

Aus dem Institut für Humangenetik
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Siebert)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**NACHWEIS KONSTITUTIONELLER SUBMIKROSKOPISCHER
VERÄNDERUNGEN BEI STÖRUNGEN DER GEISTIGEN ENTWICKLUNG**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
NEELE MARIA HUSEMEYER
aus Essen

Kiel 2014

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Siebert

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Schrappe

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2015

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 03.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Störung der geistigen Entwicklung bei Kindern	7
1.2 Geistige Entwicklungsstörung im Rahmen übergeordneter Syndrome	7
1.3 Untersuchungstechniken zur Analyse von submikroskopischen Chromosomenaberrationen bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung	8
1.4 Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung – <i>Array comparative genomic hybridization</i>	9
1.5 Kopienzahlvariation (Copy number variation) und familiäre Polymorphismen.....	11
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Patienten	13
2.1.2 Materialien zur Herstellung der Kontroll-Desoxynukleinsäure	14
2.1.3 Waschlösungen für die Array-CGH	16
2.1.4 Array-Plattformen	16
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)	17
2.2.2 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) mit lokusspezifischen Sonden	22
2.2.3 Erfassung der klinischen Daten.....	23
2.2.4 Erfassung der Kopienzahlvariationen – <i>Copy number variations</i> (CNV)	24
3 Ergebnisse	25
3.1 Analyseergebnisse	25
3.1.1 Ergebnisse der Analysen bei bekannter Chromosomenstörung	25

3.1.2 Ergebnisse der Array-CGH bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung und unauffälligem Karyotyp	29
3.2 Charakteristika der nachgewiesenen Aberrationen	32
3.3 Einfluss der Auflösung der unterschiedlichen Arrays auf die Detektionsrate	33
3.4 Verteilung der Kopienzahlvariation (CNV)	35
3.5 Symptome bei Patienten mit gesichert pathologischem Befund in der Array-CGH-Analyse	38
3.6 Symptome bei Patienten ohne gesichert pathologischen Befund in der Array-CGH-Analyse	38
4 Diskussion	40
4.1 Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zur aktuellen Literatur	40
4.1.1 Bruchpunktanalyse bekannter chromosomaler Aberrationen	40
4.1.2 Detektionsrate der Array-CGH bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung unklarer Genese	42
4.2 Einfluss der Arrayauflösung auf das Untersuchungsergebnis.....	43
4.3 Gibt es eine Erklärung dafür, dass häufiger Deletionen als Duplikationen detektiert werden?	45
4.4 Konventionelle Chromosomenanalyse, Subtelomerscreening versus Array-CGH.....	48
4.5 Stellung der Kopienzahlvariationen in der Array-CGH-Analyse	50
4.6 Einschlusskriterien zur Teilnahme an der Array-CGH-Analyse.....	52
4.7 Fazit und Ausblick.....	55
5 Zusammenfassung	56
6 Literaturverzeichnis.....	57
7 Anhang	76
8 Danksagung	77
9 Lebenslauf	78

Abkürzungsverzeichnis

Array-CGH	<i>Array-based comparative genomic hybridization</i> (Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung)
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i> (künstliches Bakterienchromosom)
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i> (Vergleichende genomische Hybridisierung)
CNV	<i>Copy number variation</i> (Kopienzahlvariation)
Cy	Cyanin
DAPI	Diamidinophenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
dUTP	2'Desoxyuridin 5'Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintrichloressigsäure
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HGVS	<i>Human genome variation database society</i>
IQ	Intelligenzquotient
Kb	Kilobase
Mb	Megabasen
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PHA	Phytohämagglutinin
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SSC	<i>Standard saline citrate</i> (Standard Salzlösung aus Natriumchlorid und Natriumcitrat)
SSPE	<i>Saline-sodium-phosphate-EDTA-buffer</i> (Salzsäure-Natrium-Phosphat-EDTA-Puffer)
TE	Tris-EDTA
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i> (Universität Kalifornien, Santa Cruz)

UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VSD	Ventrikelseptumdefekt
WHO	<i>World health organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)

1 Einleitung

1.1 Störung der geistigen Entwicklung bei Kindern

Laut der Weltgesundheitsorganisation wird eine Störung der geistigen Entwicklung diagnostiziert, wenn eine signifikant verringerte Fähigkeit besteht, neue oder komplexe Informationen zu verstehen und neue Fähigkeiten zu erlernen und anzuwenden (beeinträchtigte Intelligenz). Dadurch verringert sich ebenso die Fähigkeit, ein unabhängiges Leben zu führen (beeinträchtigte soziale Kompetenz). Dieser Prozess beginnt vor dem Erwachsenenalter und hat dauerhafte Auswirkungen auf die Entwicklung (Weltgesundheitsorganisation 2013).

Im Jahr 2011 wurden in Deutschland etwa 663 000 Kinder geboren (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden). Die Prävalenz für eine Störung der geistigen Entwicklung liegt bei 2-3 % unter den Neugeborenen (Roeleveld et al. [1997]; Yeargin-Allsopp et al. [1997]; Larson et al. [2001]). Im klinischen Alltag des Pädiaters spielt die Entwicklungsstörung von Patienten* also eine erhebliche Rolle. Bei einem großen Teil der Patienten, zwischen 30 % und 50 %, bleibt die Ursache ihrer geistigen Entwicklungsstörung ungeklärt (Hagberg et al. [1982]; Schaefer und Bodensteiner [1992]). Die Klärung der Ursache einer geistigen Behinderung ist jedoch in vielerlei Hinsicht von großer Bedeutung. Für die weitere Entwicklung des Kindes ist die spezielle therapeutische Förderung besonders wichtig. Außerdem ermöglicht die ätiologische Einordnung der Entwicklungsstörung dem behandelnden Arzt, vergesellschaftete Risiken so früh wie möglich zu erkennen und zu therapieren (Thienpont et al. [2007]). Für die Eltern des betroffenen Kindes ist das Wissen über ein mögliches Wiederholungsrisiko, aber auch der Austausch mit anderen Betroffenen, von hoher Relevanz.

1.2 Geistige Entwicklungsstörung im Rahmen übergeordneter Syndrome

Die geistige Entwicklungsstörung wird nach Kriterien der WHO (1980) in unterschiedliche Schweregrade unterteilt: Leichte geistige Behinderung (IQ 69 - 50), mäßige geistige Behinderung (IQ 49-35), schwere geistige Behinderung (IQ 34 - 20) und schwerste geistige

*Generischer Begriff „Patienten“: Um eine bessere Lesbarkeit zu gewährleisten, werden im Rahmen dieser Arbeit Doppelungen wie „Patientinnen und Patienten“ zugunsten des generischen Begriffs „Patienten“ aufgegeben.

Behinderung ($IQ < 20$). In Abhängigkeit vom Schweregrad einer geistigen Entwicklungsstörung können die Ursachen identifiziert werden (WHO [1980]). So lässt sich bei über 80 % der Patienten mit einer schweren geistigen Behinderung die Ursache für diese Entwicklungsstörung klären (Gärtner [2007]). Hingegen bleiben die Gründe für eine leichte geistige Behinderung häufig unentdeckt (Gärtner [2007]).

Die häufigste Ursache für eine geistige Entwicklungsstörung beim Menschen ist die Trisomie 21. Sie tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1:700 Neugeborenen auf (Zschocke und Tariverdian [2007]). Die Ursache dieser syndromalen Erkrankung ist ein zusätzliches Chromosom 21. Erstmals wurde die Trisomie 21 im Jahr 1828 von dem englischen Arzt John Langdon Hexden Down beschrieben. Die Chromosomenstörung wurde jedoch erst 1959 von Lejeune et al. nachgewiesen. Das Down-Syndrom bezeichnet eine Kombination aus geistiger Entwicklungsstörung und spezifischen fazialen Dysmorphiezeichen, zum Beispiel lateral ansteigende Lidachsen, ein Epikantus oder Organfehlbildungen. Die spezifischen kraniofazialen Dysmorphiezeichen lassen in der Regel bereits direkt nach der Geburt auf ein Down-Syndrom schließen (Zschocke und Tariverdian [2007]).

Eine weitere sehr häufige genetische Ursache für eine geistige Entwicklungsstörung sind Veränderungen auf dem X-Chromosom. Es sind bereits mehr als 200 X-chromosomal-assoziierte Retardierungssyndrome beschrieben (Zschocke und Tariverdian [2007]). Das Häufigste ist das Fragile X-Syndrom. Die Häufigkeit des Auftretens beträgt etwa 1:4500 bei männlichen beziehungsweise 1:9000 bei weiblichen Neugeborenen. Das Fragile X-Syndrom beruht auf einem Funktionsverlust des *FMRI*-Gens durch eine Trinukleotidexpansion im nicht-kodierenden Bereich vor diesem Gen (Oberlé et al. [1991]). Sie führt zu einer Hypermethylierung und damit zur Inaktivierung des Gens. Klinisch zeigt sich bei Patienten mit Fragilem X-Syndrom ebenfalls eine charakteristische Kombination aus geistiger Behinderung und spezifischen Dysmorphiezeichen (Saul und Tarleton [1998, updated 2012]).

1.3 Untersuchungstechniken zur Analyse von submikroskopischen Chromosomenaberrationen bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung

Die konventionelle Chromosomenanalyse stellt seit Tjio und Levan [1957], die die Anzahl der menschlichen Chromosomen beschrieben haben, die Technik der Wahl zur Analyse

numerischer und struktureller Veränderungen der Chromosomen dar. Diese Technik zur Untersuchung des menschlichen Genoms kann Veränderungen bis zu einer Größe von etwa 5 - 10 Mb erkennen (Friedman et al. (2006)). Bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung kann bei etwa 15 % der Fälle eine genetische Ursache mittels konventioneller Chromosomenanalyse diagnostiziert werden (Phelan et al. [1996]; de Vries et al. [1997]; Schinzel [2001]). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass bei deutlich mehr Patienten eine chromosomale Veränderung die Ursache einer geistigen Entwicklungsstörung ist. Allerdings liegt in vielen Fällen vermutlich eine Chromosomenaberration von geringerer Größe als 5 - 10 Mb einer mentalen Retardierung zugrunde (Flint et al. [1995]; Knight et al. [1999]; de Vries et al. [2003]).

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bietet eine Möglichkeit, nach submikroskopischen Aberrationen zu suchen. Die FISH-Analyse beruht auf der Bindung von für einen Genort spezifischen DNA-Sonden am gewünschten komplementären Chromosomenabschnitt. Die DNA-Sonden sind mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert und können im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Die FISH bietet eine maximale Auflösung von 50 Kb (Ekong und Wolfe [1998]). Hierzu ist jedoch ein Verdacht auf eine spezielle Chromosomenveränderung erforderlich. Ein solcher Verdacht wird häufig aufgrund einer Kombination phänotypisch gemeinsam auftretender Veränderungen angenommen (Trask [1991]).

Das Subtelomerscreening wurde entwickelt, um die Telomerregionen aller Chromosomen auf Veränderungen zu untersuchen. Mit einem Subtelomerscreening kann bei etwa 5 % der Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung unklarer Genese und zytogenetisch normalem Chromosomensatz eine Veränderung diagnostiziert werden (Flint et al. [1995]; Knight et al. [1999]; De Vries et al. [2003]; Koolen et al. [2004]). Alle anderen Chromosomenregionen waren einem systematischen Screening auf submikroskopische Veränderungen mittels FISH bisher nicht zugänglich (Friedman et al. [2006]).

1.4 Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung – *Array comparative genomic hybridization*

Die vergleichende genomische Hybridisierung ist die methodische Grundlage dieser Arbeit. Die Array-CGH wurde 1997 in der Arbeitsgruppe von Peter Lichter (DKFZ, Heidelberg)

entwickelt (Solinas-Taldo et al. [1997]). Sie beruht auf der Hybridisierung von Patienten-DNA an komplementäre, genomisch kartierte DNA-Fragmente, die nach einem definierten Raster auf einer Oberfläche immobilisiert werden. Die Auflösung der Array-CGH ist abhängig von der Anzahl und Dichte der Fragmente (Klopocki und Huber [2006]).

Sie bietet die Möglichkeit submikroskopische Verluste und Zugewinne zu erkennen und mit klinischen Symptomen in einen Zusammenhang zu stellen (Klopocki und Huber [2006]). Dabei ist die Auflösung von der verwendeten Plattform abhängig. Neben der konventionellen Chromosomenanalyse stellt die Array-CGH eine Methode dar, das komplette Genom ohne einen gezielten Verdacht auf chromosomale Imbalancen zu untersuchen (Klopocki und Huber [2006]). Diese Methode ermöglicht außerdem eine präzise Bruchpunktbestimmung bei bekannten Chromosomenaberrationen (Flipsen-ten Berg et al. [2007]).

Die Array-CGH ist durch Standardisierung der einzelnen Methoden weitgehend objektivierbar (Shinawi und Cheung [2008]). Ein weiterer Vorteil ist, dass keine Zellkulturen benötigt werden, um eine Array-CGH durchzuführen (Shinawi und Cheung [2008]). Die so entstehende Zeitersparnis in der Durchführung könnte insbesondere im Rahmen der Pränataldiagnostik ein großer Vorteil sein, da gerade hier die Zeit einen ausschlaggebenden Faktor darstellt.

Es bestehen jedoch auch Limitationen der Array-CGH. Zum einen hat sie im Gegensatz zur konventionellen Chromosomenanalyse keine Möglichkeiten, balancierte Aberrationen, wie Translokationen und Inversionen zu erfassen. Diese balancierten Aberrationen, bei denen zwar kein Genmaterial verloren geht, jedoch der Bruchpunkt in einem Gen liegen kann, können dennoch von pathologischem Wert sein (Shinawi und Cheung [2008]).

Zum anderen hat die Array-CGH Schwierigkeiten schwache Mosaik zu erfassen. Dies beschrieben sowohl Pickering et al. [2008] als auch Gouas et al. [2008]. Allerdings wurden auch Mosaik mittels Array-CGH entdeckt, die durch konventionelle Karyotypisierung nicht diagnostiziert werden konnten (Ballif et al. [2006]; Cheung et al. [2007]).

Außerdem sind die Kosten für hochauflösende Array-Plattformen, die eine genomweite Analyse ermöglichen, aktuell noch sehr hoch, insbesondere im Vergleich zu den Kosten einer konventionellen Chromosomenanalyse.

1. 5 Kopienzahlvariation (Copy number variation) und familiäre Polymorphismen

Die Sammlung von Daten, die durch die molekulare Karyotypisierung an 270 Patienten in einer Studie von Redon et al. [2006] aufgenommen wurde, zeigte deutlich, dass eine Vielzahl von Regionen im menschlichen Genom über Variationen der DNA-Kopien verfügt, die zu keinerlei phänotypischer Anomalie führen.

Die Kopienzahlvariation (*Copy number variation* - CNV) bezeichnet submikroskopische strukturelle Chromosomenveränderungen. In den letzten Jahren ist es zu einem Bedeutungswandel gekommen. Ursprünglich wurde dieser Begriff vorwiegend für Veränderungen ohne Krankheitswert verwendet. Es hat sich jedoch inzwischen eine Unterscheidung zwischen pathologischer CNV, benigner CNV und potenziell pathologischer CNV etabliert (Gijbbers et al. [2011]). Benigne CNV verteilen sich in wahrscheinlich nicht-zufälliger Anordnung über alle Chromosomenpaare und variieren in Anzahl und Verteilungsmuster von Individuum zu Individuum. In den meisten Fällen handelt es sich um kleinere Duplikationen und Deletionen, definitionsgemäß von mehr als 1000 Basenpaaren (Bartholdi [2008]).

Redon et al. untersuchten 2007 Patienten unterschiedlicher, ethnischer Herkunft. Hierbei wurden insgesamt 1447 submikroskopische Regionen entdeckt, die *copy number variations* enthalten. Sie stellten fest, dass auch populationsabhängige Polymorphismen existieren, die bei der Interpretation von Untersuchungsergebnissen berücksichtigt werden müssen.

Datenbanken wie *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/>) oder die *Database of Genomic Variations* (<http://projects.tcag.ca/variation/>) erfassen diese Genregionen, die etwa 12 % (Redon et al. [2006]) des Genoms ausmachen. Sie erleichtern die Interpretation von Imbalancen in diesen Bereichen enorm.

Es treten dennoch auch große Schwierigkeiten im Zusammenhang mit den Datenbanken bekannter CNV auf. Die meisten Daten zu CNV-Lokalisationen stammen aus Studien, in denen mit BAC-Arrays gearbeitet wurde (Bauke et al. [2006]; Iafrate et al. [2004]). BAC-Arrays haben häufig eine geringe Auflösung (Friedman et al. [2006]). Die Auflösung eines BAC-Arrays ist von der Anzahl und Größe seiner BAC-Klone abhängig. Befindet sich also eine CNV innerhalb eines BAC-Klons, wird seine Größe mindestens mit der des Klons angegeben. Dies führt dazu, dass viele CNV in ihrer Größe überschätzt werden (Perry et al. [2008]).

Redon et al. [2006] haben in ihrer Studie am Genom von 269 Probanden CNV untersucht, sowohl mithilfe von BAC-Arrays als auch mithilfe von SNP-Array. Die Anzahl der durch die unterschiedlichen Plattformen erfassten CNV waren ähnlich, jedoch unterschieden sich die CNV erheblich in ihrer Größe. So sind die CNV, die mithilfe von BAC-Arrays entdeckt wurden, im Schnitt dreimal so groß wie jene, die mit SNP-Arrays entdeckt wurden (BAC-Array: 228 Kb, SNP-Array: 63Kb). Gleiches bestätigen auch Perry et al. [2008]. Ihren Angaben nach sind 88 % der in der Datenbank genomischer Variationen (<http://projects.tcag.ca/variation>) beschriebenen CNV kleiner als angenommen.

Darüberhinaus ist die Interpretation einer Aberration an einem CNV-Lokus nicht eindeutig. Beispielsweise stellt sich die Frage, wie eine Duplikation zu interpretieren ist, die sich an einem bekannten CNV-Lokus befindet, der in der Literatur jedoch als Deletion beschrieben wird.

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass große Probleme bezüglich der Interpretation der CNV und Polymorphismen in der genetischen Beratung bestehen, sodass eine enge Zusammenarbeit mit klinischen Genetikern und die genaue Dokumentation von entdeckten CNV und Genotyp-/Phänotypkorrelationen in Datenbanken dringend erforderlich sind (Bartholdi [2008]; Thienpont et al. [2007]).

1. 6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Viele Patienten mit einer Störung der geistigen Entwicklung sind von bislang nicht diagnostizierten Mikrodeletions- oder Duplikationssyndromen betroffen (Miller et al. [2010]). Die vergleichende genomische Hybridisierung soll dazu dienen, bislang unentdeckte submikroskopische Chromosomenveränderungen zu analysieren. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den neuen Möglichkeiten der Array-CGH-Analyse, sowie mit ihrer kritischen Auseinandersetzung. Hierbei wird insbesondere auf die folgenden Fragestellungen Bezug genommen:

1. Kann die Array-CGH der Bestätigung oder genaueren Eingrenzung bereits bekannter Chromosomenstörungen dienen?
2. Werden durch die Array-CGH bei Patienten mit unklarer Entwicklungsverzögerung häufiger Chromosomenstörungen identifiziert als durch andere Untersuchungsverfahren?

3. Unterscheiden sich die detektierten Deletionen und Duplikationen in ihrer Größe?
4. Werden mit höher auflösenden Array-Plattformen häufiger Aberrationen detektiert?
5. Wie ist die Verteilung der CNV in den Array-CGH-Analysen der vorliegenden Arbeit? Gibt es Häufungen bei Analysen mit pathologischem Array-CGH-Befund?
6. Welche Begleitsymptome erhöhen die Wahrscheinlichkeit einen pathologischen Befund in der Array-CGH-Analyse zu erhalten?
7. Welche Symptome scheinen eher unspezifisch und erhöhen damit nicht die Wahrscheinlichkeit ein pathologisches Ergebnis in der Array-CGH-Analyse zu erhalten?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten

Insgesamt wurden die Daten von 130 Patienten bereitgestellt, bei denen im Zeitraum vom 01.08.2006 bis 01.09.2007 eine Array-CGH-Untersuchung durchgeführt wurde.

Das Blut, beziehungsweise die DNA, der Patienten wurde dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, zur Analyse zugesandt. Entweder hatten die Patienten bzw. Sorgeberechtigten ihr Einverständnis für die anonymisierte Nutzung der Daten für wissenschaftliche Zwecke auf dem jeweiligen Einsendeschein gegeben oder die einsendenden Ärzte hatten bestätigt, dass ihnen dieses vorliegt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität hat der anonymisierten Nutzung von Restmaterialien und der Auswertung von Daten aus der humangenetischen Diagnostik zugestimmt, sofern diese Bestätigung vorlag (z.B. unter D402/09).

In aller Regel handelte es sich um Proben von Patienten mit einer Entwicklungsstörung, bei denen exogene Ursachen weitgehend ausgeschlossen worden waren. Die Patienten, deren DNA mittels Array-CGH untersucht wurde, mussten die folgenden Kriterien erfüllen. Die Indikation zur Array-CGH-Untersuchung wurde in der Regel nach unauffälliger konventioneller Chromosomenanalyse und gegebenenfalls Ausschluss eines Fragilenen X-Syndroms gestellt, wenn bei einem Patienten eine Störung der geistigen Entwicklung ($IQ \leq 70$) vorlag und wenigstens zwei der folgenden Kriterien erfüllt wurden:

- Positive Familienanamnese für eine Störung der geistigen Entwicklung
- Pränatale und/oder postnatale Wachstumsretardierung bzw. Hochwuchs
- Mikro- oder Makrozephalie
- Faziale Dysmorphien
- Andere kongenitale Anomalien/Fehlbildungen (z. B. Skelettfehlbildungen, Herzfehler)
- Verhaltensauffälligkeiten (z. B. aggressives Verhalten)
- Zerebrale Krampfanfälle

Weitere Indikationen zur Array-CGH waren zum einen die Abklärung bereits beschriebener chromosomaler Veränderungen. Zum anderen wurde eine Array-CGH-Analyse durchgeführt, wenn durch übliche Untersuchungen bei Patienten mit eindeutiger Zuordnung zu einem bekannten genetischen Krankheitsbild, entweder keine typische Veränderung nachgewiesen wurde oder von einem bekannten Krankheitsbild abweichende Befunde bestanden.

Die DNA der Patienten wurde entweder aus EDTA-Blut durch die Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel, extrahiert oder es gingen hier bereits DNA-Proben ein. Auffällige Befunde in der Array-CGH Untersuchung wurden soweit möglich mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) an Lymphozytensediment verifiziert. Hierfür wurde peripheres heparinisertes Vollblut der Probanden 72 Stunden lang mit Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert. Anschließend folgte die Aufarbeitung nach Standardmethoden. Die für zyto- beziehungsweise molekularzytogenetische Untersuchungen nicht benötigte Lymphozytensuspension wurde in Carnoys Fixativ (Methanol:Essig, 3:1) bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.2 Materialien zur Herstellung der Kontroll-Desoxynukleinsäure

Zur Herstellung der Kontroll-DNA für die vergleichende genomische Hybridisierung wurde DNA von zehn klinisch unauffälligen weiblichen beziehungsweise männlichen Probanden verwendet. Aus dem peripheren Blut wurde DNA isoliert und aus der gewonnen DNA die Proben gemischt.

Material	Hersteller	Ort
Acetonitril	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
ALU I	Promega	Mannheim, Deutschland
COT-1 DNA, human	Invitrogen	Carlsbach, Deutschland
N-Lauroylsarcosine Solution	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Puffer C	Promega	Mannheim, Deutschland
RSA I	Promega	Mannheim, Deutschland
TE-Puffer (pH 8,0)	Invitrogen	Deisenhofen, Deutschland
SSPE	Invitrogen	Deisenhofen, Deutschland
Stabilization&Drying Solution	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland

Tabelle 1: Materialien

Kit	Hersteller	Ort
DNA – Clean & Concentrator 5 TM- Kit	Zymo-Research	Freiburg, Deutschland
Bio Prime Array-CGH Genomic Labeling Kit	Invitrogen	Deisenhofen, Deutschland
Agilent Hybridisierungs Kit	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland

Tabelle 2: Kits

Gerät	Typ	Hersteller	Ort
Brutschrank		Heraeus Instruments	Osterode/Harz, Deutschland
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Hybridisierungskammer		Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Hybridisierungsofen		Shel Lab	Cornelius, USA
Magnetrührer		Ikomag	Lübeck, Deutschland
Nano Drop	ND 1000 Spectro- Photometer	PeqLab, Bio- technologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Objektträger	Gaskit slides, Microarray	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Scanner	Axon GenePix 4000 B	Molecular Devices	Ismaningen, Deutschland
Software	Analytics V3.5	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Software	Agilent Feature Extraction V9.5.3	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Software	Agilent Feature Extraction V9.1	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Software	CGH Analytics V3.4.27	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Software	N.D. 1000 3.2.1	PeqLab, Bio- technologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Software	Office Excel 2007	Microsoft	Unterschleißheim, Deutschland

Software	VP 2000	Vysis Abbott	Wiesbaden, Deutschland
Tubes/Filter	Microcon-Filtersatz	Millipore	Schwalbach, Deutschland
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries	München, Deutschland
Wasserbad		Köttermann Labortechnik	Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge	Mikro 200	Andreas Hettich GmbH&Co.	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge 22R	Heraeus Sepatech	Osterode/Harz, Deutschland
Zentrifuge	Rotanta K	Andreas Hettich GmbH	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Jouan RC1010	Thermo-Electron Cooperation	Chateau-Gon- tier, Frankreich
Zentrifuge	Sorvall Super T21	Kendro Laboratory Products GmbH	Langenselbold Deutschland

Tabelle 3: Geräte

2.1.3 Waschlösungen für die Array-CGH

Waschpuffer 1: 50 ml 20 x SSPE (Invitrogen)
 500 µl Lauril
 1,45 l dH₂O
 Total: 2 l

Waschpuffer 2: 5 ml 20 x SSPE (Invitrogen)
 250 µl Lauril
 745 ml dH₂O
 Total: 1 l

2.1.4 Array-Plattformen

In dieser Arbeit wurden Human Genome CGH Microarrays des Herstellers Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) verwendet. Es wurde auf Microarrays unterschiedlicher Auflösung hybridisiert. 38 Analysen wurden mit 44K-Arrays mit 43 000 60 mer Oligonukleotiden durchgeführt. Nach Einführung des 105K-Arrays wurde dieser für 88 Analysen verwendet. 105K-Arrays verfügen über 99 000 60 mer Oligonukleotide und gewährleisten damit eine höhere Auflösung. Für bestimmte Fragestellungen, wie Abklärung

einer bekannten Chromosomenaberration, wurde der 244K-Array eingesetzt. Dieser trägt 236 000 60 mer Oligonukleotide und wurde lediglich für sieben Analysen verwendet.

2.2 Methoden

Bei den ersten 30 Array-CGH-Analysen habe ich an der Durchführung der Versuche teilgenommen, insbesondere war ich in die Auswertung der Microarrays involviert. Im Verlauf wurde die Array-CGH Teil der Standardanalyse des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Kiel, sodass infolgedessen vor allem die Datensammlung und Auswertung der Ergebnisse zum Gegenstand dieser Arbeit wurden.

2.2.1 Vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)

Mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung (Array-CGH) soll geklärt werden, ob im Genom der Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung Mikrodeletionen oder –duplikationen zu entdecken sind, die durch konventionelle zytogenetische und gezielte molekularzytogenetische Analyse nicht erfassbar sind.

Die Matrix (gebräuchlich: Array) basierte vergleichende genomische Hybridisierung (CGH = *comparative genomic hybridization*) ist ein hochauflösendes Verfahren zum Nachweis von Zugewinnen (Duplikationen) oder Verlusten (Deletionen) im Genom. Sie beruht auf der Basenpaarung von Patienten-DNA mit DNA-Fragmenten, die auf der Oberfläche eines Objektträgers immobilisiert sind. Der Begriff „Array“ bezieht sich auf die regelmäßige rasterförmige Anordnung der DNA-Fragmente.

Es wird die Fluoreszenzintensität zweier genomischer DNA-Proben verglichen. Dazu werden gleiche Mengen Patienten- und Referenz-DNA kohybridisiert, die unterschiedlich mittels Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Tönnies [2002]). Üblicherweise wird die Test-DNA rot und die Referenz-DNA grün markiert. Veränderungen in der Patienten-DNA führen zu Farbverschiebungen des Fluoreszenzsignals der betroffenen Fragmente. So erscheinen zum Beispiel Regionen, die in der zu testenden DNA durch eine Duplikation überrepräsentiert sind, intensiver rot. Im Gegensatz dazu führt eine in der Test-DNA unterrepräsentierte Region, wie im Falle einer Deletion, zu geringerer Intensität roter Fluoreszenz. Diese

Fluoreszenzintensitätsverhältnisse können mit Computerprogrammen exakt quantifiziert und der genauen Region auf einem Chromosom zugeordnet werden.

So stellt die Array-CGH ein Screeningverfahren dar, mit dem das gesamte Genom auf Deletionen und Duplikationen untersucht werden kann. Auch Aneuploidien für einzelne Chromosomen sind erfassbar. Balancierte Veränderungen, wie zum Beispiel Translokationen oder Polyploidien, sind hingegen nicht nachweisbar.

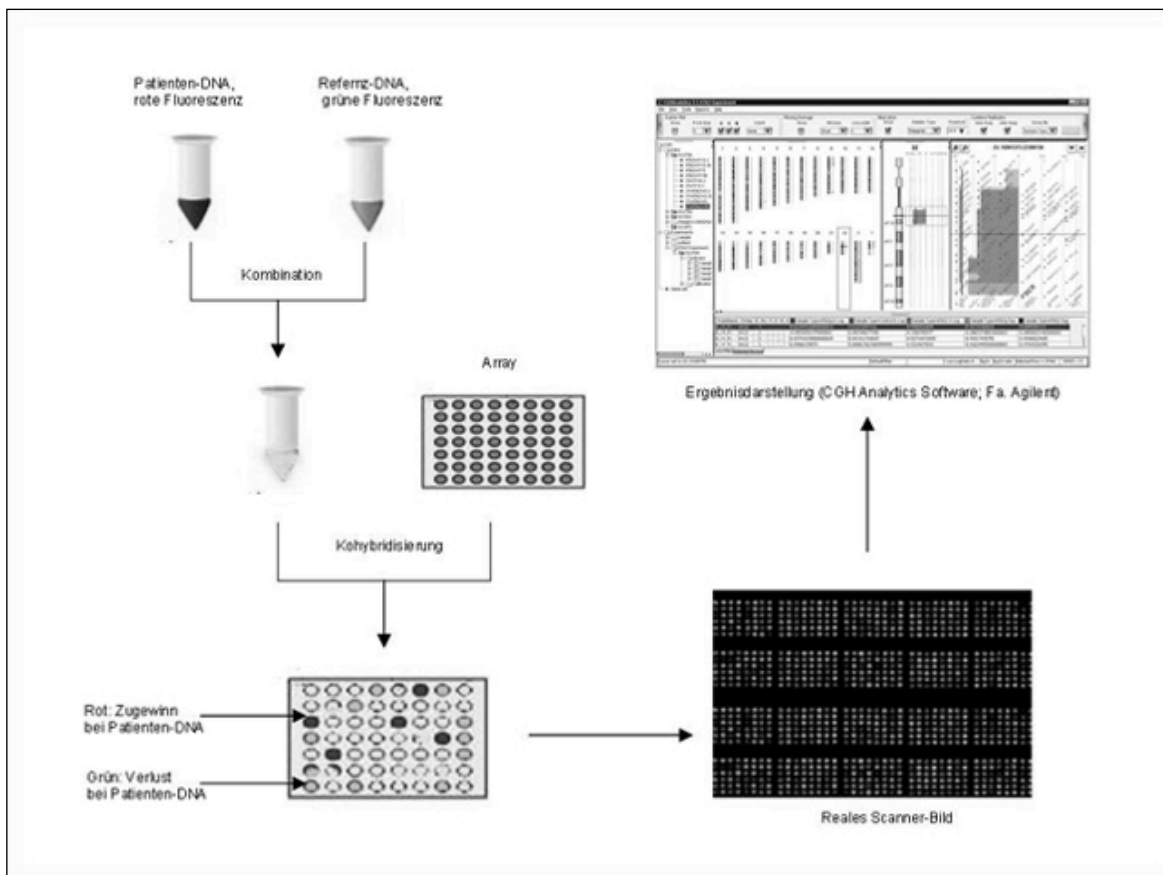


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Array-CGH; Referenz-DNA ist grün markiert, die Patienten-DNA rot; Verluste (Deletionen) von Patienten-DNA führen zu vermehrter grüner Fluoreszenz, Zugewinne (Duplikationen) von Patienten-DNA zu vermehrter roter Fluoreszenz (Tönnies [2002]).

A) Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des ND 1000 Spektralphotometers des Herstellers PeqLab bestimmt. Das Spektralphotometer kann anhand der Farbabsorption die DNA-Konzentration einer Probe quantifizieren. Für die Messung der DNA-Konzentration wurde

1 µl der Probe verwendet. Es wurde mit Wellenlängen zwischen 220 und 750 nm gemessen. Es wurde im Vergleich zur Farbintensität des TE-Puffers gemessen. Waren die Werte höher als 0,7, die das Spektralphotometer mithilfe der zugehörigen Software errechnete, ging man davon aus, dass die DNA-Konzentration hoch genug war, um ein möglichst aussagekräftiges Ergebnis in der Array-CGH-Analyse zu erhalten.

B) Verdau der Patienten- und Kontroll-DNA

Für den Verdau der DNA wurde Material aus dem DNA-Clean & Concentrator 5 TM-Kit des Herstellers Zymo-Research verwendet. Patienten- und Kontroll-DNA wurden in gleicher Weise behandelt. 1 µg DNA wurde mit dH₂O auf 42,5 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 5 µl des Puffers C des Herstellers Promega hinzugegeben, um ein optimales Milieu für die Restriktionsenzyme herzustellen. Von beiden Restriktionsenzymen wurden 1,25 µl hinzupipettiert, sodass das Gesamtvolumen 50 µl betrug. Es folgte eine zweistündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C.

C) Aufreinigung der verdauten DNA

1. 100 µl Bindungspuffer aus dem DNA-Clean & Concentrator 5 TM-Kit des Herstellers Zymo-Research wurden zu der DNA auf den Filter einer vorbereiteten Säule gegeben. Diese wurde 30 s bei 10 000 rpm zentrifugiert.
2. 200 µl Waschpuffer aus dem oben genannten Kit wurden zur Aufreinigung auf den Filter gegeben und erneut 30 s in einem Reaktionsröhrchen bei 10 000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde anschließend wiederholt.
3. 11 µl dH₂O wurden auf die DNA in den Filter gegeben, dann 1 min einwirken lassen, bevor die DNA erneut für 30 s bei 10 000 rpm zentrifugiert wurde.
4. 10 µl dH₂O wurden nun auf die DNA gegeben und erneut 1 min abgewartet, bevor wieder für 30 s bei 10 000 rpm zentrifugiert wurde. Die DNA befand sich nun aufgereinigt in einem Reaktionsröhrchen und der Filter konnte verworfen werden.

D) DNA-Markierung

Zur Markierung der DNA wurden Substanzen des Bio Prime Array-CGH Genomic Labeling Kit des Herstellers Invitrogen verwendet.

1. 20 μl 2,5 x Random-Primer aus dem oben genannten Kit wurden zu der verdauten und aufgereinigten DNA hinzugefügt und zur Inkubation bei 100 °C für 5 min ins Wasserbad gestellt. Danach erfolgte die Abkühlung im Eisbad für 1 min.
2. Zu der denaturierten DNA (41 μl) wurden 5 μl 10 x dUTP-Mix, 3 μl Cy5 (blau, Patienten-DNA) beziehungsweise Cy3 (rot, Kontroll-DNA) und 1 μl Exo-Klenow hinzugefügt. Das Gesamtvolumen betrug 50 μl .
3. Die DNA wurde für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Beendigung der Farbbindungsreaktion wurden anschließend 5 μl Stopppuffer des Kits hinzugefügt.

E) Aufreinigung der markierten DNA

1. 400 μl 1x TE-Puffer (pH 8,0) wurden zur markierten DNA gegeben und auf eine Filtersäule pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation in Reaktionsröhrchen von 8 min bei 9000 rpm.
2. Der Filter wurde umgedreht und auf ein neues Reaktionsröhrchen gesetzt. Es wurde wieder bei gleicher Geschwindigkeit 1 min zentrifugiert.
3. Die Konzentration der DNA wurde erneut mithilfe des Nano Drops (PeqLab) gemessen. Die Konzentration der DNA wurde über die Farbintensität bei einer Wellenlänge zwischen 220 und 750 nm gemessen. In der vergleichenden Messung diente TE-Puffer als Material. Der erwartete Wert betrug mindestens 7,0.
4. Patienten- und gleichgeschlechtliche Kontroll-DNA wurden nun zu gleichen Teilen, je 50 μl , miteinander vermischt.
5. 400 μl 1 x TE-Puffer (pH 8,0) wurden hinzugefügt und auf einen Filter gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 9000 rpm für 8 min.
6. Der Filter wurde umgedreht, auf ein neues Reaktionsröhrchen gesetzt und erneut bei 9000 rpm 1 min zentrifugiert.
7. Die Proben wurden mit der Pipette gemessen und auf das gewünschte

Volumen (44K-Array: 158 µl; 105K-Array: 91,5 µl; 244K-Array: 158 µl) mit dH₂O aufgefüllt.

8. Das weitere Vorgehen war an die Auflösung der Array-Plattform gebunden. Es wurde das Agilent Hybridisierungs Kit des Herstellers Agilent Technologies verwendet:

- 44K-Array: 50 µl Human Cot-1 DNA (Invitrogen), 52 µl Agilent 10 x *blocking agent* und 250 µl Agilent 2 x *hybridization buffer* wurden der DNA hinzugefügt. Dies ergab für den 44K-Array ein Gesamtvolumen von 520 µl.

- 105K-Array: 28,8 µl Human Cot-1 DNA (Invitrogen), 30 µl Agilent 10 x *blocking agent* und 148,5 µl Agilent 2 x *hybridization buffer* wurden der DNA hinzugefügt. Dies ergab für den 105K-Array ein Gesamtvolumen von 298,8 µl.

- 244k-Array: 50 µl Human Cot-1 DNA (Invitrogen), 52 µl Agilent 10 x *blocking agent* und 260 µl Agilent 2 x *hybridization buffer* wurden der DNA hinzugefügt. Dies ergab für den 244K-Array ein Gesamtvolumen von 520 µl.

Die Proben wurden nun 3 min im Wasserbad bei 100 °C und danach 30 min im Heizblock bei 37 °C inkubiert.

9. Anschließend wurden die Proben in die Dichtungsobjektträger (Agilent Technologies) gefüllt, mit der entsprechenden Array-Plattform verschlossen und in der Hybridisierungskammer in den Hybridisierungsöfen von Shel Lab eingesetzt. Hier verblieben die Objektträger 40 bis 48 h bei 65 °C.

F) Waschvorgang, Ozonstabilisierung und Trocknung

1. Die Arrays und der Objektträger wurden in Waschpuffer 1 unter Magnetührung voneinander getrennt.
2. Nur der Objektträger wurde in einen weiteren Behälter mit Waschpuffer 1 gesetzt, dort verblieb er 5 min.
3. Der Objektträger wurde für weitere 2 min in Waschpuffer 2 gestellt.
4. Der Objektträger wurde für 1 min in Acetonitril (Sigma) inkubiert.

5. Nun wurden die Arrays für 30 s in die *Stabilization & Drying-Solution* des Herstellers Agilent Technologies getaucht. Der Objektträger wurde dann langsam aus der Lösung herausgezogen. Dabei war darauf zu achten, dass sich keinerlei Tropfen bildeten. Die Arrays waren unter Ausschluss von Licht aufzubewahren, um zu vermeiden, dass die Farbintensität der DNA abnahm, die an die Oligonukleotide auf dem Objektträger gebunden war.

G) Einscannen der Arrays

Die Arrays wurden mithilfe des Scanners Axon GenePix 4000 B des Herstellers Molecular Devices eingelesen. Die Auflösung betrug 5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Die Software Feature Extraction V9.1 und CGH Analytics V3.4.27 des Herstellers Agilent Technologies maßen die Signalstärke der einzelnen Bildpunkte und stellten sie grafisch dar.

H) Auswertung

Die Auswertung der Arrays erfolgte mittels zwei unterschiedlicher Softwares. Die ersten 23 Analysen wurden mit der Software Analytics V3.5 des Herstellers Agilent Technologies durchgeführt und die darauffolgenden mit der Software Agilent Feature Extraction V9.5.3. des gleichen Herstellers. Das gesamte Genom wurde ausgewertet und nach Regionen untersucht, die mehr als zehn aufeinanderfolgende Oligonucleotide außerhalb von $|0,5|$ bei einer Transformierung von \log_2 aufwiesen. Wenn eine solche Region außerhalb von bekannten *copy number variations* (CNV) lag, wurde sie als aberrant angenommen und mittels FISH-Analyse verifiziert.

2.2.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit lokusspezifischen Sonden

Um ein positives Ergebnis der Array-CGH mit einem anderen diagnostischen Verfahren zu verifizieren, wurde die FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) gewählt, da mit dieser Technik gezielt Chromosomenregionen dargestellt werden können. Diese Analysen wurden bei den meisten Patienten ebenfalls durch die Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel, durchgeführt.

Sie beruht auf der Basenpaarung von markierten einzelsträngigen DNA-Sonden mit ihren komplementären Zielsequenzen in der zu untersuchenden chromosomalen DNA (Heinrich [2010]).

Ein Vorteil gegenüber den traditionellen Bänderungstechniken ist die Möglichkeit, Chromosomen in allen Phasen des Zellzyklus, also auch während der Interphase, darzustellen. Mittels FISH können Veränderungen von 0,1 Mb und weniger nachgewiesen werden. Das Prinzip der FISH ist in der folgenden Abbildung bildlich dargestellt.

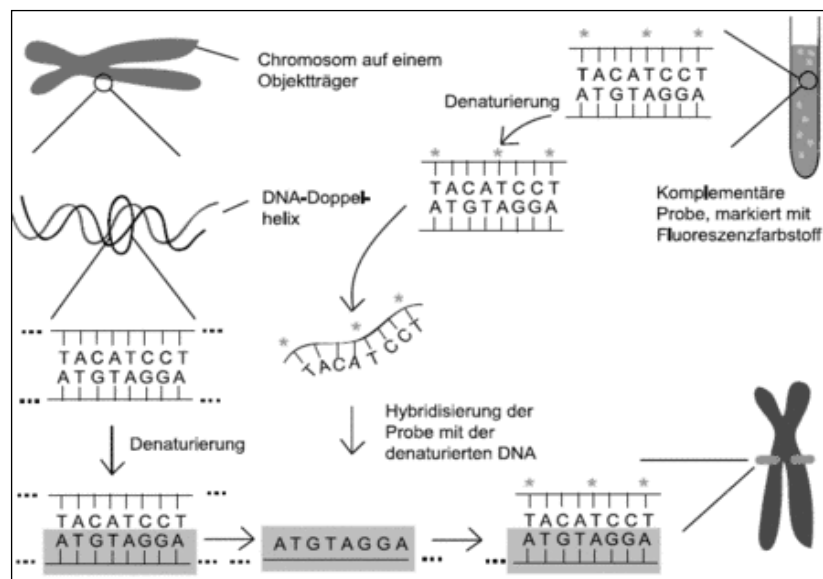


Abbildung 2: Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Chromosomenpräparaten (Heinrich [2010])

Bei der verwendeten „direkten Methode“ werden die Sonden direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Es entsteht dann unter Anregung ein Fluoreszenzsignal am Ort („*In Situ*“) der Bindung („Hybridisierung“).

Die fluoreszierenden gebundenen Sonden können mit Fluoreszenzmikroskopen, die mit speziellen Filtern ausgerüstet sind, detektiert werden.

In dieser Arbeit dienten als Untersuchungsmaterial PHA-stimulierte Blutlymphozyten, die in Carnoy's Fixativ aufbewahrt wurden, bestehend aus einem Eisessig-Methanol-Gemisch.

2.2.3 Erfassung der klinischen Daten

Um die klinischen Daten zu erfassen, wurden die Krankenakten der Patienten nach folgenden Kriterien untersucht: Es wurde zunächst darauf geachtet, ob eine Störung der geistigen

Entwicklung sowohl bei dem Patienten selbst, als auch in der Familienanamnese zu diagnostizieren war. Prä- und postnatale Wachstumsretardierung und eine Mikro-beziehungsweise Makrozephalie wurden als relevant angesehen, außerdem faziale Dysmorphiezeichen sowie andere kongenitale Fehlbildungen. Verhaltensauffälligkeiten und zerebrale Krampfanfälle wurden ebenfalls erfasst.

Der Großteil waren Patienten der Kinderklinik des UKSH, Campus Kiel, sodass ausreichende Informationen zu klinischen Symptomen der Patienten zur Verfügung standen. Einige Fälle wurden jedoch von anderen Instituten, Kliniken und Praxen dem Institut für Humangenetik der Universität Kiel zur Array-CGH-Analyse zugesandt. Hier fehlten in einigen Fällen genaue Angaben zur Klinik der Patienten. Um auch die klinischen Symptome dieser Patienten erfassen zu können, wurde ein Fragebogen erstellt. Dieser Fragebogen deckte die gleichen Punkte ab, nach denen auch die Unterlagen der Patienten der Kinderklinik des UKSH, Campus Kiel untersucht wurden. Im Anhang 1 ist der Fragebogen zu finden. Außerdem wurden Angaben zu vorherigen zytogenetischen Analysen, deren Ergebnissen, Karyotyp, eventuell erfolgten genetischen Analysen bei den Eltern, sowie das eingesandte Material, Einsendedatum und Untersuchungsort den Unterlagen entnommen.

Die Daten wurden in einer Excel-Tabelle zusammengestellt, sodass eine Auswertung nach speziellen Fragestellungen mithilfe dieses Computerprogramms ermöglicht wurde sowie entsprechende Grafiken generiert werden konnten.

2.2.4 Erfassung der Kopienzahlvariationen – *Copy number variations* (CNV)

Zur Erfassung der Kopienzahlvariationen wurden die einzelnen Array-CGH-Analysen mithilfe der Software Agilent Feature Extraction V9.5.3 (Agilent Technologies) erneut bei einer Transformierung von \log_2 betrachtet. Ein Oligonukleotid und mehr, die oberhalb von +2 lagen, wurden als homozygot dupliziert angesehen. Mehr als drei konsekutive Oligonukleotide zwischen +1 und +2 wurden als heterozygot dupliziert bezeichnet.

Lagen ein oder mehrere Oligonukleotide unter -2, war von einer homozygoten Deletion und bei mehr als drei konsekutiven Oligonukleotide zwischen -1 und -2 von einer heterozygoten Deletion auszugehen. Diese *copy number variations* (CNV) wurden mit den internationalen Datenbanken (*Golden path* von UCSC, HGVS und *Ensembl*) verglichen um festzustellen, ob es sich um bekannte CNV handelt.

Da in den ersten Untersuchungen eine andere Software, Analytics V3.5 von Agilent Technologies, angewandt wurde, wurden die ersten 23 Analysen hinsichtlich der Erfassung und Verteilung der CNV nicht berücksichtigt.

Die Erfassung der CNV wurde mithilfe von Excel durchgeführt. Es wurde eine Tabelle erstellt und zur besseren Darstellung aus den zusammengestellten Daten eine Grafik generiert, die in Abbildung 8 auf der Seite 37 zu finden ist.

3 Ergebnisse

3.1 Analyseergebnisse

Am Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel wurden vom 01.08.2006 bis zum 01.09.2007 150 Array-CGH-Analysen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden von diesen 150 Analysen 17 nicht berücksichtigt, da es sich um ausgewählte Fälle handelte, bei denen nur bestimmte Regionen genauer analysiert wurden. Bei drei Analysen wurde eine Array-CGH an Plattformen unterschiedlicher Auflösung beziehungsweise zweimal durchgeführt, sodass insgesamt die Array-CGH-Befunde von 130 Patienten in dieser Arbeit analysiert wurden. Genmaterial von 116 Patienten wurde mit der Frage nach einer Chromosomenstörung bei Entwicklungsstörung bislang unklarer Genese analysiert. Bei 14 Patienten war bereits eine Chromosomenstörung bekannt, die jedoch durch die Array-CGH weiter eingegrenzt werden konnte. Die Array-CGH-Analysen wurden an Plattformen unterschiedlicher Auflösung durchgeführt. Der Großteil, 88 Analysen (66 %), wurde mit 105K-Arrays durchgeführt. 38 Analysen (29 %) wurden mit 44K-Arrays und lediglich sieben Analysen (5 %) wurden mit 244K-Arrays durchgeführt.

3.1.1 Ergebnisse der Analysen bei bekannter Chromosomenstörung

Bei 14 Analysen war bereits eine Chromosomenstörung durch vorherige genetische Untersuchungen vorbeschrieben. Mittels Array-CGH konnte bei neun der 14 Analysen eine Aberration bestätigt und genauer eingegrenzt werden.

Bei einer Patientin konnte keine chromosomale Imbalance im Bereich der Bruchpunkte der bekannten Inversion im Chromosom 4 festgestellt werden. Diese Inversion ist damit am ehesten als balanciert anzusehen. Zusätzlich konnte allerdings eine *de novo* Deletion in

Chromosom 1q44 entdeckt werden, die als kausal für den Phänotyp der Patientin anzusehen war. Genaue Angaben zu den anderen Analysen werden in der folgenden Tabelle 4 aufgezeigt.

Karyotyp	Befund der Array-CGH	Array	Geistige Entwicklung	Faziale Dismorphien	Sonstige Auffälligkeiten
46,XX,inv(4)	Deletion von 1,1 Mb in 1q44	44K 244K	Globale Entwicklungsstörung	Prominente Nasenwurzel, langes Philtrum, lateral abfallende Lidachse	Vierfingerfurche, muskuläre Hypotonie
46,XX,t(7;8;14)	Deletion von 3,4 Mb in 7q21.2 - q21.3 und Deletion von 7,7 Mb in 8p21.2- p22	105K	Keine Angabe	Keine Angabe	Kein Angabe
46,XX,der(10)del(10)(q26)t(10;12)(q26;q15)	Deletion von 5,1 Mb in 10q26	105K	Globale Entwicklungsstörung	Gesichtsasymmetrie, flaches Gesicht, breite Nasenwurzel, Epikanthus bds., große, dysplastische Ohren, lateral abfallende Mundwinkel	Kopfneigung nach links, tiefer Nackenhaaransatz
46,XY,t(5;11;18)	Deletion von 25,3 Mb in 11q14.2-23.1	44K	Gestige Entwicklungsstörung	Hypertelorismus	Gaumenspalte, offenes Foramen ovale
46,XY,IC-Deletion 14	Deletion von 1,1 Mb in 14q13	105K	Gestige Entwicklungsstörung	Keine Dismorphien	
46,XY,r(18)	Deletion von 12,8 Mb in 18p11.22	105K	Entwicklungsstörung	Dysplastische Ohren, langes Philtrum, schmales Oberlippenrot	Atypische Vierfingerfurche links, muskuläre Hypotonie
46,XX,dup(13)(q33)	Deletion von 8,9 Mb in 13q33-q34 und Duplikation von 2.8 in 6q27	105K	Globale Entwicklungsstörung	Dysplastische Ohrmuscheln, Epikanthus	
46,XY,der(9)t(9;15)(p23;q25.3)	Deletion von 11,5 Mb in 9pter-p23 und Duplikation von 14,5 Mb in 15q25.3-qter	105K	Geistige Entwicklungsstörung	Längliches Gesicht mit betontem Kinn, breite Zahnleisten, offener Mund	Muskuläre Hypotonie
mos46,XY[19]/47,XY,+r(19)[11]	Deletion von 2,59 Mb in 19p13, Duplikation von 0,42 Mb in 19q11 und Duplikation von 2,3 Mb in 19q13	105K	Geistige Entwicklungsstörung	Telekanthus, tiefsitzende Ohren	Plumpe Hände und Füße

Tabelle 4: Analysen mit pathologischem Array-CGH-Befund bei bekannter chromosomaler Aberration

Bei vier Analysen ging man aufgrund vorangegangener genetischer Analysen davon aus, dass eine bestimmte chromosomale Aberration vorlag. In der Array-CGH konnte diese jedoch nicht nachgewiesen werden.

Weitere Informationen zu den Aberrationen, die in der Array-CGH nicht bestätigt werden konnten, sind in der Tabelle 5 angegeben. Im Kapitel 3.2 (Charakteristika der Aberrationen) wird genauer auf die einzelnen Aberrationen eingegangen.

Karyotyp	Array	Geistige Entwicklung	Faziale Dismorphien	Sonstige Auffälligkeiten
46,XX,t(3;8) (p26; p22)	44K	Globale Entwicklungsstörung	Vorhanden, jedoch ohne genaue Angaben	
mos46,XX/46,XX r(17)	105K	Entwicklungsstörung	Keine Angabe	Mikrozephalie, postnataler Kleinwuchs
46,XY,t(1;2) (p13;p23)	244K	Globale Entwicklungsstörung	Keine Angabe	Muskuläre Hypotonie, kurze, plumpe Hände Klumpfüße, Mikrogenitale
46,XY,ins(18;?) (p11.2;?)	44K	Entwicklungsstörung mit Sprachentwicklungsverzögerung	Keine Angabe	Mikrozephalie, postnataler Kleinwuchs

Tabelle 5: Analysen mit unauffälliger Array-CGH bei zuvor diagnostizierter Chromosomenaberration

Zusammengefasst konnten mittels Array-CGH neun Aberrationen bestätigt und näher eingegrenzt, sowie fünf Aberrationen nicht bestätigt werden. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse soll die folgende Abbildung dienen.

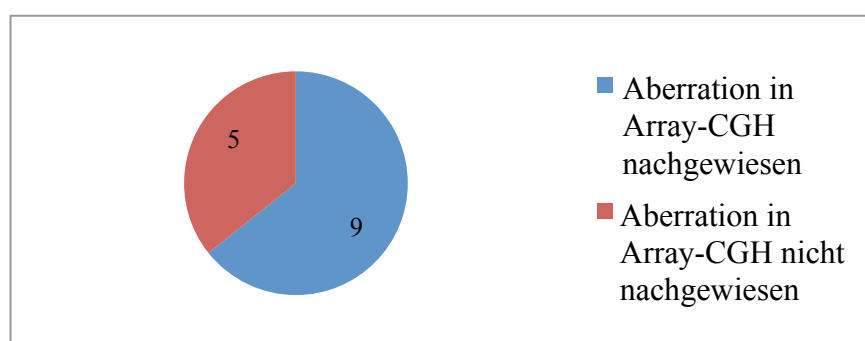


Abbildung 3: Nachweis einer bekannten chromosomalen Aberration bei Patienten mit Entwicklungsstörung (n = 14)

3.1.2 Ergebnisse der Array-CGH bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung und unauffälligem Karyotyp

Von den 116 Patienten, bei denen zur Abklärung einer Entwicklungsstörung eine Array-CGH-Analyse vorgenommen wurde, konnte in 19 Fällen eine Aberration diagnostiziert werden. Es wurden verifizierende FISH-Untersuchungen an den Chromosomenpräparaten der Patienten mit Aberration in der Array-CGH-Analyse durchgeführt. Anschließend wurden die gleichen Sonden verwendet, um zusätzlich zytogenetische Untersuchungen an den Chromosomen der Eltern durchzuführen. Hierbei stellte sich heraus, dass bei 14 Patienten eine *de novo* Aberration besteht, die wahrscheinlich kausal mit den klinischen Symptomen der Patienten in Zusammenhang steht und mittels vorheriger Analysen nicht beschrieben werden konnte. Genaue Angaben zu den Patienten mit einer *de novo* Aberration in der Array-CGH können Tabelle 6 entnommen werden.

Karyotyp	Befund der Array-CGH	Array	Geistige Entwicklung	Faziale Dismorphien	Sonstige Auffälligkeiten
46,XX	Deletion von 8,4 Mb in 2q31	44K	Mittelschwere Entwicklungsstörung	Keine Angabe	Syndaktylie der Zehen, Mikrozephalus, Mikrogenie
46,XX	Deletion von 4,5 Mb in 7p15.3-p21.1	105K	Globale Entwicklungsstörung	Epikanthus, breite Nasenwurzel, flaches Mittel-gesicht, dysmorphe Ohren, lateral ansteigende Lidachsen	Vierfinger-/Sandalenfurchen, submuköse Gaumenspalte, Kraniosynostosen
46,XX	Deletion von 1,5 Mb in 7q21.3	105K	Keine geistige Entwicklungsstörung	Mandelförmige Augen, dysmorphe Ohrmuscheln	Spalthände/-füße, Wangenknochenhypoplasie, Mikrogenie, Uvula bifida
46,XY	Deletion von 7,8 Mb in 16p12.1	44K	Sprachbetonte Entwicklungsstörung	Enge Lidspalte, flaches Philtrum, schmales Oberlippenrot, flaches Mittelgesicht, flache Nasenwurzel	Kleinwuchs
46,XY	Deletion von 4,1 Mb in 1q44	244K	Globale Entwicklungsstörung	Ohranhängsel, lateral ansteigende Lidachse, schmales Lippesrot	Vierfingerfurchen rechts, hypoplastische Mamillen, Gehirnfehlbildung, Mikro- und Retrognathie, Balkonstirn, Verkürzung der 2. Zehe, Herzvitium, Nierenagenesie
46,XY	Deletion von 1,6 Mb in 10p12.1	105K	Entwicklungsstörung	Dysmorphe Ohren, Epikanthus, breite Nasenwurzel	
46,XY	Deletion von 2 Mb in 14q13	105K	Entwicklungsstörung		Brachycephalie, fokale Epilepsie, muskuläre Hypotonie, Hypothyreose, Nystagmus, gastroösophagealer Reflux
46,XY	Deletion von 3 Mb in 16p13.2	44K	Globale Entwicklungsstörung	Dysmorphe Ohren, Widow's peak, Epikanthus	Kurze Finger, Choanalstenose, Pseudo-Lennox-Syndrom
46,XY	Deletion von 1,2 Mb in 18p11.22	105K	Sprach- und globale Entwicklungsstörung	Breite Nasenwurzel	
46,XY	Deletion von 1,5 Mb in 22q13.33	105K	Sprachentwicklungsverzögerung	Synophrys, dysmorphe Ohren, Strabismus	Kleine Café-au-lait-Flecken, generalisierte Hypertrichose, kurze Finger, Syndaktylien an den Füßen
46,XX	Duplikation von 27 Mb in 2q31.2-33.2	44K	Globale Entwicklungsstörung	Epikanthus, lateral ansteigende Lidachsen	Muskuläre Hypotonie
46,XX	Duplikation von 17,2 Mb in 5q12-q14	44K	Keine Angabe	Große Ohrfläppchen, Entropium	Überstreckbare Gelenke
46,XX	Duplikation von 3,9 Mb in 17p11.2	105K	Sprach- und globale Entwicklungsstörung	Lateral abfallende Lidachsen, Epikanthus, kleines Mittelgesicht, breite Nasenwurzel	Muskuläre Hypotonie, leichter Autismus

Tabelle 6: Analysen mit pathologischem Array-CGH-Befund bei zuvor ungeklärter Entwicklungsstörung

Durch die zytogenetischen Untersuchungen an den Chromosomen der Eltern fiel auf, dass bei fünf Analysen die Aberration von einem klinisch unauffälligen Elternteil vererbt wurde und somit als familiär erworben gilt. Bei diesen Patienten ist davon auszugehen, dass die Aberration nicht allein für die Entwicklungsstörung verantwortlich ist, da die analysierte Chromosomenveränderung bei den Eltern keine beziehungsweise nicht die gleichen Symptome verursachte. Weitere Informationen zu den Patienten mit einer familiären Aberration sind in Tabelle 7 dargestellt.

Karyotyp	Array-CGH-Befund	Array	Betroffenes Elternteil	Geistige Entwicklung der Patienten	Faziale Dismorphien der Patienten	Sonstige Auffälligkeiten der Patienten
46,XX	Deletion von 0,4 Mb in 16q23.3-q24.1	105K	Mutter	Globale Entwicklungsstörung	Keine Angabe	Mikrozephalie, zerebrale Bewegungsstörung
46,XX	Deletion von 1,7 Mb in 16p13.11	105K	Vater	Störung der geistigen Entwicklung	Flächiges Gesicht, breite Nasenwurzel und breiter Nasenrücken	
46,XY	Deletion von 1,9 Mb in 5q23.2	105K	Mutter	Entwicklungsstörung	Hypertelorismus, langer Nasenrücken, dysmorphe Ohren	
46,XX	Duplikation von 1,3 Mb in 12q14.1	105K	Mutter	Entwicklungs- und Sprachentwicklungsstörung	Keine Dismorphien	Schwerer Autismus mit Autoaggression
46,XY	Duplikation von 1,6 Mb in 7q21.13	105K	Vater	Bisher keine Entwicklungsstörung	Keine Dismorphien	Frontalnahtsynostose, Trigonozephalus, präaxiale Hexdaktylie rechts

Tabelle 7: Analysen mit familiärer Aberration in der Array-CGH

Zusammengefasst konnte bei 97 Patienten durch die Array-CGH-Analyse keine Chromosomenveränderung als Ursache der Entwicklungsstörung beschrieben werden. Bei 14 Patienten konnte mittels Array-CGH eine Aberration analysiert werden, die als kausal für den Phänotyp des jeweiligen Patienten anzusehen ist. Bei fünf Analysen wurde eine familiäre Aberration beschrieben, die nicht allein für die Entwicklungsstörung des jeweiligen Patienten verantwortlich ist. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse dient die folgende Abbildung.

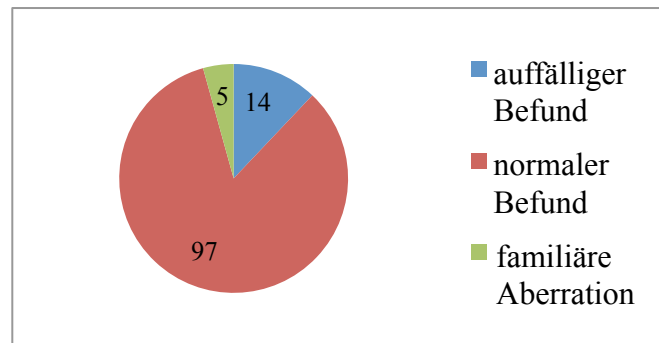


Abbildung 4: Nachweis einer chromosomalen Aberration bei Patienten mit einem Retardierungssyndrom unklarer Genese (n=116)

3.2 Charakteristika der nachgewiesenen Aberrationen

Bei elf pathologischen Befunden, die bereits vor der Array-CGH-Analyse bekannt waren, fanden sich zehn Deletionen und vier Duplikationen. Der Median der Größe der bereits zuvor beschriebenen Deletionen in der Array-CGH lag bei 6,4 Mb. Die kleinste detektierte Deletion war 1,1 Mb groß, die größte 25,3 Mb. Der Median der Größe der hier analysierten Duplikationen lag bei 2,55 Mb. Die größte Duplikation betrug 14,5 Mb, die kleinste 0,42 Mb. Unter den *de novo* aufgetretenen Aberrationen fanden sich neun Deletionen und drei Duplikationen. Der Median der Größe der *de novo* analysierten Deletionen war 3 Mb (kleinste Deletion 1,2 Mb, größte Deletion 8,4 Mb) und der Median der Größe der *de novo* diagnostizierten Duplikationen betrug 17,2 Mb (kleinste Duplikation 3,9 Mb, größte Duplikation 27 Mb).

Bei den familiären Veränderungen handelte es sich um eher kleinere Verluste beziehungsweise Zugewinne. Der Median der Größe der familiären Deletionen lag bei 1,7 Mb (kleinste Deletion 0,4 Mb, größte Deletion 1,9 Mb) und der Median der Größe der familiären Duplikationen bei 1,45 Mb (kleinste Duplikation 1,3 Mb, größte Duplikation 1,6 Mb).

Im nachfolgenden Diagramm sind die Größen der Aberrationen in der Array-CGH bei Analysen mit zuvor bekannter, *de novo* und familiärer Veränderung im Vergleich unter Angabe des jeweiligen Median dargestellt.

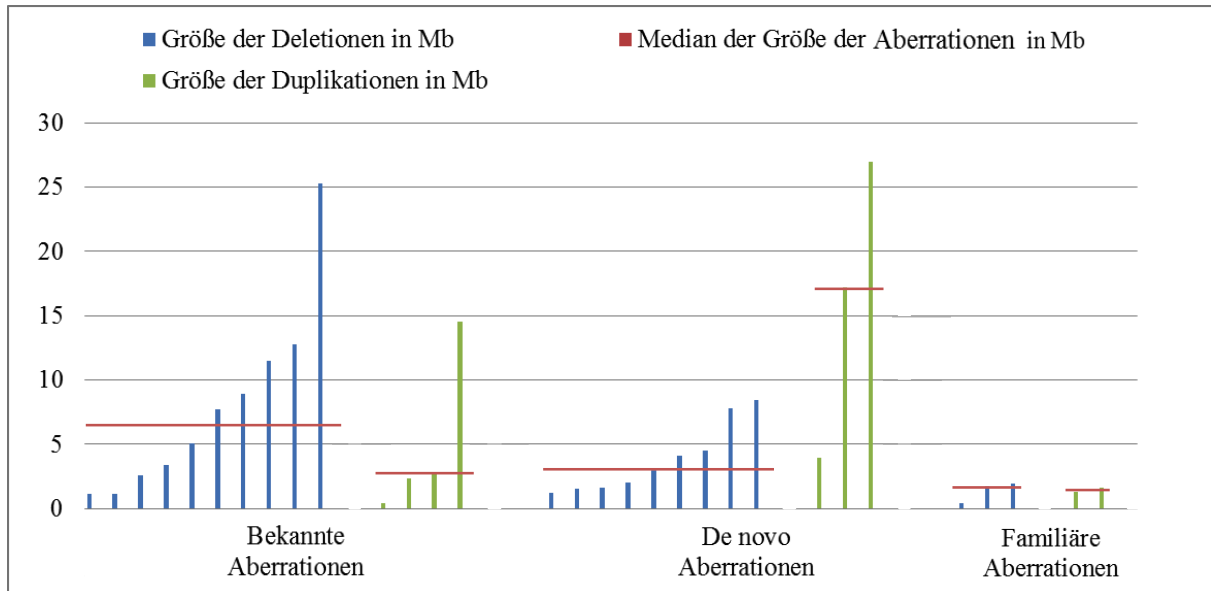


Abbildung 5: Größe der Aberration in der Array-CGH bei Analysen mit zuvor bekannter, *de novo* und familiärer Veränderung im Vergleich unter Angabe des jeweiligen Median

3.3 Einfluss der Auflösung der unterschiedlichen Arrays auf die Detektionsrate

Wie bereits beschrieben, wurden Arrays unterschiedlicher Auflösung verwendet. Von den 38 Analysen, die mit 44K-Arrays durchgeführt wurden, zeigten acht Analysen einen pathologischen Befund. Dies entspricht einer Detektionsrate von 21 %. Von diesen acht Aberrationen waren zwei (5 %) Aberration durch vorhergehende Untersuchungsverfahren bereits beschrieben, sechs (16 %) wurden neu entdeckt und konnten als Ursache für einen pathologischen Phänotyp angenommen werden.

Die DNA von 86 Patienten wurde mit 105K-Arrays untersucht. Hier zeigten sich sechs (7 %) *de novo* Aberrationen, sieben (8 %) bekannte Chromosomenstörungen konnten bestätigt werden und fünf (6 %) familiäre Veränderungen wurden nachgewiesen.

Die hochauflösende 244K-Plattform wurde nur bei sieben Analysen verwendet. Hier konnte in einem Fall eine (14 %) *de novo* Aberration detektiert werden. Bei einer anderen Analyse

war bereits durch den 44K-Array eine Deletion in 1q44 aufgefallen und zur genaueren Bruchpunktanalyse ist eine erneute Array-CGH mit höherer Auflösung durchgeführt worden. In einem anderen Fall konnte weder mit einem 44K-Array, noch mit einem 105K-Array eine Aberration bei klinischem Verdacht auf eine syndromale Erkrankung mit geistiger sowie motorischer Entwicklungsstörung und Dysmorphiezeichen detektiert werden.

In fünf Fällen konnte trotz pathologischer Befunde in genetischen Voruntersuchungen in der Array-CGH die entsprechende Aberration nicht bestätigt werden. Bei diesen Untersuchungen wurden zweimal 44K-Arrays und zweimal 105K-Arrays sowie ein 244K-Array verwendet.

Da der Stichprobenumfang insgesamt gering ist (133 Analysen an Genmaterial von 130 Patienten) und die Anteile der verschiedenen Arrayauflösungen sich deutlich voneinander unterscheiden, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob mit höher auflösenden 244K-Arrays signifikant mehr und vor allem kleinere Aberrationen detektiert werden. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheinen jedoch die geringer auflösenden 44K-Arrays keine erheblich niedrigere Detektionsrate aufzuweisen. Im Gegenteil, die Detektionsrate lag bei den kleinen 44K-Arrays am höchsten bei 21 %. Außerdem konnte die Aberrationen, die sowohl mit einem 244K- als auch mit einem 44K-Array analysiert wurden, auch mit dem geringer auflösenden Array nachgewiesen werden. Zur Verdeutlichung dient Abbildung 6.

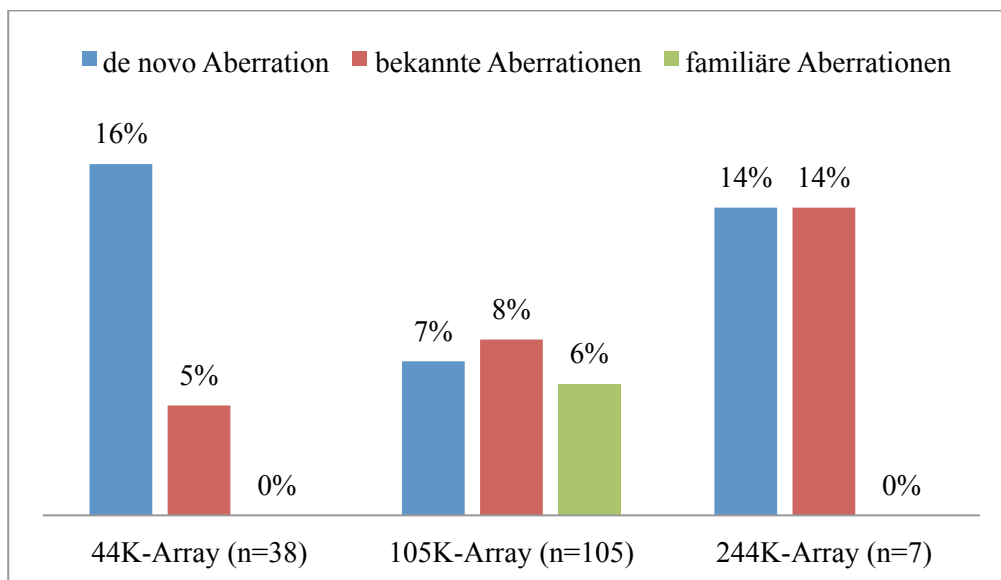


Abbildung 6: Detektionsraten der unterschiedlich großen Arrays im Vergleich bezogen auf *de novo*, bekannte und familiäre Aberrationen

In Abbildung 7 wird die Größe der Abberationen in Abhängigkeit von der Arrayplattform dargestellt. Es zeigt sich, dass auch kleine Aberrationen mit dem geringer auflösenden 44K-Array detektiert werden konnten.

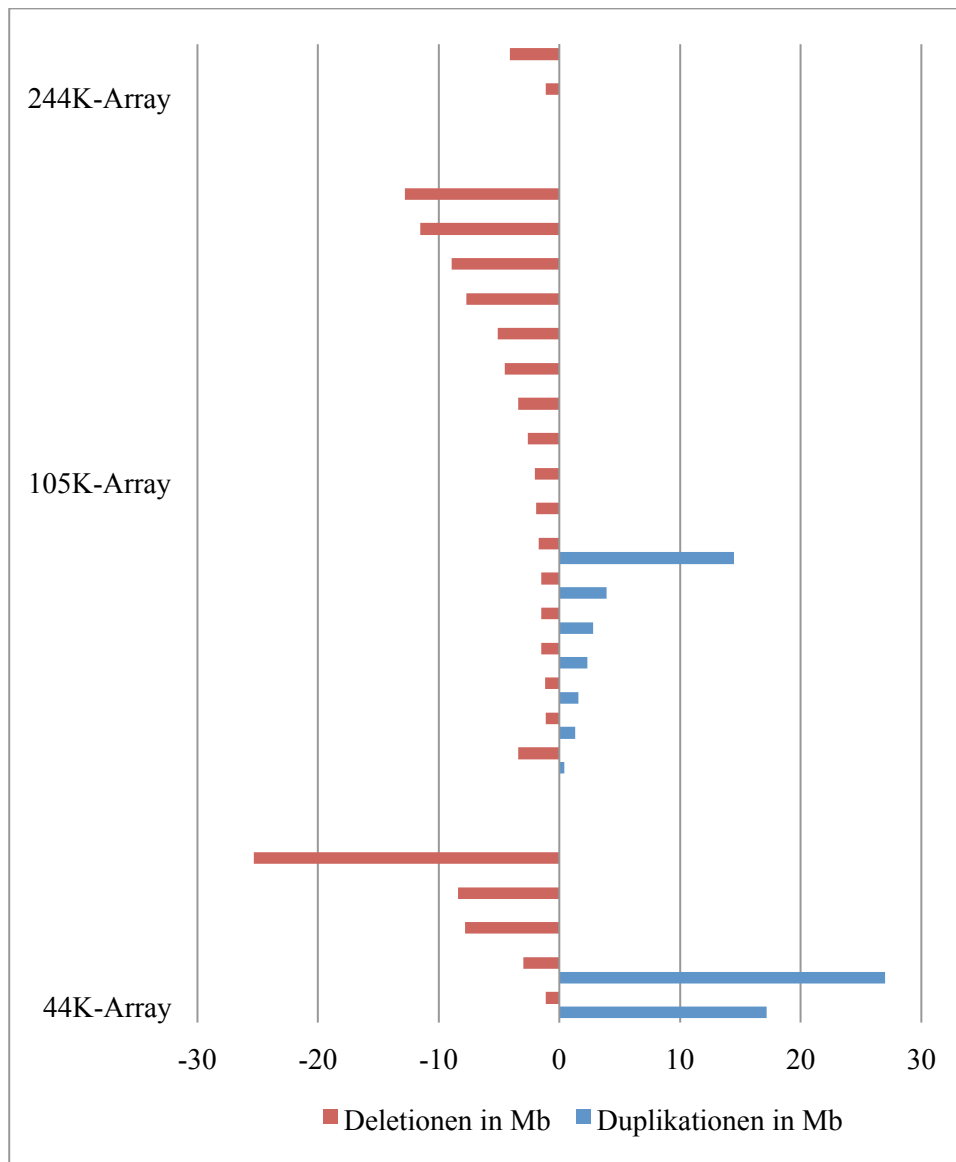


Abbildung 7: Darstellung der Größe der Deletionen und Duplikationen in Abhängigkeit von der Arrayplattform

3.4 Verteilung der Kopienzahlvariation (CNV)

Zur Auswertung der Polymorphismen wurden hier ausschließlich jene aufgeführt, die in mehr als 25 % der analysierten Proben auftraten. Außerdem mussten sie den oben genannten Kriterien genügen. Als homozygot dupliziert wurden bei einer Transformation von log₂ ein

oder mehrere Oligonukleotide größer +2 angesehen. Als homozygot deletiert galten ein oder mehrere Oligonukleotide kleiner -2. Zu den heterozygot veränderten Chromosomenregionen zählten solche, die in der Transformation \log_2 mindestens drei konsekutive Oligonukleotide zwischen -2 und -1, beziehungsweise +2 und +1 zeigten.

Es wurde die Verteilung der CNV in den Analysen mit pathologischem Befund mit denen in den Analysen ohne pathologischen Befund verglichen. Außerdem wurde unterschieden in welcher Form ein Locus verändert war, also homo- oder heterozygot, dupliziert oder deletiert.

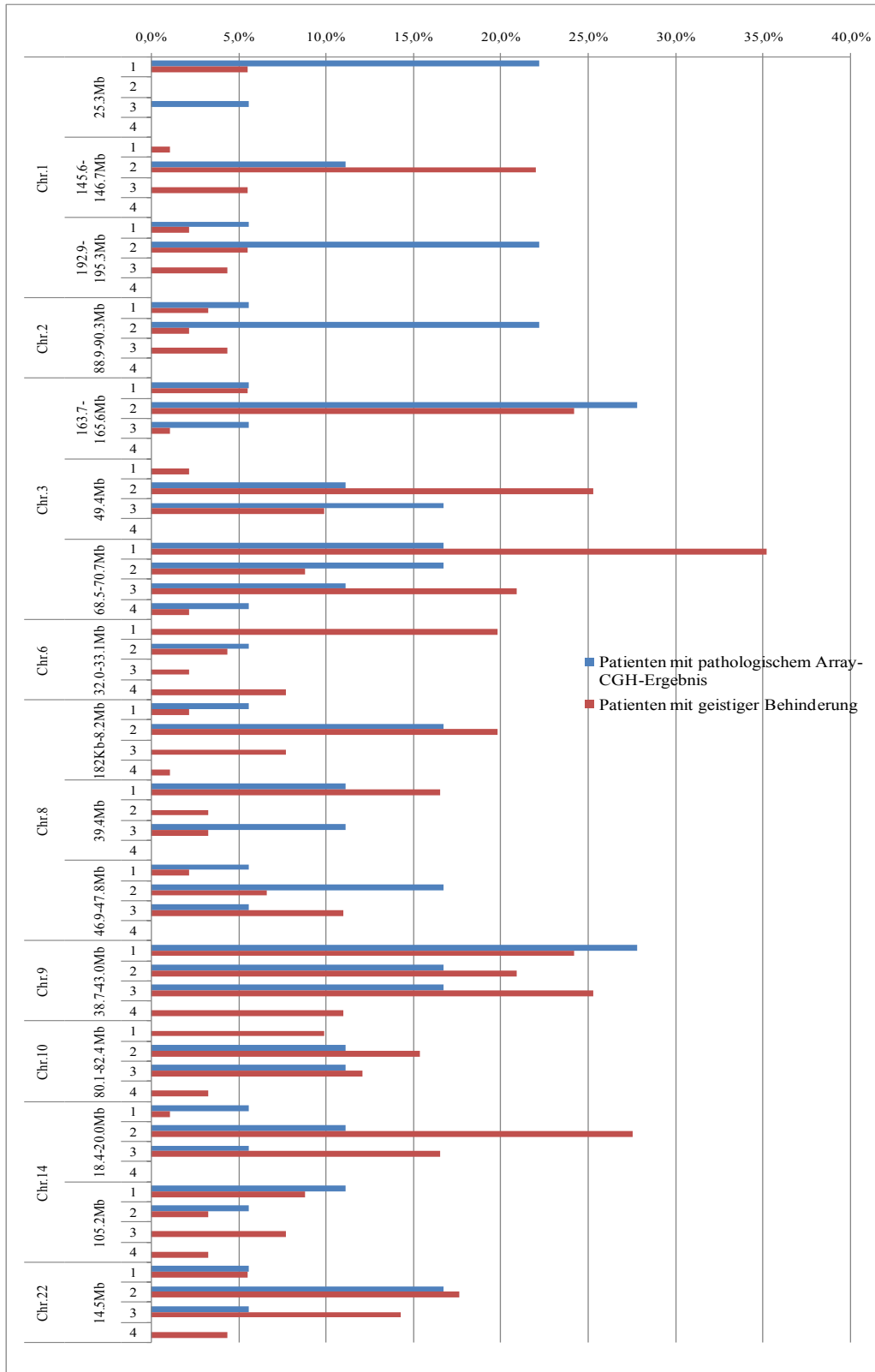


Abbildung 8: Darstellung zur Verteilung der häufigen CNV (> 5% der Probanden) unter den Analysen mit und ohne pathologischem Befund in der Array-CGH. Die CNV sind unter Angabe des jeweiligen Chromosomen (= Chr.) und des Locus auf dem Chromosom in Mb angegeben. Zusätzlich wird unterschieden zwischen 1 = homozygot deletiert, 2 = heterozygot deletiert, 3 = heterozygot dupliziert und 4 = homozygot dupliziert.

3.5 Symptome bei Patienten mit gesichert pathologischem Befund in der Array-CGH-Analyse

Um herauszufinden, welche Symptome die Wahrscheinlichkeit eines positiven Array-CGH-Ergebnisses erhöhten, wurden ausschließlich die Patienten mit einer Entwicklungsstörung unklarer Genese betrachtet. Die Patienten mit bereits bekannter Chromosomenstörung wurden nicht berücksichtigt.

Von den 14 Patienten zeigten 13 eine Störung der geistigen Entwicklung. Bei drei der 14 Patienten trat auch bei weiteren Familienmitgliedern eine Störung der geistigen Entwicklung auf. Pränatale und/oder postnatale Wachstumsretardierung wurde bei drei der 14 Patienten beschrieben. Von den 14 Patienten waren vier mikrozephal.

Die fazialen Dysmorphiezeichen wurden zusammengefasst. Zwölf Patienten zeigten faziale Dysmorphiezeichen. Andere Dysmorphiezeichen (z.B. Vierfingerfurchen) traten bei vier Patienten auf. Außerdem gab es bei drei Patienten Angaben zu Fehlbildungen des Gehirns. Elf Patienten wiesen Fehlbildungen des Skeletts und des Bewegungsapparates sowie zentrale Bewegungsstörungen z.B. muskuläre Hypotonie auf. In drei Fällen bestanden kongenitale Herzvitien. Organfehlbildungen und -fehlfunktionen (Nierenagenesie, Hypothyreose) wurden ebenfalls bei drei Patienten beschrieben.

Von den 14 Patienten war zudem ein Patient verhaltensauffällig (leichter Autismus) und weitere drei litten an zerebralen Krampfanfällen.

3.6 Symptome bei Patienten ohne gesichert pathologischen Befund in der Array-CGH-Analyse

Die Patienten mit nicht gesichert pathologischem Befund wiesen folgende phänotypischen Besonderheiten auf: Von den 102 Patienten zeigten 95 eine Störung der geistigen Entwicklung. Außerdem war bei elf Patienten mindestens ein Angehöriger mit geistiger Entwicklungsstörung bekannt. Bei 26 Patienten wurde eine pränatale und/oder postnatale Wachstumsanomalie beschrieben. 28 Kinder wiesen eine Mikro- oder Makrozephalie auf.

Faziale Dysmorphiezeichen, wie ein Epikanthus oder abfallende Lidachsen, fielen bei 65 Patienten auf. Andere Dysmorphien, zum Beispiel Vierfingerfurchen, zeigten 33 Patienten. Fehlbildungen und/oder Fehlfunktionen des Gehirns bestanden bei 17 der 102 Patienten. Bei 54 Kindern wurden Fehlbildungen des Skeletts und des Bewegungsapparates, sowie zentrale

Bewegungsstörungen beschrieben. Bei neun Patienten wurden Herzvitien diagnostiziert. 30 Patienten wiesen Fehlbildungen oder Fehlfunktionen der Organe auf.

Von den 102 Patienten zeigten sich 20 verhaltensauffällig und 17 hatten zerebrale Krampfanfälle.

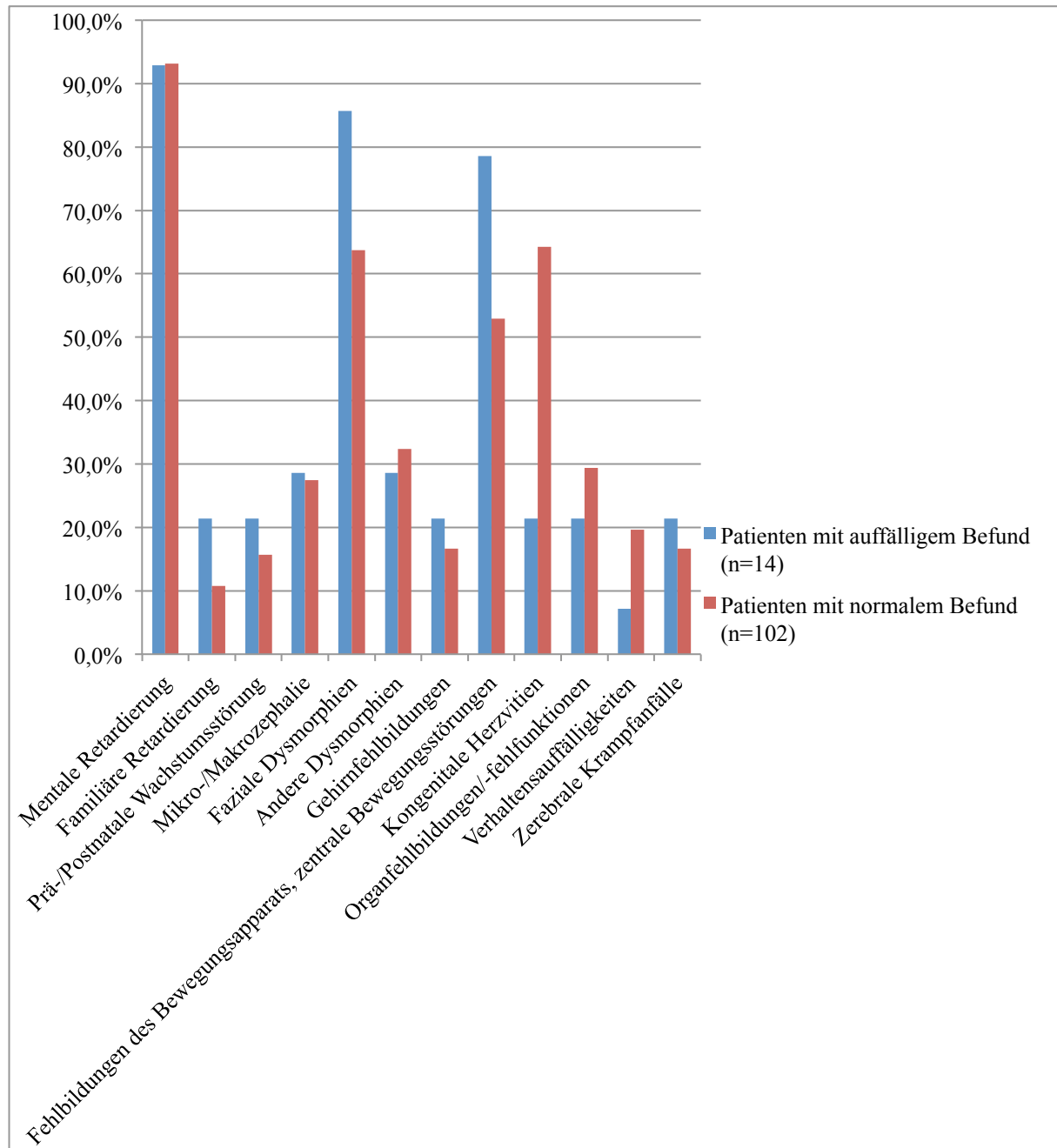


Abbildung 9: Klinische Symptome der Patienten mit pathologischem Array-Befund im Vergleich zu Patienten ohne pathologischen Befund in der Array-CGH

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zur aktuellen Literatur

4.1.1 Bruchpunktanalyse bekannter chromosomaler Aberrationen

Die Array-CGH-Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen bei Patienten mit Entwicklungsstörung angewandt und zum anderen bei Patienten mit bereits bekannter Chromosomenstörung zur genaueren Charakterisierung.

Unter den 14 Analysen, bei denen eine Chromosomenstörung bekannt war, konnte bei neun Analysen diese Chromosomenstörung verifiziert und genauer charakterisiert werden. Somit konnte bei fast 65 % der Analysen mit einer zytogenetisch bekannten Chromosomenveränderung diese durch die Array-CGH präziser beschrieben werden. Die genaue Kenntnis der einzelnen Imbalance ist für die Beurteilung der Prognose wichtig (Thienpont et al. [2007]).

Bei Patienten mit syndromalen Erkrankungen, die durch Genverlust oder -zugewinn entstanden sind, und nicht durch balancierte Veränderungen, wie reziproke Translokationen oder Inversionen, waren die Chancen höher eine Aberration zu entdecken. Allerdings beschrieben Schluth-Bolard et al. [2009] in ihrer Studie, dass bei 40 % der Analysen mit scheinbar balancierten Chromosomentranslokationen, aber auffälligem Phänotyp, in der Array-CGH-Analyse eine Deletion festgestellt werden konnte. Diese Deletionen liegen nicht zwingend an einem Bruchpunkt oder in der translozierten Region, sondern sind auch an anderen Chromosomen zu finden. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *de novo* und familiär aufgetretenen Translokationen mit versteckten Imbalancen. Auch in dieser Arbeit konnte bei einer Patientin in einer scheinbar balancierten Translokation zwischen den Chromosomen 5, 11 und 18 eine Deletion von 25,3 Mb in der Region 11q14.2-q23.1 diagnostiziert werden. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse von Schluth-Bolard et al. [2009]. Baptista et al. [2008], Di Gregori et al. [2007] und Gribble et al. [2005] kamen in ihren Studien zu ähnlichen Ergebnissen: Bei 30-50 % ihrer Analysen mit scheinbar balancierten Translokationen und auffälligem Phänotyp ließen sich mithilfe der Array-CGH-Analyse zuvor nicht bekannte Deletionen entdecken.

In den oben genannten Studien wurde ausschließlich von zuvor nicht erkannten Deletionen bei Patienten mit scheinbar balancierten Translokationen gesprochen. Schluth-Bolard et al. [2009] vermuteten eine generelle Tendenz zum Genverlust bei solchen

Chromosomenveränderungen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei einer Patientin eine Deletion in Chromosom 1q44 bei zytogenetisch nachgewiesener parazentrischer Inversion des Chromosoms 4. Die Array-CGH sollte helfen, eine versteckte Aberration in dieser Region zu diagnostizieren. Dabei wurde vor allem eine Imbalance in Chromosom 4 vermutet. Die neu entdeckte Deletion von 1,1 Mb in Chromosom 1q44 hingegen ist sehr gut mit dem Phänotyp dieser Patientin zu vereinbaren (Caliebe et al. [2010]). Van Bon et al. [2008] beschrieben in ihrer Arbeit 13 Patienten mit einem ähnlichen Phänotyp bei einer Deletion in Chromosom 1q44. Zusätzlich stützt der Fall dieser Patientin die Vermutung von Schluth-Bolard et al. [2009], dass eine generelle Tendenz zum chromosomalen Verlust bei Neuordnungen der Chromosomen vorliegt.

Eine systematische Studie über Bruchpunktanalyse mittels Array-CGH ist in der Literatur nicht zu finden. Es beschreiben jedoch zahlreiche Autoren, dass unklare genetische Befunde mithilfe der Array-CGH-Untersuchung genauer charakterisiert werden konnten. Zum Beispiel nutzten Flipsen-ten Berg et al. [2007] die Array-CGH-Analyse, um einen besseren Zusammenhang zwischen Bruchpunkt und Phänotyp bei bestehendem Wolf-Hirschhorn-Syndrom herstellen zu können, das durch die Deletion 4p hervorgerufen wird.

Auch De Gregori et al. [2007] beschrieben in ihrer Arbeit, dass die Array-CGH sich sehr gut zur Analyse der Bruchpunkte und Detektion der damit zusammen auftretenden chromosomalen Imbalancen eignet. Bei ihren Analysen konnten in den meisten Fällen nach konventioneller und molekularer Zytogenetik zusätzliche Bruchpunkte in der Array-CGH entdeckt werden. Die Bruchpunktanalyse bietet die Möglichkeit, genau zu charakterisieren, welche Gene durch die Imbalance betroffen sind. Außerdem kann eventuell ein Zusammenhang zwischen den einzelnen Elementen des Phänotyps und der Aberration hergestellt werden (Shinawi und Cheung [2008]).

De Gregori et al. [2007] beschrieben insbesondere den Nutzen der Array-CGH bei der genaueren Charakterisierung von scheinbar balancierten Translokationen, die zuvor durch die konventionelle Chromosomenanalyse beschrieben wurden. Sie untersuchten 14 Feten, bei denen die konventionelle Chromosomenanalyse eine balancierte Translokation zeigte. Alle 14 Feten zeigten auch in der Array-CGH-Analyse keine chromosomalen Verluste. Wäre jedoch eine versteckte Imbalance vorhanden gewesen, hätte man diese mithilfe der Array-CGH-Analyse entdecken können.

Auch Van den Veyen et al. [2009] führten eine Studie zur Array-CGH in der Pränataldiagnostik durch. Es wurde mittels Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie die

DNA von 300 Feten gewonnen und anschließend analysiert. Alle Schwangerschaften waren sogenannte Risikoschwangerschaften. Es wurde sowohl eine konventionelle Chromosomenanalyse, als auch die Array-CGH-Analyse durchgeführt. In 19,3 % der Fälle fanden sich CNV, von denen sich 13,3 % als benigne herausstellten. In 5 % der Fälle fanden sich Aberrationen mit definierter pathologischer Signifikanz. Bei 3 % konnte keine klare Aussage über die phänotypische Konsequenz gemacht werden. In 2,3 % der Untersuchungen konnte die Array-CGH durch genaue Charakterisierung der Aberrationen zusätzliche Informationen liefern. 1 % der Aberrationen hätte ohne Array-CGH-Analyse nicht entdeckt werden können. Diese Ergebnisse entsprechen in etwa den Detektionsraten (5,1 %) von Sahoo et al. [2006].

4.1.2 Detektionsrate der Array-CGH bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung unklarer Genese

Bei der Patientengruppe mit einer Entwicklungsstörung bislang unklarer Genese wurde bei 16,5 % unserer Analysen eine Aberration beschrieben. Es wurden jedoch durch FISH-Untersuchungen an Chromosomenpräparaten der Eltern insgesamt fünf familiäre Veränderungen unter den Patienten mit Entwicklungsstörung unklarer Genese festgestellt, sodass bei 12,1 % der Analysen eine *de novo* Aberration nachgewiesen wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotid-Arrays verwendet, in den meisten Studien anderer Arbeitsgruppen hingegen BAC-Arrays (*bacterial artificial chromosomes*) (Menten et al. [2006]; Shaw-Smith et al. [2004]; Schoumans et al. [2005]; Miyake et al. [2006]; Rosenberg et al. [2006]; de Vries et al. [2005]; Vissers et al. [2003]). BAC-Arrays haben häufig eine geringere Auflösung als die Oligonucleotidarrays, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Es gibt nur wenige Arbeiten, in denen mit Oligonukleotid-Arrays gearbeitet wurde. Ein Beispiel ist die Arbeit von Friedman et al. [2006]. Sie beschreiben Detektionsraten von 11 % bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung bislang unklarer Genese. Dies entspricht etwa der Detektionsrate der vorliegenden Arbeit von 12,1 %.

Sagoo et al. veröffentlichten 2009 eine Übersichtsarbeit, in der sie alle größeren Studien der letzten Jahre über Array-CGH-Analyse bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung und/oder kongenitalen Anomalien zusammenfassten. Diese Arbeit umfasste 19 Studien mit

insgesamt 13 926 Analysen. Die umfangreichsten Studien stammten von Lu et al. [2008] mit 2444 Analysen, Shaffer et al. [2007] mit 8789 Analysen und Pickering et al. [2008] mit 1101 Analysen. Im Durchschnitt betrug die Detektionsrate der zusammengefassten Studien ebenfalls etwa 10 %.

Gewisse Variationen unter den Ergebnissen der einzelnen Arbeitsgruppen sahen Sagoo et al. [2009] in den unterschiedlichen Auflösungen der verwendeten Array-Plattformen begründet. Außerdem sei der Probenumfang ein entscheidender Faktor gewesen. Ebenso wurden Bias der Publikation und Auswertung vor allem in kleinen Studien vermutet. Ferner schlossen große Studien wahrscheinlich viele Patienten mit weniger schwerer geistiger Entwicklungsstörung ein. Dies führte möglicherweise zu einer niedrigeren Detektionsrate, da die Literatur davon ausgeht, dass eine leichtere Störung der geistigen Entwicklung seltener mit einer genetischen Aberration assoziiert ist. Diese Vermutung ist allerdings noch nicht hinreichend belegt (Sagoo et al. [2009]).

Einen weiteren Einflussfaktor stellten die unterschiedlichen Einschlusskriterien der Studien dar. Zum Beispiel berichteten Miyake et al. [2006] und Rosenberg et al. [2006] von Detektionsraten in Höhe von 14,1 %. In diesen Studien wurden jedoch keine vorherigen Analysen, wie z.B. ein Subtelomerscreening durchgeführt. Geht man davon aus, dass in den Studien acht Aberrationen der 111 Analysen durch ein Subtelomerscreening entdeckt worden wären, handelt es sich auch hier lediglich um 9,9 % Chromosomenstörungen, die durch die Array-CGH neu entdeckt wurden (Rauch et al. [2006]).

Insgesamt ließen sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer Arbeitsgruppen sehr gut vergleichen. Dass die Detektionsrate in dieser Arbeit etwas über dem Durchschnitt der Raten anderer Arbeitsgruppen lag, ist durch die höhere Auflösung der Oligonukleotid-Arrays wohl hinreichend begründet.

4.2 Einfluss der Arrayauflösung auf das Untersuchungsergebnis

Es wurde mit Arrays unterschiedlicher Größe gearbeitet: 44K (Auflösung nach den verwendeten Kriterien 0,7 Mb), 105K (Auflösung nach den verwendeten Kriterien 0,3 Mb), 244K (Auflösung nach den verwendeten Kriterien 0,1 Mb).

Die Größe der neu entdeckten pathologischen Befunde lag zwischen 1 Mb und 8,4 Mb, sodass davon auszugehen ist, dass alle Aberrationen auch mit einem 44K-Array bei einer Auflösung von 0,7 Mb hätten analysiert werden können.

Es wurden auch Aberrationen unter 1 Mb bei den Analysen gefunden, zum Beispiel eine Deletion von 0,4 Mb. Diese Imbalancen konnten allerdings durch FISH-Untersuchungen an Chromosomenpräparaten der Eltern als familiäre Variation beschrieben werden. Da die chromosomale Aberration bei einem klinisch gesunden Elternteil auftrat, wurde davon ausgegangen, dass die Chromosomenveränderung zumindest nicht alleinige Ursache der Symptomatik ist und somit keinen pathologischen Wert hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entsprechen den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Friedman et al. [2006], die ebenfalls hochauflösende Oligonukleotid-Arrays verwendete. Friedman et al. [2006] beschrieben 11 Analysen mit Imbalancen. Es wiesen lediglich zwei Analysen Defekte auf, die kleiner als 1,1 Mb waren.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse sind zudem mit denen von De Vries et al. [2005] vergleichbar. Diese Arbeitsgruppe verwendete Tiling-Arrays. Hier wiesen ebenfalls zwei Analysen Defekte kleiner als 1 Mb auf. Die Tiling-Arrays von de Vries et al. haben eine Auflösung von bis zu 100 Kb.

In den meisten Studien wurden BAC-Arrays mit einer geringeren Auflösung verwendet. Daher ist es schwierig Aberrationen unter einer Größe von 1 Mb (Pickering et al. [2008]) zu entdecken. Es gab bei diesen Studien zwei unterschiedliche Ansätze, um das Genom von Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung zu analysieren:

Viele Arbeitsgruppen untersuchten das komplette Genom auf Imbalancen (Shaw-Smith et al. [2004]; Schoumans et al. [2005]; Miyake et al. [2006]). Hier zeigte sich besonders in den Subtelomerregionen eine geringe Auflösung. Doch gerade in diesen Regionen wurden bei Patienten mit Fehlbildungs- und Retardierungssyndromen häufig Aberrationen nachgewiesen (Friedman et al. [2006]). Unter den Analysen der vorliegenden Arbeit fanden sich ebenfalls zwei Analysen, bei denen sich eine Aberration im Subtelomer eines Chromosoms befand.

Andere Arbeitsgruppen haben BAC-Arrays entwickelt, die ausschließlich die Subtelomerregionen abdeckten, jedoch hier eine sehr hohe Auflösung zeigten (Veltman et al. [2002], Harada et al. [2004], Kok et al. [2005]).

Toruner et al. [2006] arbeiteten ebenfalls mit Oligonukleotid-Arrays der Firma Agilent. Bei allen Analysen, die in der konventionellen Karyotypisierung oder der FISH-Analyse eine Aberration zeigten, fand sich diese auch in der Array-CGH. Außerdem wurden zwei weitere

Imbalancen beschrieben, die zuvor nicht identifiziert werden konnten. Diese Aberrationen wiesen eine Größe von 3,0 Mb und 3,5 Mb auf.

Diese Resultate lassen vermuten, dass Arrays mit einer Auflösung von 1 Mb den Großteil der chromosomalen Anomalien bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung detektieren (Schulte-Bolard et al. [2009]).

Hinzu kommt, dass die hohe Auflösung der Oligonukleotid-Array-CGH zu Problemen in der Interpretation unklarer Befunde führt. Die Gefahr eines falsch positiven Testergebnisses wird dadurch wesentlich erhöht (Sagoo et al. [2009]). Insbesondere bei Anwendung der Array-CGH in der Pränataldiagnostik kann dies zu Schwierigkeiten führen.

Allerdings wurden durch hochauflösende Array-Verfahren neue Syndrome entdeckt (Slavotinek [2008]). Zum Beispiel wurde von Weiss et al. [2008] und Kumar et al. [2008] ein Mikrodeletionssyndrom beschrieben, das eine Imbalance von etwa 0,6 Mb in Chromosom 16p11.2 zeigt. Eine Deletion in diesem Chromosomenabschnitt ist mit Autismus vergesellschaftet (Miller et al. [2011]).

In den Analysen dieser Arbeit, die einen pathologischen Befund in der Array-CGH zeigten, fanden sich ebenfalls drei Aberrationen kleiner als 1 Mb. Es scheint also von großer Bedeutung zu sein, hochauflösende Arrays zu verwenden. Um die Rate der Testergebnisse, die fälschlicherweise als aberrant angenommen werden, so niedrig wie möglich zu halten, ist eine enge Zusammenarbeit mit klinischen Genetikern unabdingbar (Pickering et al. [2008]).

4.3 Gibt es eine Erklärung dafür, dass häufiger Deletionen als Duplikationen detektiert werden?

Bei der Betrachtung des Verhältnisses zwischen Deletionen und Duplikationen fiel auf, dass sich unter den Analysen mit pathologisch relevantem Befund lediglich fünf Analysen (22 %) mit einer Duplikation befanden. Vier der detektierten Duplikationen, waren durch eine zytogenetische Voruntersuchung bereits bekannt und zählten damit nicht zu den neu entdeckten Aberrationen. Lediglich eine Analyse zeigte in der molekularen Karyotypisierung eine Duplikation 17p11.2, die zuvor nicht bekannt war. Unter den fünf Analysen mit familiärer Variation befanden sich zwei Duplikationen (40 %). In diesen Fällen wurde allerdings davon ausgegangen, dass sie nicht alleinige Ursache der Klinik des jeweiligen Patienten sind.

Die Größen der Duplikationen, die eine klinische Relevanz zeigten und zuvor bekannt waren, lagen zwischen 5 Mb (hier handelt es sich um ein Mosaik zwischen einer normalen männlichen Zelllinie und einer zweiten Zelllinie mit einem Ringchromosom 19) und 27 Mb. Die Größe der in 17p11.2 entdeckten Duplikation betrug 3,9 Mb.

Es wurden 19 Deletionen mit klinisch-pathologischer Relevanz analysiert, also 79 % der detektierten Aberrationen insgesamt. Sechs dieser Deletionen waren bereits durch genetische Voruntersuchungen bekannt, sodass lediglich 13 Deletionen neu entdeckt wurden. Diese neu entdeckten Deletionen wiesen Größen zwischen 1 Mb und 12,4 Mb auf. Die Größe der familiären Deletionen lag bei drei Analysen zwischen 0,4 Mb und 2 Mb und stellten damit kleinere Verluste dar.

Im Vergleich der Größen der Deletionen und Duplikationen, so scheint ein Verlust genetischen Materials schon bei kleiner Größe eine klinische Relevanz zu zeigen. Ein Zugewinn an Genmaterial macht sich im Gegensatz dazu möglicherweise erst bei größeren Aberrationen klinisch bemerkbar. Dies könnte dazu führen, dass Patienten mit Verlusten häufiger mittels Array-CGH untersucht werden als Patienten mit Zugewinnen.

Zu den oben genannten Ergebnisse kamen auch Menten et al. [2006], die als Begründung biologische und technische Komponenten angaben: Technisch begünstigen Grenzwertalgorithmen mehr falsch negative Ergebnisse für Duplikationen als für Deletionen. Die Grenzwerte für Duplikation und Deletion werden in gleichem Abstand vom Mittelpunkt der Farbintensitätsskala gewählt. Allerdings werden Deletionen in höherer Farbintensität widergespiegelt als Duplikationen, sodass die Wahrscheinlichkeit, Duplikationen zu übersehen, höher ist als Deletionen nicht zu entdecken.

Die Frequenz von Deletionen im Verhältnis zu Duplikationen ist im menschlichen Genom höher. Dieses Phänomen griff Van Ommen [2005] auf und schätzte die Frequenz von Deletionen auf eine unter acht Geburten und die der Duplikationen auf eine unter 50 Geburten. Dies entspricht etwa einer sechsfach höheren Frequenz. Die Zahlen beziehen sich auf Imbalancen mit und ohne klinische Relevanz.

Unter den Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung fanden sich in der Untersuchung von Menten et al. [2006] etwa doppelt so viele Deletionen wie Duplikationen. In der vorliegenden Arbeit lag dieser Wert mit 22 % etwas niedriger. Dennoch spiegelten diese Ergebnisse die Erkenntnisse von Menten et al. [2006] wider.

Durch die Array-CGH ist in den letzten Jahren entdeckt worden, dass an bekannten Genorten für Mikrodeletionssyndrome auch Duplikationen auftreten können, die von klinischer

Relevanz sind. Patienten mit einem solchen Mikroduplikationssyndrom scheinen einen milder ausgeprägten Phänotyp zu zeigen, als Patienten mit einer korrespondierenden Mikrodeletion. Ein Beispiel hierfür ist das neu beschriebene Mikroduplikationssyndrom in 22q11.2 (Portnoi [2003]). Seit Langem bekannt ist das Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 (Jobb et al. [2005]). Der Phänotyp einer Duplikation in 22q11.2 scheint milder ausgeprägt zu sein. Leitsymptome sind laut Yobb et al. [2005] eine Entwicklungsstörung unterschiedlicher Ausprägung, Verhaltensauffälligkeiten und milde, variable Dysmorphiezeichen. Zusätzlich tritt eine Hörstörung bei diesen Patienten vermehrt auf. Patienten, die von einem Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 betroffen sind, zeichnen sich durch einen deutlich schwereren Phänotyp aus. Hier stehen vor allem Herzfehler und Immundefekte im Vordergrund, aber auch charakteristische faziale Dysmorphien und eine variable geistige Entwicklungsstörung wurden beschrieben (Ehl [2004]). Ein weiteres Beispiel ist das Potocki-Lupski-Syndrom (Lupski [2006]), welches durch eine Duplikation in 17p11.2 verursacht wird. Das schon länger bekannte Smith-Magenis-Syndrom (Chen et al. 1997) ist durch eine Deletion in der gleichen Chromosomenregion bedingt. Patienten mit einer Duplikation in diesem Bereich, zeigen eine Entwicklungsstörung mit Betonung der expressiven Sprache, Ernährungsschwierigkeiten, muskuläre Hypotonie und variable Dysmorphiezeichen (Potocki et al. [2007]). Patienten, die eine Deletion in 17p11.2 aufweisen, zeigen ebenfalls eine Störung der geistigen Entwicklung mit Sprachentwicklungsverzögerung, außerdem Höreinschränkungen, periphere Neuropathien und Verhaltensauffälligkeiten (Chen et al. [1997]).

Wie zuvor beschrieben, weisen Patienten mit einem Mikroduplikationssyndrom häufig einen milderen Phänotyp auf als Patienten mit dem korrespondierenden Mikrodeletionssyndrom. Dies ist ein möglicher Grund dafür, dass diese bisher seltener erkannt wurden. Ein entscheidender Nachteil scheinen außerdem die begrenzten Möglichkeiten der FISH-Untersuchung zu sein, Mikroduplikationen zu erfassen, sodass sowohl Shinawi und Cheung [2008] als auch Pickering [2008] bereits vermuteten, dass die Prävalenz für Mikroduplikationssyndrome eventuell viel höher liegt als bislang angenommen.

Des Weiteren wird die FISH-Analyse zur Validierung eines auffälligen Array-CGH-Befundes verwendet. Im Gegensatz zu einer Deletion ist eine Duplikation mittels dieser Technik schwerer nachzuweisen. Meist gelingt dies bei größeren Duplikationen nur an Interphasekernen. Kleinere Duplikationen sind hingegen oft nicht nachweisbar (Shinawi und Cheung [2008]). Dies kann dazu führen, dass das Ergebnis der Array-CGH als normal

klassifiziert wird. Aus diesem Grund nutzen in der Zwischenzeit einige Gruppen MLPA oder qPCR zur Validierung von Duplikationen (Hills et al. [2010]; Tchinda und Lee [2006]). Auch der Einsatz eines zweiten Arrays kann in dieser Situation hilfreich sein. Der Nachteil dieser auf DNA basierten Verfahren ist, dass keine Information über die Art der Veränderung gewonnen werden können. Das heißt es bleibt unklar, ob der duplizierte Bereich an regelrechter Stelle liegt oder verlagert ist. Da dann auch eine Validierung bei den Eltern nur mittels DNA-basierter Verfahren möglich ist, können wichtige Informationen hinsichtlich eines Wiederholungsrisikos nicht erfasst werden.

4.4 Konventionelle Chromosomenanalyse, Subtelomerscreening versus Array-CGH

Die konventionelle Chromosomenanalyse war bis zur Entwicklung der molekularen Karyotypisierung die Standardanalyse bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung, bei denen andere Ursachen wie eine Stoffwechselstörung oder eine monogen erbliche Erkrankung als Ursache ausgeschlossen werden konnte. Sie stellt eine Möglichkeit dar, das gesamte Genom in Bezug auf numerische und strukturelle Veränderungen zu analysieren.

Durch die konventionelle Karyotypisierung können bei etwa 15 % der Patienten Imbalancen im Genom analysiert werden. Diese Werte stammen aus einer zusammenfassenden Analyse von Curry et al. [1997]. Van Karnebeek et al. [2005a] dokumentierten in ihrer Studie mit 9,5 % einen etwas niedrigeren Wert. Rauch et al. [2006] entdeckten bei 12 % ihrer Analysen eine Aberration mittels Karyotypisierung. Die konventionelle Chromosomenanalyse hat eine Auflösung von 5-10 Mb (Flint et al. [1995]; Knight et al. [1999]; de Vries et al. [2003]). Zusätzlich ist die Auflösung abhängig von der Erfahrung des Untersuchers, von der Präparation und auch von der Chromosomenregion. Diese Einflussfaktoren führen dazu, dass die konventionelle Chromosomenanalyse nicht objektivierbar ist. Diese Erkenntnis stimmt mit den Ergebnissen von Rauch et al. [2006] überein, die nach der Diagnose einer Anomalie durch Subtelomerscreening bei erneuter Betrachtung des Karyogramms mit Fokus auf die aberrante Region die Anomalie auch im Karyogramm nachweisen konnten. Ein weiterer Nachteil der konventionellen Chromosomenanalyse ist die Zeitdauer, die sich aus der Notwendigkeit ergibt, Zellkulturen anzulegen (Klopocki und Huber [2006]). Aus peripherem Blut können nach drei Tagen Chromosomenpräparate hergestellt werden. Sollen Zellkulturen aus fetalem Material hergestellt werden, dauert es zwei bis drei Wochen bis genügend Zellen

für eine Analyse vorhanden sind (Gouas et al. [2008]). Das kann für Eltern in der Schwangerschaft, insbesondere bei Risikoschwangerschaften, eine entscheidende Zeitspanne darstellen.

Während der letzten Jahre wurden als Screeningtest auf submikroskopische Veränderungen im Bereich der Subtelomerregionen ein FISH- und ein MLPA-basiertes Verfahren entwickelt (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*). Diese Methoden können weitaus kleinere Imbalancen detektieren als die konventionelle Chromosomenanalyse. Sie haben allerdings auch einige Nachteile. Zum einen können sie nicht das komplette Genom auf Imbalancen analysieren und zum anderen ist es häufig schwer mithilfe der FISH-Analyse Duplikationen im Subtelomer zu erfassen (Koolen et al. [2004]). Außerdem ist dieses Verfahren sehr aufwändig. Die MLPA kann, wie auch die Array-CGH, keine balancierten Aberrationen erfassen (Gouas et al. [2008]). Des Weiteren ist das Erfassungsspektrum auf bestimmte Regionen begrenzt.

Mehrere Arbeitsgruppen befassten sich in der Vergangenheit mit Aberrationen im Subtelomerbereich bei Patienten mit Retardierungssyndromen. Zusammengefasst wurden im Durchschnitt bei etwa 5 % der Analysen Aberrationen in der Subtelomerregion diagnostiziert (Veltman et al. [2003]; van Karnebeek et al. [2002]; Flint und Knight [2003]; Harada et al. [2004]; Koolen et al. [2004]; Rooms et al. [2004 a, b]; Walter et al. [2004]; Adeyinka et al. [2005]; Baroncini et al. [2005]; Kok et al. [2005]; Moog [2005]; Ravnán et al. [2006]; Yu et al. [2005]). Die Frequenz, mit der eine Chromosomenaberration durch ein Subtelomerscreening entdeckt wurde, lag zwischen 0,3 % und 29,4 %. Die große Schwankungsbreite der Detektionsraten war bedingt durch unterschiedliche Einschlusskriterien, die zur Teilnahme an einem solchen Screening führten. Außerdem war die Qualität der Untersuchungen entscheidend, die im Vorhinein durchgeführt wurden. Hinzu kam, dass die Deletionen, die im Subtelomerscreening entdeckt wurden, durchschnittlich 10 Mb betrug und 15 % sogar größer als 20 Mb waren (Flint und Knight [2003]). Rauch et al. [2006] berichteten hingegen von subtelomeren Imbalancen von 5 Mb und kleiner, die bei 2 % der Analysen gefunden wurden. Dies ist wiederum vergleichbar mit den Ergebnissen von Yu et al. [2005].

Die Array-CGH-Analyse hat gegenüber den herkömmlichen Methoden einige Vorteile. Mit ihr wurde ein hochauflösendes Verfahren entwickelt, das eine effiziente Analyse von chromosomalen Imbalancen für alle im Array repräsentierten Regionen erlaubt. Sie bietet eine sichere Möglichkeit, Mikro- und Subtelomeraberrationen in ihren genauen Bruchpunkten zu

erfassen. Dies führt dazu, dass die Array-CGH nach weitreichenden genetischen Untersuchungen, wie zum Beispiel der konventionellen Karyotypisierung oder FISH, bei weiteren 10 % der Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung unklarer Genese Aberrationen an den Chromosomen diagnostizieren kann (Sagoo et al. [2009]). Die Detektionsrate in der vorliegenden Studie lag mit 12,1 % etwas höher. In dieser Studie wurden, wie oben bereits beschrieben, ausschließlich Oligonukleotid-Arrays verwendet. In denen von Sagoo et al. [2009] zusammengefassten Studien wurden hingegen ausschließlich BAC-Arrays verwendet, die eine geringere Auflösung aufwiesen.

Zusammenfassend scheint die Array-CGH-Analyse die besten Möglichkeiten zu bieten. Schwierigkeiten in der Interpretation von positiven Untersuchungsbefunden und damit die Anwendung dieser Methode im klinischen Alltag erfordern größere Studien und genaue Datensammlung (Rosenberg et al. [2006]).

4.5 Stellung der Kopienzahlvariationen in der Array-CGH-Analyse

Die Diagnose einer chromosomalen Imbalance deutet nicht automatisch auf einen pathologischen Befund hin. Dies wurde in den letzten Jahren durch die Interpretation und Analyse zahlreicher Untersuchungsergebnisse der Array-CGH festgestellt.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde jede in der Array-CGH auffällige Region untersucht und zunächst mithilfe von Datenbanken verglichen (*Golden path* von UCSC, HGVS und *Ensembl*) um sicher zu stellen, dass es sich nicht um einen bekannten Polymorphismus handelt. In der Übersicht der CNV ist zu erkennen, dass einige Polymorphismen mit einer sehr hohen Frequenz auftraten, wie zum Beispiel in Chromosom 9 zwischen 38,7 Mb und 43,00 Mb. Hier wiesen 78,1 % der Analysen des Kollektivs eine Aberration auf.

De Ravel et al. [2007] wiesen daraufhin, dass folgende Kriterien bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen sind:

- Familiäre Imbalancen, die nicht in einer bekannten CNV-Region zu finden sind, können nur schwer als Grund für den Phänotyp angesehen werden.
- Aberrationen, die einen Genort beinhalten, der für bekannte Mikrodeletions- oder duplikationssyndrome verantwortlich ist, sprechen für einen pathologischen Befund.

- Eine Imbalance, die *de novo* auftritt und deren Genotyp-/Phänotypkorrelation übereinstimmt, weist daraufhin, dass es sich um einen pathologischen Befund handelt, dies aber nicht belegt ist.

Diese Kriterien liegen auch der Auswertung dieser Arbeit zugrunde. Den Eltern der Patienten wurde mitgeteilt, dass eine Aberration, die auch bei ihnen zu finden war, wahrscheinlich nicht alleiniger Grund für die Erkrankung des Kindes sein kann, da das betroffene Elternteil gesund ist. Bei fünf Analysen der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass es sich um eine familiäre Aberration handelt. Dies entspricht 17,9 % der Analysen mit aberrantem Array-CGH-Befund, welches einen beachtlichen Anteil ausmacht. Dies bestätigt die Aussage von de Ravel et al. [2007], dass es zwingend notwendig ist, die Eltern der Patienten ebenfalls auf entsprechende Veränderungen zu untersuchen.

Gerade diese familiären Variationen stellen bei der genetischen Beratung der Eltern ein großes Problem dar. Das beschrieben auch Menten et al. [2007]. Zum Beispiel kann eine Duplikation der Chromosomenregion 22q11.2 unterschiedliche phänotypische Auswirkungen haben. Es ist möglich, dass ein Patient mit einer solchen Aberration keinerlei Symptome aufweist, jedoch können eine Störung der geistigen Entwicklung und kongenitale Fehlbildungen ebenfalls das klinische Korrelat darstellen (Ensenauer et al. [2003], Yobb et al. 2005]). Eine hohe phänotypische Varianz zeigt auch eine Duplikation/Deletion in 16p13.11 (Ullmann et al. [2007], Hannes et al. [2009]).

Chromosomale Imbalancen, die von phänotypisch unauffälligen Eltern übertragen wurden, können durch unterschiedliche Penetranz, Expression und epigenetische Effekte zu einem klinischen Symptom beim Kind führen (Menten et al. [2007]).

Weiterhin ist zu bedenken, dass für den Fall, dass ein Elternteil Anlageträger in einem rezessiven Gen ist und das zweite Elternteil in diesem Bereich eine Deletion trägt, das Kind das veränderte Gen des einen Elternteils und die an sich benigne Deletion des anderen Elternteils erben kann. In diesem Fall wird das Kind Symptome einer monogenen Störung aufweisen. Daher ist es wichtig, die in der Deletion enthaltenen Gene zu analysieren und auf eine mögliche Verbindung mit dem Phänotyp zu bewerten.

In den meisten Fällen muss dennoch nach jetzigem Kenntnisstand davon ausgegangen werden, dass eine Aberration, die von phänotypisch unauffälligen Eltern vererbt wurde, nicht als alleinige Ursache eines pathologischen Phänotyps angenommen werden kann. Diese Informationen wurden auch an die Patienten der vorliegenden Studie weitergegeben, bei denen eine familiäre Imbalance diagnostiziert wurde.

Menten et al. [2007] und auch Sharp [2009] wiesen in ihren Arbeiten deutlich daraufhin, dass es äußerst wichtig ist, sowohl bei *de novo* aufgetretenen Aberrationen, als auch bei familiären Aberrationen Informationen über den Geno- und Phänotyp zu sammeln. Dies ist notwendig, um im Einzelfall die Beteiligung der oben beschriebenen Phänomene besser interpretieren zu können.

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass die technischen Möglichkeiten, kleinste Variationen des menschlichen Genoms zu diagnostizieren, rasch voranschreiten. Ein großes Problem in der genetischen Beratung stellt jedoch die Interpretation solch kleiner Varianzen im Genom dar. So ist es zwingend notwendig, dass Studien an großen, sorgfältig ausgewählten Kollektiven durchgeführt werden, um die Interpretation eines CNV und seiner phänotypischen Relevanz zu verbessern (Rosenberg et al. [2006]).

4.6 Einschlusskriterien zur Teilnahme an der Array-CGH-Analyse

Für die Teilnahme an der vorliegenden Studie gab es keine explizite Vorgabe hinsichtlich dessen, dass eine konventionelle Chromosomenanalyse, Subtelomerscreening oder andere Untersuchungen zum Ausschluss einer genetischen Ursache im Vorhinein unternommen werden mussten. Bei anderen Arbeitsgruppen, wie zum Beispiel Vissers et al. [2003], Rosenberg et al. [2006] oder Shaw-Smith et al. [2004], wurde mindestens eine konventionelle Karyotypisierung vorausgesetzt. In anderen Studien sogar speziellere Untersuchungen, wie zum Beispiel ein Subtelomerscreening oder der Ausschluss eines fragilen X-Syndroms.

Zur Teilnahme an dieser Studie mussten die Symptome der Patienten allerdings einige Kriterien erfüllen. Um die klinischen Symptome zu erfassen, wurde ein Fragebogen erstellt, den der behandelnde Arzt nach der klinischen Untersuchung und ausführlicher Anamnese ausfüllte. Ein Kriterium allein war in den meisten Fällen nicht ausreichend, viel mehr war eine Kombination unterschiedlicher Kriterien ausschlaggebend, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben. Voraussetzung war in den meisten Fällen eine Störung der geistigen Entwicklung.

Auch andere Arbeitsgruppen haben ihre Patienten vor der Durchführung dieser Analyse selektiert. So legten zum Beispiel Shaw-Smith et al. [2004] für ihre Studie folgende Kriterien an: Störung der geistigen Entwicklung, familiär aufgetretene Lernschwierigkeiten, Wachstumsanomalien, Verhaltensauffälligkeiten, zerebrale Krampfanfälle,

Dysmorphiezeichen und kongenitale Anomalien. Rosenberg et al. [2006] erfassten eine Störung der geistigen Entwicklung sowie faziale und nicht-faziale Dysmorphien. Familiär aufgetretene Störungen der geistigen Entwicklung wurden hingegen nicht als relevant angesehen.

Viele weitere Arbeitsgruppen (u. a. Vissers et al. [2003], Schoumans et al. [2005], de Vries et al. [2005]) wählten als Grundlage ihrer Einschlusskriterien die Checkliste, die de Vries et al. [2001] in ihrer Arbeit „*Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist*“ veröffentlichten.

Die Checkliste berücksichtigt folgende Symptome: Familiär aufgetretene Störung der geistigen Entwicklung, prä- und postnatale Wachstumsretardierung (Groß-/Kleinwuchs, Makro-/Mikrozephalie), Anzahl der fazialen Dysmorphien und nicht-faziale Dysmorphien. Diese Symptome werden unterschiedlich gewichtet, dies ist durch die unterschiedliche Verteilung von Punkten gewährleistet. Ab einem Scorewert von ≥ 3 Punkten werden die Patienten als geeignet angesehen.

Symptome	Score
Familiär aufgetretene Störung der geistigen Entwicklung	
Vereinbar mit den mendelschen Regeln	1
Nicht vereinbar mit den mendelschen Regeln	2
Pränatale Wachstumsretardierung	2
Postnatale Wachstumsstörung	2
Je einen Punkt für Makro-/Mikrozephalie und Groß-/Kleinwuchs (max. 2)	
≥ 2 Faziale Dysmorphien	2
Nicht-faziale Dysmorphien	2
Je einen Punkt pro Dysmorphie (max. 2)	

Tabelle 8: Checkliste für Patienten mit submikroskopischen subtelomerischen Aberrationen von de Vries et al. [2001]

Diese Checkliste entwickelte die Arbeitsgruppe de Vries et al. [2001] mithilfe ihrer Studie, in der 139 Analysen durchgeführt wurden. Bei 29 Analysen konnte im Subtelomerscreening eine Chromosomenaberration nachgewiesen werden. Die übrigen 110 Patienten zeigten eine Störung der geistigen Entwicklung ohne Chromosomenveränderung. Diese 110 Patienten dienten als Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede wurden lediglich bei einem niedrigen Geburtsgewicht und familiär aufgetretener geistiger Entwicklungsstörung festgestellt.

Die von De Vries et al. [2001] durchgeführte Studie zielte ausschließlich auf den Subtelomerbereich und betraf nicht alle Chromosomenabschnitte, wie es in dieser Arbeit der

Fall ist. Bei Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse sind keinerlei statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Symptome zu erkennen. Das kann, wie auch de Vries et al. [2001] beschrieben, daran liegen, dass die Kontrollgruppe bereits durch die klinische Untersuchung des behandelnden Arztes nach den bekannten Kriterien vorselektiert wurde. Eine genetische Ursache für eine Behinderung scheint besonders häufig mithilfe der Array-CGH analysiert zu werden, wenn faziale Dysmorphien und/oder eine Störung der geistigen Entwicklung auftreten. So zeigten 86 % der Patienten, die eine chromosomale Imbalance aufwiesen, faziale Dysmorphien. 93 % der Patienten mit aberrantem Array-CGH-Befund zeigten eine Störung der geistigen Entwicklung. Sowohl faziale Dysmorphiezeichen als auch eine Störung der geistigen Entwicklung wurden bei 80 % der Patienten mit pathologischem Array-CGH-Befund beschrieben. Außerdem schienen zentrale Bewegungsstörungen wie zum Beispiel muskuläre Hypotonie gehäuft aufzutreten. In dem untersuchten Patientenkollektiv mit pathologischem Array-CGH-Befund traten diese bei 80 % auf. Von den Patienten, bei denen keine genetische Ursache ihrer Entwicklungsstörung nachgewiesen werden konnte, zeigten nur 64 % faziale Dysmorphien und 93 % eine Störung der geistigen Entwicklung. Erkrankungen des Bewegungsapparats oder zentrale Bewegungsstörungen traten bei 52 % auf. So kann nach unseren Daten davon ausgegangen werden, dass vor allem faziale Dysmorphien und Erkrankungen des Bewegungsapparats ein Hinweis auf einen genetischen Defekt sein können und damit wichtige Kriterien zur Durchführung einer Array-CGH-Analyse darstellen.

Im Vergleich ist festzustellen, dass die Checkliste von de Vries et al. [2001] und der Fragebogen, der zur Datenerfassung in dieser Arbeit verwendet wurde, sehr ähnliche Kriterien zur Teilnahme an der Array-CGH-Analyse aufweisen. In dieser Studie wurden die Patienten zusätzlich auf zerebrale Krampfanfälle und Verhaltensauffälligkeiten untersucht. Da zerebrale Krampfanfälle bei 21 % der Patienten mit chromosomalem Defekt beschrieben wurden und Verhaltensauffälligkeiten immerhin 7 % der Patienten zeigten, wäre es sinnvoll, diese Symptome in eine solche Checkliste aufzunehmen, wenn diese als Einschlusskriterium für die Array-CGH-Analyse entwickelt würde. Zerebrale Krampfanfälle sahen im Übrigen auch Shaw-Smith et al. [2004] als relevantes Kriterium zur Teilnahme an ihrer Studie an.

4.7 Fazit und Ausblick

Die Array-CGH verfügt über eine höhere Auflösung und ist schneller durchführbar als bisherige genetische Analyseverfahren. Sie bietet die Möglichkeit kleine Aberrationen zu erkennen und Bruchpunkte genauer zu analysieren. Es scheint jedoch, dass die technischen Möglichkeiten sich schneller entwickelt haben als das Verständnis über die medizinischen und biologischen Implikationen der generierten Information (Bartholdi [2008]). So entstehen große Probleme bei der Interpretation der Ergebnisse der vergleichenden genomischen Hybridisierung, vor allem bezüglich der zahlreichen Kopienzahlvariationen im menschlichen Genom (Rosenberg et al. [2006]). Große Datenbanken (*Golden path* von UCSC, HGVS, *Ensembl*) sammeln die Loci der *copy number variations*, um eine möglichst genaue Aussage über eine chromosomale Aberration und deren klinische Ausprägung machen zu können. Die heutigen technischen Möglichkeiten erlauben es kleinste Aberrationen der Chromosomen zu analysieren, jedoch stellt die Interpretation solcher kleiner Varianten im Genom ein Problem in der genetischen Beratung und vor allem in der Pränataldiagnostik dar [Pickering et al. [2008]]. Es ist also zwingend notwendig, umfassende Studien an großen, sorgfältig ausgewählten Kollektiven durchzuführen, um die Interpretation einer diagnostizierten chromosomalen Veränderung und deren phänotypischen Relevanz zu verbessern und so die genetische Beratung von Familien zu optimieren (Rosenberg et al. [2006]).

5 Zusammenfassung

Trotz Fortschritten in der Diagnostik bleibt bei etwa der Hälfte der Kinder mit einer angeborenen Störung der geistigen Entwicklung die Ursache unklar. Der Annahme, dass submikroskopische Chromosomenstörungen ursächlich sein können, konnte erstmals mit Einführung der Array-basierten vergleichenden genomischen Hybridisierung (Array-CGH) genomweit nachgegangen werden. Ziel der Arbeit war es, die Häufigkeit für den Nachweis einer pathogenen Veränderung zu bestimmen, pathologische Veränderungen von benignen Kopienzahlvarianten abzugrenzen und zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen benignen Kopienzahlvarianten und pathogenen Veränderungen besteht, sowie Kriterien für den Einsatz dieser Methode zu entwickeln.

In die Untersuchung wurden 130 Patienten eingeschlossen. 116 Patienten wiesen eine geistige Entwicklungsstörung bisher unklarer Genese auf. Bei 14 Patienten sollte eine bekannte Aberration genauer analysiert werden. Die Detektionsrate für eine *de novo* Aberration lag bei 12 %. In der aktuellen Literatur werden durchschnittlich Detektionsraten von 10 % angegeben. Allerdings wurden in den meisten Studien BAC-Arrays mit einer Auflösung von etwa 1 Mb und, nicht wie in der vorliegenden Arbeit, die höher auflösenden Oligonukleotid-Arrays mit einer Auflösung zwischen 0,7 und 0,1 Mb verwendet. Die detektierten pathologischen Aberrationen waren zwischen 1 Mb und 8,4 Mb groß. Das entspricht auch den Ergebnissen der aktuellen Literatur. Die Aberrationen unter 1 Mb stellten sich in dieser Arbeit als familiäre heraus. Es ist davon auszugehen, dass eine höhere Auflösung auch mehr falsch positive Befunde hervorruft, da insbesondere die Interpretation der Kopienzahlvariationen in der Beurteilung eines aberranten Array-Befundes ein Problem darstellt. Signifikante Unterschiede in den Symptomen ließen sich zwischen den Probanden mit einem normalen und einem pathologischen Befund nicht nachweisen. Auch ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung benigner Kopienzahlvarianten.

Zusammengefasst bietet die Array-CGH-Analyse gegenüber herkömmlichen genetischen Verfahren, wie der konventionellen Chromosomenanalyse, der FISH-Diagnostik oder dem Subtelomerscreening, die Möglichkeit bei Patienten mit geistiger Entwicklungsstörung kleinere Aberrationen genomweit zu erfassen. Allerdings erfordert der Nachweis kleinster Aberrationen zwingend umfangreiche Studien an sorgfältig ausgewählten Kollektiven, um die Interpretation einer nachgewiesenen Aberration und deren phänotypische Relevanz zu verbessern und so die genetische Beratung auch im Hinblick auf das Wiederholungsrisiko zu optimieren.

6 Literaturverzeichnis

Adeyinka A., Adams S. A., Lorentz C. P., Van Dyke D. L., Jalal S. M. (2005) *Subtelomere deletions and translocations are frequently familial. American Journal of Medical Genetics 135A(1): 28–35*

Astbury C., Christ L. A., Aughton D. J., Cassidy S. B., Kumar A., Eichler E. E., Schwartz S. (2004) *Detection of deletions in de novo “balanced” chromosome rearrangements: Further evidence for their role in phenotypic abnormalities. Genetics in Medicine 6(2): 81–89*

Ballif B. C., Rorem E. A., Sundin K., Lincicum M., Gaskin S., Coppinger J., Kashork C. D., Shaffer L. G., Bejjani B. A. (2006) *Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. American Journal of Medical Genetics 140A(24): 2757–2767*

Ballif B. C., Hornor S. A., Jenkins E., Madan-Khetarpal S., Surti U., Jackson K. E., Asamoah A., Brock P. L., Gowans G. C., Conway R. L., Graham J. M., Medne L., Zackai E. H., Shaikh T. H., Geoghegan J., Selzer R. R., Eis P. S., Bejjani B. A., Shaffer L. G. (2007) *Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2–p12.2. Nature Genetics 39(9): 1071–1074*

Baptista J., Mercer C., Prigmore E., Gribble S. M., Carter N. P., Maloney V., Thomas N. S., Jacobs P. A., Crolla J. A. (2008) *Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. American Journal of Human Genetics 82(4): 927–36*

Baroncini A., Rivieri F., Capucci A., Croci G., Franchi F., Sensi A., Battaglia P., Aiello V., Calzolari E. (2005) *FISH screening for subtelomeric rearrangements in 219 patients with idiopathic mental retardation and normal karyotype. European Journal of Medical Genetics 48(4): 388–396*

Bartholdi D. (2008) Medizinische Genetik: Copy number variations (CNV) Krankheitsverursachend, Risikofaktor oder bedeutungslose Normvariante? *Swiss Medical Forum 8(51-52): 1007–1008*

Bauke Y., von den Ijssel P., Carvalho B., Brakenhoff R. H., Meijer G. A. [2006] *BAC to future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). Nucleic Acids Reseach 34(2): 445–450*

van Bon B. W., Koolen D. A., Borgatti R., Magee A., Garcia-Minaur S., Rooms L., Reardon W., Zollino M., Bonaglia M. C., De Gregori M., Novara F., Grasso R., Ciccone R., van Duyvenvoorde H. A., Aalbers A. M., Guerrini R., Fazzi E., Nillesen W. M., McCullough S., Kant S. G., Marcelis C. L., Pfundt R., de Leeuw N., Smeets D., Sistermans E. A., Wit J. M., Hamel B. C., Brunner H. G., Kooy F., Zuffardi O., de Vries B. B. (2008) *Clinical and molecular characteristics of Iqter microdeletion syndrome: delineating a critical region for corpus callosum agenesis/hypogenesis. Journal of Medical Genetics 45 (6): 346-54*

Caliebe A., Kroes H. Y., van der Smagt J. J., Martin-Subero J. I., Tönnies H., van 't Slot R., Nievelstein R. A., Muhle H., Stephani U., Alfke K., Stefanova I., Hellenbroich Y., Gillissen-Kaesbach G., Hochstenbach R., Siebert R., Poot M. (2010) *Four patients with speech delay, seizures and variable corpus callosum thickness sharing a 0.440 Mb deletion in region 1q44 containing the HNRPU gene. European Journal of Medical Genetics 53(4):179-85*

Chen K. S., Manian P., Koeuth T., Potocki L., Zhao Q., Chinault A. C., Lee C. C., Lupski J. R. (1997) *Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. Nature Genetics 17(2): 154-63*

Cheung S. W., Shaw C. A., Yu W., Li J., Ou Z., Patel A. Yatsenko S. A., Cooper M. L., Furman P., Stankiewicz P., Lupski J. R., Chinault A. C. Beaudet A. L. (2005) *Development and Validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. Genetics in Medicine 7 (6): 422-432*

Cheung S. W., Shaw C. A., Scott D. A., Patel A., Sahoo T., Bacino C. A., Pursley A., Li J., Erickson R., Gropman A. L., Miller D. T., Seashore M. R., Summers A. M., Stankiewicz P., Chinault A. C., Lupski J. R., Beaudet A. L., Sutton V. R. (2007) *Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. American Journal of Medical Genetics 143A(15):1679–1686*

Curry C. J., Stevenson R. E., Aughton D., Byrne J., Carey J. C., Cassidy S., Cunniff C., Graham J. M. Jr, Jones M. C., Kaback M. M., Moeschler J., Schaefer G. B., Schwartz S., Tarleton J., Opitz J. (1997) *Evaluation of mental retardation: Recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. American Journal of Medical Genetics 72(4): 468–477*

Darilek S., Ward P., Pursley A., Plunket K., Furman P., Magoulas P., Patel A., Cheung S. W., Eng C. M. (2008) *Pre- and postnatal genetic testing by array-comparative genomic hybridization: genetic counseling perspectives. Genetics in Medicine:10(1): 13–18*

Edelmann L., Pandita R. K., Morrow B. E. (1999) *Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with Velo-cardio-facial syndrome. American Journal of Medical Genetics 64(4): 1076–1086*

Edelmann L. und Hirschhorn K. (2009) *Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. Annals of the New York Academy of Sciences 1151: 157–166*

Ehl S. (2004) DiGeorge-Syndrom. *Allergologie 11: 473–476*

Ekong R. und Wolfe J. (1998) *Advances in fluorescent in situ hybridization. Current Opinion in Biotechnology 9: 19–24*

Ensenauer R. E., Adeyinka A., Flynn H. C., Michels V. V., Lindor N. M., Dawson D. B., Thorland E. C., Lorentz C. P., Goldstein J. L., McDonald M. T., Smith W. E., Simon-Fayard E., Alexander A. A., Kulharya A. S., Ketterling R. P., Clark R. D., Jalal S. M. (2003) *Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. American Journal of Human Genetics 73(5): 1027-1040*

Fan Y. S., Jayakar P., Zhu H., Barbouth D., Sacharow S., Morales A., Carver V., Benke P., Mundy P., Elsas L. J. (2007) *Detection of pathogenic gene copy number variations in patients*

with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. Human Mutation 28(11): 1124-1132

Fernández L., Nevado J., Santos F., Heine-Suñer D., Martínez-Glez V., García-Miñaur S., Palomo R., Delicado A., López Pajares I., Palomares M., García-Guereta L., Valverde E., Hawkins F., Lapunzina P. (2009) *A deletion and a duplication in distal 22q11.2 deletion syndromeregion. Clinical implications and review. BMC Medical Genetics 10:48*

Flint J., Wilkie A. O., Buckle V. J., Winter R. M., Holland A. J., McDermid H. E. (1995) *The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. Nature Genetics 9(2): 132-40*

Flint J. und Knight S. (2003) *The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. Current Opinion in Genetics & Development 13(3): 310-316*

Flipsen-ten Berg K., van Hasselt P. M., Eleveld M. J., van der Wijst S. E., Hol F. A., de Vroede M. A. M., Beemer F. A., Hochstenbach R., Poot M. (2007) *Unmasking of a hemizygous WFS1 gene mutation by a chromosome 4p deletion of 8.3Mb in a patient with Wolf-Hirschhorn syndrome. European Journal of Human Genetics 15(11): 1132-1138*

Freeman J. L., Perry G. H., Feuk L., Redon R., McCarroll S. A., Altshuler D. M., Aburatani H., Jones K. W., Tyler-Smith C., Hurles M. E., Carter N. P., Scherer S. W., Lee C. (2006) *Copy number variation: New insights in genome diversity. Genome Research 16(8): 949-961*

Friedman J. M., Baross A., Delaney A. D., Ally A., Arbour L., Asano J., Bailey D. K., Barber S., Birch P., Brown-John M., Cao M., Chan S., Charest S. L., Farnoud N., Fernandes N., Flibotte S., Go A., Gibson W. T., Holt R. A., Jones S. J. M., Kennedy G. C., Krzywinski M., Langlois S., Li H. I., McGillivray B. C., Nayar T., Pugh T. J., Rajcan-Separovic E., Schein J. E., Schnerch A., Siddiqui A., Van Allen M. I., Wilson G., Yong S. L., Zahir F., Eydoux P., Marra M. A. (2006) *Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. The American Journal of Human Genetics 79(3): 500-513*

Gärtner J. (2007) Psychointellektuelle Entwicklungsstörung. In: Koletzko B. *Kinderheilkunde und Jugendmedizin*. 13: 561-565, Springer Berlin Heidelberg, Deutschland

Gijsbers A. C., Schoumans J., Ruivenkamp C. A. (2011) *Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge*. *Cytogenet Genome Research* 135(3-4):222-227

Gouas L., Goumy C., Véronèse L., Tchirkov A., Vago P. (2008) *Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities*. *Pathologie Biologie* 56(6): 345–353

De Gregori M., Ciccone R., Magini P., Pramparo T., Gimelli S., Messa J., Novara F., Vetro A., Rossi E., Maraschio P., Bonaglia M. C., Anichini C., Ferrero G. B., Silengo M., Fazzi E., Zatterale A., Fischetto R., Previderé C., Belli S., Turci A., Calabrese G., Bernardi F., Meneghelli E., Riegel M., Rocchi M., Gueneri S., Lalatta F., Zelante L., Romano C., Fichera M., Mattina T., Arrigo G., Zollino M., Giglio S., Lonardo F., Bonfante A., Ferlini A., Cifuentes F., Van Esch H., Backx L., Schinzel A., Vermeesch J. R., Zuffardi O. (2007) *Cryptic deletions are a common finding in “balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients*. *Journal of Medical Genetics* 44(12): 750–762

Gribble S. M., Prigmore E., Burford D. C., Porter K. M., Ng B. L., Douglas E. J., Fiegler H., Carr P., Kalaitzopoulos D., Clegg S., Sandstrom R., Temple I. K., Youings S. A., Thomas N. S., Dennis N. R., Jacobs P. A., Crolla J. A., Carter N. P. (2005) *The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes*. *Journal of Medical Genetics* 42(1): 8–16

Hagberg B., Hagberg G., Olow I. (1982) *Gains and hazards of intensive neonatal care: an analysis from Swedish Cerebral palsy epidemiology*. *Developmental Medicine and Child Neurology* 24(1): 13-19

Hannes F. D., Sharp A. J., Mefford H. C., de Ravel T., Ruivenkamp C. A., Breuning M. H., Fryns J. P., Devriendt K., Van Buggenhout G., Vogels A., Stewart H., Hennekam R. C., Cooper G. M., Regan R., Knight S. J., Eichler E. E. Vermeesch J. R. (2009) *Recurrent*

reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. Journal of Medical Genetics 46(4): 223-232

Harada N., Hatchwell E., Okamoto N., Tsukahara M., Kurosawa K., Kawame H., Kondoh T., Ohashi H., Tsukino R., Kondoh Y., Shimokawa O., Ida T., Nagai T., Fukushima Y., Yoshiura K., Niikawa N., Matsumoto N. (2004) *Subtelomere specific microarray based comparative genomic hybridisation: A rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation. Journal of Medical Genetics 41(2): 130–136*

De Heer I. M., Hoogeboom A. J. M., Eussen H. J., Vaandrager J. M., De Klein A. (2004) *Deletion of the TWIST gene in a large five-generation family. Clinical Genetics 65(5): 396-399*

Heinrich U. (2010) Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin. Analysetechniken und Systematik der Chromosomenstörungen, <http://www.medizinischegenetik.de/index.php?id=1412> (28.02.2013)

Higgins A. W., Alkuraya F. S., Bosco A. F., Brown K. K., Bruns G. A. P., Donovan D. J., Eisenman R., Fan Y., Farra C. G., Ferguson H. L., Gusella J. F., Harris D. J., Herrick S. R., Kelly C., Kim H. G., Kishikawa S., Korf B. R., Kulkarni S., Lally E., Leach N. T., Lemyre E., Lewis J., Ligon A. H., Lu W., Maas R. L., MacDonald M. E., Moore S. D. P., Peters R. E., Quade B. J., Quintero-Rivera F., Saadi I., Shen Y., Shendure J., Williamson R. E., Morton C. C. (2008) *Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. The American Journal of Human Genetics 82(3): 712–722*

Hills A., Ahn J. W., Donaghue C., Thomas H, Mann K., Ogilvie C. M. (2010) *MLPA for confirmation of array CGH results and determination of inheritance. Molecular Cytogenetics 3: 19*

Iafate A. J., Feuk L., Rivera M. N., Listewnik M. L., Donahoe P. K., Ying Q., Scherer S. W., Lee C. (2004) *Detection of large-scale variation in the human genome. Nature genetics 39(9): 949 – 951*

ICD-10: Kapitel V: Psychische und Verhaltensstörungen (F00-F99), Intelligenzminderung (F70–F79) <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-gm/kodesuche/onlinefassungen/htmlgm2004/index.htm?gf70.htm> (28.02.2013)

Jobanputra V., Sebat J., Troge J., Chung W., Anyane-Yeboah K., Wigler M., Warburton D. (2005) *Application of ROMA (representational oligonucleotide microarray analysis) to patients with cytogenetic rearrangements. Genetics in Medicine 7(2): 111–118*

van Karnebeek C. D., Koevoets C., Sluijter S., Bijlsma E. K., Smeets D. F., Redeker E. J., Hennekam R. C., Hoovers J. M. (2002) *Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown etiology: The Amsterdam experience. Journal of Medical Genetics 39(1): 546–553*

van Karnebeek C. D., Jansweijer M. C., Leenders A. G., Offringa M., Hennekam R. C. (2005a) *Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: A systematic literature review of their usefulness. European Journal of Human Genetics 13(1): 6–25*

van Karnebeek C. D., Scheper F. Y., Abeling N. G., Alders M., Barth P. G., Hoovers J. M., Koevoets C., Wanders R. J., Hennekam R. C. (2005b) *Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: A prospective study. American Journal on Mental Retardation 110(4): 253–267*

Kirchhoff M., Rose H., Maahr J., Gerdes T, Bugge M., Tommerup N., Tumer Z., Lespinasse J., Jensen P., Wirth J., Lundsteen C. (2000) *High resolution comparative genomic hybridization analysis reveals imbalances in dyschromosomal patients with normal or apparently balanced conventional karyotypes. European Journal of Human Genetics 8(9): 661–668*

Klopocki E. und Huber A. (2006) Standardisierte Mikroarray-basierte Komparative Genomhybridisierung (Array-CGH). *Molekulare Zytogenetik*: 2-5

Klopocki E., Schulze H., Strauss G., Ott C. E., Hall J., Trotier F., Fleischhauer S., Greenhalgh L., Newbury-Ecob R. A., Neumann L. M., Habenicht R., König R., Seemanova E., Megarbane A., Ropers H. H., Ullmann R., Horn D., Mundlos S. (2007) *Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. American Journal of Human Genetics* 80(2): 232-240

Knight S. J., Regan R., Nicod A., Horsley S. W., Kearney L., Homfray T., Winter R. M., Bolton P., Flint J. (1999) *Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. Lancet* 354(9191): 1676–1681

Knight S. J., Regan R. (2006) *Idiopathic learning disability and genome imbalances. Cytogenet and Genome Research* 115 (3-4): 215-224

Kok K., Dijkhuizen T., Swart Y. E., Zorgdrager H., van der Vlies P., Fehrmann R., te Meerman G. J., Gerssen-Schoorl K. B., van Essen T., Sikkema-Raddatz B., Buys C. H. (2005) *Application of a comprehensive subtelomere array in clinical diagnosis of mental retardation. European Journal of Medical Genetics* 48(3): 250–262

Koolen D. A., Nillesen W. M., Versteeg M. H. A., Merkx G. F. M., Knoers N. V. A. M., Kets M., Vermeer S., van Ravenswaaij C. M. A., de Kovel C. G., Brunner H. G., Smeets D., de Vries B. B. A., Sistermans E. A. (2004) *Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). Journal of Medical Genetics* 41(12): 892–899

Kumar R. A., KaraMohamed S., Sudi J., Conrad D. F., Brune C., Badner J. A., Gilliam T. C., Nowak N. J., Cook E. H., Dobyns W. B., Christian S. L. (2008) *Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. Human Molecular Genetics* 17(4): 628–638

Larson S. A., Lakin K. C., Anderson L., Kwak N., Lee J. H., Anderson D. (2001) *Prevalence of mental retardation and developmental disabilities: estimates from the 1994/1995 National Health Interview Survey Disability Supplements. American Journal of Mental Retardation 106(3): 231-52*

Lejeune J, Turpin R & Gautier M 1959 *Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine 143(11-12): 256–265*

Lupski J. R. (2006) *Genome structural variation and sporadic disease traits. Nature Genetics 38(9): 974-976*

Lu X. Y., Phung M. T., Shaw C. A., Pham K., Neil S. E., Patel A., Sahoo T., Bacino C. A., Stankiewicz P., Lee Kang S. H., Lalani S., Chinault A. C., Lupski J. R., Cheung S. W., Beaudet A. L. (2008) *Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. Pediatrics 122(6): 1310-1318*

Mao R., Yalal S. M., Snow K., Michels V. V., Szabo S. M., Babovic-Vuksanovic D. (2000) *Characteristics of two cases with dup(15)(q11.2-q11.12): one of maternal and one of paternal origin. Genetics in medicine 2(2): 131-135*

Menten B., Maas N., Thienpont B., Buysse K., Vandesompele J., Melotte C., de Ravel T., Van Vooren S., Balikova I., Backx L., Janssens S., De Paepe A., De Moor B., Moreau Y., Marynen P., Fryns J.-P., Mortier G., Devriendt K., Speleman F., Vermeesch J. R. (2006) *Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. Journal of Medical Genetics 43(8): 625-633*

Miller D. T., Nasir R., Sobeih M. M., Shen Y., Wu B. L., Hanson E., Adam M. P., Bird T. D., Dolan C. R., Fong C. T., Stephens K. (2009 ,updated 2011) *16p11.2 Microdeletion. GeneReviews™*

Miller D. T., Adam M. P., Aradhya S., Biesecker L. G., Brothman A. R., Carter N. P., Church D. M., Crolla J. A., Eichler E. E., Epstein C. J., Faucett W. A., Feuk L., Friedman J. M.,

Hamosh A., Jackson L., Kaminsky E. B., Kok K., Krantz I. D., Kuhn R. M., Lee C., Ostell J. M., Rosenberg C., Scherer S. W., Spinner N. B., Stavropoulos D. J., Tepperberg J. H., Thorland E. C., Vermeesch J. R., Waggoner D. J., Watson M. S., Martin C. L., Ledbetter D. H. (2010) *Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. American Journal of Human Genetics* 86(5): 749-764

Miyake N., Shimokawa O., Harada N., Sosonkina N., Okubo A., Kawara M. H., Okamoto N., Kurosawa K., Kawame H., Iwakoshi M., Kosho T., Fukushima Y., Makita Y., Yokoyama Y., Yamagata T., Kato M., Hiraki Y., Nomura M., Yoshiura K., Kishino T., Ohta T., Mizuguchi T., Niikawa N., Matsumoto N. (2006) *BAC array CGH reveals benomic aberrations in idiopathic mental retardation. American Journal of Medical Genetics* 140A(3): 205–211

Moeschler J. B., Shevell M. and the Committee on Genetics (2006) *Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. Pediatrics* 117(6): 2304-2316

Moog U. (2005) *The outcome of diagnostic studies on the etiology of mental retardation: considerations on the classification of the causes. American Journal of Medical Genetics* 137A(2): 228–231

Oberlé I., Rousseau F., Heitz D., Kretz C., Devys D., Hanauer A., Boué J., Bertheas M. F., Mandel J. L. (1991) *Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. Science* 252(5009): 1097-1102

Okamura R., Sagehashi N., Tsukagosti T. (1988) *11q-syndrome with cleft palate: A case report. Japanese Journal PSR* 8: 353-358

Van Ommen G. J. (2005) *Frequency of new copy number variation in humans. Nature Genetics* 37(4):333-334

Ono J., Hasegawa T., Saguwa S., Sagahashi N., Hase Y., Oku K., Endo Y., Ohdo S., Ishikiriyama S., Tsukamoto H., Okada S. (1996) *Partial deletion of the long arm of chromosome 11: ten Japanese children. Clinical Genetics 50(6): 474-478*

Perry G. H., Ben-Dor A., Tsalenko A., Sampas N., Rodriguez-Revenge L., Tran C. W., Scheffer A., Steinfeld I., Tsang P., Yamada N. A., Park H. S., Kim J. I., Seo J. S., Yakhini Z., Laderman S., Bruhn L., Lee C. (2008) *The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. American Journal of Human Genetics 82(3): 685-695*

Phelan M. C., Crawford E. C., Bealer D. M. (1996) *Mental retardation in South Carolina. III. Chromosome aberrations. In: Saul R. A., Phelan M. C., Proceedings of the Greenwood Genetic Center. Greenwood Genetic Center 15: 45-60 Greenwood, USA*

Pickering D. L., Eudy J. D., Haskins Olney A., Dave B. J., Golden D., Stevens J., Sanger W. G. (2008) *Array-based comparative genomic hybridization analysis of 1176 consecutive clinical genetics investigations. Genetics in Medicine 10(4): 262-266*

Pinkel D., Segraves R., Sudar D., Clark S., Poole I., Kowbel D., Collins C., Kuo W.-L., Chen C., Zhai Y., Dairke S. H., Ljung B.-M., Gray J. W., Albertson D. G. (1998) *High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nature Genetics 20(2): 207-211*

Portnoi M. F. (2009) *Microduplication 22q11.2: A new chromosomal syndrome. European Journal of Medical Genetics 52(3-4): 88-93*

Potocki L., Bi W., Treadwell-Deering D., Carvalho C. M. B., Eifert A., Friedman E. M., Glaze D., Krull K., Lee J. A., Lewis R. A., Mendoza-Londono R., Robbins-Furman P., Shaw C., Shi X., Weissenberger G., Withers M., Yatsenko S. A., Zackai E. H., Stankiewicz P., Lupski J. R. (2007) *Characterization of Potocki-Lupski Syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. The American Journal of Human Genetics 80(4): 633-649*

Redon R., Ishikawa S., Fitch K. R., Feuk L., Perry G. H., Andrews T. D., Fiegler H., Shapero M. H., Carson A. R., Chen W., Cho E. K., Dallaire S., Freeman J. L., Gonzalez J. R., Gratacos M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J. R., Marshall C. R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M. J., Tchinda J., Valsesia A., Woodward C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Armengol L., Conrad D. F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N. P., Aburatani H., Lee C., Jones K. W., Scherer S. W., Hurles M.E. (2006) *Global variation in copy number in the human genome. Nature 444(7118): 444–454*

Rauch A., Hoyer J., Guth S., Zweier C., Kraus C., Becker C., Zenker M., Hüffmeier U., Thiel C., Rüschemdorf F., Nürnberg P., Reis A., Trautmann U. (2006) *Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. American Journal of Medical Genetics Part A 140A(19): 2063–2074*

de Ravel T. J. , Devriendt K., Fryns J. P., Vermeesch J. R. (2007) *What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). European Journal of Pediatrics 166(7): 637–643*

Ravnan J. B., Tepperberg J. H., Papenhausen P., Lamb A. N., Hedrick J., Eash D., Ledbetter D. H., Martin C. L. (2006) *Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. Journal of Medical Genetics 43(6): 478–489*

Rickman L., Fiegler H., Carter N. P., Bobrow M. (2005) *Prenatal Diagnosis by Array-CGH. European Journal of Medical Genetics 48(3): 232–240*

Roeleveld N., Zielhuis G. A., Gabreels F. (1997) *The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. Developmental Medicine & Child Neurology 39(2): 125-132*

Rooms L., Reyniers E., van Luijk R., Scheers S., Wauters J., Ceulemans B., Van Den Ende J., Van Bever Y., Kooy R. F. (2004a) *Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic*

mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Human Mutation* 23(1): 17–21

Rooms L., Reyniers E., van Luijk R., Scheers S., Wauters J., Kooy R. F. (2004b) *Screening for subtelomeric rearrangements using genetic markers in 70 patients with unexplained mental retardation. Annales Génétique* 47(1): 53–59

Rosenberg C., Knijnenburg J., Bakker E., Vianna-Morgante A. M., Sloos W., Otto P. A., Kriek M., Hansson K., Krepischi-Santos A. C. V., Fiegler H., Carter N. P., Bijlsma E. K., van Haeringen A., Szuhai K., Tanke H. J. (2006) *Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. Journal of Medical Genetics* 43(2): 180-186

Schaefer G. B., Bodensteiner J. B. (1992) *Evaluation of the child with idiopathic mental retardation. Pediatric Clinics of North America* 39(4): 929-943

Sagoo G. S., Butterworth A. S., Sunderson S., Shaw-Smith C., Higgins J. P. T., Burton H. (2009) *Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. Genetics in medicine* 11(3): 139-146

Sahoo T., Cheung S. W., Ward P., Darilek S., Patel A., del Gaudio D., Kang S. H. L., Lalani S. R., Li J., McAdoo S., Burke A., Shaw C. A., Stankiewicz P., Chinault A. C., Van den Veyver I. B., Roa B. B., Beaudet A. L., Eng C. M. (2006) *Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. Genetics in Medicine* 8(11): 719–727

Saul R. A. und Tarleton J. C. (1998, updated 2012) *FMRI-related disorders. GeneReviews™* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/> (16.07.2013)

Schinzel A. (2001) *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. Berlin-New York: Walter de Gruyter*

Sebat J., Lakshmi B., Troge J., Alexander J., Young J., Lundin P., Manér S., Massa H., Walker M., Chi M., Navin N., Lucito R., Healy J., Hicks J., Ye K., Reiner A., Gilliam T. C., Trask B., Patterson N., Zetterberg A., Wigler M. (2004) *Large-scale copy number polymorphism in the human genome. Science 305(5683): 525-528*

Sebat J., Lakshmi B., Malhotra D., Troge J., Lese-Martin C., Walsh T., Yamrom B., Yoon S., Krasnitz A., Kendall J., Leotta A., Pai D., Zhang R., Lee Y. H., Hicks J., Spence S. J., Lee A. T., Puura K., Lehtimäki T., Ledbetter D., Gregersen P. K., Bregman J., Sutcliffe J. S., Jobanputra V., Chung W., Warburton D., King M. C., Skuse D., Geschwind D. H., Gilliam T. C., Ye K., Wigler M. (2007) *Strong association of de novo copy number mutations with autism. Science 316(5823): 445-449*

Schluth-Bolard C., Delobel B., Sanlaville D., Boute O., Cuisset J. M., Sukno S., Labalme A., Duban-Bedu B., Plessis G., Jaillard S., Dubourg C., Henry C., Lucas J., Odent S., Pasquier L., Copin H., Latour P., Cordier M. P., Nadeau G., Till M., Edery P., Andrieux J. (2009) *Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. European Journal of Medical Genetics 52(5): 291-296*

Schoumans J., Ruivenkamp C., Holmberg E., Kyllerman M., Anderlid B. M., Nordenskjöld M. (2005) *Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). Journal of Medical Genetics 42(9): 699-705*

Shaffer L. G., Kashork C. D., Saleki R., Rorem E., Sundin K., Ballif B. C., Bejjani B. A. (2006) *Targed genomic microarray analysis for indentification of abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. The Journal of Pediatrics 149(1): 98-102*

Shaffer L. G., Bejjani B. A., Torchia B., Kirkpatrick S., Coppinger J., Ballif B. C. (2007) *The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. American Journal of Medical Genetics 145C(4): 335-345*

Shaikh T. H. (2007) *Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies. Journal of Medical Genetics 9(9): 617–625*

Sharp A. J. (2009) *Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease. Human Mutation 30(2): 135-44*

Shaw-Smith C., Redon R., Rickman L., Rio M., Willatt L., Fiegler H., Firth H., Sanlaville D., Winter R., Colleaux L., Bobrow M., Carter N. P. (2004) *Microarray based comparative genomic hybridization (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. Journal Medical Genetics 41(4): 241–248*

Shen Y., Irons M., Miller D. T., Wai Cheung S., Lip V., Sheng X., Tomaszewicz K., Shao H, Fang H., Siv Tang H., Walsh C. A., Platt O., Gusella J.F., Wu B.-L. (2007) *Development of a focused oligonucleotide-array comparative genomic hybridization chip for clinical diagnosis of genomic imbalance. Clinical Chemistry 53(12): 2051–2059*

Shinawi M. und Cheung S. W. (2008) *The array CGH and its clinical applications. Drug Discovery Today 13(17-18): 760-770*

Slavotinek A. M. (2008) *Novel microdeletion syndromes detected by chromosome. Human Genetics 124(1): 1-17*

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

Stankiewicz P. und Beaudet A. L. (2007) *Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. Current Opinion in Genetics & Development 17(3): 182–192*

Subramonia-Iyer S., Sanderson S., Sagoo G., Higgins J., Burton H., Zimmern R., Kroese M., Brice P., Shaw-Smith C. (2007) *Array-based comparative genetic hybridization for investigating chromosomal abnormalities in patients with learning disability: Systematic review meta-analysis of diagnostic and false-positive yields. Genetics in Medicine 9(2): 74-79*

Tchinda J. und Lee C. (2006) *Detecting copy number variation in the human genome using comparative genomic hybridization. Bio Techniques 41(4): 385-392*

Thienpont B., Mertens L., de Ravel T., Eyskens B., Boshoff D., Maas N., Fryns J.-P., Gewillig M., Vermeesch J. R., Devriendt K. (2007) *Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. European Heart Journal 28(22): 2778–2784*

Tjio J.H., Levan A. (1956) *The chromosome number of man. Hereditas 42: 1–6*

Tönnies H. (2002) *Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. Trends in Molecular Medicine 8(6): 246-50*

Toruner G. A., Streck D. L., Schwalb M. N., Dermody J. J. (2006) *An oligonucleotide based array-CGH system for detection of genome wide copy number changes including subtelomeric regions for genetic evaluation of mental retardation. American Journal of Medical Genetics 143A(8): 824–829*

Trask B. J. (1991) *Fluorescence in situ hybridization: Applications in cytogenetics and gene mapping. Trends in Genetics 7: 149–154*

Ullmann R., Turner G., Kirchhoff M., Chen W., Tonge B., Rosenberg C., Field M., Vianna-Morgante A. M., Christie L., Krepisch-Santos A. C., Banna L., Brereton A. V., Hill A., Bisgaard A. M., Müller I., Hultschig C., Erdogan F., Wieczorek G., Ropers H. H. (2007) *Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. Human Mutation 28(7): 674-82*

Vialard F., Molina Gomes D., Leroy B., Quarello E., Escalona A., Le Sciellour C., Serazin V., Roume J., Ville Y., de Mazancourt P., Selva J. (2009) *Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: another experience. Fetal Diagnosis and Therapy* 25(2): 277-284

Van den Veyver I. B., Arthur L., Beaudet A (2006). *Comparative genomic hybridization and prenatal diagnosis. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 18(2): 185–191

Van den Veyver I. B., Patel A., Shaw C. A., Pursley A. N., Kang S. H., Simovich M. J., Ward P. A., Darilek S., Johnson A., Neill S. E., Bi W., White L. D., Eng C. M., Lupski J. R., Cheung S. W., Beaudet A. L. (2009) *Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. Prenatal Diagnostics* 29(1): 29–39

Veltman J. A., Schoenmakers E. F., Eussen B. H., Janssen I., Merckx J., van Cleef B., van Ravenswaaij C. M., Brunner H. G., Smeets D., van Kessel A. G. (2002) *High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. American Journal of Human Genetics* 70(5): 1269- 1276

Vissers L. E., de Vries B. B., Osoegawa K., Janssen I. M., Feuth T., Choy C. O., Straatman H., van der Vliet W., Huys E. H., van Rijk A., Smeets D., van Ravenswaaij-Arts C., Knoers N. V., van der Burgt I., de Jong P. J., Brunner H. G., van Kessel A. G., Schoenmakers E. F., Veltman J. A. (2003) *Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. American Journal of Human Genetics* 73(6): 1261–1270

Vissers L. E., Veltman J. A., van Kessel A. G., Brunner H. G. (2005) *Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. Human Molecular Genetics* 14(2): 215–223

De Vries B. B., van den Ouweland A. M., Mohkamsing S., Duivenvoorden H. J., Mol E., Gelsema K., van Rijn M., Halley D. J., Sandkuijl L .A., Oostra B. A., Tibben A., Niermeijer M. F. (1997) *Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. American Journal of Human Genetics* 61(3): 660-667

de Vries B. B., White S. M., Knight S. J., Regan R., Homfray T., Young I. D., Super M., McKeown C., Splitt M., Quarrell O. W., Trainer A. H., Niermeijer M. F., Malcolm S., Flint J., Hurst J. A., Winter R. M. (2001) *Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. Journal of Medical Genetics 38(3): 145–150*

De Vries B. B., Winter R., Schinzel A., van Ravenswaaij-Arts C. (2003) *Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. Journal of Medical Genetics 40(6): 385–398*

de Vries B. B., Pfundt R., Leisink M., Koolen D. A., Vissers L. E., Janssen I. M., van Reijmersdal S., Nillesen W. M., Huys E. H., de Leeuw N., Smeets D., Sistermans E. A., Feuth T., van Ravenswaaij-Arts C. M., van Kessel A. G., Schoenmakers E. F., Brunner H. G., Veltman J. A. (2005) *Diagnostic genome profiling in mental retardation. American Journal of Human Genetics 77(4): 606–616*

Walter S., Sandig K., Hinkel G. K., Mitulla B., Ounap K., Sims G., Sitska M., Utermann B., Viertel P., Kalscheuer V., Bartsch O. (2004) *Subtelomere FISH in 50 children with mental retardation and minor anomalies, identified by a checklist, detects 10 rearrangements including a de novo balanced translocation of chromosomes 17p13.3 and 20q13.33. American Journal of Medical Genetics 128A(4): 364–373*

Weiss L. A., Shen Y., Korn J. M., Arking D. E., Miller D. T., Fossdal R., Saemundsen E., Stefansson H., Ferreira M. A., Green T., Platt O. S., Ruderfer D. M., Walsh C. A., Altshuler D., Chakravarti A., Tanzi R. E., Stefansson K., Santangelo S. L., Gusella J. F., Sklar P., Wu B. L., Daly M. J. (2008) *Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. The New England Journal of Medicine 358(7): 667-675*

Weltgesundheitsorganisation: <http://www.euro.who.int/de/what-we-do/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/news/news/2010/15/childrens-right-to-family-life/definition-intellectual-disability> (28.02.2013)

Weltgesundheitsorganisation, Genf (1980) *International classification of impairments, disabilities and handicaps*

Yeargin-Allsopp M., Murphy C. C., Cordero J. F., Decouflé P., Hollowell J. G. (1997) *Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10-year-old children, metropolitan Atlanta, 1985 to 1987. Developmental Medicine & Child Neurology 39(3): 142-149*

Yobb T. M., Somerville M. J., Willatt L., Firth H. V., Harrison K., MacKenzie J., Gallo N., Morrow B. E., Shaffer L. G., Babcock M., Chernos J., Bernier F., Sprysak K., Christiansen J., Haase S., Elyas B., Lilley M., Bamforth S., McDermid H. E. (2005) *Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome. American Journal of Human Genetics 76(5): 865–876*

Yu S., Baker E., Hinton L., Eyre H. J., Waters W., Higgins S., Sutherland G. R., Haan E. (2005) *Frequency of truly cryptic subtelomere abnormalities – a study of 534 patients and literature review. Clinical Genetics 68(5): 436–441*

Zschocke J. und Tariverdian G. (2007) *Humangenetik und Pädiatrie*. In: Mayatepek E. *Pädiatrie*. Urban & Fischer 1: 68-83, München Jena, Deutschland

Verwendete Datenbanken:

Ensembl - <http://www.ensembl.org/> (13.03.2013)

Database of Genomic Variations - <http://projects.tcag.ca/variation/> (13.03.2013)

UCSC Genome bioinformatics - <http://genome.ucsc.edu/> (13.03.2013)

HGVS - <http://www.hgvs.org/> (13.03.2013)

7Anhang

<u>Fragebogen zu klinischen Symptomen Array-CGH-</u> <u>untersuchter Patienten</u>		
Einsender:	Empfänger: Institut für Humangenetik Universitätsklinikum SH Campus Kiel Direktor: Prof. Dr. med. R. Siebert Schwanenweg 24 24105 Kiel	
Name:	Geburtsdatum:	
	JA	NEIN
Mentale Retardierung Wenn ja, wie schwer ist der Patient mental retardiert?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Positive Familienanamnese für mentale Retardierung Wenn ja, welches Familienmitglied ist betroffen und in welchem Ausmaß?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Vater <input type="checkbox"/> Mutter <input type="checkbox"/> Bruder <input type="checkbox"/> Schwester <input type="checkbox"/>		
Pränatale Wachstumsretardierung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Postnatale Wachstumsanomalien	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mikrozephalie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Makrozephalie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Faziale Dysmorphien Wenn ja, weche fazialen Dysmorphien weist der Patient auf?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere kongenitale Anomalien/Fehlbildungen Wenn ja, welche anderen kongenitalen Anomalien/Fehlbildungen weist der Patient auf?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Verhaltensauffälligkeiten: Wenn ja, welche Verhaltensauffälligkeiten zeigt der Patient?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Zerebrale Anfälle	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ggf. klinische Diagnose: _____		
Karyotyp: _____		
evtl. FISH-Befunde: _____		
Sonstiges (z.B. auffälliger Chromosomenbefund): _____		

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. Siebert möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die vorbildliche und unermüdliche Unterstützung während der ganzen Zeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. A. Caliebe und Herrn Dr. rer. nat. J. I. Martin-Subero, die mich bei der Konzeption und Durchführung dieser Arbeit, sowie bei der Erstellung der Dissertationsschrift sehr gut betreuten und mir bei allen fachlichen Fragen stets zur Seite standen. Frau Prof. Dr. med. G. Gillessen-Kaesbach danke ich für die Bereitstellung, der für diese Arbeit erforderlichen Informationen des humangenetischen Instituts der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.

Frau Magret Ratjen möchte ich sehr danken für die Einführung und Unterstützung bei der Durchführung der Array-CGH-Analyse.

Darüberhinaus möchte ich mich auch bei allen weiteren Mitgliedern des humangenetischen Instituts der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel sowie der Archive für ihre stets freundliche Hilfe bei fachlichen und organisatorischen Fragen danken.

9 Lebenslauf

Name: Neele Maria Husemeyer
 Wohnort: Schlankreye 53, 20144 Hamburg
 Geburtsdatum: 06.07.1984
 Geburtsort: Essen

Schulbildung:

1990 - 1994: Grundschule: Stiftsschule, Essen
 1994 - 2003: Gymnasium: B.M.V.- Schule, Essen
 08/2000- 02/2001: Lycée Franco-Allemand, Versailles, Frankreich
 Juni 2003: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

WS2003/04: Medizin Vorbereitungssemester im naturwissenschaftlichen
 Segment: Studium der Chemie, Universität Essen

SS2004 - WS2005/06: Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Georg-
 August-Universität Göttingen

März 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

SS2006 – WS2006/07: Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Christian-
 Albrechts-Universität zu Kiel

August 2006: Beginn der Promotion am Institut für Humangenetik des UKSH,
 Campus Kiel bei Herrn Prof. Dr. med. Reiner Siebert
 Thema: Nachweis konstitutioneller, submikroskopischer
 Veränderungen bei Störungen der geistigen Entwicklung

SS2007 – WS 2009/10: Klinischer Abschnitt an der Eberhard-Karls-Universität
 Tübingen

SS2009/WS2009/10: Praktisches Jahr
 1. Tertial: Chirurgie im Universitätsklinikum Zürich
 2. Tertial: Innere Medizin im *University Hospital of Wales, Cardiff* und im Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
 3. Tertial: Pädiatrie im Universitätsklinikum Tübingen

März 2010: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Facharztausbildung:

11/2010-12/2012: Assistenzärztin in der Abteilung für Geriatrie im Marienkrankenhaus Hamburg, Chefärzte Dr. med. Heinrich Bünemann/ PD Dr. med. Daniel Kopf/ Dr. med. Helmut Böhre

Seit 01/2013: Assistenzärztin im Zentrum für Innere Medizin, Marienkrankenhaus Hamburg, Chefärzte Prof. Dr. med. Andreas Van de Loo/ Prof. Dr. med. Udo Vanhoefer

Veröffentlichungen:

Caliebe A., Platzer K., Argyriou L., Bens S., Hellenbroich Y., Husemeyer N., Nagel I., Martin-Subero J. I., Sporns P., Stefanova I., Tönnies H., Vater I., Weimer J., Siebert R., Gillessen-Kaesbach G. (2012) Array-CGH-Erfahrungen aus Schleswig-Holstein. *Medgen 24*: 99-107

Caliebe A., Husemeyer N., Martin-Subero J. I., Gesk S., Stefanova I., Gillessen-Kaesbach G., Bruhn K., Stephani U., Kautza M., Krüger G., Weimer J., Tönnies H., Siebert R. (2008) *Oligonucleotide array-CGH in postnatal cytogenetics – Kiel experiences*. *Medgen 20*: 92