

## **2. Eigene Arbeiten**

In den hier vorgestellten Arbeiten erfolgte die phänotypische Analyse anhand klinisch-morphologischer Merkmale. Die Chromosomenanalysen aus verschiedenen Geweben und die DNA-Isolation wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Als Methoden der molekulargenetischen und molekularzytogenetischen Diagnostik kamen folgende Standardmethoden zur Anwendung, die in den Arbeiten beschrieben wurden:

1. Auf Mikrosatelliten basierende Kopplungsanalyse  
(siehe Horn et al., 2000; Hennies et al., 2004)
2. Sequenzierung genomischer DNA nach PCR-Amplifikation  
(siehe Turkmen et al., 2003; Hennies et al., 2004; Horn et al., 2004; Horn et al., 2005; Seifert et al., 2006, Zweier et. al.; 2006; Zenker et al., 2007)
3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung  
(siehe Horn et al., 1995; Horn et al., 1997; Horn et al., 2003; Horn et al., 2004, Zweier et al., 2006).

### **2.1 Monogene syndromale Krankheitsbilder mit mentaler Retardierung**

#### **2.1.1 Das Cohen-Syndrom**

##### **2.1.1.1 Klinische Daten einer multipel konsanguinen Familie und Ergebnisse der Kopplungsanalyse**

Das durch Cohen et al. 1973 abgegrenzte autosomal rezessive Krankheitsbild ist durch die Hauptsymptome mentale Retardierung, muskuläre Hypotonie, Mikrozephalie, Kleinwuchs, kraniofaziale Dysmorphie und Adipositas gekennzeichnet (Cohen et al., 1973) (MIM 216550). Anhand der Beschreibung weiterer Patienten wurden als zusätzliche spezifische Symptome ophthalmologische Probleme (progressive Myopie, Retinitis pigmentosa) sowie eine milde bis moderate Neutropenie, die selten zu einer erhöhten Infektionsneigung führt, erkannt (Norio et al., 1984; Kivitie-Kallio et al., 1997; Kivitie-Kallio et al., 2001). Eine

intrafamiliäre Variabilität ist ausgeprägt (Fryns et al., 1996). Anhand des klinischen Bildes sind bisher mehr als 150 Patienten beschrieben worden.

Nach unauffälligen Maßen in der Säuglingsperiode entwickelt sich bei Patienten mit Cohen-Syndrom ab dem 6. Lebensmonat eine zunehmende Mikrozephalie. Alle Patienten zeigen ab dem Säuglingsalter eine muskuläre Hypotonie. Die Myopie erreicht ab der Kindheit in der Regel Werte über -6 Dioptrien.

Der Visusverlust - verursacht durch die Retinopathie - beginnt ab dem 5. Lebensjahr, nach dem 40. Lebensjahr verschlechtert sich der Visus rapide, eine vollständige Erblindung tritt aber nicht auf. Die Mehrheit der Patienten weist eine schwere psychomotorische Retardierung auf, selten kann auch nur ein leichter Schweregrad einer Retardierung bestehen. MRT-Untersuchungen des Schädels bei Betroffenen zeigen eine in Relation zum Gehirn vermehrte Dicke des Corpus callosum (Kivitie-Kallio et al., 2001).

Die milden fazialen Auffälligkeiten bestehen in einer Hypoplasie der Nasenflügel, einem kurzen Philtrum, einer nach außen abfallenden Lidachse und einer milden Ptosis des Oberlides. Aufgrund der sich erst später entwickelnden ophthalmologischen Symptomatik und der diskreten kraniofazialen Dysmorphiezeichen ist eine frühe klinische Diagnose schwierig (Fryns et al., 1996). Die in der Literatur berichteten Patienten wurden daher meist erst ab dem 5. - 10. Lebensjahr diagnostiziert. Die Pathogenese dieses pleiotropen Syndroms konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Aufgrund des breiten Spektrums an Symptomen und der in der Vergangenheit nicht festgelegten diagnostischen Kriterien ist eine Heterogenie innerhalb der als Cohen-Syndrom publizierten Fälle nicht auszuschließen.

Einen relativ homogenen Phänotyp lassen finnische Patienten mit Cohen-Syndrom erkennen. Durch Kopplungsuntersuchungen bei diesen Patienten wurde auf eine Kandidatengen-Region auf Chromosom 8q21.3 - 8q22.1 in einer kritischen Region von 10 centiMorgan (cM) geschlossen (Kolehmainen et al., 1997). Haplotypuntersuchungen innerhalb dieser Patientengruppe zeigten die Existenz einer „founder mutation“ bei der Mehrheit der finnischen Patienten an.

Innerhalb einer multipel konsanguinen libanesischen Familie wurden von uns mehrere Patienten mit schwerer mentaler Retardierung, Mikrozephalie, Kleinwuchs, muskulärer Hypotonie, chorioretinaler Dystrophie und Myopie klinisch charakterisiert (Horn et al., 2000). Eine Kartierung durch eine auf Mikrosatelliten-Markern basierende Kopplungsanalyse ergab in dieser Familie eine Übereinstimmung zu dem bei finnischen

Familien gefundenen Genort für das Cohen-Syndrom in einer Region von 26,8 cM (Abb. 1). Des weiteren wurden aufgrund unserer Analysen die diagnostischen Kriterien für das Cohen-Syndrom überarbeitet. Als diagnostische Hauptkriterien wurde die Kombination folgender Symptome vorgeschlagen: Mikrozephalie mit typischem fazialen Aspekt, mentale Retardierung, Myopie oder/und Retinitis pigmentosa.

Als zusätzliches diagnostisches Kriterium sollte eine Neutropenie aufgenommen werden, da sie bei der Mehrzahl der publizierten Patienten nachgewiesen wird. Ein Kleinwuchs wird nur bei der Hälfte der Patienten gefunden und sollte daher nicht als obligates Kriterium gewertet werden. Eine Adipositas liegt ebenfalls nur bei der Hälfte der Patienten vor und sollte als weiteres fakultatives Symptom gelten.

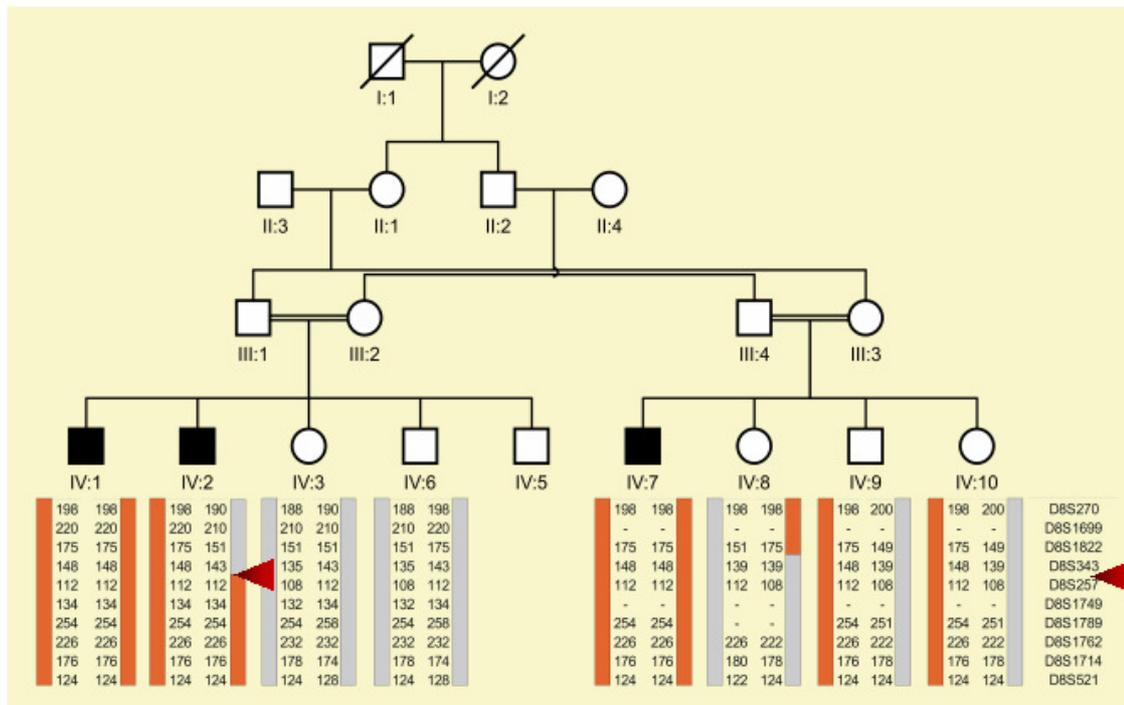


Abb. 1: Stammbaum und Kopplungsdaten der betroffenen Familie.

**Originalarbeit:**

**Horn D, Krebsová A, Kunze J, Reis A. (2000).** Homozygoty mapping in a family with microcephaly, mental retardation, and short stature to a Cohen syndrome region on chromosome 8q21.3-8q22.1: redefining a clinical entity. *Am J Med Genet* 92: 285-92.

### 2.1.1.2 Klinische und molekulargenetische Studien an mehreren Patientenkohorten

Im Jahr 2003 wurden erstmals Mutationen in *COH1* bei Patienten mit Cohen-Syndrom beschrieben (Kolehmainen et al., 2003). Das von den Autoren definierte, unbekannte Gen lag in der zuvor beschriebenen Kandidatengen-Region (Tahvanainen et al., 1994; Kolehmainen et al., 1997; Horn et al., 2000) und umfasste mehrere, in der genomischen Sequenz annotierte unbekannte Transkripte *FLJ20583*, *MGC45726* und *KIAA0532*.

Das längste Transkript hat eine Länge von 14093 Basenpaaren (bp) und überdeckt eine genomische Region von 864 Kilobasen (kb). Das Gen, das zunächst *COH1* genannt wurde, ist aus 62 Exons aufgebaut. Es wurden mehrere Spleißvarianten beschrieben, die bisher jedoch nicht funktionell untersucht worden sind (Kolehmainen et al. 2003). Vorliegende Daten aus Expressionsuntersuchungen sind bisher inkonsistent, deuten aber auf eine oft schwache Expression in zahlreichen Geweben hin (Mochida et al., 2004).

Während die 2003 untersuchte Patientenkohorte hauptsächlich der finnischen Population entstammte, wurden von unserer Arbeitsgruppe Mutationen in *VPS13B* (vormals *COH1*) auch in Patienten mit einem breiten ethnischen Hintergrund gefunden (Hennies et al., 2004). Es wurde eine Gruppe von 20 Patienten, die aus 12 Familien aus Deutschland, Polen, der Türkei, dem Libanon, dem Oman und Brasilien stammten, klinisch und molekulargenetisch analysiert, darunter auch solche, die einen überlappenden Phänotyp von Cohen- und Mirhosseini-Holmes-Walton-Syndrom (MIM 268050), einem sehr selten beschriebenen Krankheitsbild, das bisher klinisch vom Cohen-Syndrom abgegrenzt wurde, zeigten (Mirhosseini et al., 1972; Mendez et al., 1985). Alle Patienten waren homozygot oder compound heterozygot für Mutationen in *VPS13B*. 17 Mutationen waren neu beschriebene Mutationen, die überwiegend zu einem vorzeitigen Abbruchsignal führten. Anhand des klinischen Spektrums dieser Patientengruppe wurden die klinischen Kriterien für die Diagnosestellung erweitert: Alle Patienten zeigten als übereinstimmende Befunde eine mentale Retardierung, eine früh manifeste Myopie, eine Gelenküberstreckbarkeit und die charakteristischen fazialen Auffälligkeiten.

Eine Pigmentretinopathie, Mikrozephalie und Neutropenie stellten sich als nicht konstante klinische Zeichen bei der Patientengruppe mit nachgewiesenen Mutationen dar und müssen daher nicht zwingend für die Diagnosestellung vorhanden sein.

Als weiteres Ziel der Studie sollten die klinische Variabilität und das Mutationsspektrum des Cohen-Syndroms detailliert untersucht werden. Aus diesem Grund wurde eine weitere Analyse mit 24 neuen Patienten aus 16 Familien durchgeführt, bei denen 25 Mutationen, von diesen 19 das erste Mal, beschrieben wurden (Seifert et al., 2006). Dabei wurden acht Mutationen mit Leserasterverschiebung, vier Spleiß-Mutationen, drei größere In-Frame-Deletionen und eine Missense-Mutation dargestellt. Durch den Nachweis von Mutationen bei dieser Patientengruppe konnte das klinische Spektrum des Erkrankungsbildes breiter definiert werden. Die ophthalmologische Symptomatik (Myopie, Pigmentretinopathie) stellte sich bei einigen Patienten mit nachgewiesenen Mutationen als nicht konstantes Merkmal dar.

Die typische faziale Dysmorphie (Abb. 2), die bisher bei allen Patienten dokumentiert worden war, lag bei einem der Patienten mit Nachweis einer Compound-Heterozygotie nicht vor. Klinische Daten aus dem späteren Erwachsenenalter, die den Verlauf der Erkrankung dokumentieren, sind bisher sehr selten publiziert worden. Wir konnten in unserer Studie nachweisen, dass die ophthalmologischen Symptome progredient sind und zur Erblindung der Betroffenen führen. Diese Progression der Pigmentretinopathie bis zur Erblindung war in anderen Untersuchungen nicht gesehen worden (Kivitie-Kallio et al., 2001). Anhand des Verlaufs des Erkrankungsbildes bei Patienten im höheren Erwachsenenalter lässt sich vermuten, dass keine eingeschränkte Lebenserwartung bei dieser syndromalen Erkrankung besteht. Mit unseren Ergebnissen konnten wir eine ausgeprägte allelische Heterogenität des Cohen-Syndroms demonstrieren. Wie wir und andere gezeigt haben, sind nahezu alle bekannten Mutationen in *VPS13B* einmalig. Interessanterweise sind 61 von insgesamt 73 bisher identifizierten Mutationen solche, die ein vorzeitiges Stopp-Kodon bewirken. Sechs weitere Mutationen sind größere In-Frame-Deletionen. Somit sind nur sechs möglicherweise pathogene Missense-Mutationen bisher beschrieben worden, die jedoch funktionell noch nicht charakterisiert werden konnten.

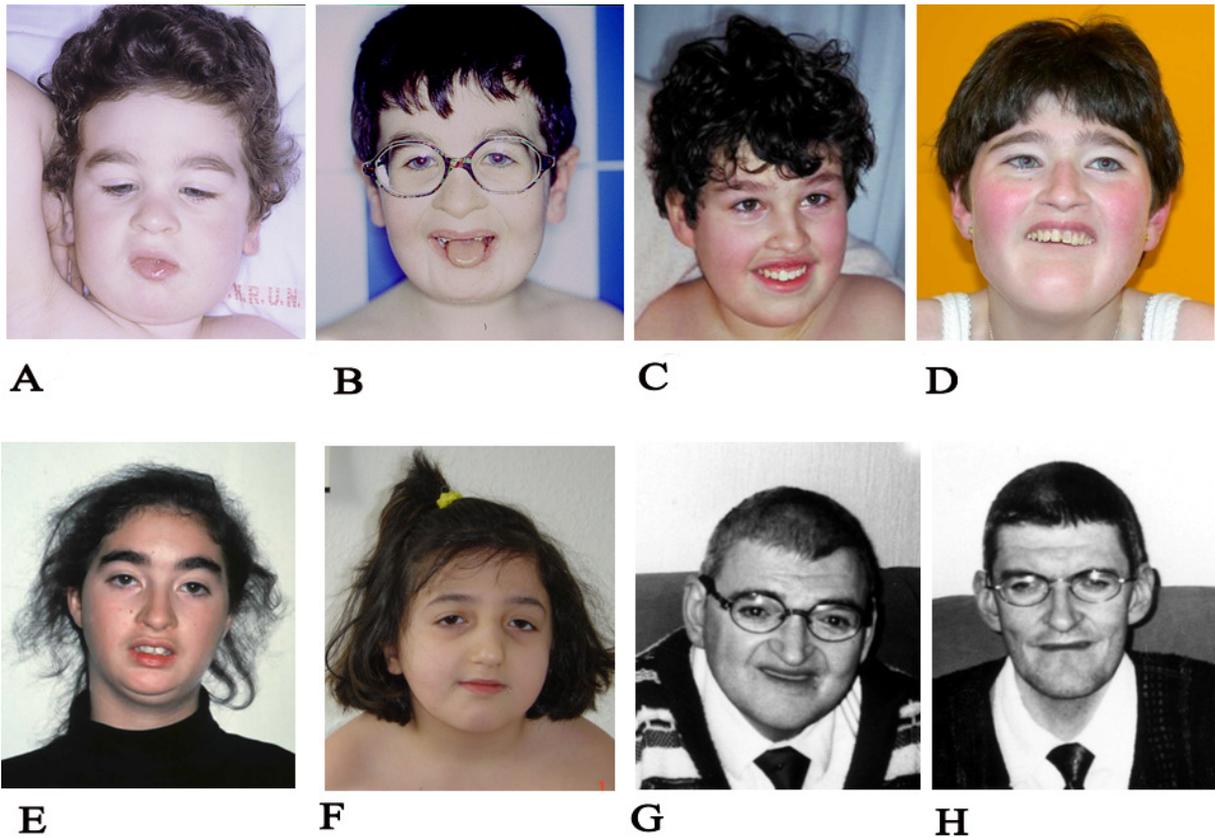


Abb. 2: Typische kraniofaziale Dysmorphie bei Patienten mit Mutationen in *COH1* in unterschiedlichen Alterstufen (von 2,5 - 60 Jahren).

### Originalarbeiten:

Hennies HC, Rauch A, Seifert W, Schumi C, Moser E, Al Taji E, Tariverdian G, Chrzanowska KH, Krajewska-Walasek M, Rajab A, Giugliani R, Neumann TE, Eckl KM, Karbasiyan M, Reis A, **Horn D.** (2004). Allelic heterogeneity in the *COH1* gene explains clinical variability in Cohen syndrome. *Am J Hum Genet* 75: 138-45.

Seifert W, Holder-Espinasse M, Spranger S, Hoeltzenbein M, Rossier E, Dollfus H, Lacombe D, Verloes A, Chrzanowska KH, Maegawa GHB, Chitayat D, Kotzot D, Huhle D, Meinecke P, Albrecht B, Mathijssen I, Leheup B, Raile K, Hennies HC, **Horn D.** (2006). Mutational spectrum of *COH1* and clinical heterogeneity in Cohen syndrome. *J Med Genet* 43: e22.

### **2.1.2 Das phänotypische und genotypische Spektrum bei Patienten mit Noonan-Syndrom, Kardio-Fazio-Kutanem Syndrom und Costello-Syndrom und assoziierten KRAS-Mutationen**

Das Noonan-Syndrom (MIM 163950), das Kardio-Fazio-Kutane Syndrom (MIM 115150) und das Costello-Syndrom (MIM 218040) bilden eine Gruppe von autosomal dominanten Erkrankungen mit mentaler Retardierung, die zudem ein überlappendes Muster kongenitaler Anomalien aufweisen. Diese beinhalten eine ähnliche kraniofaziale Dysmorphie, typische Herzfehler und einen Kleinwuchs. Die Differenzierung innerhalb dieser Erkrankungen basiert auf dem Vorhandensein bestimmter klinischer Zeichen, so findet man bei den Patienten mit dem Kardio-Fazio-Kutanen Syndrom zusätzliche Haut- und Haaranomalien sowie eine hyperelastische Haut im Hand- und Fußbereich bei Patienten mit Costello-Syndrom. Die mentale Retardierung ist bei Patienten mit Kardio-Fazio-Kutanem Syndrom und Costello-Syndrom stärker ausgeprägt, während Patienten mit Noonan-Syndrom durch milde kognitive Defizite oder eine normale Intelligenz charakterisiert sind. Nach heutigem Wissen werden diese Erkrankungen durch Keimbahnmutationen von Schlüsselkomponenten des hochkonservierten Ras-MAPK-Signalweges verursacht. Dieser gemeinsame Signalweg lässt eine ähnliche Pathogenese wahrscheinlich erscheinen (Kratz et al., 2006; Niihori et al., 2006). Ursächliche Mutationen in *PTPN11* wurden bei ca. 50 % der Patienten mit Noonan-Syndrom nachgewiesen, bei Patienten mit Kardio-Fazio-Kutanem Syndrom ließen sich Mutationen in *BRAF*, *MEK1* und *MEK2* darstellen (Tartaglia et al., 2001; Tartaglia et al., 2002). Das Costello-Syndrom fand man bislang mit Mutationen in *HRAS* assoziiert (Aoki et al., 2005; Gripp et al., 2006).

KRAS repräsentiert innerhalb dieser Kaskade ein hochkonserviertes Transduktions-Molekül und ist als Proto-Onkogen bei verschiedenen Formen von Krebserkrankungen beim Menschen bekannt (Schubbert et al., 2006).

Bei unseren Untersuchungen von 276 Patienten mit dem klinischen Spektrum von Noonan-Syndrom, dem Kardio-Fazio-Kutanen Syndrom und dem Costello-Syndrom wurden 12 Missense-Mutationen in *KRAS* detektiert, wovon acht erstmals beschrieben wurden (Zenker et al., 2007). Alle Mutationen betreffen hochkonservierte Bereiche des KRAS-

Gens und sind in der Nähe von sogenannten „hot spots“ für bekannte Keimbahn- und somatische Mutationen lokalisiert.

Zwei der nachgewiesenen Mutationen, K5N und Q22R, sind auch als somatische Mutationen in Tumoren beschrieben. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den bisherigen molekulargenetischen Daten, die keine Überlappung von Keimbahn- und somatischen Mutationen ergaben. Somit muss für die Patienten mit K5N und Q22R von einem erhöhten Tumorrisiko ausgegangen werden. Funktionelle Experimente lassen Effekte eines Funktionsgewinns für die von uns detektierten Mutationen vermuten.

Das phänotypische Spektrum wird anhand der bisher größten Patientengruppe, deren Krankheitsbild mit KRAS-Mutationen assoziiert ist, durch unsere Untersuchungen erweitert, weil erstmals auch bei Patienten mit Costello-Syndrom KRAS-Mutationen nachgewiesen wurden.

Bei den Patienten mit KRAS-Mutationen findet sich eine mentale Retardierung als ein konstantes klinisches Zeichen, während in den untersuchten Patientenkohorten mit Noonan-Syndrom und assoziierten PTPN11-Mutationen ein Anteil von nur 24 % eine mentale Retardierung zeigte. Somit stellt sich eine weitere Abgrenzung der durch KRAS-Mutationen verursachten Symptomatik dar.

### **Originalarbeit:**

Zenker M, Lehmann K, Schulz AL, Barth H, Hansmann D, Koenig R, Korinthenberg R, Kreiß-Nachtsheim M, Meinecke P, Morlot S, Mundlos S, Quante AS, Raskin S, Schnabel D, Wehner LA, Kratz CP, **Horn D\***, Kutsche K\*. (2007). Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations. *J Med Genet.* 44(2): 131-5.

\*Gemeinsame Letztautorenschaft

### **2.1.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit Sotos-Syndrom und bei Patienten mit weiteren Erkrankungsbildern mit mentaler Retardierung und Großwuchs**

Das Sotos-Syndrom (MIM 117550) weist neben einer mentalen Retardierung als Hauptsymptome einen Hochwuchs, eine Makrozephalie und eine spezielle faziale Dysmorphie auf, die durch eine längliche Gesichtsform, eine betonte Stirn mit hohem Stirnhaaransatz, eine nach außen abfallende Lidachse und ein dreieckförmiges, zurückliegendes Kinn bestimmt wird.

Als Ursache des autosomal dominanten Sotos-Syndroms wurden Punktmutationen und Deletionen des „nuclear receptor binding SED domain 1“ (NSD1)-Gens auf Chromosom 5q35 identifiziert (Kurotaki et al., 2002; Douglas et al., 2003). NSD1 gehört zur Gruppe der Kernrezeptoren, die eine Rolle beim Zellwachstum und der Differenzierung spielen.

Das Weaver-Syndrom (MIM 277590), das ebenfalls durch einen Hochwuchs gekennzeichnet ist, lässt sich anhand anderer fazialer Merkmale und bestimmter radiologischer Zeichen abgrenzen. Aufgrund in der Literatur beschriebener Fälle, die ein überlappendes klinisches Spektrum von Sotos- und Weaver-Syndrom boten, ließ sich nicht ausschließen, dass es sich um allelische Krankheitsbilder handelt (Opitz et al., 1998).

Zur Untersuchung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation wurden in unserer Studie 21 Patienten (einschließlich eines familiären Falles) mit Sotos-Syndrom, fünf Patienten mit Weaver-Syndrom, sechs Patienten mit unklassifiziertem Hochwuchs und mentaler Retardierung und sechs Patienten mit Makrozephalie und mentaler Retardierung auf Vorliegen einer Mutation im NSD1-Gen analysiert (Turkmen et al., 2003). In 90 % der klinisch als Sotos-Syndrom klassifizierten Patienten ließen sich verschiedene heterozygote Mutationen (Nonsense-Mutationen, Frameshift-Mutationen, Spleiß-Mutationen, Missense-Mutationen, In-frame-Deletion) nachweisen.

Die höchste Korrelation zwischen klinischer Einschätzung und Vorliegen einer NSD1-Mutation ergab sich bei Vorhandensein des typischen fazialen Aspektes in Kombination mit Hochwuchs, Makrozephalie und mentaler Retardierung.

Die Diagnose Sotos-Syndrom ließ sich molekulargenetisch auch bei einzelnen Patienten bestätigen, die keinen Hochwuchs oder keine Makrozephalie aufwiesen, aber andere typische Manifestationen dieses Syndroms hatten.

Die untersuchten anderen Patientenkohorten mit Weaver-Syndrom, unklassifiziertem Hochwuchs/mentaler Retardierung und mit Makrozephalie/mentaler Retardierung zeigten keine Assoziation zu NSD1-Alterationen. Im Kontrast zu Ergebnissen anderer Gruppen fanden sich in unserem Patientenkollektiv keine Deletionen des gesamten NSD1-Gens (Douglas et al., 2003; Baujat et al., 2005).

In einer Multicenterstudie, in die klinische und molekulargenetische Daten von 266 Patienten mit Sotos-Syndrom einfließen, fanden sich in 93 % intragenische NSD1-Mutationen und in 10 % Mikrodeletionen im Bereich von Chromosom 5q35 (Tatton-Brown et al., 2005). Im Vergleich zu Patienten mit Punktmutationen zeigten Patienten mit einer Mikrodeletion einen weniger betonten Hochwuchs und eine stärkere mentale Retardierung. Der Anteil von familiären Fällen innerhalb dieser Studiengruppe war mit 13 Fällen gering, wofür ursächlich eine verminderte reproduktive Funktion der betroffenen erwachsenen Patienten vermutet wird.

### **Originalarbeiten:**

Turkmen S, Gillessen-Kaesbach G, Meinecke P, Albrecht B, Neumann LM, Hesse V, Palanduz S, Balg S, Majewski F, Fuchs S, Zscheschang P, Greiwe M, Mennicke K, Kreuz F, Dehmel HJ, Kunze J, Tinschert S, Mundlos S, **Horn D.** (2003). NSD1 mutations are responsible for Sotos syndrome, but are not present in other overgrowth phenotypes. *Eur J Hum Genet* 11(11): 858-65.

Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, Baujat G, Cole TR, Das S, **Horn D**, Hughes HE, Temple IK, Faravelli F, Waggoner D, Turkmen S, Cormier-Daire V, Irrthum A, Rahman N. (2005). Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. *Am J Hum Genet.* 77(2): 193-204.

#### **2.1.4 Klinische Untersuchungen bei Patienten mit Okulo-Fazio-Kardio-Dentalem Syndrom und Lenz-Mikrophthalmie-Syndrom und Resultate der BCOR-Mutationsanalyse**

Das Okulo-Fazio-Kardio-Dentale Syndrom (OFCD, MIM 300166) wird mit X-chromosomal dominanter Grundlage weitergegeben, bei der eine Letalität im männlichen Geschlecht angenommen wird.

Weibliche Betroffene weisen kongenitale Katarakte, eine Mikrophthalmie, angeborene Herzfehler, dentale Anomalien und eine faziale Dysmorphie auf (Opitz et al., 1998; Schulze et al., 1999). Ein Teil der weiblichen Betroffenen zeigt eine mentale Retardierung. Das Lenz-Mikrophthalmie-Syndrom (MIM 309800) ist X-chromosomal rezessiv bedingt, die männlichen Betroffenen fallen durch eine Mikrophthalmie/Anophthalmie, eine mentale Retardierung, urogenitale und skelettale Anomalien auf. Für das Lenz-Mikrophthalmie-Syndrom sind zwei genetische Loci auf dem X-Chromosom bestimmt worden: Xq27-q28 und Xp11.4-p21.2. Mutationen im BCOR-Gen auf Chromosom Xp11.4 sind als Ursache des OFCD identifiziert worden (Ng et al., 2004).

Eine Missense-Mutation in nur einer einzigen Familie mit vermutetem Lenz-Mikrophthalmie-Syndrom wurde detektiert (Ng et al. 2004), sodass unklar blieb, ob Mutationen im BCOR-Gen ursächlich für dieses Syndrom bei umfangreicheren Patientenkollektiven sind. Bei den drei Patienten mit OFCD wurden durch Sequenzierung und FISH-Untersuchungen im BCOR-Gen zwei kleine Deletionen (c.2488\_2489delAG und c.3286delG) und eine submikroskopische Deletion von ca. 60 kb, welche die BCOR-Exons 2 - 15 umfasst, nachgewiesen (Horn et al., 2005). Die Detektion von den dargestellten Frameshift-Mutationen und der Deletion, die fast das gesamte Gen beinhaltet, lässt auf ein funktionelles Null-Allel als Mechanismus schließen. Mutationen in *BCOR* bei acht Patienten mit dem klinischen Bild eines Lenz-Mikrophthalmie-Syndroms, die neben der mentalen Retardierung und der Mikrophthalmie/Anophthalmie eine breite Assoziation von weiteren Anomalien wie Katarakte, urogenitale Fehlbildungen und Syndaktylien zeigten, wurden ausgeschlossen (Horn et al., 2005). Dieses Ergebnis legt nahe, dass *BCOR* nicht das hauptsächliche Gen für dieses Syndrom ist. Basierend auf den Kopplungsdaten

von weiteren Familien mit Lenz-Mikrophthalmie-Syndrom sollte sich die Kandidatengensuche auf den Locus Xq27-q28 konzentrieren.

### **Originalarbeiten:**

Schulze BRB, **Horn D**, Kobelt A, Tariverdian G, Stellzig A. (1999). Rare dental abnormalities seen in oculo-facio-cardio-dental (OFCD) syndrome: three new cases and review of nine patients. *Am J Med Genet* 82: 429-35.

**Horn D**, Chyrek M, Kleier S, Lüttgen S, Bolz H, Hinkel G, Korenke GC, Rieß A, Schell-Apacik C, Tinschert S, Wiczorek D, Gillessen-Kaesbach G, Kutsche K. (2005). Novel mutations in BCOR in three patients with oculo-facio-cardio-dental syndrome, but none in Lenz microphthalmia syndrome. *Eur J Hum Genet* 13(5): 563-9.

### 2.1.5 Klinische Evaluation und molekulare Befunde bei Patienten mit Mowat-Wilson-Syndrom

Das Mowat-Wilson-Syndrom (MWS, MIM 235730) wurde in den letzten Jahren klinisch definiert und weist als diagnostische Kriterien eine schwere mentale Retardierung sowie eine spezifische faziale Dysmorphie mit Hypertelorismus, medial verbreiterten Augenbrauen, prominenter Columella und mit einer Ohrmuscheldysplasie auf. Zusätzliche Symptome können ein Morbus Hirschsprung, angeborene Herzfehler, eine Agenesie des Corpus callosum sowie eine Epilepsie sein (Zweier et al., 2002). Heterozygote Nonsense- und Frameshift-Mutationen oder Deletionen des „Zinc finger homeobox 1B“-Gens (ZFHX1B-Gen, MIM 605802), das für ein Smad interagierendes Protein 1 kodiert, konnten ursächlich nachgewiesen werden (Zweier et al., 2002; Mowat et al., 2003). ZFHX1B-Haploinsuffizienz wird somit als krankheitsverursachender Mechanismus angesehen. Wegen des häufig berichteten Auftretens eines Morbus Hirschsprungs bei den Patienten wurde das MWS in der Vergangenheit als Form des syndromalen Morbus Hirschsprung angesehen. Wir bestätigten die Diagnose eines MWS bei zwei Patienten, die keinen Morbus Hirschsprung aufwiesen und dokumentierten damit, dass die Diagnosestellung bei vorhandener mentaler Retardierung durch den spezifischen fazialen Aspekt gelingt (Horn et al., 2004). Durch Sequenzierung des ZFHX1B-Gens konnte bei Patient 1 eine heterozygote *de novo* Stopp-Mutation R343X in Exon 8 nachgewiesen werden, die ein verkürztes Protein zur Folge hat, dem die Smad-bindende Domäne und die C-terminal gelegene Zinc-finger Domäne fehlen. FISH-Analysen bei Patient 2 stellten eine *de novo* Deletion des gesamten ZFHX1B-Gens dar.

Patienten mit Deletionen des gesamten Gens und ohne Manifestation eines Morbus Hirschsprung waren bisher nicht in der Literatur bekannt. Die Ergebnisse zeigen damit an, dass die Deletion des gesamten Gens sowie Mutationen im Exon 8 nicht zwingend mit einem Morbus Hirschsprung assoziiert sind und es sich damit um ein variables Symptom dieses Krankheitsbildes handelt.

Bei einem weiteren Patienten mit nur milder mentaler Retardierung und ohne Manifestation von Organfehlbildungen wurde aufgrund der diskreten fazialen Dysmorphie eine Sequenzierung des ZFHX1B-Gens durchgeführt, die das Vorliegen einer

heterozygoten *de novo* Spleiß-Mutation c.1-70G>A an der Spleiß-Akzeptorstelle von Exon 2 darstellte, die zum Fehlen des Exons 2 des Transkripts führt (Zweier et al., 2006). Das resultierende Protein unterscheidet sich nur in den ersten 24 Aminosäuren vom Wildtyp und enthält somit alle funktionellen Domänen des Gens, zeigt aber ein Fehlen des N-Terminus. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der N-Terminus von ZFHX1B Bedeutung für die neuronale Funktion und die Ausbildung fazialer Strukturen hat.

**Originalarbeiten:**

**Horn D**, Weschke B, Zweier C, Rauch A. (2004). Facial phenotype allows diagnosis of Mowat-Wilson syndrome in the absence of Hirschsprung disease. *Am J Med Genet A* 124(1): 102-4.

Zweier C, **Horn D**, Kraus C, Rauch A: (2006). Atypical ZFHX1B mutation associated with a mild Mowat-Wilson syndrome phenotype. *Am J Med Genet A* 140(8): 869-72.

## **2.2 Syndromale Krankheitsbilder verursacht durch submikroskopische zytogenetische Aberrationen**

### **2.2.1 Milde Manifestationen des Holoprosenzephalie-Spektrums durch Deletionen des Sonic-Hedgehog-Gens auf Chromosom 7q36**

Symptome des Holoprosenzephalie-Spektrums können durch unterschiedliche, in der Fetalperiode wirkende Umweltfaktoren und genetische Ursachen bedingt sein.

Innerhalb der genetischen Formen stellen Mutationen und Deletionen des Sonic-Hedgehog (SHH)-Gens auf Chromosom 7q36 eine Ursache dar, wobei Patienten mit zytogenetisch sichtbaren Deletionen der Region bislang sehr selten in der Literatur beschrieben wurden (Masuno et al., 1990; Roessler et al., 1996; Benzacken et al., 1997; Frints et al., 1998).

Die klinische Symptomatik der Holoprosenzephalie reicht von der schwersten Form, der alobären Holoprosenzephalie, bis zu fazialen Mikrosymptomen wie Hypotelorismus, Mittelgesichtshypoplasie, eine Enge der Choanen, ein singulärer oberer Schneidezahn und eine Gaumenspalte. Milde Manifestationen des zentralen Nervensystems beinhalten eine Mikrozephalie, eine Hypoplasie von Corpus callosum oder Septum pellucidum, eine Fusion des Thalamus, und eine Hypophyseninsuffizienz. Die Patienten sind von einer unterschiedlich starken Entwicklungsverzögerung und mentalen Einschränkung betroffen.

Das Homeobox-Gen *HLXB9* ist 1,2 Megabasen telomerwärts von dem SHH-Gen entfernt (Lynch et al., 1995; Belloni et al., 2000). Mutationen von *HLXB9* verursachen die variable Symptomatik des Currarino-Syndroms, das mit einer Sakralagenesie, anorektalen Fehlbildungen und einer präsakralen Tumorbildung einhergeht (Lynch et al., 2000; Kochling et al., 2001). Eine reduzierte Penetranz von ca. 40 % ist bei *HLXB9*-Mutationsträgern bekannt. Klinische, zytogenetische und molekularzytogenetische Untersuchungen an vier Patienten mit subtilen oder submikroskopischen Deletionen von 7q36 zeigen eine *de novo* Entstehung oder das Vorliegen einer kryptischen familiären Translokation an (Horn et al., 2004). Die durchgeführten FISH-Analysen dokumentieren, dass beide Gene, *SHH* und *HLXB9*, bei den untersuchten Patienten deletiert sind. Neben einer mentalen Retardierung und einem Kleinwuchs zeigen alle Patienten sehr milde faziale Dysmorphien des Holoprosenzephalie-Spektrums, wie Mikrozephalie, Mittelgesichtshypoplasie sowie Gaumenspalten, aber keine schweren strukturellen Hirnfehlbildungen. Heterozygote SHH-Deletionen können somit bei Patienten vorliegen,

die nur diskrete faziale Anomalien des Holoprosenzephalie-Spektrums aufweisen. Eine partielle Sakralagenesie und ein „tethered cord“ als klinische Zeichen des Currarino-Syndroms wurden bei nur einem Patienten des Kollektivs nachgewiesen, was mit der reduzierten Penetranz des Krankheitsbildes erklärt werden kann.

Patienten, bei denen zytogenetisch oder molekularzytogenetisch eine Deletion der entsprechenden chromosomalen Region festgestellt wurde, sollten auch hinsichtlich der Symptome des Currarino-Syndroms untersucht werden.

Treten bei einem Patienten kombiniert Symptome des Holoprosenzephalie-Spektrums und des Currarino-Syndroms auf, sind gezielte Untersuchungen auf Deletionen von 7q36 durch zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden angezeigt.

#### **Originalarbeit:**

**Horn D**, Tönnies H, Neitzel H, Wahl D, Hinkel KG, von Moers A, Bartsch O. (2004). Minimal clinical expression of the holoprosencephaly spectrum and of Currarino syndrome due to different cytogenetic rearrangements deleting the Sonic Hedgehog gene and the HLXB9 gene at 7q36. *Am J Med Genet A*. 128(1): 85-92.

### **2.2.2 Familiäres Retardierungssyndrom durch eine submikroskopische Translokation t(18;21)(q22.1q21.3) mit Bruchpunkt in der für das Down-Syndrom kritischen Region**

Aufgrund von durchgeführten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei Patienten mit partieller Trisomie 21 wurde klar, dass der Phänotyp des Down-Syndroms mit einer Trisomie der Bande 21q22 des Chromosoms 21 assoziiert ist. Die in der Nähe des Markers D21S55 liegende Region, die als „Down-Syndrom-kritische Region“ bezeichnet wurde, hat eine Größe von ca. 0,4 - 3 Megabasen (Delabar et al., 1993). Diese Region konnte später auf eine 1,6 Megabasen große Region eingengt werden (Shibuya et al., 2000).

Eine Familie mit zwei Betroffenen mit schwerer mentaler Retardierung und zusätzlichen körperlichen Auffälligkeiten sowie mit gehäuften Aborten wurde von uns klinisch, zytogenetisch und molekularzytogenetisch untersucht (Horn et al., 2003).

Das klinische Bild des Indexpatienten der Familie, der durch einen Kleinwuchs und eine faziale Dysmorphie mit ansteigenden Lidachsen, Epikanthus, Hypertelorismus und einer Ohrmuscheldysplasie auffiel, konnte diagnostisch zunächst nicht eingeordnet werden. Neben einem Kleinwuchs, Fingerkontrakturen und einer Gaumenspalte hatte der ebenfalls betroffene Onkel mütterlicherseits eine faziale Dysmorphie, die durch ansteigende Lidachsen, eine evertierte Unterlippe und eine Progenie gekennzeichnet war und die somit für eine Beteiligung der kritischen Region für das Down-Syndrom hinweisend war.

Die vor den FISH-Analysen durchgeführten konventionellen Chromosomenanalysen bei beiden Patienten zeigten bei einer Auflösung von 550 Banden pro haploidem Chromosomensatz keine Auffälligkeiten.

Durch FISH-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Patienten eine kryptische unbalanzierte Translokation tragen, die zu einer partiellen Trisomie 21 und einer partiellen Monosomie 18 führt. Der Bruchpunkt auf dem Chromosom 21q konnte in einem Intervall von 1000 kb zwischen den Klonen cos518 und RB-1-245P17 lokalisiert werden, das in der Nähe der proximalen Grenze der „Down-Syndrom-kritischen“ Region liegt. Der Bruchpunkt auf Chromosom 18 wurde bestimmt in der Nähe des Markers D18S466 in der Bande q22.1. Insgesamt sind bisher sechs familiäre Fälle von kryptischen oder subtilen subtelomerischen Translokationen, die das Chromosom 21 involvieren, dokumentiert (Garcia-Heras et al., 1999). Bei der Hälfte sind terminale Abschnitte von Chromosom 18q

in die Translokation einbezogen. Vergleichende Untersuchungen zu bereits publizierten Fällen zeigen an, dass die Bruchpunkte auf Chromosom 18q und 21q jeweils different sind (Knight et al., 1996; Bartsch et al., 1997). Unsere molekularen und physikalischen Daten lassen erkennen, dass in der 1997 publizierten Familie der Bruchpunkt auf Chromosom 18q ca. 3 - 10 Megabasen distaler liegt und der Bruchpunkt auf Chromosom 21q 1,5 - 2,5 Megabasen distaler lokalisiert ist im Vergleich zu denen in unserer untersuchten Familie (Horn et al., 2003).

Diese Untersuchungsergebnisse betonen die Bedeutung der Untersuchung der Subtelomerbereiche bei familiären Fällen von mentaler Retardierung in Kombination mit kongenitalen Auffälligkeiten und gehäuften Aborten.

#### **Originalarbeit:**

**Horn D**, Neitzel H, Tönnies H, Kalscheuer V, Kunze J, Hinkel GK, Bartsch O. (2003). Familial MCA/MR syndrome due to inherited submicroscopic translocation t(18;21)(q22.2q21.3) with breakpoint at the Down syndrome critical region. *Am J Med Genet* 117(3): 236-44.

### 2.3 Erkrankungsbilder mit mentaler Retardierung bedingt durch chromosomale Mosaik

Eine mosaikartige Pigmentverteilung stellt einen heterogenen kutanen Phänotyp dar, der durch verschiedene chromosomale Mosaik oder Chimärismus verursacht wird (Happle, 1993). Zahlreiche numerische und strukturelle chromosomale Aberrationen sind im Mosaikzustand als Ursache des Phänotyps in der Literatur dokumentiert. Mehr als die Hälfte der untersuchten Patienten zeigen zusätzliche, extrakutane Symptome, insbesondere eine mentale Retardierung, aber auch Asymmetrien der Extremitäten, eine Skoliose, Anomalien des Auges, der Zähne und des Hirns. Diese klinischen Bilder entstehen in der Regel *de novo* als Resultat einer postzygotischen Mutation, die zu einem Mosaikstatus des Embryos führt. Daher wird in den meisten Fällen ein sporadisches Vorkommen gesehen. Eine Hypopigmentierung entlang der Blaschko-Linien ist dabei das häufigste dokumentierte Hautmuster, für das aus historischen Gründen der Terminus „Hypomelanosis Ito“ benutzt wird. Eine Hyperpigmentierung entlang der Blaschko-Linien wird aber ebenfalls bei Patienten gesehen. Die streifigen Muster von Hypo- oder Hyperpigmentierung reflektieren das Vorhandensein von zwei Zelllinien mit einer unterschiedlichen Pigmentproduktion.

Die Pigmentproduktion, -verteilung und -speicherung unterliegen der Kontrolle vieler Gene und können daher durch verschiedene chromosomale Rearrangements oder Mutationen von entsprechenden Genen gestört werden. Wenn diese beiden Zellklone bis zum 16. Embryonaltag entstehen, folgt die weitere Verteilung, Migration und Proliferation der Zellen den Blaschko-Linien, welche normales Wachstum von embryonalem Gewebe anzeigen. Bei einem differenten Entstehungszeitpunkt des Mosaiks oder einem veränderten Migrationspotential der betroffenen Zellen könnten andere Muster als die der Blaschko-Linien hervorgerufen werden, z. B. das „phylloide“ Muster (Happle, 1993). Nach der von Happle postulierten Klassifikation von Pigmentierungsmustern entspricht die von uns beschriebene Pigmentanomalie („phylloides“ Muster) bei einer Patientin mit starker mentaler Retardierung dem Typ 3 der Klassifikation und wurde durch das Vorliegen einer Mosaiktrisomie 13 (46,XX/47,XX,+13) verursacht, die durch zytogenetische Untersuchungen aus Lymphozyten und Hautfibroblasten sowie durch FISH-Analysen an Interphasezellen der Mundschleimhaut bestätigt wurde (Horn et al., 1997).

Das Pallister-Killian-Syndrom (PKS, MIM 601803), welches durch eine Mosaik-Tetrasomie des Chromosoms 12p verursacht wird, ist eines der wenigen klinischen Bilder, das aufgrund der speziellen fazialen Dysmorphie innerhalb der Erkrankungsgruppe syndromologisch zugeordnet werden kann (Schinzel, 1991). Die betroffenen Patienten fallen in der Regel durch eine schwere psychomotorische Retardierung mit fehlender Sprachentwicklung und kraniofaziale Dysmorphiezeichen wie eine frontotemporale Alopecie, eine flache Orbitalregion, Hypertelorismus, eine antevertierte Nasenbodenebene und ein relativ langes und prominentes Philtrum auf; daneben bestehen häufig Fehlbildungen, wie Herzfehler und Zwerchfeldefekte (Horneff et al., 1993). Das Isochromosom 12p kann nur selten in kultivierten Lymphozyten nachgewiesen werden, in der Regel gelingt der Nachweis der aberranten Zelllinie nur in Hautfibroblasten. Auch in Amnionzellen wurde die Diagnose einer Mosaik-Tetrasomie 12p beschrieben (Tejada et al., 1992). Als Ursache der Mosaik-Tetrasomie 12p wird ein meiotischer Teilungsfehler mit nachfolgendem mitotischen Verlust des Isochromosoms in einigen embryonalen Zellen angenommen. Wir untersuchten Probleme der zytogenetischen Diagnosestellung bei Patienten mit PKS (Horn et al., 1995).

Bei einem Patienten lag ein unauffälliger Befund der zytogenetischen Diagnostik aus Chorionzotten vor sowie ein normaler postnataler Befund aus Lymphozyten, währenddessen in Hautfibroblasten der überwiegende Anteil der Zellen eine Tetrasomie 12p zeigte. Der normale Chromosomenbefund des Zytotrophoblasten (Kurzzeitkultur) und des mesenchymalen Anteils (Langzeitkultur) könnte durch das klonale Wachstum der Chorionzotten in der Kultur erklärt werden. Bei dem zweiten Patienten zeigte die Chromosomenanalyse aus Lymphozyten sowie aus langsam wachsenden Zellen einer Hautbiopsie, bei denen es sich wahrscheinlich um epidermale Zellen handelte, einen unauffälligen zytogenetischen Befund. Bei klinisch starkem Verdacht wurde eine zweite, tiefere Hautbiopsie durchgeführt, die zum rapiden Auswachsen von Hautfibroblasten in der Kultur führte und den Nachweis der aberranten Zelllinie in 70 % der untersuchten Zellen ergab. Die Untersuchungen betonen die Probleme der Diagnostik und Interpretation bei der Untersuchung zytogenetischer Mosaik (Horn et al., 1995).

Die Annahme, dass ein Mosaikstatus der Pigmentzellen postzygotisch entsteht und daher in der Regel ein sporadisches Vorkommen in der Literatur dokumentiert ist, ist allgemein akzeptiert. Familiäre Fälle von chromosomalen Mosaiken sind sehr selten beschrieben (Horn et al., 2002).

Berichtet wird ein familiärer Fall von Pigment-Mosaiken, bei dem ein Betroffener eine Duplikation von Chromosom 3p als Mosaikbefund (mos 46,XY, dup(3)(p21.3;pter)/46,XY) in Lymphozyten und Hautfibroblasten zeigte, während der klinisch ebenfalls betroffene Halbbruder einen unauffälligen zytogenetischen Befund in Lymphozyten aufwies. Neben der mentalen Retardierung und Pigmentanomalie zeigte der betroffene Halbbruder mit dem Mosaikstatus für die strukturelle Aberration eine faziale Asymmetrie, einen Kleinwuchs und eine Skoliose, während der Bruder zusätzlich eine Makrozephalie und eine faziale Asymmetrie aufwies. Ursächlich sind bei diesen familiären Fällen an eine Translokation zwischen einem X-Chromosom und einem Autosom, die durch übergreifende X-Chromosom-Inaktivierung auf autosomale Chromosomenabschnitte zu einem funktionellen Mosaikzustand führen kann, sowie an das Modell der paradominanten Weitergabe zu denken (Happle, 1993; Horn et al., 2002).

#### **Originalarbeiten:**

**Horn D**, Majewski F, Hildebrandt B, Körner H. (1995). Pallister-Killian syndrome: normal karyotype in prenatal chorionic villi, in postnatal lymphocytes, and in slowly growing epidermal cells, but mosaic tetrasomy 12p in skin fibroblasts. *J Med Genet* 32: 68-71.

**Horn D**, Rommeck M, Sommer D, Körner H. (1997). Phylloid pigmentary pattern with mosaic trisomy 13. *Pediatr Dermatol* 14 (4): 278-80.

**Horn D**, Happle R, Neitzel H, Kunze J. (2002). Pigmentary mosaicism of the hyperpigmented type in two half-brothers. *Am J Med Genet* 112: 65-9.