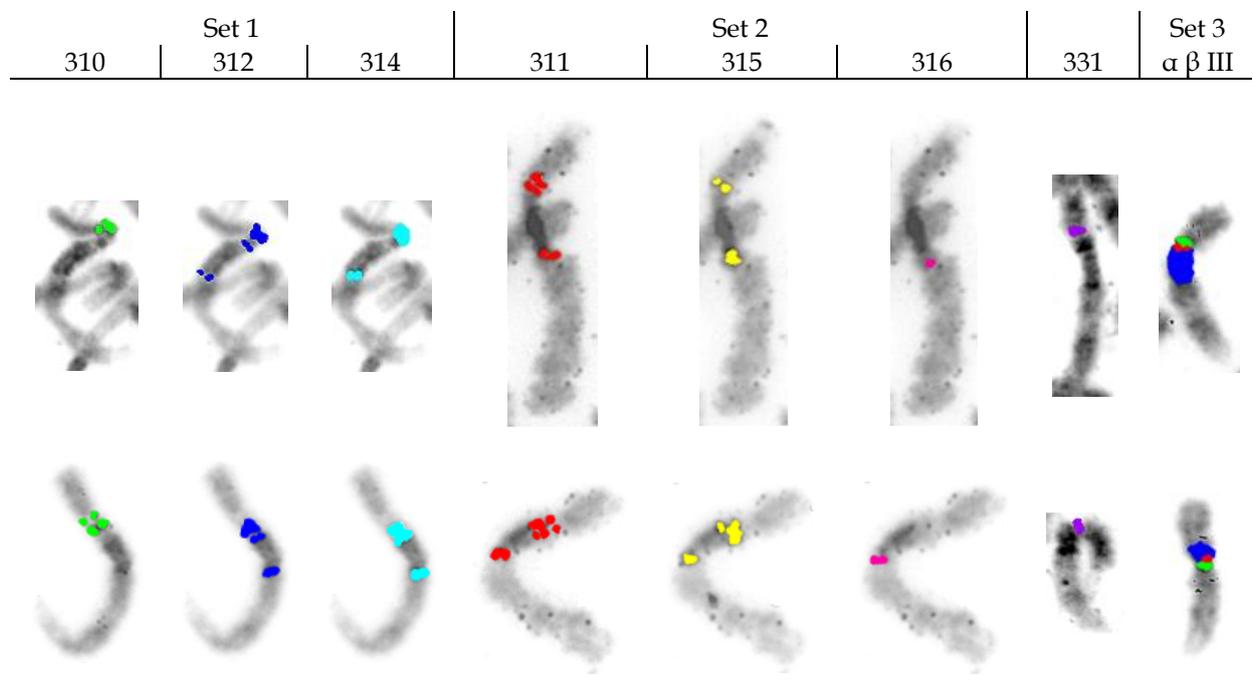


Abb. 3.26: Hybridisierung INV004.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

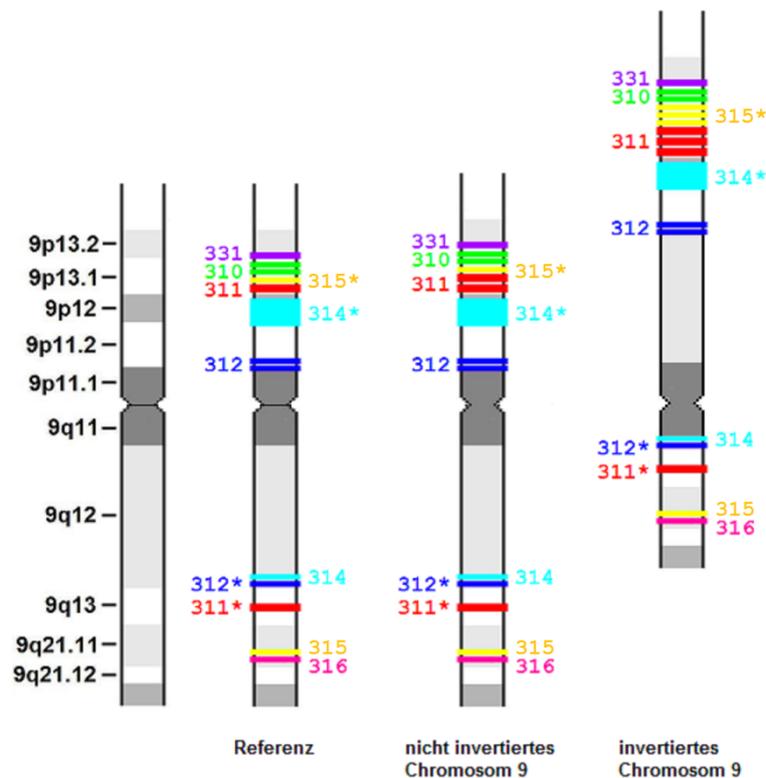


Abb. 3.27: Ideogramme INV004.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Duplikation von 311 in 9p.

Invertiertes Chromosom 9: Bruchpunkt 9p proximal von 312, Bruchpunkt 9q proximal von 314. Zytogenetisch ergibt sich damit eine $inv(9)(p11.1q13)$. Triplikation von 311 in 9p, Triplikation von 315* in 9p.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.4.1.4 Molekulare Zytogenetik INV003

Das erste nicht invertierte Chromosom 9 zeigte eine regelrechte Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- $\alpha\beta$ III-q) sowie ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster für alle Sonden (Abbildung 3.28).

Das zweite nicht invertierte Chromosom 9 zeigte ebenfalls eine regelrechte Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- $\alpha\beta$ III-q), jedoch drei Signale für die Sonde 312 im p-Arm mit etwa 1,5facher Intensität bezogen auf die Referenz (Abbildung 3.28).

Es liegt somit eine CNV der Sonde 312 im Sinne einer zumindest partiellen Duplikation der Hybridisierungsregion in 9p vor (Abbildung 3.29).

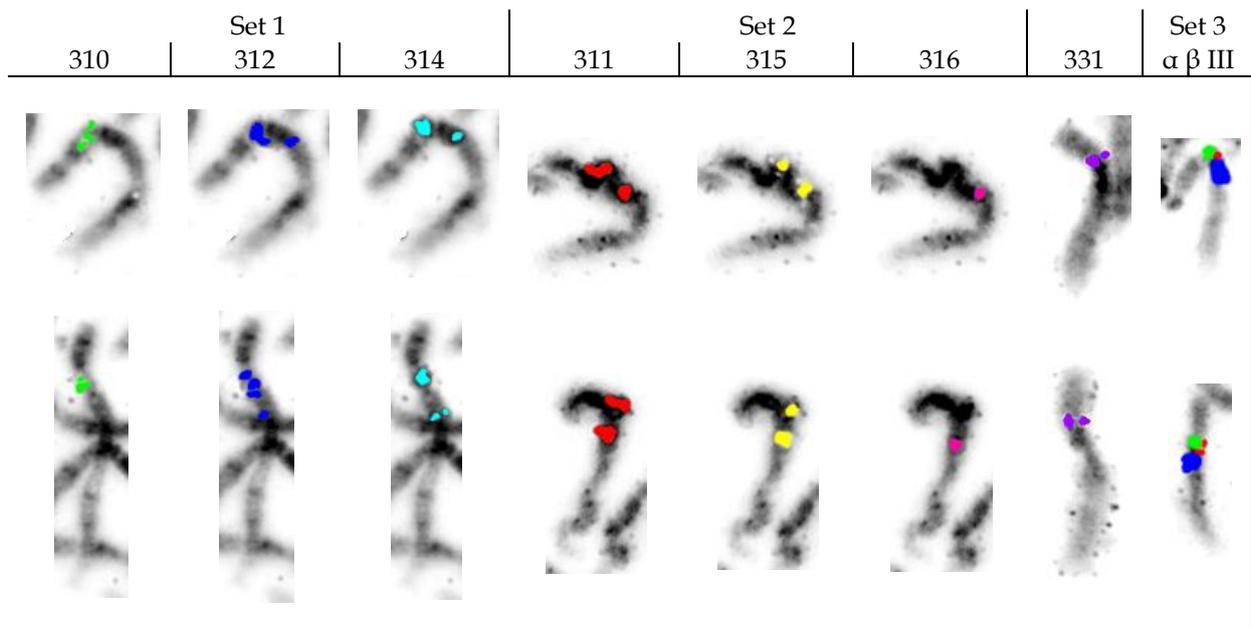


Abb. 3.28: Hybridisierung INV003.

Obere Reihe: Erstes nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Zweites nicht invertiertes Chromosom 9.

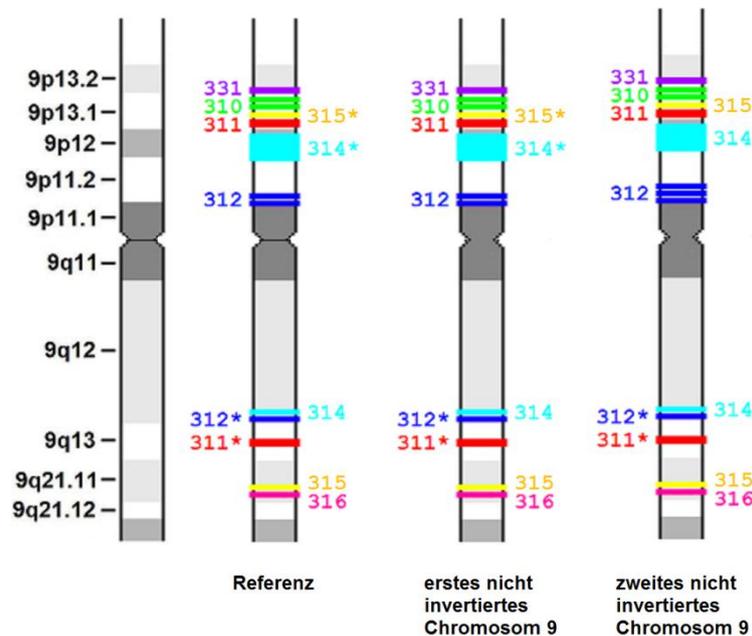


Abb. 3.29: Ideogramme INV003.

Erstes nicht invertiertes Chromosom 9: Entspricht der Referenz.

Zweites nicht invertiertes Chromosom 9: Partielle Duplikation von 312 in 9p.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

Da sich beim Kind (INV002) weder ein in den durch die eingesetzten Sonden abgedeckten Chromosomenabschnitten unauffälliges nicht invertiertes Chromosom 9 noch ein nicht invertiertes Chromosom

9 mit partieller Duplikation der Hybridisierungsregion der Sonde 312 in 9p nachweisen ließ, ist von einem *de novo*-Ereignis beim Kind hinsichtlich der nachgewiesenen Duplikation der Hybridisierungsregion der Sonde 315 in 9q auszugehen. Auch das Vorliegen einer paternalen uniparentalen Disomie 9 ist eher unwahrscheinlich, da das nicht invertierte Chromosom 9 des Vaters eine CNV in Form einer Duplikation der Hybridisierungsregion der Sonde 311 in 9p trägt, welche beim Kind ebenso nicht nachgewiesen werden konnte.

3.4.2 Probanden INV007, INV008 und INV009

3.4.2.1 Fallkasuistiken, Vorbefunde und klassische Zytogenetik

INV007 wurde im Alter von 23 Monaten im Dr. von Haunerschen Kinderspital wegen einer Entwicklungsretardierung in Kombination mit Makrozephalie vorgestellt. Die durchgeführte Chromosomenanalyse ergab einen numerisch unauffälligen männlichen Chromosomensatz mit einer perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9 (Abbildung 3.30). Dieselbe perizentrische Inversion fand sich beim Vater (INV009), der zum Zeitpunkt der Geburt von INV007 44 Jahre alt war (Abbildung 3.31). Die Mutter (INV008, zum Zeitpunkt der Geburt 31 Jahre alt) hatte einen numerisch und strukturell unauffälligen weiblichen Chromosomensatz (Abbildung 3.32). Beide Elternteile waren im wesentlichen gesund, weitere Angaben liegen nicht vor.

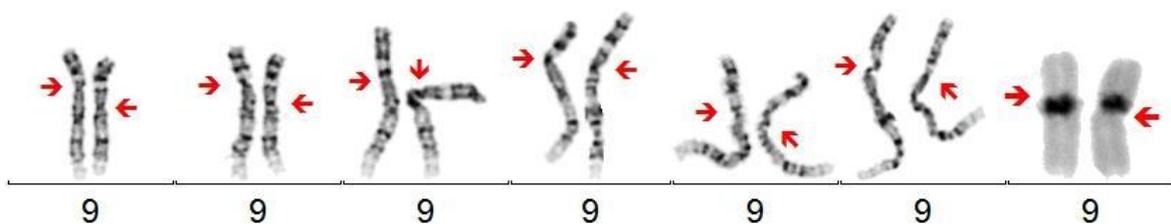


Abb. 3.30: Chromosomen 9 von INV007 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

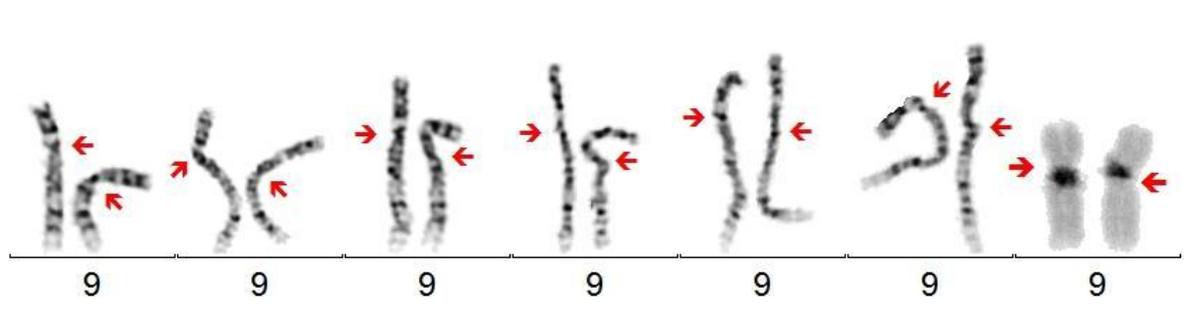


Abb. 3.31: Chromosomen 9 von INV009 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

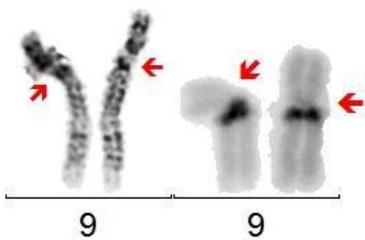


Abb. 3.32: Chromosomen 9 von INV008 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

3.4.2.2 Molekulare Zytogenetik INV007

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- $\alpha\beta$ III-q) für die Sonde 311 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.33).

Im p-Arm fand sich im Vergleich zur Referenz ein Signal von annähernd doppelter Intensität, was auf eine Duplikation der entsprechenden Hybridisierungsregion im Sinne einer CNV hinweist (Abbildung 3.34). Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster. Die beobachtete Veränderung ließ sich auch auf dem ersten nicht invertierten Chromosom 9 bei der Mutter (INV008) nachweisen und ist somit als vererbt anzusehen (siehe Absatz 3.4.2.4).

Das invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer kompletten Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-III β α -q) für die Sonden 311 und 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.33).

Die Sonde 311 zeigte für ihre Hybridisierungsregion im p-Arm ein Signal doppelter Intensität im Vergleich zur Referenz. Die Sonde 315 zeigte für ihre Hybridisierungsregion im q-Arm ein Signal von nur etwa der Hälfte der Intensität der Referenz. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Es liegen mehrere Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten vor. Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment liegt proximal der Hybridisierungsregionen der Sonden 312 und 314 mit den Bruchpunkten in 9p11.1 und 9q12. Da die Sat-III-DNA-Sonde keinen Hinweis auf

eine nur partielle Inversion ergab und der Übergang zwischen perizentromerischer Sat-III-DNA und angrenzendem Euchromatin keine scharf definierte Grenze darstellt, ist ein Bruchpunkt im q-Arm in 9q13 anzunehmen, da die Sonde 314 genau in dieser Grenzregion lokalisiert (Abbildung 3.34).

Für die Sonden 311 und 315 liegen CNVs vor: Für die Hybridisierungsregion der Sonde 311 im p-Arm ergibt sich eine Duplikation, während für die Hybridisierungsregion der Sonde 315 im q-Arm eine partielle Deletion vorliegt (Abbildung 3.34). Alle beobachteten Veränderungen des invertierten Chromosoms 9 von INV007 ließen sich auch bei dessen Vater (INV009) nachweisen und sich somit als vererbt anzusehen (siehe Absatz 3.4.2.3).

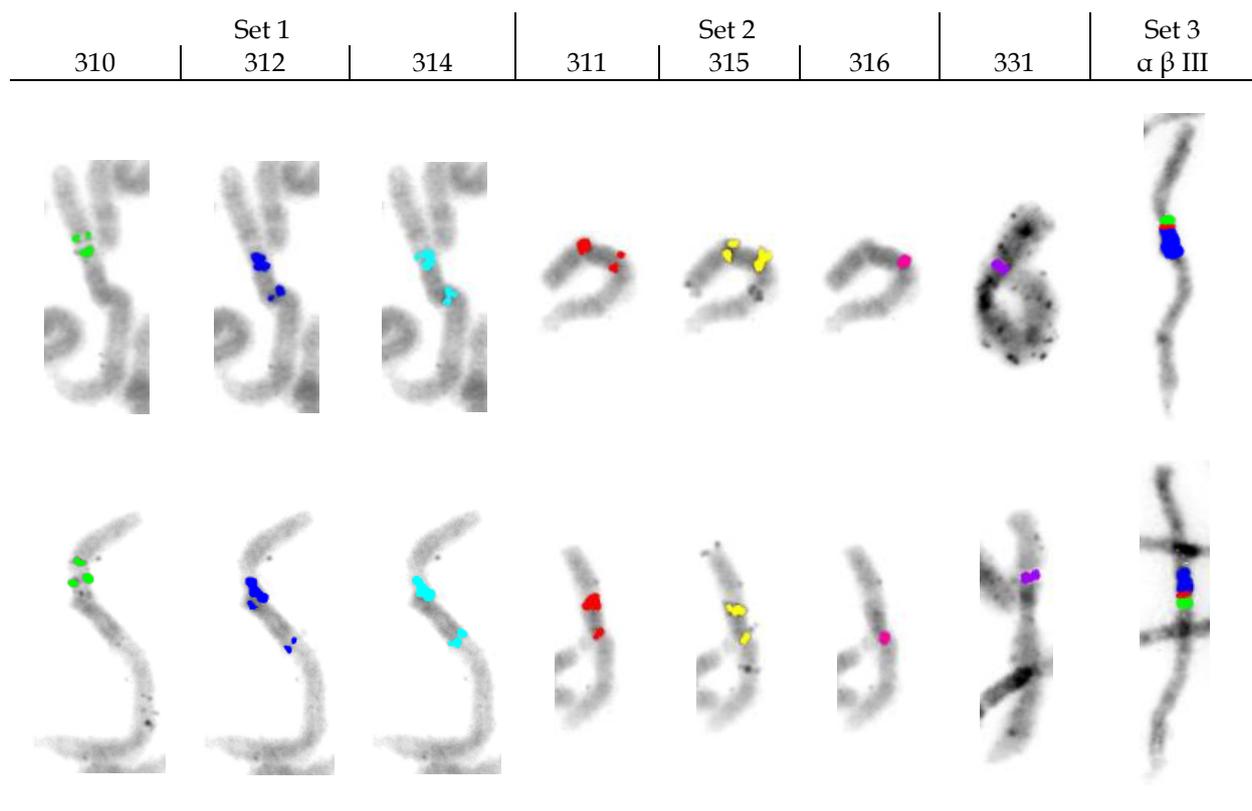


Abb. 3.33: Hybridisierung INV007.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

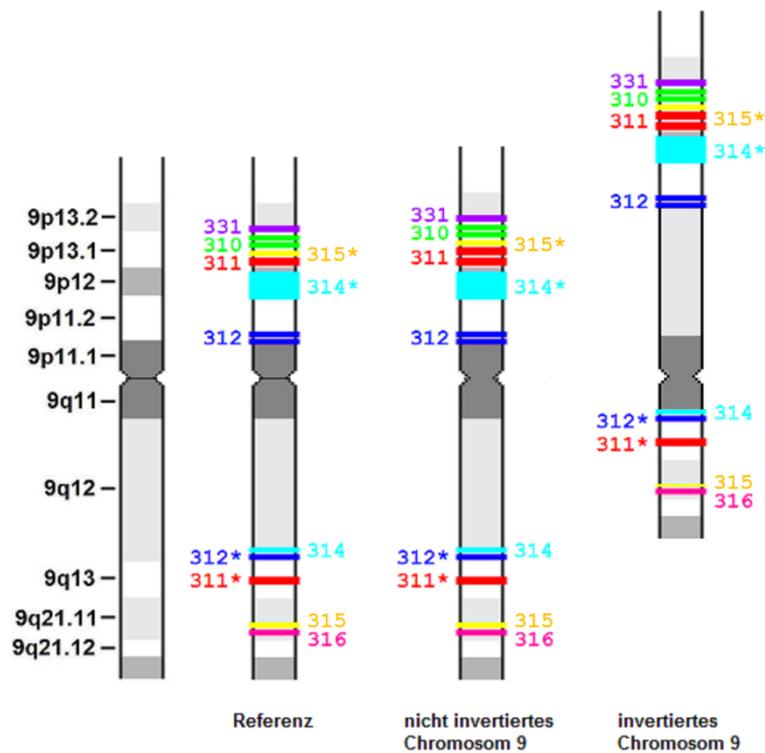


Abb. 3.34: Ideogramme INV007.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Duplikation von 311 in 9p.

Invertiertes Chromosom 9: Bruchpunkt 9p proximal von 312, Bruchpunkt 9q proximal von 314. Zytogenetisch ergibt sich damit eine $inv(9)(p11.1q13)$. Duplikation von 311 in 9p, partielle Deletion von 315 in 9q.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.4.2.3 Molekulare Zytogenetik INV009

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) für die Sonden 311 und 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.35).

Die Sonde 311 zeigte für ihre Hybridisierungsregion im p-Arm ein Signal doppelter Intensität im Vergleich zur Referenz. Die Sonde 315 zeigte für ihre Hybridisierungsregion im q-Arm ein Signal von nur etwa der Hälfte der Intensität der Referenz. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Für die Sonden 311 und 315 liegen somit CNVs vor: Für die Hybridisierungsregion der Sonde 311 im p-Arm ergibt sich eine Duplikation, während für die Hybridisierungsregion der Sonde 315 im q-Arm eine partielle Deletion vorliegt (Abbildung 3.36).

Das invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer kompletten Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-III β α -q) für die Sonden 311 und 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.35).

Die Sonde 311 zeigte für ihre Hybridisierungsregion im p-Arm ein Signal doppelter Intensität im Vergleich zur Referenz. Die Sonde 315 zeigte für ihre Hybridisierungsregion im q-Arm ein Signal von nur etwa der Hälfte der Intensität der Referenz. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Es liegen mehrere Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten vor. Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment liegt proximal der Hybridisierungsregionen der Sonden 312 und 314 mit den Bruchpunkten in 9p11.1 und 9q12. Da die Sat-III-DNA-Sonde keinen Hinweis auf eine nur partielle Inversion ergab und der Übergang zwischen perizentromerischer Sat-III-DNA und angrenzendem Euchromatin keine scharf definierte Grenze darstellt, ist ein Bruchpunkt im q-Arm in 9q13 anzunehmen, da die Sonde 314 genau in dieser Grenzregion lokalisiert (Abbildung 3.36).

Für die Sonden 311 und 315 liegen CNVs vor: Für die Hybridisierungsregion der Sonde 311 im p-Arm ergibt sich eine Duplikation, während für die Hybridisierungsregion der Sonde 315 im q-Arm eine partielle Deletion vorliegt (Abbildung 3.36). Alle beobachteten Veränderungen des invertierten Chromosoms 9 von INV009 ließen sich auch bei dessen Kind (INV007) nachweisen und sind somit als vererbt anzusehen (siehe Absatz 3.4.2.2).

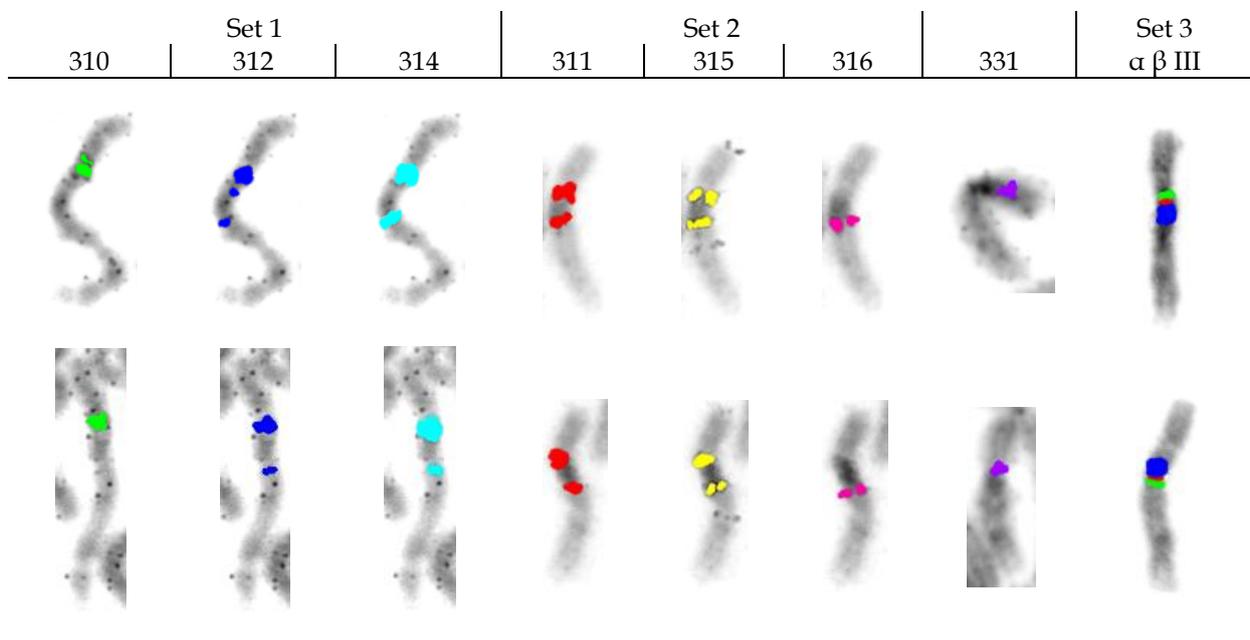


Abb. 3.35x: Hybridisierung INV009.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

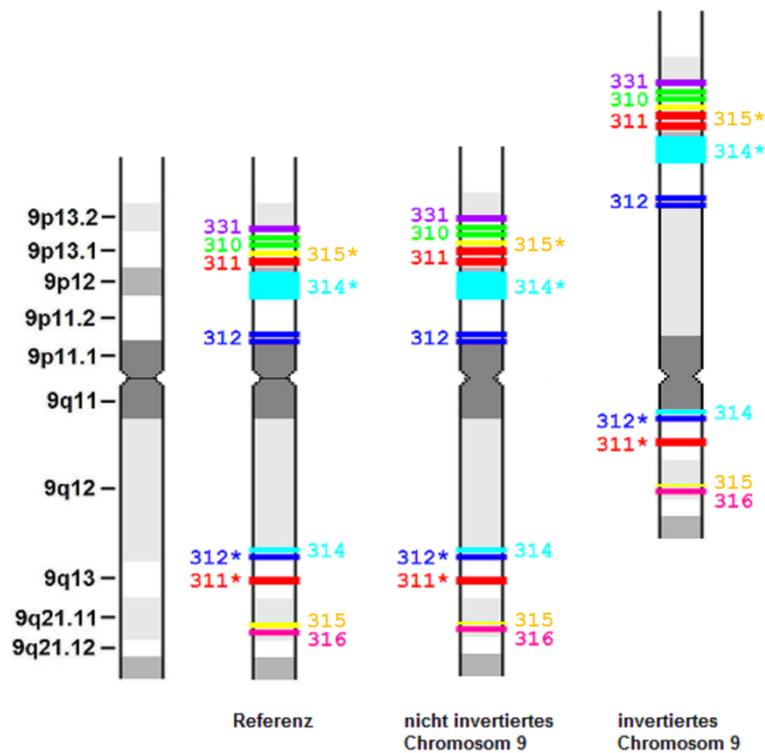


Abb. 3.36: Ideogramme INV009.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Duplikation von 311 in 9p, partielle Deletion von 315 in 9q. Invertiertes Chromosom 9: Bruchpunkt 9p proximal von 312, Bruchpunkt 9q proximal von 314. Zytogenetisch ergibt sich damit eine $inv(9)(p11.1q13)$. Duplikation von 311 in 9p, partielle Deletion von 315 in 9q.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.4.2.4 Molekulare Zytogenetik INV008

Das erste nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) für die Sonde 311 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.37).

Im p-Arm fand sich im Vergleich zur Referenz ein Signal von annähernd doppelter Intensität, was auf eine Duplikation der entsprechenden Hybridisierungsregion im Sinne einer CNV hinweist (Abbildung 3.38). Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Die beobachtete Veränderung ließ sich auch auf dem nicht invertierten Chromosom 9 beim Kind (INV007) nachweisen und ist somit als vererbt anzusehen (siehe Absatz 3.4.2.2).

Das zweite nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) für die Sonde 311 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.37).

Im p-Arm fand sich im Vergleich zur Referenz ein Signal von dreifacher Intensität, was auf eine Triplikation der entsprechenden Hybridisierungsregion im Sinne einer CNV hinweist (Abbildung 3.38). Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

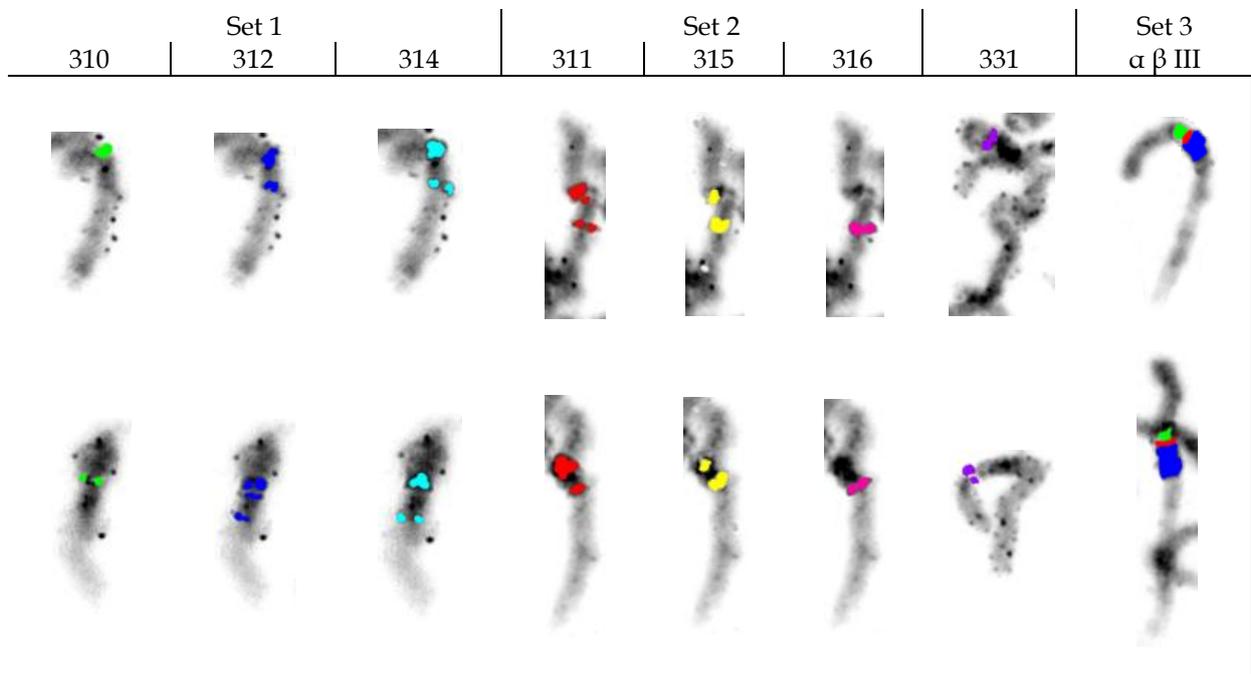


Abb. 3.37: Hybridisierung INV008.

Obere Reihe: Erstes nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Zweites nicht invertiertes Chromosom 9.

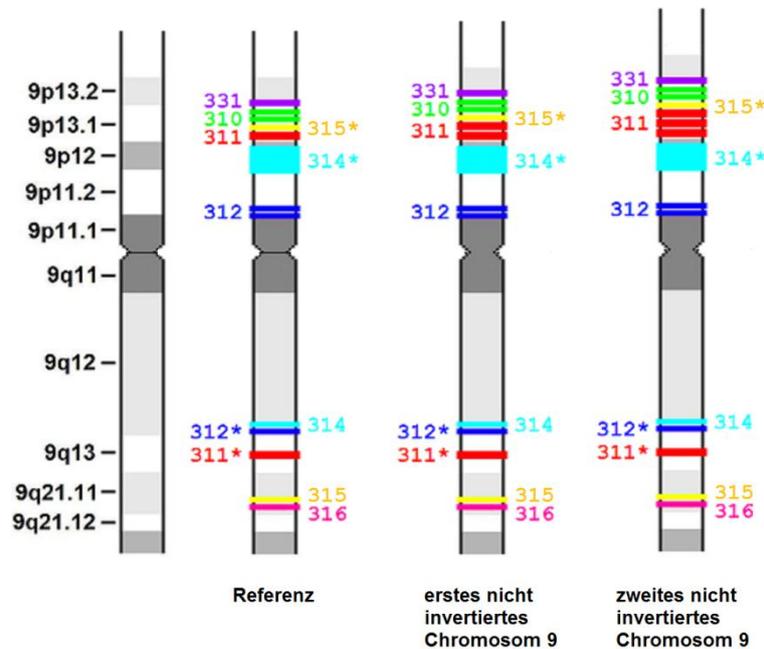


Abb. 3.38: Ideogramme INV008.

Erstes nicht invertiertes Chromosom 9: Duplikation von 311 in 9p.

Zweites nicht invertiertes Chromosom 9: Triplikation von 311 in 9p.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.4.3 Probanden INV012, INV013 und INV014

3.4.3.1 Fallkasuistiken, Vorbefunde und klassische Zytogenetik

Bei INV014 wurde im Alter von 5 Tagen durch einen externen Einsender eine Chromosomenanalyse wegen Kleinwuchs und dem klinischen Verdacht auf eine Trisomie 21 veranlasst. Die Chromosomenanalyse ergab einen numerisch unauffälligen, strukturell auffälligen männlichen Chromosomensatz mit einer perizentrischen Inversion eines der beiden Chromosomen 9 (Abbildung 3.39). Eine molekularzytogenetische Analyse mit einer Sonde für die Down Syndrom kritische Region (DSCR) lieferte eine regelrechte Signalverteilung und ergab damit keinen Hinweis auf eine Trisomie 21.

Dieselbe perizentrische Inversion fand sich beim Vater (INV013), der zum Zeitpunkt der Geburt von INV014 43 Jahre alt war (Abbildung 3.40). Die Mutter (INV012, zum Zeitpunkt der Geburt 30 Jahre alt) hatte einen numerisch und strukturell unauffälligen weiblichen Chromosomensatz (Abbildung 3.41). Beide Elternteile waren im wesentlichen gesund, weitere Angaben liegen nicht vor.

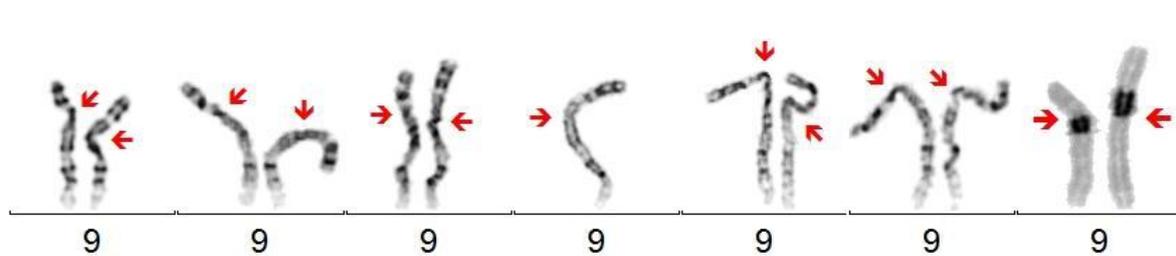


Abb. 3.39: Chromosomen 9 von INV014 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

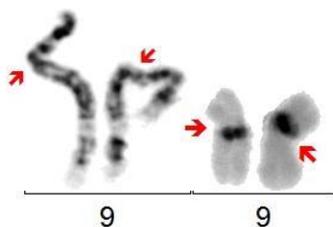


Abb. 3.40: Chromosomen 9 von INV013 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Das invertierte Chromosom 9 ist rechts, die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

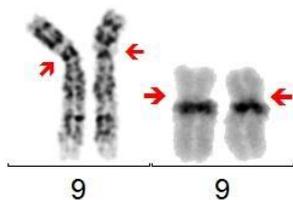


Abb. 3.41: Chromosomen 9 von INV012 in GTG- und DA/DAPI-Färbung.
Die Pfeile zeigen auf das Zentromer.

3.4.3.2 Molekulare Zytogenetik INV014

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- α III-q) das der Referenz entsprechende Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.42).

Das invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer kompletten Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-III β α -q) für die Sonden 312 und 314 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.42), nämlich eine Inversion ihrer Signale im p- bzw. q-Arm. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment zeigt Bruchpunkte im p-Arm distal der Kreuzhybridisierungsregion von 314 und proximal der Hybridisierungsregion von 311 und im q-Arm distal der Kreuzhybridisierungsregion von 312 und proximal der Kreuzhybridisierungsregion von 311. Dies entspricht Bruchpunkten in 9p11.1 und 9q13.3 (Abbildung 3.43). Alle beobachteten Verände-

rungen des invertierten Chromosoms 9 von INV014 ließen sich auch bei dessen Vater (INV013) nachweisen und sind somit als vererbt anzusehen (siehe Absatz 3.4.3.3).

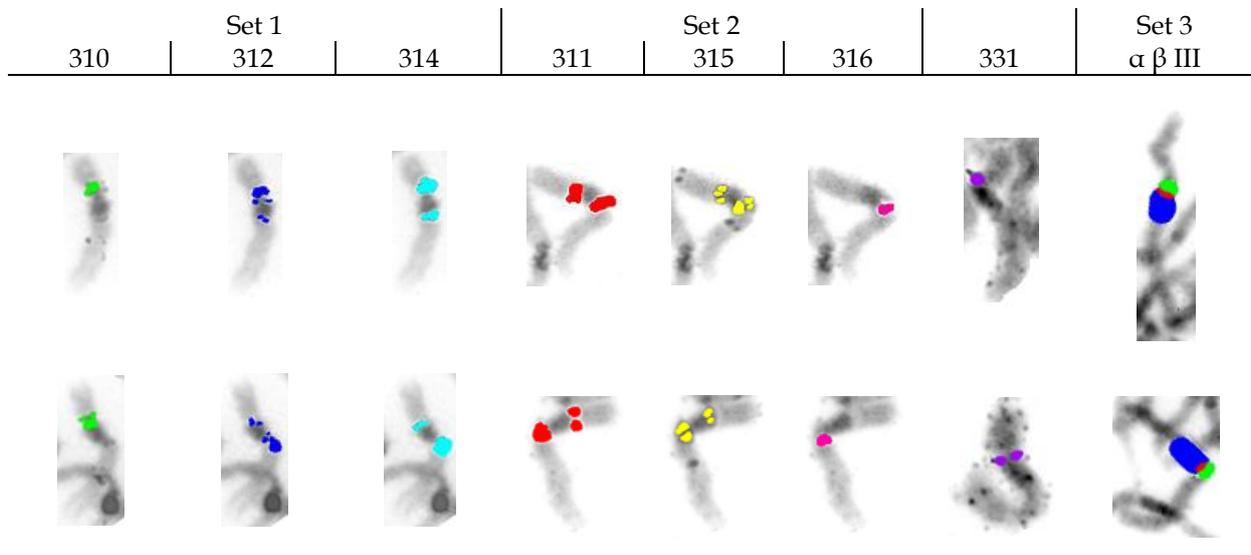


Abb. 3.42: Hybridisierung INV014.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

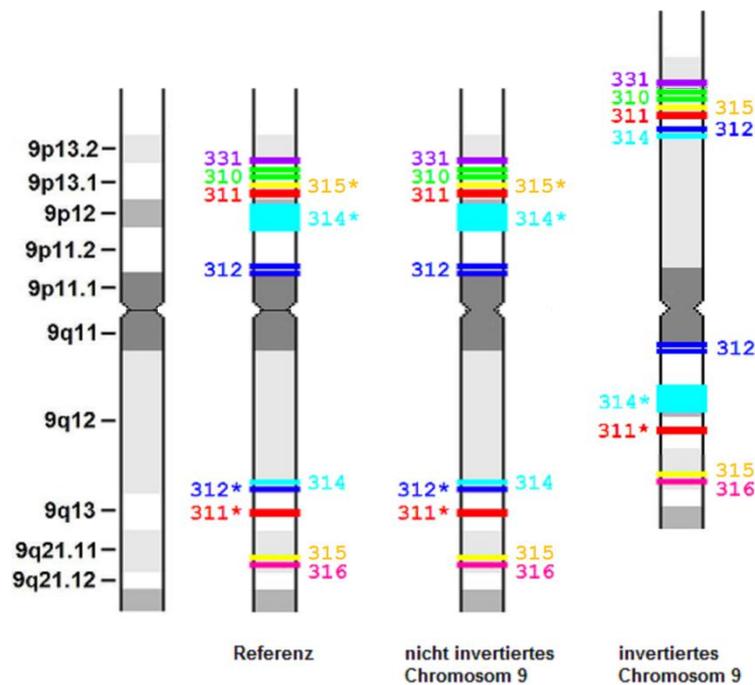


Abb. 3.43: Ideogramme INV014.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Entspricht der Referenz.

Invertiertes Chromosom 9: Bruchpunkt 9p distal von 314* und proximal von 311, Bruchpunkt 9q distal von 312* und proximal von 311*. Zytogenetisch ergibt sich damit eine $inv(9)(p13.1q13)$.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.4.3.3 Molekulare Zytogenetik INV013

Das nicht invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer regelrechten Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- $\alpha\beta$ III-q) für die Sonde 315 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.44).

Für die Kreuzhybridisierungsregion der Sonde 315 im p-Arm liegt eine CNV im Sinne einer zumindest partiellen Duplikation vor (Abbildung 3.45), da sich hier eine im Vergleich zur Referenz etwa um die Hälfte gesteigerte Signalintensität der Region ergab. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Das invertierte Chromosom 9 zeigte neben einer kompletten Inversion der Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p-III $\beta\alpha$ -q) für die Sonden 312 und 314 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.44), nämlich eine Inversion ihrer Signale im p- bzw. q-Arm. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

Das von der Inversion betroffene Chromosomensegment zeigt Bruchpunkte im p-Arm distal der Kreuzhybridisierungsregion von 314 und proximal der Hybridisierungsregion von 311 und im q-Arm distal der Kreuzhybridisierungsregion von 312 und proximal der Kreuzhybridisierungsregion von 311, was Bruchpunkten in 9p11.1 und 9q13.3 entspricht (Abbildung 3.45). Alle beobachteten Veränderungen des invertierten Chromosoms 9 von INV013 liesen sich auch bei dessen Kind (INV014) nachweisen und sind somit als vererbt anzusehen (siehe Absatz 3.4.3.2).

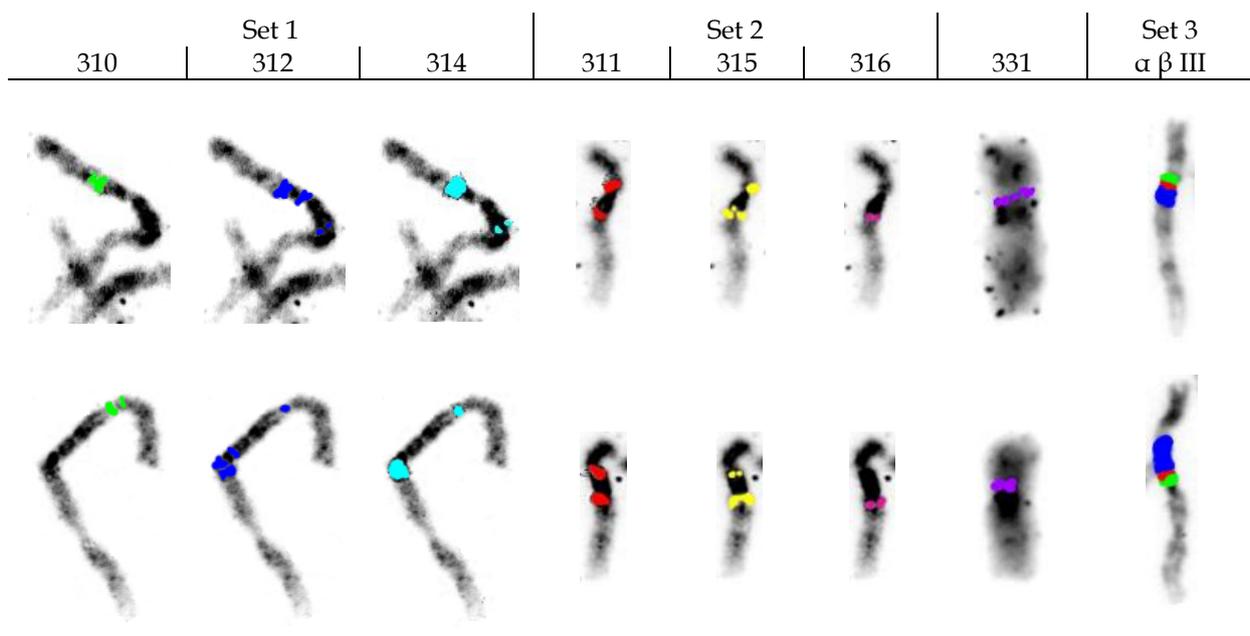


Abb. 3.44: Hybridisierung INV013.

Obere Reihe: Nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Invertiertes Chromosom 9.

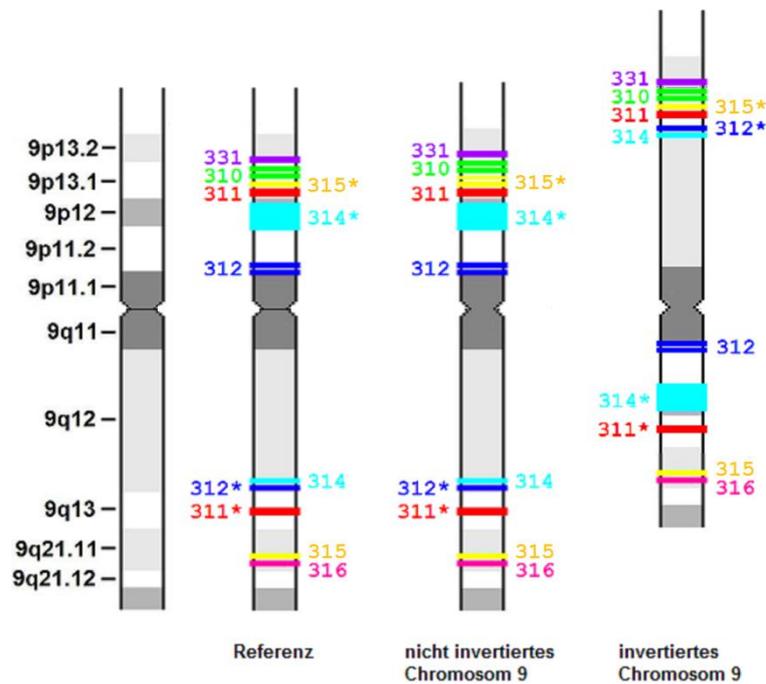


Abb. 3.45: Ideogramme INV013.

Nicht invertiertes Chromosom 9: Partielle Duplikation von 315* in 9p.

Invertiertes Chromosom 9: Bruchpunkt 9p distal von 314* und proximal von 311, Bruchpunkt 9q distal von 312* und proximal von 311*. Zytogenetisch ergibt sich damit eine *inv(9)(p13.1q13)*.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

3.4.3.4 Molekulare Zytogenetik INV012

Das erste nicht invertierte Chromosom 9 zeigte eine regelrechte Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- $\alpha\beta$ III-q) sowie ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster für alle Sonden (Abbildung 3.46). Dasselbe Hybridisierungsmuster ließ sich auch auf dem nicht invertierten Chromosom 9 beim Kind (INV014) von INV012 nachweisen und ist somit als vererbt anzusehen (siehe Absatz 3.4.3.2).

Das zweite nicht invertierte Chromosom 9 zeigte ebenfalls eine regelrechte Abfolge von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin (p- $\alpha\beta$ III-q), jedoch für die Sonde 314 ein von der Referenz abweichendes Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.46).

Für die Hybridisierungsregion der Sonde 314 im q-Arm liegt eine CNV im Sinne einer Duplikation vor (Abbildung 3.47), da sich hier im Vergleich zur Referenz eine etwa doppelte Signalintensität ergab. Für die übrigen Sonden ergab sich ein der Referenz entsprechendes Hybridisierungsmuster.

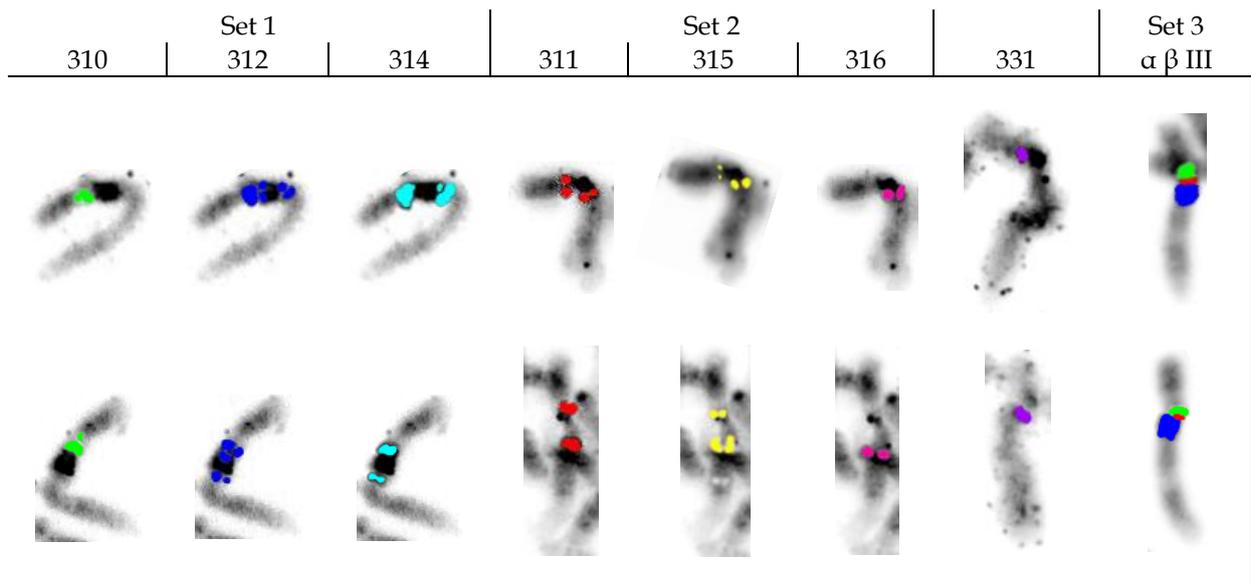


Abb. 3.46: Hybridisierung INV012.

Obere Reihe: Erstes nicht invertiertes Chromosom 9. Untere Reihe: Zweites nicht invertiertes Chromosom 9.

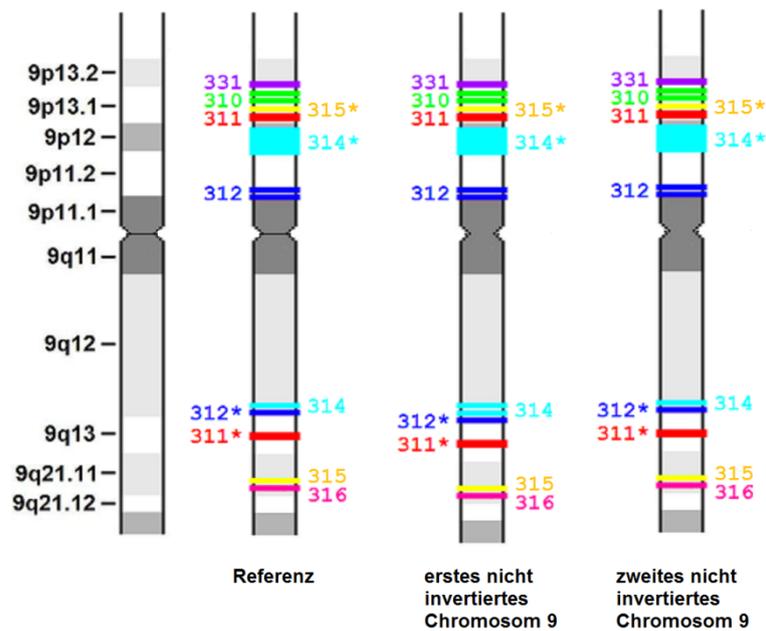


Abb. 3.47: Ideogramme INV012.

Erstes nicht invertiertes Chromosom 9: Duplikation von 314 in 9q.

Zweites nicht invertiertes Chromosom 9: Entspricht der Referenz.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

4. Diskussion

Die perizentrische Inversion des Chromosoms 9 beschäftigt seit vielen Jahrzehnten sowohl Ärzte als auch Biologen, da sie die beim Menschen am häufigsten vorkommende Inversion ist (DANA and STOIAN 2012) und gleichzeitig ihre pathologische Bedeutung nicht eindeutig geklärt ist. Immer wieder wird sie in Verbindung gebracht mit Erkrankungen der unterschiedlichsten Art, ohne dass bisher ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der Inversion und den bei den Inversionsträgern beobachteten Phänotypen zufriedenstellend nachgewiesen oder widerlegt werden konnte. Das Phänotypenspektrum reicht von unerfülltem Kinderwunsch über kongenitale Malformationen bis hin zu Neoplasien (vergleiche hierzu den Absatz 1.6.3).

Zahlreiche Veröffentlichungen beschäftigten sich mit der Bestimmung der Bruchpunkte mit dem Ergebnis, dass diese im kurzen Arm des Chromosoms 9 in 9p12 und im langen Arm im Bereich von 9q12-q21.1 liegen (MATTEI *et al.* 1981; NERI *et al.* 1982; RAMESH and VERMA 1996; SAMONTE *et al.* 1996).

Bisher keine Untersuchungen gab es hinsichtlich von zusätzlichen Aberrationen im Bruchpunktbereich der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9. Von Aberrationen anderer Chromosomen ist bekannt, dass sich in unmittelbarer Nähe der Bruchpunkte weitere Veränderungen finden lassen, vornehmlich Deletionen und/oder Duplikationen (PIOVANI *et al.* 2006; JIANG *et al.* 2008; DESCIPPIO *et al.* 2010; DEVILLARD *et al.* 2010).

In der vorliegenden Arbeit sollen die Bruchpunkte von Inversionsträgern mit unerfülltem Kinderwunsch einerseits und von Kindern mit phänotypischen Besonderheiten und deren Eltern andererseits charakterisiert werden. Darüber hinaus wird die Umgebung der Bruchpunkte – die Übergangsregion zwischen perizentromerischem Heterochromatin und Chromosom 9-spezifischem Euchromatin – auf das Vorliegen zusätzlicher Strukturaberrationen untersucht. Verwendet werden dabei hochaufgelöste Chromosomenpräparationen, die mit Hilfe von GTG-Bänderung und speziell für diese Arbeit entwickelten Sonden-Sets analysiert werden. Auf diese Weise soll eine genauere Bruchpunktbestimmung und ein Nachweis von zusätzlichen strukturellen Aberrationen im Bruchpunktbereich möglich werden.

4.1 Zytogenetische Analyse hochaufgelöster Chromosomen

Für die Erzeugung hochaufgelöster Chromosomen im Mitosestadium der Prophase/Prometaphase wurde nach den von YUNIS *et al.* (1978) und SAWYER (1995) beschriebenen Protokollen vorgegangen. In der Vergangenheit beschäftigten sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Verbesserung der chromosomalen Auflösung durch Gewinnung von Chromosomen in einem möglichst frühen Stadium der Zellteilung (YUNIS *et al.* 1978; YUNIS *et al.* 1979; RONNE 1984; RONNE 1989; SAWYER 1995), was zu Chromo-

somenpräparationen mit einer Auflösung von bis zu 2000 bphs (*bands per haploid set*) führte (YUNIS 1981). Problematisch für die Beurteilung dieser hochaufgelösten Chromosomen in der vorliegenden Arbeit erwiesen sich zwei Punkte. Erstens liegen nur vereinzelte Vergleichsdaten für die zu erwartenden Bandenmuster bei Chromosomen mit mehr als 850 bphs vor (YUNIS *et al.* 1978; YUNIS *et al.* 1979; YUNIS 1981), was eine standardisierte Beurteilung der beobachteten Banden erschwerte. Zweitens kam es durch die Behandlung mit dem Interkalator Echinomycin zu einem veränderten Färbeverhalten des verlängerten, weil hochaufgelösten Heterochromatinblocks in verschiedenen Grauschattierungen. Mit zunehmender Auflösung der Chromosomen zeigten sich eine Reihe feiner Banden, die eine sichere Abgrenzung zum benachbarten Euchromatin erschwerten oder sogar unmöglich machten (Abbildung 4.1). Zusätzlich dazu musste noch der polymorphe Charakter der untersuchten Region berücksichtigt werden. Allein aus dem direkten Vergleich der Banden beider homologer Chromosomen einer Mitosefigur konnte nicht wie bei der routinemäßigen Beurteilung von Chromosomen auf mögliche Veränderungen geschlossen werden.



Abb. 4.1: Chromosom 9 in verschiedenen Stadien der Bandenauflösung.

Links beginnend mit einer Bandenauflösung von ca. 100 bphs („grobstrukturell“) bis zu einer Bandenauflösung > 900 bphs (ISCN 2013). Die beiden Chromosomen 9 ganz rechts stammen aus YUNIS *et al.* (1979) und dienen zum Vergleich.

Hinsichtlich des Heterochromatinblocks und des Übergangs von Hetero- zu Euchromatin ergibt sich durch Erhöhung der Auflösung kein zusätzlicher Informationsgewinn. Im Heterochromatin bei erhöhter Auflösung zusätzlich auftretende Banden in unterschiedlichen Graustufen scheinen nicht reproduzierbar bzw. standardisierbar zu sein und spiegeln vermutlich den polymorphen Charakter der Region wider.

Mit den heute zur Verfügung stehenden Analyseverfahren wie der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und der Array-basierten vergleichenden genomischen Hybridisierung (aCGH, *array-based comparative genomic hybridization*) besteht keine Notwendigkeit mehr, eine derart hohe Auflösung der Chromosomen über 550 bphs hinaus in der Routinediagnostik anzustreben. Letztlich verlangt die Untersuchung in diesem Auflösungsstadium eine extrem hohe analytische Erfahrung des Zytogenetikers und erfordert außerdem einen mit den Gegebenheiten eines Routinelabors nicht vereinbaren Zeitaufwand.

In mehreren Arbeiten (YUNIS *et al.* 1978; YUNIS *et al.* 1979; YUNIS 1981) wurde der Versuch unternommen, Ideogramme für die hochaufgelösten Chromosomen zu erstellen. In Hinblick auf das für diese Arbeit relevante Chromosom 9 – und hier speziell die perizentromerische Region – finden sich im

Heterochromatinblock Banden verschiedener Intensität. In Anbetracht des hochvarianten Charakters der Region erscheint es fraglich, ob es sich dabei tatsächlich um reproduzierbare Banden wie auf dem Rest des Chromosoms handelt, oder ob dies viel wahrscheinlicher zytogenetische Manifestationen von Strukturvarianten innerhalb des Heterochromatins sind, die bedingt durch die hohe Auflösung und der damit verbundenen Veränderung des Färbeverhaltens zu Tage treten. Schlussendlich kann durch eine Erhöhung der chromosomalen Auflösung mit keinem weiteren Informationsgewinn bezüglich des Inversionssegments einer perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 gerechnet werden.

Auch die Analyse von Chromosomen aus Mangelmedium-Kulturen, bei denen durch Methotrexat die Dihydrofolatreduktase gehemmt und somit der Zellzyklus unterbrochen wurde (BARBI *et al.* 1984), ergab keinen Hinweis auf erhöhte Brüchigkeiten entweder im perizentromerischen Heterochromatin noch im angrenzenden euchromatischen Bereich. Die wenigen beobachteten Bruchereignisse auf anderen Chromosomen finden sich bereits in der Literatur beschrieben (SUTHERLAND and LEONARD 1979; SUTHERLAND *et al.* 1983; TEDESCHI *et al.* 1987; SUTHERLAND 2003). In Anbetracht dieser Tatsache ist der hohe zeitliche Aufwand für die für diese Analyse notwendige Anzahl an Mitosefiguren bei gleichzeitig sehr geringem Mitoseindex nicht gerechtfertigt.

4.2 Analyse von Zentromer und perizentromerischem Heterochromatin

Um die Zusammensetzung der heterochromatischen Region einschließlich des Zentromers der beiden Chromosomen 9 eines Probanden molekularzytogenetisch zu untersuchen, wurde auf die bereits mehrfach beschriebene Analyse von α - und β -Satelliten- sowie Satellit-III-DNA zurückgegriffen (GOSDEN *et al.* 1981; RAMESH and VERMA 1996; SAMONTE *et al.* 1996; STARKE *et al.* 2002; KOSYAKOVA *et al.* 2013). Zum Nachweis des Zentromers wurde eine aus hochrepetitiven DNA-Sequenzen bestehende und für das Chromosom 9 spezifische Alphoid-DNA verwendet, die Prof. Dr. Mariano Rocchi (Department für Biologie der Universität Bari, Italien) freundlicherweise zur Verfügung stellte (ROCCHI *et al.* 1991). Für den Nachweis des β -Satelliten bzw. der Satellit-III-DNA wurden FISH-Sonden generiert unter Verwendung spezieller PCR-Primer (vergleiche hierzu für Details den Absatz 2.6.3), wie sie von CARDONE *et al.* (2004) bzw. HASEGAWA *et al.* (1995) beschrieben wurden.

Vor über 30 Jahren beschrieben GOSDEN *et al.* (1981) den molekularzytogenetischen Nachweis von Satelliten-DNA III als Korrelat zum zytogenetisch sichtbaren Heterochromatinblock des Chromosoms 9. Sie konnten zeigen, dass er im Falle einer perizentrischen Inversion teilweise oder komplett vom langen in den kurzen Arm des Chromosoms verlagert wurde. LUKE *et al.* (1992) kamen bei ihren Untersuchungen zu vergleichbaren Ergebnissen und verfeinerten die Analyse durch Hinzufügen einer spezifischen Sonde für den α -Satelliten. Schließlich veröffentlichten sowohl RAMESH and VERMA (1996)

als auch SAMONTE *et al.* (1996) zeitgleich Arbeiten, in denen sie die perizentromerische heterochromatinreiche Region des Chromosoms 9 mit Hilfe von Sonden für α - und β -Satelliten- sowie Satellit-III-DNA charakterisierten. Aus den beobachteten Veränderungen entwickelten sie verschiedene Modelle für Typen von perizentrischen Inversionen. Diese sind in der Abbildung 1.21 unter Absatz 1.6.4 zusammenfassend dargestellt. In einer von STARKE *et al.* (2002) veröffentlichten Arbeit haben die Autoren die bei 56 Probanden gefundenen Varianten des Chromosoms 9 molekularzytogenetisch untersucht, in Anbetracht der zuvor erwähnten Arbeiten aber einen diagnostischen Rückschritt gemacht. Es wurde auf die zusätzliche Analyse des β -Satelliten verzichtet und der Heterochromatinblock nur hinsichtlich der Lage von α -Satelliten- und Satellit-III-DNA untersucht. Die daraus in Verbindung mit einer midi36- und einer midi18-Sonde (siehe weiter unten) abgeleiteten Varianten haben daher nur eingeschränkte Aussagekraft, da sie die heterochromatische Region nur unzureichend charakterisieren.

Eine mit der Arbeit von STARKE *et al.* (2002) vergleichbare Charakterisierung von Varianten des perizentromerischen Heterochromatins versuchten KOSYAKOVA *et al.* (2013) bei der molekularzytogenetischen Analyse an 334 Probanden. Es wurde neben einer kommerziellen α -Satellit-Sonde der Firma Abbott (Vysis) eine Hybridisierung mit Sonden durchgeführt, welche durch Mikrodisektion gewonnen wurden. Bei der Mikrodisektion werden Teile von Chromosomen unter dem Mikroskop entweder mit einer sehr feinen Nadel von einem Objektträger dissektiert oder es werden Teile von Chromosomen mit Hilfe eines Lasers von einer speziellen Folie ablatiert, um aus diesen Chromosomenteilstücken DNA-Sonden zu generieren. Die von den Autoren gewonnenen Sonden waren ‚spezifisch‘ für die Regionen 9p12/9q13~21.1 (midi36-Sonde) und 9q12 (midi18-Sonde). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Sonden-Set 3, bestehend aus Sonden für α -Satellit-, β -Satellit- sowie Satellit-III-DNA, ist hinsichtlich der Feinanalyse den durch Mikrodisektion generierten Sonden von KOSYAKOVA *et al.* (2013) überlegen, da es sich erstens auf den heterochromatischen Bereich beschränkt, zweitens dessen Einzelkomponenten (Satelliten-DNAs) untersucht und drittens nicht den Bereich der segmentellen Duplikationen mit einbezieht (keine Erfassung von Längenvarianten erzeugenden Deletionen, Duplikationen und Triplikationen). Die von KOSYAKOVA *et al.* (2013) durchgeführte Untersuchung entspricht in ihrer Aussagekraft den durch C-Banden- oder DA/DAPI-Färbung zu gewinnenden Informationen, da bedingt durch die Mikrodisektion keine definierten Sequenzen für die eingesetzten Sonden vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit konnte nur die als ‚klassisch‘ bezeichnete perizentrische Inversion des Chromosoms 9 nachgewiesen werden, bei der es zur kompletten Drehung des zytogenetisch sichtbaren Heterochromatinblocks in den kurzen Arm des Chromosoms 9 kommt (p-III β α -q). Andere Veränderungen wie in den oben aufgeführten Arbeiten, bei denen sich die verschiedenen Satelliten-DNAs alternierend unterbrechen, wurden nicht nachgewiesen. Aufgrund des hochvariablen Charakters der untersuchten Region liegt auch dies im zu erwartenden Spektrum. Es ist auch nicht bekannt, inwieweit bei den publizierten Fällen eine Vorauswahl getroffen wurde, um ein möglichst breites Spektrum an derartigen Varianten aufzuzeigen.

4.3 Analyse des angrenzenden Euchromatins und Bruchpunktbestimmung

4.3.1 Eingesetzte BAC-Klone

Für die Analyse des an das perizentromerische Heterochromatin angrenzenden Euchromatins wurden FISH-Sonden aus insgesamt 7 BAC-Klonen generiert (vergleiche Absätze 2.6.1, 2.6.2 und 2.6.4). Diese BAC-Klone wurden nach spezifischen Kriterien ausgewählt unter Berücksichtigung, dass das Chromosom 9 über segmentelle Duplikationen mit Strukturhomologien unmittelbar im Anschluss an das perizentromerische Heterochromatin sowohl im kurzen als auch im langen Arm verfügt (PARK *et al.* 1998; HORVATH *et al.* 2000a; STARKE *et al.* 2002; HORVATH *et al.* 2003; HUMPHRAY *et al.* 2004).

Für den kurzen Arm ist der Klon RP11-1021H7 (311) der erste Klon im Bereich der segmentellen Duplikationen in der Bande 9p13.1, der Klon RP11-211P14 (312) der letzte Klon in der Bande 9p12.1 direkt an der Grenze zum perizentromerischen Heterochromatin. Für den langen Arm des Chromosoms 9 ist der Klon RP11-101E5 (314) der erste Klon im Bereich der segmentellen Duplikationen in der Bande 9q12 unmittelbar im Anschluss an den zytogenetisch sichtbaren Heterochromatinblock, der Klon RP11-151I14 (315) der letzte Klon in der Bande 9q21.11 direkt an der Grenze zum Chromosom 9 spezifischen Euchromatin. Da alle diese Klone innerhalb des Bereichs der segmentellen Duplikationen liegen, zeigen die aus ihnen generierten DNA-Sonden Kreuzhybridisierungssignale auf dem jeweils anderen Chromosomenarm des Chromosoms 9. Es wurden deshalb Klone ausgewählt, von denen die Lokalisation und die Größe des Kreuzhybridisierungssignals in der UCSC- oder NCBI-Datenbank verzeichnet ist (<http://genome-euro.ucsc.edu> oder www.ncbi.nlm.nih.gov). Außer für das Kreuzhybridisierungssignal des Klons RP11-151I14 (315) trifft dies für alle in dieser Region verwendeten Klone zu. Zur eindeutigen Markierung des kurzen bzw. langen Arms des Chromosoms 9 wurden die Klone RP11-99D24 (310) für 9p und RP11-876N18 (316) für 9q als „Ankerklone“ verwendet, die außerhalb des Bereichs der segmentellen Duplikationen liegen. Diese Angaben wurden aus BALLIF *et al.* (2007) übernommen, wobei sich schon bei Testhybridisierungen auf hochaufgelösten Chromosomen eines Kontrollprobanden herausstellte, dass der Klon RP11-99D24 (310) – zumindest im Auflösungsstadium der Chromosomen dieser Arbeit – ein deutliches Doppelsignal lieferte (Abbildung 3.2). Es zeigte sich, dass der Klon bei keinem der untersuchten Probanden der vorliegenden Arbeit an strukturellen Aberrationen beteiligt war. Ebenso an keinen strukturellen Aberrationen war der Klon RP11-876N18 (316) beteiligt. Daraus lässt sich ableiten, dass das an der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 beteiligte Chromosomensegment im Bereich zwischen 9p13.1 (Position > 38.700.000) und 9q21.11 (Position < 71.600.000) liegen muss, also höchstwahrscheinlich im Bereich der segmentellen Duplikationen.

4.3.2 Bestimmung der Bruchpunkte

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Bruchpunkte für die perizentrische Inversion des Chromosoms 9 nicht einheitlich sind. Insgesamt fanden sich drei verschiedene molekularzytogenetische Varianten der perizentrischen Inversion, bedingt durch unterschiedliche Lage der Bruchpunkte, aus denen sich zwei zytogenetische Varianten ergaben. Allen untersuchten perizentrischen Inversionen gemeinsam war, dass die Bruchpunkte im Bereich der segmentellen Duplikationen lagen und dass die Bruchpunkte bei Kindern und dem Elternteil, von dem die perizentrische Inversion geerbt wurde, identisch waren. Die Tabelle 4.1 fasst die beobachteten Bruchpunkte dieser Arbeit zusammen und stellt ihnen ihr zytogenetisches Korrelat gegenüber.

Proband	Bruchpunkt im p-Arm	Bruchpunkt im q-Arm	zytogenetisches Korrelat
INV001 (Möglichkeit 1)	in 311	dist 312* und prox 311*	inv(9)(p13.1q13)
INV006 (Möglichkeit 1)			
INV001 (Möglichkeit 2)	dist 314* und prox 311	dist 312* und prox 311*	
INV006 (Möglichkeit 2)			
INV013			
INV014			
INV002	prox 312	prox 314	inv(9)(p11.1q13)
INV004			
INV005			
INV007			
INV009			
INV010			
INV015			

Tab. 4.1: Bruchpunkte der vorliegenden Arbeit.

Erklärung: in – innerhalb des Klons; prox – proximal des Klons; dist – distal des Klons. Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Resultaten, die KOSYAKOVA *et al.* (2013) in ihrer großangelegten Studie gefunden haben, lassen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede bei der Bruchpunktbestimmung erkennen. Innerhalb des hier verwendeten Klons RP11-1021H7 (311) liegt der von KOSYAKOVA *et al.* (2013) verwendete Klon RP11-402N8. Beide Klone markieren einen Bruchpunkt im kurzen Arm des Chromosoms 9. Dasselbe kann man vom Klon RP11-211E19 bei KOSYAKOVA *et al.* (2013) annehmen, der zwischen den in dieser Arbeit verwendeten Klonen RP11-1021H7* (311*) und RP11-151I14 (315) liegt, und für den genau wie für die Region zwischen RP11-1021H7* (311*) und RP11-151I14 (315) ein Bruchpunkt gefunden wurde. Insgesamt gestaltet sich der Vergleich jedoch schwierig aufgrund der verschiedenen eingesetzten Klone. Dennoch ist eine Tendenz dahingehend erkennbar, dass es keine ‚bevorzugten‘ Stellen im Sinne von ‚Sollbruchstellen‘ bei der Entstehung einer perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 zu geben scheint.

Außer in der hier vorliegenden Arbeit wurde in keiner der nach gleichem Schema erarbeiteten Publikationen (STARKE *et al.* 2002; WILLATT *et al.* 2007; BARBER *et al.* 2013; KOSYAKOVA *et al.* 2013) auf die

Lage und Größe der Kreuzhybridisierungssignale der verwendeten Klone auf dem jeweils anderen Arm des Chromosoms 9 eingegangen. Es wurde lediglich deren Vorhandensein oder Fehlen registriert und aufgrund der Signalintensität auf dessen Menge im Sinne von Zugewinnen oder Verlusten geschlossen. Im Fall von KOSYAKOVA *et al.* (2013) findet sich in keiner der Datenbanken eine Angabe zu chromosomaler Lokalisation oder Größe des zu erwartenden Kreuzhybridisierungssignals bei den von ihnen verwendeten Klonen. Dabei scheint aber genau hier ein Schlüssel zum Verständnis des Entstehungsmechanismus der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu liegen. In der Abbildung 4.2 werden schematisch die Regionen mit mehr als 98 Prozent Sequenzhomologie (*similarity*) der einzelnen Klonlokalisationen dieser Arbeit dargestellt.

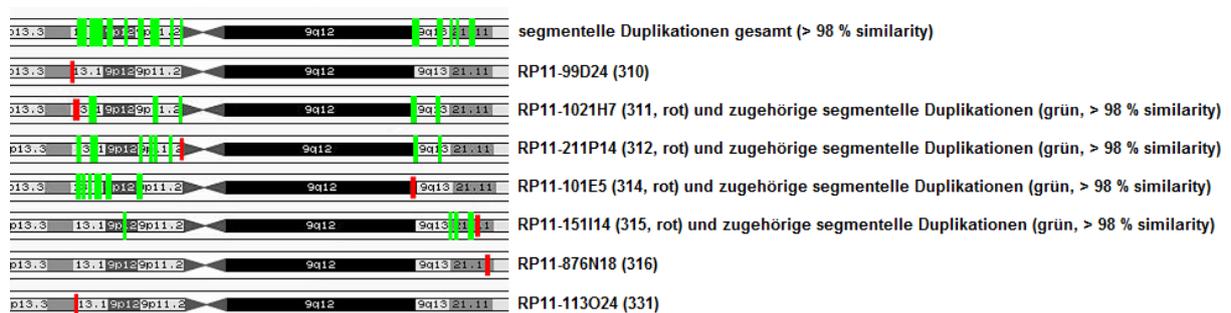


Abb. 4.2: Sequenzhomologien (segmentelle Duplikationen) von mehr als 98 Prozent Ähnlichkeit (*similarity*) innerhalb der in dieser Arbeit verwendeten Klone im kurzen und langen Arm des Chromosoms 9.

Rot: Lokalisation des BAC-Klons.

Grün: Sequenzhomologien größer 98 Prozent des jeweiligen Klons auf dem kurzen bzw. langen Arm des Chromosoms 9.

Daten stammen aus der UCSC-Datenbank: <http://genome-euro.ucsc.edu>.

In der vorliegenden Arbeit wurden hinsichtlich der Bruchpunkte zwei Phänomene beobachtet (Abbildung 4.3):

- a) Die Bruchpunkte lagen unmittelbar an den Grenzen der Satelliten-DNA reichen perizentromerischen Region (INV002, INV004, INV005, INV007, INV009, INV010, INV015).
- b) Der Bruchpunkt im kurzen Arm lag entweder im Klon 311 bzw. proximal von Klon 311 und distal der Kreuzhybridisierungsregion von Klon 314 (314*), während der Bruchpunkt im langen Arm proximal der Kreuzhybridisierungsregion von Klon 311 (311*) und distal der Kreuzhybridisierungsregion von Klon 312 (312*) lag (INV001, INV006, INV013, INV014).

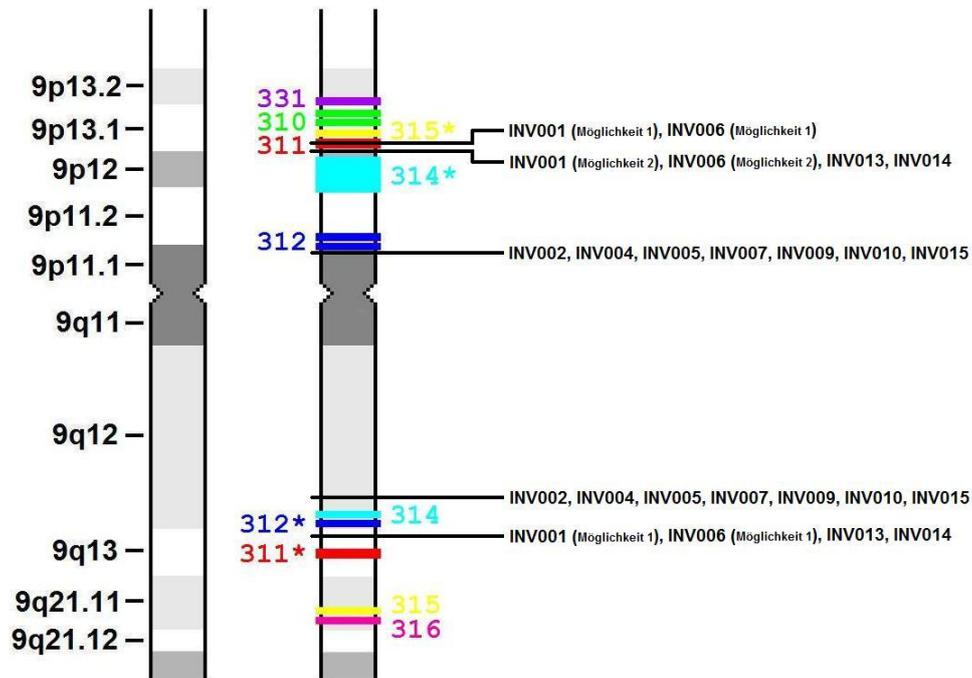


Abb. 4.3: Zusammenfassende Darstellung der Bruchpunkte der vorliegenden Arbeit.

Ob sich ein Zusammenhang zwischen der hohen Strukturähnlichkeit auf dem kurzen bzw. langen Arm des Chromosoms 9 (Abbildung 4.2) und der Lage der Bruchpunkte (Abbildung 4.3) ableiten lässt bleibt spekulativ wegen fehlender Vergleichsangaben zu den Kreuzhybridisierungsregionen in den Publikationen von KOSYAKOVA *et al.* (2013) und STARKE *et al.* (2002). Es lässt sich auch kein Zusammenhang zwischen der Lage der Bruchpunkte und der Entfernung zum Heterochromatin ableiten, wie er von COLLODEL *et al.* (2006) vermutet wurde. Dennoch bleiben die in den Absätzen 1.6.2.3 und 1.6.2.4 beschriebenen Effekte von *heterochromatization* bzw. *euchromatization* denkbar.

4.3.3 Zusätzliche Strukturaberrationen

Neben der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 erbrachte die molekularzytogenetische Analyse mittels DNA-Sonden aus BAC-Klonen noch eine Reihe von zusätzlichen Strukturaberrationen. Die Tabelle 4.2 fasst die Ergebnisse zusammen. Derartige Veränderungen wurden auch von anderen Autoren mit anderen Klonen beschrieben (WILLATT *et al.* 2007; BARBER *et al.* 2013; KOSYAKOVA *et al.* 2013), eine weitergehende Betrachtung über ihre mutmaßliche Eigenschaft als Varianten hinaus erfolgte meines Wissens nach jedoch nicht.

Proband	Chromosom 9	Aberration	Vererbungsmodus
INV001	nicht invertiert	partielle Deletion von 315* Triplikation von 315	---
	invertiert (Möglichkeit 1)	Duplikation von 315	---
	invertiert (Möglichkeit 2)	Duplikation von 315 partielle Deletion von 311 partielle Duplikation von 311*	---
INV005	nicht invertiert	Duplikation von 311 partielle Duplikation von 315*	---
INV006	invertiert (Möglichkeit 1)	partielle Duplikation von 312	---
	invertiert (Möglichkeit 2)	partielle Duplikation von 312 partielle Deletion von 311 partielle Duplikation von 311*	---
INV010	invertiert	Duplikation von 311 Duplikation von 311* Duplikation von 312*	---
INV015	invertiert	Duplikation von 311 partielle Duplikation von 315*	---
INV002	nicht invertiert	Duplikation von 315 in 9q	<i>de novo</i>
	invertiert	Triplikation von 311 Triplikation von 315*	paternal
INV004	nicht invertiert	Duplikation von 311	---
	invertiert	Triplikation von 311 Triplikation von 315*	---
INV003	nicht invertiert (zweites)	partielle Duplikation von 312	---
INV007	nicht invertiert	Duplikation von 311	maternal
	invertiert	Duplikation von 311 partielle Deletion von 315	paternal
INV009	nicht invertiert	Duplikation von 311 partielle Deletion von 315	---
	invertiert	Duplikation von 311 partielle Deletion von 315	---
INV008	nicht invertiert (erstes)	Duplikation von 311	---
	nicht invertiert (zweites)	Triplikation von 311	---
INV013	nicht invertiert	partielle Duplikation von 315*	---
INV012	nicht invertiert (erstes)	Duplikation von 314	---

Tab. 4.2: Zusätzliche Strukturaberrationen innerhalb der mit DNA-Sonden untersuchten Chromosomenabschnitte.

Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Lokalisationen stehen für Kreuzhybridisierungssignale.

Für die in dieser Arbeit eingesetzten Klone konnten bezogen auf die Referenz sowohl Zugewinne im Sinne partieller Duplikationen (312, 311*, 315*), Duplikationen (311, 314, 315, 311*, 312*) und Triplikationen (311, 315, 315*) als auch Verluste im Sinne partieller Deletionen (311, 315, 315*) nachgewiesen werden. Mit Abstand am häufigsten fanden sich derartige Veränderung in der von Klon 311 abgedeckten chromosomalen Region in 9p13.1, nämlich 9 mal Duplikationen, 3 mal Triplikationen und 2 mal partielle Deletionen. Hierbei könnte es sich um einen *hot spot* für die Entstehung von Varianten handeln. Inwieweit die beobachteten Zugewinne oder Verluste Einfluss auf den Phänotyp des betroffenen Individuums haben, lässt sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht klären.

Keine Veränderungen bezogen auf die Referenz wurden für die Klone 310, 311, 316, 331 und 314* beobachtet. Dies bedeutet nicht, dass nicht auch hier Veränderungen vorliegen können, allerdings wurden sie in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden.

Wie schon erwähnt erfolgt in keiner der mir bekannten Quellen eine Beurteilung der zusätzlich vorliegenden Strukturaberrationen, weshalb eine Einordnung des Ergebnisses von Proband INV002 schwierig ist. Bei INV002 lag eine Duplikation des Klons 315 auf dem langen Arm des nicht invertierten Chromosoms 9 vor. Da das invertierte Chromosom 9 vom Vater (INV004) stammte, musste das nicht invertierte Chromosom 9 von der Mutter (INV003) stammen. Da bei der Mutter auf keinem der analysierten Chromosomen eine derartige Duplikation nachweisbar war, musste die bei INV002 beobachtete Veränderung als neu entstanden (*de novo*) angesehen werden. Dieses Beispiel verdeutlicht, wie wichtig die Untersuchung nicht nur des Indexpatienten, sondern auch naher Verwandter (Eltern, Geschwister, Kinder) beim Vorliegen sowohl der perizentrischen Inversion als auch zusätzlicher Strukturaberrationen ist, nicht nur wenn es um die Beurteilung von Veränderungen in hochvariablen Regionen wie dem Bereich der segmentellen Duplikationen des Chromosoms 9 geht (EINFELD and SMITH 1982; PIOVANI *et al.* 2006; DESCIPPO *et al.* 2010; DEVILLARD *et al.* 2010).

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die perizentrische Inversion des Chromosoms 9 wird auch in Zukunft eine Herausforderung für die genetische Diagnostik und Beratung bleiben. Das liegt einerseits an den verschiedenen Stellen, an denen die Bruchpunkte auftreten können, und andererseits an den zusätzlichen Strukturaberrationen. Beides wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Erhöhung der chromosomalen Auflösung und der Hybridisierung mit eigens entwickelten Sonden-Sets sowohl für invertierte als auch für nicht invertierte Chromosomen 9 innerhalb des Bereichs der segmentellen Duplikationen gezeigt. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es ratsam, sich von der Vorstellung zu lösen, dass es sich bei der perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 in jedem Fall um eine Variante ohne klinische Bedeutung handelt. Gute, aber veraltete Methoden wie die C-Banden- und DA/DAPI-Färbung charakterisieren die Inversion nur sehr ungenügend, und auch die reine Untersuchung der heterochromatischen Region mit Sonden für Satelliten-DNAs ist nicht ausreichend, sodass es notwendig erscheint, bei Inversionsträgern eine detailliertere molekularzytogenetische Analyse durchzuführen. Es wird sich erst zukünftig zeigen, ob dadurch wenigstens ein Teil der phänotypischen Besonderheiten von Patienten zufriedenstellend erklärt werden kann. Zusätzlich dazu ist auch immer eine Analyse naher Verwandter wie zum Beispiel der Eltern von Kindern mit phänotypischen Besonderheiten indiziert. Nur auf diese Weise können zuverlässige Aussagen hinsichtlich des Vererbungsmodus vor allem zusätzlicher Strukturaberrationen auf invertierten und auch auf nicht invertierten Chromosomen 9 gemacht werden.

Neben der molekularzytogenetischen Analyse sollten auch verstärkt Methoden wie die Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (aCGH, *array-based comparative genomic hybridization*) und das *molecular karyomapping* zur Analyse von Inversionsträgern herangezogen werden, um unbalancierte Zustände zu identifizieren. Nicht zuletzt wird es früher oder später auch detaillierte molekulargenetische Untersuchungen hinsichtlich des Zusammenhangs einer perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 und der asymmetrischen Transkription von piRNAs speziell bei Patienten mit Infertilität geben müssen.

Generell wäre die Untersuchung eines großen Kollektivs von Individuen sowohl mit als auch ohne perizentrischer Inversion des Chromosoms 9 mit dem für diese Arbeit verwendeten Sonden-Sets sinnvoll, um eine statistisch belastbare Verteilung hinsichtlich der Bruchpunkte und zusätzlicher Strukturaberrationen zu erfassen.

Zusätzlich ist eine vergleichende Untersuchung der konstitutionellen und erworbenen perizentrischen Inversion des Chromosoms 9 bei dem in der vorliegenden Arbeit komplett ausgesparten Kollektivs der hämatoonkologischen Patienten denkbar.

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit wird die hochkomplexe und variante Architektur der perizentromerischen Region des Chromosoms 9 deutlich. Es ist also anzunehmen, dass ähnliche Beobachtungen auch bei den Chromosomen 1, 3 und 16 zu erwarten sind, die ebenfalls relativ häufig

perizentrische Inversionen zeigen. Eine zu dieser Arbeit vergleichbare Analyse dieser Chromosomen wäre durchaus lohnenswert.

6. Literaturverzeichnis

- 1978 An international system for human cytogenetic nomenclature (1978) ISCN (1978). Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Cytogenet Cell Genet* 21: 309-409.
- 2001 ISCN rules for listing chromosomal rearrangements. *Curr Protoc Hum Genet Appendix 4: Appendix 4C*.
- Abyzov, A., J. Mariani, D. Palejev, Y. Zhang, M. S. Haney *et al.*, 2012 Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature* 492: 438-442.
- Agresti, A., R. Meneveri, A. G. Siccardi, A. Marozzi, G. Corneo *et al.*, 1989 Linkage in human heterochromatin between highly divergent Sau3A repeats and a new family of repeated DNA sequences (HaeIII family). *J Mol Biol* 205: 625-631.
- Agresti, A., G. Rainaldi, A. Lobbiani, I. Magnani, R. Di Lernia *et al.*, 1987 Chromosomal location by in situ hybridization of the human Sau3A family of DNA repeats. *Hum Genet* 75: 326-332.
- Aitman, T. J., R. Dong, T. J. Vyse, P. J. Norsworthy, M. D. Johnson *et al.*, 2006 Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 439: 851-855.
- Alexandre, C., D. A. Miller, A. R. Mitchell, D. A. Warburton, S. L. Gersen *et al.*, 1987 p82H identifies sequences at every human centromere. *Hum Genet* 77: 46-50.
- Alexandrov, I., A. Kazakov, I. Tumeneva, V. Shepelev and Y. Yurov, 2001 Alpha-satellite DNA of primates: old and new families. *Chromosoma* 110: 253-266.
- Allderdice, P. W., N. Browne and D. P. Murphy, 1975 Chromosome 3 duplication q21 leads to qter deletion p25 leads to pter syndrome in children of carriers of a pericentric inversion inv(3) (p25q21). *Am J Hum Genet* 27: 699-718.
- Amiel, A., F. Sardos-Albertini, M. D. Fejgin, R. Sharony, R. Diukman *et al.*, 2001 Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet* 46: 245-250.
- Amor, D. J., and K. H. Choo, 2002 Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet* 71: 695-714.
- Arrighi, F. E., and T. C. Hsu, 1971 Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86.
- Assum, G., T. Fink, T. Steinbeisser and K. J. Fisel, 1993 Analysis of human extrachromosomal DNA elements originating from different beta-satellite subfamilies. *Hum Genet* 91: 489-495.
- Attie-Bitach, T., M. Abitbol, M. Gerard, A. L. Delezoide, J. Auge *et al.*, 1998 Expression of the RET proto-oncogene in human embryos. *Am J Med Genet* 80: 481-486.
- Axelsson, R., and J. Wahlstrom, 1984 Chromosome aberrations in patients with paranoid psychosis. *Hereditas* 100: 29-31.
- Babu, K. A., R. S. Verma, J. Rodriguez, W. Rosenfeld and R. C. Jhaveri, 1985 A possible clinical implication of homozygous inversions of 9qh regions with Cornelia de Lange syndrome (CLS). *Hum Hered* 35: 265-267.
- Bailey, J. A., A. M. Yavor, H. F. Massa, B. J. Trask and E. E. Eichler, 2001 Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res* 11: 1005-1017.
- Ballif, B. C., S. A. Hornor, S. G. Sulpizio, R. M. Lloyd, S. L. Minier *et al.*, 2007 Development of a high-density pericentromeric region BAC clone set for the detection and characterization of small supernumerary marker chromosomes by array CGH. *Genet Med* 9: 150-162.
- Baltaci, V., R. Ors, M. Kaya and S. Balci, 1999 A case associated with Walker Warburg syndrome phenotype and homozygous pericentric inversion 9: coincidental finding or aetiological factor? *Acta Paediatr* 88: 579-583.
- Barber, J. C. K., 2000 An investigation of euchromatic cytogenetic imbalances without phenotypic effect, pp. 2 v. Original typescript.
- Barber, J. C., R. Rodrigues, V. K. Maloney, F. Taborda, M. D. Rodrigues *et al.*, 2013 Another Family with a Euchromatic Duplication Variant of 9q13-q21.1 Derived from Segmentally Duplicated Pericentromeric Euchromatin. *Cytogenet Genome Res*.

- Barbi, G., P. Steinbach and W. Vogel, 1984 Nonrandom distribution of methotrexate-induced aberrations on human chromosomes. Detection of further folic acid sensitive fragile sites. *Hum Genet* 68: 290-294.
- Barbosa, A. C., P. A. Otto and A. M. Vianna-Morgante, 2000 Replication timing of homologous alpha-satellite DNA in Roberts syndrome. *Chromosome Res* 8: 645-650.
- Basu, A. K., R. Paul, R. Bandyopadhyay and S. Chakrabarti, 2013 Gonadal dysgenesis due to isochromosome formation of long arm of X chromosome. *J Assoc Physicians India* 61: 283-284.
- Bateman, B. G., R. Neu, W. C. Nunley, Jr. and T. E. Kelly, 1986 Pregnancy wastage associated with paracentric inversion of chromosome 13. *J Med Genet* 23: 370.
- Battaglia, A., A. R. Brothman and J. C. Carey, 2002 Recombinant 4 syndrome due to an unbalanced pericentric inversion of chromosome 4. *Am J Med Genet* 112: 103-106.
- Baxter, P. S., E. L. Maltby and O. Quarrell, 1997 Xp21 muscular dystrophy due to X chromosome inversion. *Neurology* 49: 260.
- Beermann, S., 1977 The diminution of Heterochromatic chromosomal segments in Cyclops (Crustacea, Copepoda). *Chromosoma* 60: 297-344.
- Bell, J., R. Dunlop and J. Bryan, 1991 Another paracentric inversion of chromosome 18. *Am J Med Genet* 39: 238.
- Bergman, A., and E. Blennow, 2000 Inv dup(22), del(22)(q11) and r(22) in the father of a child with DiGeorge syndrome. *Eur J Hum Genet* 8: 801-804.
- Betz, J. L., A. S. Behairy, P. Rabionet, B. Tirtorahardjo, M. W. Moore *et al.*, 2005 Acquired inv(9): what is its significance? *Cancer Genet Cytogenet* 160: 76-78.
- Beyer, R., F. Wild, H. Singer, R. Pfeiffer and H. G. Dorr, 1995 [Dwarfism in pericentric inversion of the X-chromosome]. *Klin Padiatr* 207: 305-308.
- Bianchi, D. W., R. D. Nicholls, K. A. Russell, W. A. Miller, M. Ellin *et al.*, 1992 Pericentric inversion of chromosome 16 in a large kindred: spectrum of morbidity and mortality in offspring. *Am J Med Genet* 43: 791-795.
- Blennow, E., K. B. Nielsen, H. Telenius, N. P. Carter, U. Kristoffersson *et al.*, 1995 Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 55: 85-94.
- Bobrow, M., K. Madan and P. L. Pearson, 1972 Staining of some specific regions of human chromosomes, particularly the secondary constriction of No. 9. *Nat New Biol* 238: 122-124.
- Bocian, E., K. Suchenek, E. Obersztyn, B. Nowakowska and T. Mazurczak, 2005 Recombination aneusomy of subtelomeric regions of chromosome 5, resulting from a large familial pericentric inversion inv(5)(p15.33q35.3). *J Appl Genet* 46: 109-114.
- Bourthoumieu, S., F. Esclaire, F. Terro, M. C. Baclet, A. Bedu *et al.*, 2003 "Cri-du-chat" syndrome in a patient born to a mother with a paracentric inversion of chromosome 5q. *Ann Genet* 46: 483-486.
- Briault, S., S. Odent, J. Lucas, M. Le Merrer, C. Turleau *et al.*, 1999 Paracentric inversion of the X chromosome [inv(X)(q12q28)] in familial FG syndrome. *Am J Med Genet* 86: 112-114.
- Brothman, A. R., D. L. Persons and L. G. Shaffer, 2009 Nomenclature evolution: Changes in the ISCN from the 2005 to the 2009 edition. *Cytogenet Genome Res* 127: 1-4.
- Brun, M. E., E. Lana, I. Rivals, G. Lefranc, P. Sarda *et al.*, 2011 Heterochromatic genes undergo epigenetic changes and escape silencing in immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies (ICF) syndrome. *PLoS One* 6: e19464.
- Brun, M. E., M. Ruault, M. Ventura, G. Roizes and A. De Sario, 2003 Juxtacentromeric region of human chromosome 21: a boundary between centromeric heterochromatin and euchromatic chromosome arms. *Gene* 312: 41-50.
- Buckton, K. E., G. Spowart, M. S. Newton and H. J. Evans, 1985 Forty four probands with an additional "marker" chromosome. *Hum Genet* 69: 353-370.
- Buhler, E., 1977 Clinical and cytological aspects of sex chromosome activity. *Hereditas* 86: 63-74.
- Caer, E., A. Perrin, N. Douet-Guilbert, V. Amice, M. De Braekeleer *et al.*, 2008 Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril* 89: 1637-1640.
- Cappuzzo, F., F. R. Hirsch, E. Rossi, S. Bartolini, G. L. Ceresoli *et al.*, 2005 Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 97: 643-655.

- Cardone, M. F., L. Ballarati, M. Ventura, M. Rocchi, A. Marozzi *et al.*, 2004 Evolution of beta satellite DNA sequences: evidence for duplication-mediated repeat amplification and spreading. *Mol Biol Evol* 21: 1792-1799.
- Carpenter, N. J., B. Say and N. D. Barber, 1982 A homozygote for pericentric inversion of chromosome 4. *J Med Genet* 19: 469-471.
- Caspersson, T., S. Farber, G. E. Foley, J. Kudynowski, E. J. Modest *et al.*, 1968 Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49: 219-222.
- Caspersson, T., G. Lomakka and L. Zech, 1972 The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes - distinguishing characters and variability. *Hereditas* 67: 89-102.
- Caspersson, T., L. Zech and C. Johansson, 1970 Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp Cell Res* 62: 490-492.
- Chamberlain, S., J. Shaw, A. Rowland, J. Wallis, S. South *et al.*, 1988 Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature* 334: 248-250.
- Chantot-Bastaraud, S., C. Ravel, I. Berthaut, K. McElreavey, P. Bouchard *et al.*, 2007 Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod* 13: 55-59.
- Chen, C. P., S. P. Lin, C. C. Lee, W. L. Chen, L. F. Chen *et al.*, 2005 Perinatal findings of partial trisomy 13q (13q14.1-->qter) resulting from paternal pericentric inversion of chromosome 13. *Prenat Diagn* 25: 527-528.
- Cheng, Z., M. Ventura, X. She, P. Khaitovich, T. Graves *et al.*, 2005 A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. *Nature* 437: 88-93.
- Cho, E. H., Y. S. Kang and E. H. Lee, 2011 Extra G-positive band at chromosome 9q13 as a recurrent heteromorphism in a Korean population. *Fetal Pediatr Pathol* 30: 257-259.
- Choo, K. H., B. Vissel, A. Nagy, E. Earle and P. Kalitsis, 1991 A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic Acids Res* 19: 1179-1182.
- Choo, K. H. A., 1997 *The centromere*. Oxford University Press, Oxford.
- Christodoulou, K., F. Deymeer, P. Serdaroglu, C. Ozdemir, M. Poda *et al.*, 2001 Mapping of the second Friedreich's ataxia (FRDA2) locus to chromosome 9p23-p11: evidence for further locus heterogeneity. *Neurogenetics* 3: 127-132.
- Chung, J. L., S. W. Kim, J. H. Kim, T. I. Kim, H. K. Lee *et al.*, 2007 A case of Weill-Marchesani syndrome with inversion of chromosome 15. *Korean J Ophthalmol* 21: 255-260.
- Cingoz, S., B. Ozkan, H. Doneray and M. Sakizli, 2007 Familial pericentric inversion chromosome 3 and R448C mutation of CYP11B1 gene in Turkish kindred with 11beta-hydroxylase deficiency. *J Endocrinol Invest* 30: 285-291.
- Ciuladaite, Z., E. Preiksaitiene, A. Utkus and V. Kucinskis, 2014 Relatives with Opposite Chromosome Constitutions, rec(10)dup(10p)inv(10)(p15.1q26.12) and rec(10)dup(10q)inv(10)(p15.1q26.12), due to a Familial Pericentric Inversion. *Cytogenet Genome Res* 144: 109-113.
- Codina-Pascual, M., J. Navarro, M. Oliver-Bonet, J. Kraus, M. R. Speicher *et al.*, 2006 Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Hum Reprod* 21: 1490-1497.
- Collodel, G., E. Moretti, S. Capitani, P. Piomboni, C. Anichini *et al.*, 2006 TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia* 38: 122-127.
- Concolino, D., M. A. Iembo, E. Rossi, S. Giglio, G. Coppola *et al.*, 2002 Familial pericentric inversion of chromosome 5 in a family with benign neonatal convulsions. *J Med Genet* 39: 214-216.
- Conrad, D. F., D. Pinto, R. Redon, L. Feuk, O. Gokcumen *et al.*, 2010 Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464: 704-712.
- Cook, E. H., Jr., and S. W. Scherer, 2008 Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* 455: 919-923.
- Couzin, D. A., J. L. Watt and G. S. Stephen, 1986 The prenatal detection of a familial pericentric inversion of chromosome 19. *Prenat Diagn* 6: 79-82.
- Craig-Holmes, A. P., and M. W. Shaw, 1971 Polymorphism of human constitutive heterochromatin. *Science* 174: 702-704.
- Cremer, T., J. Landegent, A. Bruckner, H. P. Scholl, M. Schardin *et al.*, 1986 Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 74: 346-352.

- Cremer, T., P. Lichter, J. Borden, D. C. Ward and L. Manuelidis, 1988 Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 80: 235-246.
- Crolla, J. A., P. Howard, C. Mitchell, F. L. Long and N. R. Dennis, 1997 A molecular and FISH approach to determining karyotype and phenotype correlations in six patients with supernumerary marker(22) chromosomes. *Am J Med Genet* 72: 440-447.
- Cuesta-Seijo, J. A., and G. M. Sheldrick, 2005 Structures of complexes between echinomycin and duplex DNA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61: 442-448.
- D'Alessandro, E., C. De Matteis Vaccarella, M. L. Lo Re, F. Cappa, A. D'Alfonso *et al.*, 1988 Pericentric inversion of chromosome 19 in three families. *Hum Genet* 80: 203-204.
- Dallapiccola, B., G. Ferranti and L. Prima, 1986 Pericentric inversion of chromosome 19. *Prenat Diagn* 6: 457-458.
- Dana, M., and V. Stoian, 2012 Association of pericentric inversion of chromosome 9 and infertility in romanian population. *Maedica (Buchar)* 7: 25-29.
- Daya, S., 1994 Issues in the etiology of recurrent spontaneous abortion. *Curr Opin Obstet Gynecol* 6: 153-159.
- Demirhan, O., and D. Tastemir, 2003 Chromosome aberrations in a schizophrenia population. *Schizophr Res* 65: 1-7.
- Demirhan, O., A. Pazarbasi, D. Suleymanova-Karahan, N. Tanriverdi and Y. Kilinc, 2008 Correlation of clinical phenotype with a pericentric inversion of chromosome 9 and genetic counseling. *Saudi Med J* 29: 946-951.
- Demirhan, O., K. Ozcan, D. Tastemir, C. Demir, E. Tunc *et al.*, 2008 Inheritance of pericentric inversion in chromosome 7 through the three progenies and a newborn with congenital hydronephrosis diagnosed prenatally by fetal urine sampling. *Fertil Steril* 89: 228 e221-226.
- Descipio, C., J. D. Morrisette, L. K. Conlin, D. Clark, M. Kaur *et al.*, 2010 Two siblings with alternate unbalanced recombinants derived from a large cryptic maternal pericentric inversion of chromosome 20. *Am J Med Genet A* 152A: 373-382.
- Devillard, F., V. Guinchat, D. Moreno-De-Luca, A. C. Tabet, N. Gruchy *et al.*, 2010 Paracentric inversion of chromosome 2 associated with cryptic duplication of 2q14 and deletion of 2q37 in a patient with autism. *Am J Med Genet A* 152A: 2346-2354.
- Devine, D. H., G. Whitman-Elia, R. G. Best and J. G. Edwards, 2000 Paternal paracentric inversion of chromosome 2: a possible association with recurrent pregnancy loss and infertility. *J Assist Reprod Genet* 17: 293-296.
- Di Giacomo, M. C., C. Cesarano, N. Bukvic, E. Manisali, G. Guanti *et al.*, 2004 Duplication of 9 p11.2-p13.1: a benign cytogenetic variant. *Prenat Diagn* 24: 619-622.
- Djalali, M., P. Steinbach, J. Bullerdiek, M. Holmes-Siedle, M. R. Verschraegen-Spae *et al.*, 1986 The significance of pericentric inversions of chromosome 2. *Hum Genet* 72: 32-36.
- Docherty, Z., and M. A. Hulten, 1985 Extra euchromatic band in the qh region of chromosome 9. *J Med Genet* 22: 156-157.
- Driscoll, D. A., 2006 Molecular and genetic aspects of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *Methods Mol Med* 126: 43-55.
- Einfeld, S. L., and A. Smith, 1982 Pericentric inversion of chromosome 11 in one of two similar retarded brothers. *J Med Genet* 19: 312.
- Erukashvily, N. I., A. B. Malashicheva and I. S. Waisertreiger, 2009 Satellite DNA spatial localization and transcriptional activity in mouse embryonic E-14 and IOUD2 stem cells. *Cytogenet Genome Res* 124: 277-287.
- Erukashvily, N. I., and N. V. Ponomartsev, 2013 Mammalian satellite DNA: a speaking dumb. *Adv Protein Chem Struct Biol* 90: 31-65.
- Erukashvily, N. I., R. Donev, I. S. Waisertreiger and O. I. Podgornaya, 2007 Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells. *Cytogenet Genome Res* 118: 42-54.
- Eymery, A., B. Horard, M. El Atifi-Borel, G. Fourel, F. Berger *et al.*, 2009b A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res* 37: 6340-6354.
- Eymery, A., M. Callanan and C. Vourc'h, 2009a The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int J Dev Biol* 53: 259-268.

- Fauth, C., I. Bartels, T. Haaf and M. R. Speicher, 2001 Additional dark G-band in the p-arm of chromosome 19 due to a paracentric inversion with a breakpoint in the pericentromeric heterochromatin. *Am J Med Genet* 103: 160-162.
- Ferguson-Smith, M. A., 1974 Autosomal polymorphisms. *Birth Defects Orig Artic Ser* 10: 19-29.
- Fernandez, J. L., S. Pereira, A. Campos, J. Gosalvez and V. Goyanes, 1994 An extra band within the human 9qh+ region that behaves like the surrounding constitutive heterochromatin. *J Med Genet* 31: 632-634.
- Ford, C. E., K. W. Jones, P. E. Polani, J. C. De Almeida and J. H. Briggs, 1959 A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1: 711-713.
- Fox, K. R., and E. Kentebe, 1990 Footprinting studies on the effect of echinomycin on the structure of a bent DNA fragment. *Biochem J* 269: 217-221.
- Fox, K. R., J. N. Marks and K. Waterloh, 1991 Echinomycin binding to alternating AT. *Nucleic Acids Res* 19: 6725-6730.
- Freeman, J. L., G. H. Perry, L. Feuk, R. Redon, S. A. McCarroll *et al.*, 2006 Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res* 16: 949-961.
- Fryns, J. P., A. Kleczkowska and H. Van den Berghe, 1986 Paracentric inversions in man. *Hum Genet* 73: 205-213.
- Fryns, J. P., H. Van den Berghe and C. Schrandt-Stumpel, 1994 Kabuki (Niikawa-Kuroki) syndrome and paracentric inversion of the short arm of chromosome 4. *Am J Med Genet* 53: 204-205.
- Fussell, C. P., 1977 Telomere associations in interphase nuclei of *Allium cepa* demonstrated by C-banding. *Exp Cell Res* 110: 111-117.
- Gabriel-Robez, O., C. Ratomponirina, Y. Rumpler, B. Le Marec, J. M. Luciani *et al.*, 1986 Synapsis and synaptic adjustment in an infertile human male heterozygous for a pericentric inversion in chromosome 1. *Hum Genet* 72: 148-152.
- Gagne, R., and C. Laberge, 1972 Specific cytological recognition of the heterochromatic segment of number 9 chromosome in man. *Exp Cell Res* 73: 239-242.
- Gai, X., H. M. Xie, J. C. Perin, N. Takahashi, K. Murphy *et al.*, 2012 Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. *Mol Psychiatry* 17: 402-411.
- Garcia-Peiro, A., M. Oliver-Bonet, J. Navarro, C. Abad, M. Guitart *et al.*, 2011 Sperm DNA integrity and meiotic behavior assessment in an infertile male carrier of a 9qh+++ polymorphism. *J Biomed Biotechnol* 2011: 730847.
- Giraldo, A., E. Silva, I. Martinez, C. Campos and J. Guzman, 1981 Pericentric inversion of chromosome 1 in three sterile brothers. *Hum Genet* 58: 226-227.
- Gonzalez, E., H. Kulkarni, H. Bolivar, A. Mangano, R. Sanchez *et al.*, 2005 The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307: 1434-1440.
- Gorinati, M., D. Caufin, A. Minelli, L. Memo, G. Gaspardo *et al.*, 1991 Inv dup (8) (p21.1---22.1): further case report and a new hypothesis on the origin of the chromosome abnormality. *Clin Genet* 39: 55-59.
- Gosden, J. R., A. R. Mitchell, R. A. Buckland, R. P. Clayton and H. J. Evans, 1975 The location of four human satellite DNAs on human chromosomes. *Exp Cell Res* 92: 148-158.
- Gosden, J. R., G. Spowart and S. S. Lawrie, 1981 Satellite DNA and cytological staining patterns in heterochromatic inversions of human chromosome 9. *Hum Genet* 58: 276-278.
- Grass, F. S., J. C. Parke, Jr. and J. C. Hisley, 1987 Antenatal diagnosis of a de novo paracentric inversion of chromosome 11. *Prenat Diagn* 7: 1-5.
- Greenberg, F., R. F. Stratton, L. H. Lockhart, F. F. Elder, W. B. Dobyns *et al.*, 1986 Familial Miller-Dieker syndrome associated with pericentric inversion of chromosome 17. *Am J Med Genet* 23: 853-859.
- Greger, V., J. H. Knoll, J. Wagstaff, E. Woolf, P. Lieske *et al.*, 1997 Angelman syndrome associated with an inversion of chromosome 15q11.2q24.3. *Am J Hum Genet* 60: 574-580.
- Greig, G. M., and H. F. Willard, 1992 Beta satellite DNA: characterization and localization of two sub-families from the distal and proximal short arms of the human acrocentric chromosomes. *Genomics* 12: 573-580.
- Guilherme, R., E. Klein, A. Hamid, S. Bhatt, M. Volleth *et al.*, 2013 Human Ring Chromosomes - New Insights for their Clinical Significance. *Balkan J Med Genet* 16: 13-20.
- Guilherme, R. S., E. Klein, C. Venner, A. B. Hamid, S. Bhatt *et al.*, 2012 Human ring chromosomes and small supernumerary marker chromosomes-do they have telomeres? *Chromosome Res* 20: 825-835.

- Gutierrez-Angulo, M., A. I. Vasquez, A. L. Ramos, M. G. Dominguez, J. R. Gonzalez-Garcia *et al.*, 2001 In search of a 9q13 latent centromere in 9qh polymorphic inversions. *Genet Couns* 12: 359-362.
- Guy, J., C. Spalluto, A. McMurray, T. Hearn, M. Crosier *et al.*, 2000 Genomic sequence and transcriptional profile of the boundary between pericentromeric satellites and genes on human chromosome arm 10q. *Hum Mol Genet* 9: 2029-2042.
- Harcombe, A. A., N. R. Cary, P. Mullins, L. D. Sharples, P. M. Schofield *et al.*, 1994 Lymphocyte culture from endomyocardial biopsies. Effects of polyclonal T cell activators compared with interleukin-2 alone. *Transplantation* 58: 1277-1279.
- Hasegawa, L. S., D. S. Rupa and D. A. Eastmond, 1995 A method for the rapid generation of alpha- and classical satellite probes for human chromosome 9 by polymerase chain reaction using genomic DNA and their application to detect chromosomal alterations in interphase cells. *Mutagenesis* 10: 471-476.
- Hastings, P. J., G. Ira and J. R. Lupski, 2009 A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet* 5: e1000327.
- Herva, R., and A. de la Chapelle, 1976 A large pericentric inversion of human chromosome 8. *Am J Hum Genet* 28: 208-212.
- Horvath, J. E., C. L. Gulden, J. A. Bailey, C. Yohn, J. D. McPherson *et al.*, 2003 Using a pericentromeric interspersed repeat to recapitulate the phylogeny and expansion of human centromeric segmental duplications. *Mol Biol Evol* 20: 1463-1479.
- Horvath, J. E., J. A. Bailey, D. P. Locke and E. E. Eichler, 2001 Lessons from the human genome: transitions between euchromatin and heterochromatin. *Hum Mol Genet* 10: 2215-2223.
- Horvath, J. E., L. Viggiano, B. J. Loftus, M. D. Adams, N. Archidiacono *et al.*, 2000 Molecular structure and evolution of an alpha satellite/non-alpha satellite junction at 16p11. *Hum Mol Genet* 9: 113-123.
- Horvath, J. E., S. Schwartz and E. E. Eichler, 2000a The mosaic structure of human pericentromeric DNA: a strategy for characterizing complex regions of the human genome. *Genome Res* 10: 839-852.
- Hsu, L. Y., P. A. Benn, H. L. Tannenbaum, T. E. Perlis and A. D. Carlson, 1987 Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: a large prenatal study. *Am J Med Genet* 26: 95-101.
- Humphray, S. J., K. Oliver, A. R. Hunt, R. W. Plumb, J. E. Loveland *et al.*, 2004 DNA sequence and analysis of human chromosome 9. *Nature* 429: 369-374.
- Ichioka, K., K. Yoshimura, T. Honda, A. Takahashi and A. Terai, 2005 Paracentric inversion of chromosome 7(q22-31) associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 83: 455-456.
- Ilgin Ruhi, H., A. Tukun, H. Karabulut, P. Bayazit and I. Bokesoy, 2001 A Down syndrome case with a karyotype of 46,XY,rec(21)dup(21q)inv(21)(p11q22) derived from paternal pericentric inversion of chromosome 21. *Clin Genet* 59: 368-370.
- Imashuku, S., M. Naya, B. An, Y. Nakabayashi, K. Kuriyama *et al.*, 2002 Constitutional pericentric inversion of chromosome 9 and haemopoietic stem cell transplantation: delayed engraftment. *Br J Haematol* 118: 1195-1196.
- Inoue, K., K. Dewar, N. Katsanis, L. T. Reiter, E. S. Lander *et al.*, 2001 The 1.4-Mb CMT1A duplication/HNPP deletion genomic region reveals unique genome architectural features and provides insights into the recent evolution of new genes. *Genome Res* 11: 1018-1033.
- Ishikiriya, S., H. Tonoki, Y. Shibuya, S. Chin, N. Harada *et al.*, 1989 Waardenburg syndrome type I in a child with de novo inversion (2)(q35q37.3). *Am J Med Genet* 33: 505-507.
- Iyer, G. S., R. Krahe, L. A. Goodwin, N. A. Doggett, M. J. Siciliano *et al.*, 1996 Identification of a testis-expressed creatine transporter gene at 16p11.2 and confirmation of the X-linked locus to Xq28. *Genomics* 34: 143-146.
- Jacobs, P. A., C. Browne, N. Gregson, C. Joyce and H. White, 1992 Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 29: 103-108.
- Jacobs, P., P. Dalton, R. James, K. Mosse, M. Power *et al.*, 1997 Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet* 61: 471-483.
- Jalal, S. M., M. K. Kukulich, M. Garcia and D. W. Day, 1990 Euchromatic 9q + heteromorphism in a family. *Am J Med Genet* 37: 155-156.
- Jenderny, J., J. Gebauer, G. Rohrborn and A. Ruger, 1992 Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 20. *Hum Genet* 89: 117-119.

- Jeong, S. Y., B. Y. Kim and J. E. Yu, 2010 De novo pericentric inversion of chromosome 9 in congenital anomaly. *Yonsei Med J* 51: 775-780.
- Jiang, Y. H., J. E. Martinez, Z. Ou, M. L. Cooper, S. H. Kang *et al.*, 2008 De novo and complex imbalanced chromosomal rearrangements revealed by array CGH in a patient with an abnormal phenotype and apparently "balanced" paracentric inversion of 14(q21q23). *Am J Med Genet A* 146A: 1986-1993.
- Johnson, D. D., W. B. Dobyns, H. Gordon and G. W. Dewald, 1988 Familial pericentric and paracentric inversions of chromosome 1. *Hum Genet* 79: 315-320.
- Jones, K. W., 1973 Satellite DNA. *J Med Genet* 10: 273-281.
- Jones, K. W., I. F. Purdom, J. Prosser and G. Corneo, 1974 The chromosomal localisation of human satellite DNA I. *Chromosoma* 49: 161-171.
- Jones, K. W., J. Prosser, G. Corneo and E. Ginelli, 1973 The chromosomal location of human satellite DNA 3. *Chromosoma* 42: 445-451.
- Jones, M. L., S. L. Murden, C. Brooks, V. Maloney, R. A. Manning *et al.*, 2013 Disruption of AP3B1 by a chromosome 5 inversion: a new disease mechanism in Hermansky-Pudlak syndrome type 2. *BMC Med Genet* 14: 42.
- Joseph-George, A. M., Y. He, C. R. Marshall, R. C. Wong, J. R. MacDonald *et al.*, 2011 Euchromatic 9q13-q21 duplication variants are tandem segmental amplifications of sequence reciprocal to 9q13-q21 deletions. *J Med Genet* 48: 317-322.
- Kanda, N., 1978 Differential staining in the secondary constriction regions of human chromosomes A1, C9, and E16 by a heat-hypotonic treatment technique. *Hum Genet* 45: 19-24.
- Kariminejad, A., R. Kariminejad, A. Moshtagh, M. Zanganeh, M. H. Kariminejad *et al.*, 2011 Pericentric inversion of chromosome 18 in parents leading to a phenotypically normal child with segmental uniparental disomy 18. *Eur J Hum Genet* 19: 555-560.
- Karpen, G. H., and R. C. Allshire, 1997 The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet* 13: 489-496.
- Kasai, R., K. Narahara, K. Kikkawa, Y. Takahashi, Y. Wakita *et al.*, 1985 Reproductive risk of paracentric inversion carriers: report of two unrelated cases with paracentric inversion of the long arm of chromosome 3. *Jinrui Idengaku Zasshi* 30: 57-67.
- Kassam, G., A. T. Chen, M. F. Goldberg, S. Trusler and G. P. Oakley, Jr., 1984 Prenatal diagnosis of pericentric inversion of chromosome No. 17 in a twin pregnancy. *Prenat Diagn* 4: 213-216.
- Kehrer-Sawatzki, H., J. M. Szamalek, S. Tanzer, M. Platzner and H. Hameister, 2005 Molecular characterization of the pericentric inversion of chimpanzee chromosome 11 homologous to human chromosome 9. *Genomics* 85: 542-550.
- Keitges, E. A., C. G. Palmer and D. D. Weaver, 1982 Pericentric X inversion in dizygotic twins who differ in X chromosome inactivation and menstrual cycle function. *Hum Genet* 62: 210-213.
- Kersey, J. P., A. J. Vivian and E. Reid, 2006 A report of paracentric inversion of chromosome 8 in Moebius syndrome. *Ophthalmic Genet* 27: 29-31.
- Keung, Y. K., M. A. Knovich, B. L. Powell, D. H. Buss and M. Pettenati, 2003b Constitutional pericentric inversion of chromosome 9 and acute leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 145: 82-85.
- Keung, Y. K., M. A. Knovich, D. D. Hurd and M. Pettenati, 2003a Constitutional pericentric inversion of chromosome 9 and bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 123: 748-749.
- Keung, Y. K., M. Pettenati, D. D. Hurd, B. L. Powell and D. H. Buss, 2002 Allogenic marrow grafts from unrelated donors with congenital pericentric inversion of chromosome 9. *Br J Haematol* 116: 237-238.
- Kim, J. J., H. S. Rhee, Y. T. Chung, S. Y. Park and S. K. Choi, 1999a Prenatal detection of de novo inversion of chromosome 9 with duplicated heterochromatic region and postnatal follow-up. *Exp Mol Med* 31: 134-136.
- Kim, S. S., S. C. Jung, H. J. Kim, H. R. Moon and J. S. Lee, 1999b Chromosome abnormalities in a referred population for suspected chromosomal aberrations: a report of 4117 cases. *J Korean Med Sci* 14: 373-376.
- Kingston, H. M., D. H. Ledbetter, P. I. Tomlin and K. L. Gaunt, 1996 Miller-Dieker syndrome resulting from rearrangement of a familial chromosome 17 inversion detected by fluorescence in situ hybridisation. *J Med Genet* 33: 69-72.
- Kirillova, E. A., I. S. Rozovskii, A. G. Kurbanova and N. A. Karetnikova, 1979 [Pericentric inversion of chromosome 9 in two women with developmental defects of the internal genitalia]. *Tsitologiya* 13: 300-304.

- Kirkpatrick, G., V. Chow and S. Ma, 2012 Meiotic recombination, synapsis, meiotic inactivation and sperm aneuploidy in a chromosome 1 inversion carrier. *Reprod Biomed Online* 24: 91-100.
- Kiss, P., and M. Osztovcics, 1981 [Cytogenetic investigations in 817 dysmorphic babies]. *Z Gesamte Inn Med* 36: 356-360.
- Kit, S., 1961 Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *J Mol Biol* 3: 711-716.
- Klasterska, I., A. T. Natarajan and C. Ramel, 1974 Heterochromatin distribution and chiasma localization in the grasshopper *Btyodema tuberculata* (Fabr.) (Acrididae). *Chromosoma* 44: 393-404.
- Knebel, S., J. J. Pasantes, D. A. Thi, F. Schaller and W. Schempp, 2011 Heterogeneity of pericentric inversions of the human y chromosome. *Cytogenet Genome Res* 132: 219-226.
- Knight, L. A., G. M. Soon and M. Tan, 1993 Extra G positive band on the long arm of chromosome 9. *J Med Genet* 30: 613.
- Ko, T. M., F. J. Hsieh, L. S. Chang, M. F. Pan and T. Y. Lee, 1992 Pericentric inversions of chromosome 9 in Taiwanese fetuses. *J Formos Med Assoc* 91: 473-474.
- Koskinen, S., T. Onnelainen, A. de la Chapelle and J. Kere, 1993 A rare reciprocal translocation (12;21) segregating for nine generations. *Hum Genet* 92: 509-512.
- Kosyakova, N., A. Grigorian, T. Liehr, M. Manvelyan, I. Simonyan *et al.*, 2013 Heteromorphic variants of chromosome 9. *Mol Cytogenet* 6: 14.
- Kumar, H. V., K. J. McMahan, K. M. Allman, B. McCaffrey and A. Rowan, 1989 Pericentric inversion chromosome 9 and personality disorder. *Br J Psychiatry* 155: 408-410.
- Kunugi, H., K. B. Lee and S. Nanko, 1999 Cytogenetic findings in 250 schizophrenics: evidence confirming an excess of the X chromosome aneuploidies and pericentric inversion of chromosome 9. *Schizophr Res* 40: 43-47.
- Kurnit, D. M., 1979 Satellite DNA and heterochromatin variants: the case for unequal mitotic crossing over. *Hum Genet* 47: 169-186.
- Kuznetzova, T. V., Erukashvily, N. I., Trofimova, I. L., Gorbunova, A., Vashukova, E. S., & Baranov, V. S., 2012 Localisation and transcription of human chromosome 1 pericentromeric heterochromatin in embryonic and extraembryonic tissues. *Medical Genetics* 11: 19-24.
- Landegent, J. E., N. Jansen in de Wal, G. J. van Ommen, F. Baas, J. J. de Vijlder *et al.*, 1985 Chromosomal localization of a unique gene by non-autoradiographic in situ hybridization. *Nature* 317: 175-177.
- Le Baccon, P., D. Leroux, C. Dascalescu, S. Duley, D. Marais *et al.*, 2001 Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* 32: 250-264.
- Le Coniat, M., D. Vecchione, A. Bernheim and R. Berger, 1982 C-banding studies in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 5: 327-331.
- Lecce, R., M. Murdolo, G. Gelli, K. Steindl, L. Coppola *et al.*, 2006 The euchromatic 9p+ polymorphism is a locus-specific amplification caused by repeated copies of a small DNA segment mapping within 9p12. *Hum Genet* 118: 760-766.
- Lee, J. A., and J. R. Lupski, 2006 Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* 52: 103-121.
- Lee, J. A., C. M. Carvalho and J. R. Lupski, 2007 A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131: 1235-1247.
- Lee, K. B., H. Kunugi and S. Nanko, 1998 Familial schizophrenia with pericentric inversion of chromosome 9: a case report. *Schizophr Res* 32: 123-126.
- Legius, E., D. A. Marchuk, B. K. Hall, L. B. Andersen, M. R. Wallace *et al.*, 1992 NF1-related locus on chromosome 15. *Genomics* 13: 1316-1318.
- Lejeune, J., R. Turpin and M. Gautier, 1959 [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)]. *Bull Acad Natl Med* 143: 256-265.
- Leng, F., J. B. Chaires and M. J. Waring, 2003 Energetics of echinomycin binding to DNA. *Nucleic Acids Res* 31: 6191-6197.
- Lengauer, C., E. D. Green and T. Cremer, 1992a Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics* 13: 826-828.
- Lengauer, C., H. C. Riethman, M. R. Speicher, M. Taniwaki, D. Konecki *et al.*, 1992b Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2. *Cancer Res* 52: 2590-2596.

- Lin, C. C., R. Sasi, C. Lee, Y. S. Fan and D. Court, 1993 Isolation and identification of a novel tandemly repeated DNA sequence in the centromeric region of human chromosome 8. *Chromosoma* 102: 333-339.
- Lin, M. S., D. E. Comings and O. S. Alfi, 1977 Optical Studies of the interaction of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 60: 15-25.
- Lopez-Rangel, E., M. Hrynchak and J. M. Friedman, 1993 Cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome in a child carrying an inherited inversion of chromosome 7. *Am J Med Genet* 47: 326-329.
- Lourenco, G. J., P. M. Silva, R. A. Bognone, R. A. De Souza, M. T. Delamain *et al.*, 2007 Inherited pericentric inversion of chromosome 9 in acquired hematological disorders. *Ann Hematol* 86: 465-467.
- Luke, S., R. S. Verma, R. A. Conte and T. Mathews, 1992 Molecular characterization of the secondary constriction region (qh) of human chromosome 9 with pericentric inversion. *J Cell Sci* 103 (Pt 4): 919-923.
- MacDonald, I. M., and D. M. Cox, 1985 Inversion of chromosome 2 (p11p13): frequency and implications for genetic counselling. *Hum Genet* 69: 281-283.
- Macera, M. J., R. S. Verma, R. A. Conte, M. G. Bialer and V. R. Klein, 1995 Mechanisms of the origin of a G-positive band within the secondary constriction region of human chromosome 9. *Cytogenet Cell Genet* 69: 235-239.
- Madan, K., 1978 An extra band in human 9qh+ chromosomes. *Hum Genet* 43: 259-264.
- Madan, K., 1995 Paracentric inversions: a review. *Hum Genet* 96: 503-515.
- Malan, V., E. Pipiras, C. Sifer, S. Kanafani, I. Cedrin-Durnerin *et al.*, 2006 Chromosome segregation in an infertile man carrying a unique pericentric inversion, inv(21)(p12q22.3), analysed using fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei: significance for clinical genetics. A case report. *Hum Reprod* 21: 2052-2056.
- Manola, K. N., N. Harhalakis, A. Symeonidis, H. Rigana, C. Stavropoulou *et al.*, 2006 Constitutional pericentric inversion of chromosome 9 and hematopoietic recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 85: 611-615.
- Manolov, G., Y. Manolova, J. Sonnabend, H. Lipscomb and D. T. Purtilo, 1985 Chromosome aberrations in peripheral lymphocytes of male homosexuals. *Cancer Genet Cytogenet* 18: 337-350.
- Markie, D., S. Huson, E. Maher, A. Davies, I. Tomlinson *et al.*, 1996 A pericentric inversion of chromosome six in a patient with Peutz-Jeghers' syndrome and the use of FISH to localise the breakpoints on a genetic map. *Hum Genet* 98: 125-128.
- Martin, M. J., and J. A. Abrisqueta, 1983 Unusual pericentric inversion inv(9) (p13q11) in a phenotypically normal family. *Hum Genet* 64: 100.
- Masumoto, H., M. Nakano and J. Ohzeki, 2004 The role of CENP-B and alpha-satellite DNA: de novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres. *Chromosome Res* 12: 543-556.
- Mattei, M. G., J. F. Mattei, M. Guichaoua and F. Giraud, 1981 Partial inversion of the secondary constriction of chromosome 9. Does it exist? *Hum Genet* 59: 310-316.
- Mattina, T., C. S. Perrotta and P. Grossfeld, 2009 Jacobsen syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 4: 9.
- McCandless, F., I. Jones, K. Harper and N. Craddock, 1998 Intrafamilial association of pericentric inversion of chromosome 9, inv (9)(p11-q21), and rapid cycling bipolar disorder. *Psychiatr Genet* 8: 259-262.
- McGee, J. P., D. A. Cranin, S. F. Hoegerman and G. Hoegerman, 1981 Apparent inverted tandem duplication may result from parental paracentric inversion. *Pediatrics* 68: 751-752.
- Mears, A. J., A. M. Duncan, M. L. Budarf, B. S. Emanuel, B. Sellinger *et al.*, 1994 Molecular characterization of the marker chromosome associated with cat eye syndrome. *Am J Hum Genet* 55: 134-142.
- Mears, A. J., H. el-Shanti, J. C. Murray, H. E. McDermid and S. R. Patil, 1995 Minute supernumerary ring chromosome 22 associated with cat eye syndrome: further delineation of the critical region. *Am J Hum Genet* 57: 667-673.
- Meneveri, R., A. Agresti, A. Marozzi, S. Saccone, M. Rocchi *et al.*, 1993 Molecular organization and chromosomal location of human GC-rich heterochromatic blocks. *Gene* 123: 227-234.
- Meneveri, R., A. Agresti, G. Della Valle, D. Talarico, A. G. Siccardi *et al.*, 1985 Identification of a human clustered G + C-rich DNA family of repeats (Sau3A family). *J Mol Biol* 186: 483-489.

- Meschede, D., U. G. Froster, M. Bergmann and E. Nieschlag, 1994 Familial pericentric inversion of chromosome 1 (p34q23) and male infertility with stage specific spermatogenic arrest. *J Med Genet* 31: 573-575.
- Metaxotou, C., A. Kalpini-Mavrou, M. Panagou and C. Tsenghi, 1978 Polymorphism of chromosome 9 in 600 Greek subjects. *Am J Hum Genet* 30: 85-89.
- Milan, C., and L. Lamberti, 1996 Study of C-polymorphisms of chromosomes 1, 9 and 16 in lymphocytes of patients with laryngeal carcinoma. *Boll Soc Ital Biol Sper* 72: 187-194.
- Milot, E., J. Strouboulis, T. Trimborn, M. Wijgerde, E. de Boer *et al.*, 1996 Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 87: 105-114.
- Mitchell, A. R., P. Ambros, S. McBeath and A. C. Chandley, 1986 Molecular hybridization to meiotic chromosomes in man reveals sequence arrangement on the no. 9 chromosome and provides clues to the nature of "parameres". *Cytogenet Cell Genet* 41: 89-95.
- Mitchell, A. R., R. S. Beauchamp and C. J. Bostock, 1979 A study of sequence homologies in four satellite DNAs of man. *J Mol Biol* 135: 127-149.
- Miyazaki, M., T. Hashimoto, M. Tayama, Y. Kuroda and T. Ueta, 1991 Congenital myotonic dystrophy associated with a chromosome pericentric inversion. *Neuropediatrics* 22: 181-183.
- Mozdarani, H., A. M. Meybodi and H. Karimi, 2007 Impact of pericentric inversion of Chromosome 9 [inv (9) (p11q12)] on infertility. *Indian J Hum Genet* 13: 26-29.
- Muller, H., H. P. Klinger and M. Glasser, 1975 Chromosome polymorphism in a human newborn population. II. Potentials of polymorphic chromosome variants for characterizing the idiogram of an individual. *Cytogenet Cell Genet* 15: 239-255.
- Muller, S., M. Rocchi, M. A. Ferguson-Smith and J. Wienberg, 1997 Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 100: 271-278.
- Mun, S. J., E. H. Cho, M. J. Chey, G. H. Shim, B. M. Shin *et al.*, 2010 [Recombinant chromosome 4 with partial 4p deletion and 4q duplication inherited from paternal pericentric inversion]. *Korean J Lab Med* 30: 89-92.
- Nanko, S., 1993 Schizophrenia with pericentric inversion of chromosome 9: a case report. *Jpn J Psychiatry Neurol* 47: 47-49.
- Naritomi, K., Y. Izumikawa, S. Ohshiro, K. Yoshida, N. Shimozawa *et al.*, 1989 Gene assignment of Zellweger syndrome to 7q11.23: report of the second case associated with a pericentric inversion of chromosome 7. *Hum Genet* 84: 79-80.
- Navarro, J., J. Benet, M. R. Martorell, C. Templado and J. Egozcue, 1993 Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies. *Am J Hum Genet* 53: 214-219.
- Neilan, E., Y. Pikman and V. E. Kimonis, 2006 Peters anomaly in association with multiple midline anomalies and a familial chromosome 4 inversion. *Ophthalmic Genet* 27: 63-65.
- Neri, G., B. Tedeschi and S. Sanfilippo, 1982 Partial inversion of the secondary constriction of chromosome 9: it exists. *Hum Genet* 61: 80-81.
- Nienhaus, H., U. Mau, K. D. Zang and W. Henn, 1993 Pericentric inversion of chromosome 6 in a patient with cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet* 46: 630-631.
- Norman, A. M., A. P. Read, J. Clayton-Smith, T. Andrews and D. Donnai, 1992 Recurrent Wiedemann-Beckwith syndrome with inversion of chromosome (11)(p11.2p15.5). *Am J Med Genet* 42: 638-641.
- Oakey, R., and C. Tyler-Smith, 1990 Y chromosome DNA haplotyping suggests that most European and Asian men are descended from one of two males. *Genomics* 7: 325-330.
- Ohno, S., 1972 So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol* 23: 366-370.
- Park, J. P., S. A. Wojiski, R. A. Spellman, C. H. Rhodes and T. K. Mohandas, 1998 Human chromosome 9 pericentric homologies: implications for chromosome 9 heteromorphisms. *Cytogenet Cell Genet* 82: 192-194.
- Pearson, C. E., K. Nichol Edamura and J. D. Cleary, 2005 Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 6: 729-742.
- Pellet, P., J. Hillion, A. J. Carroll, W. M. Crist, J. C. Brouet *et al.*, 1991 Heterogeneity of the breakpoint localization in malignant cells with a 9p11 chromosomal abnormality. *Leukemia* 5: 468-472.
- Pennisi, E., 2010 Shining a light on the genome's 'dark matter'. *Science* 330: 1614.
- Petkovic, I., M. Nakic and J. Konja, 1991 Heterochromatic variability in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 54: 67-69.

- Piotrowski, A., C. E. Bruder, R. Andersson, T. Diaz de Stahl, U. Menzel *et al.*, 2008 Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues. *Hum Mutat* 29: 1118-1124.
- Piovani, G., G. Borsani, V. Bertini, V. M. Kalscheuer, P. Viertel *et al.*, 2006 Unexpected identification of two interstitial deletions in a patient with a pericentric inversion of a chromosome 4 and an abnormal phenotype. *Eur J Med Genet* 49: 215-223.
- Probst, A. V., I. Okamoto, M. Casanova, F. El Marjou, P. Le Baccon *et al.*, 2010 A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell* 19: 625-638.
- Prosser, J., M. Frommer, C. Paul and P. C. Vincent, 1986 Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J Mol Biol* 187: 145-155.
- Raimondi, E., P. Bernasconi, D. Moralli, R. Fujita, G. Uziel *et al.*, 1991 Localization of DNA probes tightly linked to the Friedreich's ataxia locus by in situ hybridization in a case of pericentric inversion of chromosome 9. *Hum Genet* 86: 525-528.
- Ramesh, K. H., and R. S. Verma, 1996 Breakpoints in alpha, beta, and satellite III DNA sequences of chromosome 9 result in a variety of pericentric inversions. *J Med Genet* 33: 395-398.
- Redon, R., S. Ishikawa, K. R. Fitch, L. Feuk, G. H. Perry *et al.*, 2006 Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444: 444-454.
- Rigby, P. W., M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg, 1977 Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-251.
- Rizzi, N., M. Denegri, I. Chiodi, M. Corioni, R. Valgardsdottir *et al.*, 2004 Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock. *Mol Biol Cell* 15: 543-551.
- Rocchi, M., N. Archidiacono, D. C. Ward and A. Baldini, 1991 A human chromosome 9-specific alphoid DNA repeat spatially resolvable from satellite 3 DNA by fluorescent in situ hybridization. *Genomics* 9: 517-523.
- Roland, B., J. E. Chernos and D. M. Cox, 1992 9qh+ variant band in two families. *Am J Med Genet* 42: 137-138.
- Ronne, M., 1984 Fluorouracil synchronization of human lymphocyte cultures. Induction of high resolution R-banding by simultaneous in vitro exposure to 5-bromodeoxyuridine/Hoechst 33258. *Hereditas* 101: 205-208.
- Ronne, M., 1989 Chromosome preparation and high resolution banding techniques. A review. *J Dairy Sci* 72: 1363-1377.
- Ruault, M., P. van der Bruggen, M. E. Brun, S. Boyle, G. Roizes *et al.*, 2002 New BAGE (B melanoma antigen) genes mapping to the juxtacentromeric regions of human chromosomes 13 and 21 have a cancer/testis expression profile. *Eur J Hum Genet* 10: 833-840.
- Rudert, F., S. Bronner, J. M. Garnier and P. Dolle, 1995 Transcripts from opposite strands of gamma satellite DNA are differentially expressed during mouse development. *Mamm Genome* 6: 76-83.
- Salihu, H. M., R. Boos, G. Tchinguem and W. Schmidt, 2001 Prenatal diagnosis of translocation and a single pericentric inversion 9: the value of fetal ultrasound. *J Obstet Gynaecol* 21: 474-477.
- Sambani, C., R. La Starza, V. Pierini, P. Vandenberghe, J. J. Gonzales-Aguilera *et al.*, 2005 Leukemic recombinations involving heterochromatin in myeloproliferative disorders with t(1;9). *Cancer Genet Cytogenet* 162: 45-49.
- Samonte, R. V., and E. E. Eichler, 2002 Segmental duplications and the evolution of the primate genome. *Nat Rev Genet* 3: 65-72.
- Samonte, R. V., R. A. Conte, K. H. Ramesh and R. S. Verma, 1996 Molecular cytogenetic characterization of breakpoints involving pericentric inversions of human chromosome 9. *Hum Genet* 98: 576-580.
- Sasagawa, I., M. Ishigooka, Y. Kubota, M. Tomaru, T. Hashimoto *et al.*, 1998 Pericentric inversion of chromosome 9 in infertile men. *Int Urol Nephrol* 30: 203-207.
- Sawyer, J. R., 1995 High resolution mid-prophase human chromosomes induced by echinomycin and ethidium bromide. *Hum Genet* 95: 49-55.
- Sawyer, J. R., C. M. Swanson, G. Wheeler and C. Cunniff, 1995 Chromosome instability in ICF syndrome: formation of micronuclei from multibranching chromosomes 1 demonstrated by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 56: 203-209.
- Scambler, P. J., A. H. Carey, R. K. Wyse, S. Roach, J. P. Dumanski *et al.*, 1991 Microdeletions within 22q11 associated with sporadic and familial DiGeorge syndrome. *Genomics* 10: 201-206.
- Schinzel, A., 1991 Tetrasomy 12p (Pallister-Killian syndrome). *J Med Genet* 28: 122-125.

- Schinzel, A. A., P. A. Adelsberger, F. Binkert, S. Basaran and S. E. Antonarakis, 1992 No evidence for a paternal interchromosomal effect from analysis of the origin of nondisjunction in Down syndrome patients with concomitant familial chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 50: 288-293.
- Schmidt, T., T. Bierhals, F. Kortum, I. Bartels, T. Liehr *et al.*, 2014 Branchio-otic syndrome caused by a genomic rearrangement: clinical findings and molecular cytogenetic studies in a patient with a pericentric inversion of chromosome 8. *Cytogenet Genome Res* 142: 1-6.
- Schreck, R. R., C. M. Disteche and D. Adler, 2001 ISCN standard idiograms. *Curr Protoc Hum Genet* Appendix 4: Appendix 4B.
- Schweizer, D., P. Ambros and M. Andrlé, 1978 Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, distamycin A. *Exp Cell Res* 111: 327-332.
- Seabright, M., 1971 A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.
- Sebat, J., B. Lakshmi, D. Malhotra, J. Troge, C. Lese-Martin *et al.*, 2007 Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316: 445-449.
- Serra, A., C. Brahe, A. Millington-Ward, G. Neri, B. Tedeschi *et al.*, 1990 Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *Am J Med Genet Suppl* 7: 162-168.
- Shaikh, T. H., H. Kurahashi, S. C. Saitta, A. M. O'Hare, P. Hu *et al.*, 2000 Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* 9: 489-501.
- Shashi, V., W. L. Golden, P. S. Allinson, S. H. Blanton, C. von Kap-Herr *et al.*, 1996 Molecular analysis of recombination in a family with Duchenne muscular dystrophy and a large pericentric X chromosome inversion. *Am J Hum Genet* 58: 1231-1238.
- Shaw, C. J., M. A. Withers and J. R. Lupski, 2004 Uncommon deletions of the Smith-Magenis syndrome region can be recurrent when alternate low-copy repeats act as homologous recombination substrates. *Am J Hum Genet* 75: 75-81.
- Shin, H. T., and M. W. Chang, 2001 Trichorhinophalangeal syndrome, type II (Langer-Giedion syndrome). *Dermatol Online J* 7: 8.
- Simons, A., L. G. Shaffer and R. J. Hastings, 2013 Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 Compared to the 2009 Edition. *Cytogenet Genome Res*.
- Stack, S. M., C. R. Clarke, W. E. Cary and J. T. Muffly, 1974 Different kinds of heterochromatin in higher plant chromosomes. *J Cell Sci* 14: 499-504.
- Stahl, A., J. M. Luciani, M. Devictor, A. M. Capodano and R. Gagne, 1975 Constitutive heterochromatin and micronucleoli in the human oocyte at the diplotene stage. *Humangenetik* 26: 315-327.
- Stanojevic, M., F. Stipoljev, B. Koprčina and A. Kurjak, 2000 Oculo-auriculo-vertebral (Goldenhar) spectrum associated with pericentric inversion 9: coincidental findings or etiologic factor? *J Craniofac Genet Dev Biol* 20: 150-154.
- Starke, H., J. Seidel, W. Henn, S. Reichardt, M. Volleth *et al.*, 2002 Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet* 10: 790-800.
- St Clair, D., 2009 Copy number variation and schizophrenia. *Schizophr Bull* 35: 9-12.
- Stein, R. A., 2009 A new TBX gene linked to human disease. *Clin Genet* 76: 23-24.
- Sutherland, G. R., 1979 Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet* 31: 125-135.
- Sutherland, G. R., 2003 Rare fragile sites. *Cytogenet Genome Res* 100: 77-84.
- Sutherland, G. R., and H. Eyre, 1981 Two unusual G-band variants of the short arm of chromosome 9. *Clin Genet* 19: 331-334.
- Sutherland, G. R., and P. Leonard, 1979 Heritable fragile sites on human chromosomes. IV. Silver staining. *Hum Genet* 53: 29-30.
- Sutherland, G. R., P. B. Jacky, E. Baker and A. Manuel, 1983 Heritable fragile sites on human chromosomes. X. New folate-sensitive fragile sites: 6p23, 9p21, 9q32, and 11q23. *Am J Hum Genet* 35: 432-437.
- Tadin-Strapps, M., D. Warburton, F. A. Baumeister, S. G. Fischer, J. Yonan *et al.*, 2004 Cloning of the breakpoints of a de novo inversion of chromosome 8, inv (8)(p11.2q23.1) in a patient with Ambras syndrome. *Cytogenet Genome Res* 107: 68-76.

- Tardy, E. P., A. Toth and G. Kosztolanyi, 1997 Prenatal exclusion of segmental trisomy in familial chromosome 21 pericentric inversion by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn* 17: 871-873.
- Tateno, T., I. Sasagawa, T. Sawamura, Y. Suzuki, M. Ishigooka *et al.*, 1994 Pericentric inversion of chromosome 9 associated with chordee without hypospadias. *Urol Int* 53: 107-109.
- Tawn, E. J., and R. Earl, 1992 The frequencies of constitutional chromosome abnormalities in an apparently normal adult population. *Mutat Res* 283: 69-73.
- Tayel, S. M., R. L. Al-Naggar, D. S. Krishna Murthy, K. K. Naguib and S. A. Al-Awadi, 1999 Familial pericentric inversion of chromosome 1 (p36.3q23) and Bardet-Biedl syndrome. *J Med Genet* 36: 418-419.
- Tedeschi, B., B. Porfirio, P. Vernole, D. Caporossi, B. Dallapiccola *et al.*, 1987 Common fragile sites: their prevalence in subjects with constitutional and acquired chromosomal instability. *Am J Med Genet* 27: 471-482.
- Telenius, H., A. H. Pelmeur, A. Tunnacliffe, N. P. Carter, A. Behmel *et al.*, 1992b Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 257-263.
- Telenius, H., N. P. Carter, C. E. Bebb, M. Nordenskjold, B. A. Ponder *et al.*, 1992a Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-725.
- Teo, S. H., M. Tan, L. Knight, S. H. Yeo and I. Ng, 1995 Pericentric inversion 9--incidence and clinical significance. *Ann Acad Med Singapore* 24: 302-304.
- Tomaru, M., I. Sasagawa, M. Ishigooka, T. Hashimoto, K. Izumiya *et al.*, 1994 Pericentric inversion of chromosome 9 associated with Sertoli-cell-only tubule. *Urol Int* 52: 118-120.
- Tomomasa, H., Y. Adachi, M. Iwabuchi, S. Oshio, T. Umeda *et al.*, 2000 Pericentric inversion of the Y chromosome of infertile male. *Arch Androl* 45: 181-185.
- Tonk, V., and J. Krishna, 1997 A report of a rare chromosome 9 variant with an unusual G-banding pattern in the 9qh region. *Indian J Pediatr* 64: 111-113.
- Tonk, V. S., G. N. Wilson and G. V. Velagaleti, 2001 Duplication 8 [inv dup(8)(p12p23)] with macrocephaly. *Ann Genet* 44: 195-199.
- Toth, A., M. Gaal, G. Sara and J. Laszlo, 1982 Pericentric inversion of chromosome 1 in an azoospermic man. *J Med Genet* 19: 303-305.
- Toyota, T., H. Shimizu, K. Yamada, K. Yoshitsugu, J. Meerabux *et al.*, 2001 Karyotype analysis of 161 unrelated schizophrenics: no increased rates of X chromosome mosaicism or inv(9), using ethnically matched and age-stratified controls. *Schizophr Res* 52: 171-179.
- Tran, T. H., Z. Zhang, M. Yagi, T. Lee, H. Awano *et al.*, 2013 Molecular characterization of an X(p21.2;q28) chromosomal inversion in a Duchenne muscular dystrophy patient with mental retardation reveals a novel long non-coding gene on Xq28. *J Hum Genet* 58: 33-39.
- Trunca, C., and J. M. Opitz, 1977 Pericentric inversion of chromosome 14 and the risk of partial duplication of 14q (14q31 leads to 14qter). *Am J Med Genet* 1: 217-228.
- Tsukamoto, K., T. Tohma, T. Ohta, K. Yamakawa, Y. Fukushima *et al.*, 1992 Cloning and characterization of the inversion breakpoint at chromosome 2q35 in a patient with Waardenburg syndrome type I. *Hum Mol Genet* 1: 315-317.
- Tyler-Smith, C., and W. R. Brown, 1987 Structure of the major block of alphoid satellite DNA on the human Y chromosome. *J Mol Biol* 195: 457-470.
- Udayakumar, A. M., A. V. Pathare, D. Dennison and J. A. Raeburn, 2009 Acquired pericentric inversion of chromosome 9 in acute myeloid leukemia. *J Appl Genet* 50: 73-76.
- Uehara, S., Y. Akai, Y. Takeyama, T. Takabayashi, K. Okamura *et al.*, 1992 Pericentric inversion of chromosome 9 in prenatal diagnosis and infertility. *Tohoku J Exp Med* 166: 417-427.
- Urioste, M., G. Visedo, A. Sanchis, C. Sentis, A. Villa *et al.*, 1994 Dynamic mosaicism involving an unstable supernumerary der(22) chromosome in cat eye syndrome. *Am J Med Genet* 49: 77-82.
- Valgardsdottir, R., I. Chiodi, M. Giordano, F. Cobiainchi, S. Riva *et al.*, 2005 Structural and functional characterization of noncoding repetitive RNAs transcribed in stressed human cells. *Mol Biol Cell* 16: 2597-2604.
- Van Dyke, D. L., C. G. Palmer, W. E. Nance and P. L. Yu, 1977 Chromosome polymorphism and twin zygosity. *Am J Hum Genet* 29: 431-447.

- Van Dyke, D. L., L. Weiss, J. R. Roberson and V. R. Babu, 1983 The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age. *Am J Hum Genet* 35: 301-308.
- Van Dyke, M. M., and P. B. Dervan, 1984 Echinomycin binding sites on DNA. *Science* 225: 1122-1127.
- Van Hemel, J. O., and H. J. Eussen, 2000 Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet* 107: 415-432.
- Verma, R. S., and H. A. Lubs, 1976 Inheritance of acridine orange R variants in human acrocentric chromosomes. *Hum Hered* 26: 315-318.
- Vermeulen, S. J., F. Speleman, L. Vanransbeeck, J. Verspeet, B. Menten *et al.*, 2005 Familial pericentric inversion of chromosome 18: behavioral abnormalities in patients heterozygous for either the dup(18p)/del(18q) or dup(18q)/del(18p) recombinant chromosome. *Eur J Hum Genet* 13: 52-58.
- Vianna-Morgante, A. M., M. J. Nozaki, C. C. Ortega, V. Coates and Y. Yamamura, 1976 Partial monosomy and partial trisomy 18 in two offspring of carrier of pericentric inversion of chromosome 18. *J Med Genet* 13: 366-370.
- von Beust, G., and K. Bink, 1999 Extra euchromatic band in the qh region of chromosome 9. *Fetal Diagn Ther* 14: 35-37.
- Vujisic, S., F. Stipoljev, R. Bauman, R. Dmitrovic and D. Jezek, 2005 Pericentric inversion of chromosome 2 in a patient with the empty follicle syndrome: case report. *Hum Reprod* 20: 2552-2555.
- Wan, T. S., S. K. Ma and L. C. Chan, 2000 Acquired pericentric inversion of chromosome 9 in essential thrombocythemia. *Hum Genet* 106: 669-670.
- Wang, H. S., and J. L. Hamerton, 1979 C-Band polymorphisms of chromosomes 1, 9, and 16 in four subgroups of mentally retarded patients and a normal control population. *Hum Genet* 51: 269-275.
- Warburton, P. E., and H. F. Willard, 1990 Genomic analysis of sequence variation in tandemly repeated DNA. Evidence for localized homogeneous sequence domains within arrays of alpha-satellite DNA. *J Mol Biol* 216: 3-16.
- Waye, J. S., and H. F. Willard, 1989 Human beta satellite DNA: genomic organization and sequence definition of a class of highly repetitive tandem DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6250-6254.
- Weinhausel, A., and O. A. Haas, 2001 Evaluation of the fragile X (FRAXA) syndrome with methylation-sensitive PCR. *Hum Genet* 108: 450-458.
- Wenger, S. L., C. Cutenese and L. R. Brancazio, 1999 Detection of pericentric inversion of X chromosome in a male fetus. *Am J Med Genet* 87: 339-341.
- Wenstrom, K. D., A. C. Muilenburg, S. R. Patil and J. W. Hanson, 1991 Unique phenotype associated with a pericentric inversion of chromosome 6 in three generations. *Am J Med Genet* 39: 102-105.
- Wevrick, R., and H. F. Willard, 1989 Long-range organization of tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromeres of human chromosomes: high-frequency array-length polymorphism and meiotic stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9394-9398.
- Willard, H. F., 1990 Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet* 6: 410-416.
- Willard, H. F., and J. S. Waye, 1987 Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. *J Mol Evol* 25: 207-214.
- Willatt, L. R., J. C. Barber, A. Clarkson, I. Simoncic, F. L. Raymond *et al.*, 2007 Novel deletion variants of 9q13-q21.12 and classical euchromatic variants of 9q12/qh involve deletion, duplication and triplication of large tracts of segmentally duplicated pericentromeric euchromatin. *Eur J Hum Genet* 15: 45-52.
- Winsor, E. J., C. G. Palmer, P. M. Ellis, J. L. Hunter and M. A. Ferguson-Smith, 1978 Meiotic analysis of a pericentric inversion, inv(7) (p22q32), in the father of a child with a duplication-deletion of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* 20: 169-184.
- Wojiski, S. A., C. H. Rhodes, C. A. Brodhurst, T. K. Mohandas, J. P. Park, 1997 The G positive band of the rare euchromatic 9qh variant is derived from 9p12. *Appl Cytogenet* 23: 125-129.
- Xu, W., C. Robert, P. S. Thornton and N. B. Spinner, 2003 Complete androgen insensitivity syndrome due to X chromosome inversion: a clinical report. *Am J Med Genet A* 120A: 434-436.
- Yamada, K., 1992 Population studies of INV(9) chromosomes in 4,300 Japanese: incidence, sex difference and clinical significance. *Jpn J Hum Genet* 37: 293-301.

- Yasuhara, T., A. Okamoto, T. Kitagawa, T. Nikaido, T. Yoshimura *et al.*, 2005 FGF7-like gene is associated with pericentric inversion of chromosome 9, and FGF7 is involved in the development of ovarian cancer. *Int J Oncol* 26: 1209-1216.
- Yunis, J. J., 1981 Mid-prophase human chromosomes. The attainment of 2000 bands. *Hum Genet* 56: 293-298.
- Yunis, J. J., D. W. Ball and J. R. Sawyer, 1979 G-banding patterns of high-resolution human chromosomes 6--22, X, and Y. *Hum Genet* 49: 291-306.
- Yunis, J. J., J. R. Sawyer and D. W. Ball, 1978 The characterization of high-resolution G-banded chromosomes of man. *Chromosoma* 67: 293-307.
- Yurov, Y. B., S. P. Mitkevich and I. A. Alexandrov, 1987 Application of cloned satellite DNA sequences to molecular-cytogenetic analysis of constitutive heterochromatin heteromorphisms in man. *Hum Genet* 76: 157-164.
- Zenker, M., and H. G. Dorr, 2000 A case associated with Walker Warburg syndrome phenotype and homozygous pericentric inversion 9: coincidental finding or aetiological factor? *Acta Paediatr* 89: 750-751.
- Zhang, F., L. Potocki, J. B. Sampson, P. Liu, A. Sanchez-Valle *et al.*, 2010 Identification of uncommon recurrent Potocki-Lupski syndrome-associated duplications and the distribution of rearrangement types and mechanisms in PTLs. *Am J Hum Genet* 86: 462-470.
- Zimmer, C., B. Puschendorf, H. Grunicke, P. Chandra and H. Venner, 1971 Influence of netropsin and distamycin A on the secondary structure and template activity of DNA. *Eur J Biochem* 21: 269-278.
- Zweier, C., H. Sticht, I. Aydin-Yaylagul, C. E. Campbell and A. Rauch, 2007 Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. *Am J Hum Genet* 80: 510-517.

7. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Molekularzytogenetische Charakterisierung der
perizentrischen Inversion des Chromosoms 9**

-

Bruchpunktanalyse und zusätzliche Strukturaberrationen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München,

9. Danksagung

Bei Frau Prof. Steinlein möchte ich für die Möglichkeit danken, an ihrem Institut die Doktorarbeit anfertigen zu können, sowie für die Übernahme des Gutachtens.

Bei Herrn PD Dr. rer. nat. Stefan Müller als Betreuer bedanke ich mich für die zahlreichen praktischen und theoretischen Anregungen bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit und die damit verbundene Unterstützung.

Herrn Dr. med. Eric Aichinger und Frau Dr. med. Martina Pfob danke ich für die telefonische Kontaktaufnahme zu den ehemaligen Ratsuchenden des Instituts für Humangenetik während der Rekrutierungsphase. Weiterhin bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei PD Dr. med. Yasemin Mehraein, Dr. rer. nat. Michaela Neusser, Barbara Tacke, Gabriele Reiling, Elzbieta Staniszewski, Annika Oelsner, Reinhild Joswig und Daniela Rudolph.

Für das zur Verfügung stellen einiger in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chromosomenabbildungen bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Sabine Langer-Freitag vom Institut für Humangenetik der Technischen Universität München sowie bei Frau Dr. med. Dr. rer. nat. Claudia Nevinny-Stickel-Hinzpeter und Frau Dr. rer. nat. Birgit Becker von synlab – Humane Genetik München. Außerdem bedanke ich mich für zahlreiche Anregungen bei Dr. rer. nat. Birgit Becker, Dr. rer. nat. Stefanie Bug-Tönnies, Anke Konwald-Cindric, Bettina Träxler, Sylvia Grün, Tina Kaupert, Jana Pricelius, Sabine Menzel-Krug und Valentina Orlovsky.

Ein besonderer Dank gilt natürlich den Probanden, die sich zur Teilnahme an der vorliegenden Arbeit bereit erklärt haben und ohne die diese nicht realisiert hätte werden können.

Zu guter Letzt bedanke ich mich für die langjährige und unermüdliche Unterstützung nicht nur während der Anfertigung dieser Doktorarbeit, sondern auch während des Studiums bei meinen Eltern, meinen Großeltern und bei Michael.