

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

**MOLEKULARZYTOGENETISCHE  
UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS  
CHROMOSOMALER ABERRATIONEN BEI  
PATIENTEN MIT SPRACHBETONTER  
ENTWICKLUNGSVERZÖGERUNG**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

**Angela Sternkopf**

aus Hamburg

Kiel 2010

**1. Berichterstatter:**

Prof. Dr. med. R. Siebert

**2. Berichterstatter:**

Prof. Dr. med. M. Siniatchkin

Tag der mündlichen Prüfung:

20.07.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

20.07.2010

**gez.: Prof. Dr. med. W. Grote  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Mentale Retardierung als kombiniertes Krankheitsbild.....	1
1.2 Normale und gestörte Sprachentwicklung.....	2
1.3 Bekannte Chromosomenstörungen, die mit einer Verzögerung der expressiven Sprachentwicklung einhergehen .....	3
1.3.1 Deletion 22q13.3 .....	3
1.3.2 Duplikation 7q11.23.....	4
1.4 Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	5
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>6</b>
2.1 Patienten .....	6
2.2 Material.....	7
2.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	7
2.2.2 Kits .....	8
2.2.3 Arrays .....	8
2.2.4 Lösungen .....	9
2.2.5 Sonden.....	11
2.2.6 Geräte .....	13
2.2.7 Software .....	14
2.3 Methoden.....	15
2.3.1 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) .....	15
2.3.1.1 Prinzip der FISH.....	15
2.3.1.2 Durchführung der FISH .....	15
2.3.1.3 Auswertung und Dokumentation der FISH.....	19
2.3.2 Array basierte komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH) .....	20
2.3.2.1 Prinzip der Array-CGH .....	20
2.3.2.2 Durchführung der Array-CGH.....	22
2.3.2.3 Auswertung der Array-CGH .....	24
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs .....	26
3.2 Häufigkeit der Duplikation 7q11.23 sowie der Deletion 22q13.3.....	28
3.2.1 Häufigkeit der Duplikation 7q11.23.....	28
3.2.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze für die Duplikation 7q11.23 .....	28
3.2.1.2 Screening des gesamten Patientenkollektivs auf eine dup(7)(q11.23).....	28
3.2.1.3 Patienten mit chromosomalen Aberrationen in der FISH: Patient mit einer Duplikation 7q22-q31.3 .....	29
3.2.2 Häufigkeit der Deletion 22q13.3.....	30
3.2.2.1 Bestimmung der Nachweisgrenze für die Deletion 22q13.3.....	30
3.2.2.2 Screening des gesamten Patientenkollektivs auf eine del(22)(q13.3).....	30
3.2.2.3 Patienten mit chromosomalen Aberrationen in der FISH: Patient mit einer Deletion 22q13.3 .....	31
3.2.2.4. Patienten mit chromosomalen Aberrationen in der FISH: Patient mit einer Deletion 22q11.2 .....	31
3.3 Detektion neuer chromosomaler Aberrationen durch Array-CGH .....	33
3.3.1 Auswahl der Patienten für die Array-CGH Analyse.....	33
3.3.1.1 Ergebnisse der Array-CGH .....	33

3.3.2	Identifizierung zusätzlicher Patienten aus der Routine-diagnostik .....	36
3.3.2.1	Ergebnisse der Array-CGH .....	36
3.4	Häufigkeit der Deletion 16p12.1, der Duplikation 17p11.2 und der Deletion 18p11.2 im gesamten Patientenkollektiv .....	40
3.4.1	Bestimmung der Nachweisgrenzen der verwendeten Sonden .....	41
3.4.1.1	Bestimmung der Nachweisgrenze für die Deletion 16p12.1 .....	41
3.4.1.2	Bestimmung der Nachweisgrenze für die Duplikation 17p11.2 .....	41
3.4.1.3	Bestimmung der Nachweisgrenze für die Deletion 18p11.2 .....	42
3.4.2	FISH-Untersuchungen am gesamten Patientenkollektiv .....	43
3.4.2.1	Untersuchung auf die Deletion 16p12.1 .....	43
3.4.2.2	Untersuchung auf die Duplikation 17p11.2 .....	43
3.4.2.3	Untersuchung auf die Deletion 18p11.2 .....	43
3.5	Klinische Beschreibung der Patienten mit Aberrationen .....	44
3.5.1	Phänotyp der Patientin mit der Duplikation 7q22-q31.3 .....	44
3.5.2	Phänotyp der Patientin mit der Deletion 16p12.1 .....	44
3.5.3	Phänotyp der Patientin mit der Duplikation 17p11.2 .....	45
3.5.4	Phänotyp des Patienten mit der Deletion 18p11.2 .....	45
3.5.5	Phänotyp des Patienten mit der Deletion 22q13.3 (Mosaik) .....	45
3.5.6	Phänotyp des Patienten mit der Deletion 22q11.2 .....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>47</b>
4.1	Eignet sich die FISH zur genetischen Diagnostik bei einer Sprachentwicklungsverzögerung? .....	47
4.2	Vorteile und Nachteile der Array-CGH .....	49
4.3	Auswahl des Patientenkollektivs für die FISH-Analysen auf del(22)(q13.3) sowie dup(7)(q11.23) .....	50
4.4	Wie erklärt der Genotyp den Phänotyp? .....	51
4.4.1	Duplikation 7q11.23 .....	52
4.4.2	Deletion 16p12.1 .....	52
4.4.3	Duplikation 17p11.2 .....	53
4.4.4	Deletion 18p11.2 .....	53
4.4.5	Deletion 22q13.3 .....	54
4.5	Genetischer und phänotypischer Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Patientin mit der Deletion 16p12.1 mit bereits veröffentlichten Fällen .....	54
4.6	Phänotypen von Patienten mit einer Duplikation 17p11.2 .....	56
4.7	Phänotypen von Patienten mit einer Deletion 18p11.2 .....	57
4.8	Vergleich des Patienten mit einem Mosaik für die Deletion (22)(q13.3) mit bereits veröffentlichten Fällen .....	58
4.9	Fazit .....	59
4.10	Ausblick .....	60
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>68</b>
7.1	Patientenbeschreibung .....	68
7.2	Bestimmung der Nachweisgrenzen für die FISH-Sonden .....	72
7.3	FISH-Ergebnisse des Patientenkollektivs .....	74
7.4	Polymorphe Kopienzahlvarianten (CNVs) .....	78
7.5	Klinische Charakteristika der Patienten mit chromosomalen Aberrationen .....	79
7.5.1	Phänotyp der Patientin mit der Duplikation 7q22-q31.3 .....	79
7.5.2	Phänotyp der Patientin mit der Deletion 16p12.1 .....	79
7.5.3	Phänotyp der Patientin mit der Duplikation 17p11.2 .....	80

7.5.4	Phänotyp des Patienten mit der Deletion 18p11.2 .....	80
7.5.5	Phänotyp des Patienten mit der Deletion 22q11.2 .....	81
7.5.6	Phänotyp des Patienten mit der Deletion 22q13.3 .....	81
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>83</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Array-CGH	Matrix (gebräuchlich: Array) basierte komparative genomische Hybridisierung
Apgar	Punkteschema für die Zustandsdiagnostik des Neugeborenen unmittelbar nach der Geburt
BAC	bacterial artificial chromosome = künstliches Bakterienchromosom
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CNV	Copy Number Variation; polymorphe Kopienzahlvarianten von Chromosomenabschnitten
chr	Chromosom
CTD	California Institute of Technology human BAC library D
Cy3	Indocarbocyanin, Fluoreszenzfarbstoff
Cy5	Indodicarbocyanin, Fluoreszenzfarbstoff
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DAPI	4,6-Diaminido-2-Phenylindoldihydrochlorid
dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat
del	Deletion
dest.	destilliert
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid 5'-Triphosphat
dup	Duplikation
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin 5'-Triphosphat
EEG	Elektroenzephalographie
Fa.	Firma
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
g	Gramm
Hrsg.	Herausgeber
ICD	internationale Klassifikation der Krankheiten (international classification of diseases)
idR.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IQ	Intelligenzquotient
k.A.	keine Angaben
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molar = mol/l
Mb	Megabasen
MRT	Magnetresonanztomographie

MW	Mittelwert
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
Nr.	Nummer
nmol	Nanomol
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man, Datenbank über humane Gene und erbliche Erkrankungen
p	kurzer Chromosomenarm
P.	Perzentile
PBS	phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PLS	Potocki-Lupski-Syndrom
pter	terminaler Bereich des kurzen Armes eines Chromosoms
q	langer Chromosomenarm
RP11	Roswell-Park-Cancer-Institute human BAC-library 11
SD	Standarddifferenz
SG	Spectrum Green
SMS	Smith-Magenis-Syndrom
SO	Spectrum Orange
SSC	standard saline citrate = Standard Salzlösung aus Natriumchlorid und Natriumcitrat
SSW	Schwangerschaftswoche
u.a.	unter anderem
U/l	Units pro Liter
U/min	Umdrehungen pro Minute
WBS	Williams-Beuren-Syndrom
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## **1.1 Mentale Retardierung als kombiniertes Krankheitsbild**

Die „International Classification of Diseases“ (ICD-10) (<http://www.icd-code.de>) beschreibt mentale Retardierung als einen Zustand von verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten. Eine mentale Retardierung reicht von einer leichten bis zu einer schwersten Intelligenzminderung.

In Deutschland leben etwa zwei Millionen geistig milde retardierte (IQ < 70) sowie etwa 400.000 stark retardierte Personen (IQ < 50) (Roeleveld et al., 1997). Diese Zahlen machen deutlich, dass die mentale Retardierung ein häufiges Krankheitsbild darstellt.

Bislang wurden knapp 1.200 Krankheitsbilder beschrieben, die mit einer mentalen Retardierung kombiniert sind (Meinecke, 2001). Die Ursachen einer mentalen Retardierung sind vielfältig und reichen von exogenen Noxen während der Schwangerschaft über Stoffwechselstörungen und monogenen Störungen bis hin zu chromosomalen Aberrationen wie z.B. der mit dem Down-Syndrom assoziierten Trisomie 21 (OMIM: 190685; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Durch die in den letzten Jahren verbesserten diagnostischen Möglichkeiten ließen sich zunehmend bislang unbekannte genetische Veränderungen wie z.B. das Mikrodeletionssyndrom del(22)(q11.2) als Ursache einer mentalen Retardierung identifizieren (Brunet et al., 2006). Die Häufigkeit solcher chromosomaler Aberrationen schwankt. Chromosomale Störungen im Bereich der Subtelomerregionen sind bei 6-10% der mental retardierten Kinder, bei denen sonst keine Ursache der Retardierung nachweisbar ist, für das Krankheitsbild verantwortlich zu machen (Manning et al., 2004; Cusmano-Ozog et al., 2007). Es wird vermutet, dass die Zahl der Patienten mit submikroskopischen Chromosomenveränderungen als Ursache der Sprachentwicklungsverzögerung durch neue und verbesserte Untersuchungsmöglichkeiten wie die Matrix-basierte komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH) weiter steigt, da bei Patienten, bei denen die Ursache der Retardierung bislang unklar war, zunehmend submikroskopische Chromosomenveränderungen nachgewiesen werden. Die Angaben über die Häufigkeit chromosomaler Aberrationen schwanken je nach Untersuchungsverfahren. Bei bis zu 17% der Patienten mit mentaler Retardierung unklarer Ursache konnten mit Hilfe der Array-CGH chromosomale Veränderungen aufgezeigt werden (Stankiewicz und Beaudet, 2007).

Eine mentale Retardierung ist selten ein isoliertes Symptom bei einem Patienten. Meistens ist sie kombiniert mit anderen Auffälligkeiten, die eine richtungweisende Bedeutung für die Diagnosestellung haben. Im Hinblick auf Chromosomenstörungen sind faziale Dismorphien bzw. die Gestalt des Gesichts wegweisend (Meinecke, 2001). Auch Fehlbildungen und Anomalien des Wachstums (Kleinwuchs, Hochwuchs) können zur Diagnosefindung beitragen (Tariverdian und Buselmaier, 2003). Weiterhin kommen dem Verhalten sowie bestimmten Teilleistungsschwächen, aber auch besonderen Fähigkeiten, Bedeutung für die klinische Diagnostik zu. Beispiele für Chromosomenstörungen mit besonderen Verhaltensweisen sind z.B. das Prader-Willi-Syndrom (del(15)(q11-q13)), bei dem Betroffene eine Hyperphagie zeigen, das Smith-Magenis-Syndrom (del(17)(p11.2)), das durch ein herabgesetztes Schmerzempfinden, aggressives Verhalten und einen gestörten Tag-Nacht-Rhythmus gekennzeichnet ist oder das Williams-Beuren-Syndrom (del(7)(q11.23)), bei dem Betroffene über gute sprachliche Fähigkeiten verfügen (OMIM: 176270, 182290, 194050 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Tariverdian und Buselmaier, 2003; Torniero et al., 2007). Patienten mit einer Mikroduplikation dup(7)(q11.23) zeigen hingegen eine sprachbetonte Retardierung (Berg et al., 2007).

## **1.2 Normale und gestörte Sprachentwicklung**

Die Sprachentwicklung wird in eine expressive und eine rezeptive Komponente unterteilt.

Der expressive Teil, die gesprochene Sprache, besteht aus Lauten, Wörtern, Syntax sowie Semantik. Die Entwicklung dieser einzelnen Komponenten dauert unterschiedlich lange. Die Lautentwicklung wird um das 7. Lebensjahr abgeschlossen, während die Semantik ein Leben lang weiterentwickelt wird (Crosley, 1999). Die rezeptive Komponente der Sprachentwicklung umfasst das Sprachverständnis und ist deutlich seltener verzögert. Die Sprachentwicklung ist ein individueller Prozess und von vielen Faktoren abhängig.

Die Sprachentwicklungsverzögerung gehört zu den häufigsten Lernstörungen im Kindesalter (Göbel et al., 1999). Je nach Quelle zeigen 10-34% aller deutschen und bis zu 66% aller ausländischen Grundschulkinder eine Sprachentwicklungsverzögerung (Göbel et al., 1999, Federspil und Delb, 2002). Symptome sind z.B. ein verminderter Wortschatz, Dysgrammatismus oder Dyslalie (Remschmidt et al., 2002).

Die Ursachen einer Sprachentwicklungsverzögerung sind vielfältig und umfassen Anomalien des Sprachapparates (z.B. Kiefer-Gaumenspalte) sowie periphere und zentrale Hör- oder

Sehstörungen (Boenninghaus und Lenarz, 2007). Weitere Ursachen können ZNS-Schäden und Schilddrüsenstoffwechselstörungen sein. Ebenso kann eine Sprachentwicklungsverzögerung durch Umgebungsfaktoren begründet oder Teilsymptom einer Chromosomenstörung sein (Federspil und Delb, 2002).

### **1.3 Bekannte Chromosomenstörungen, die mit einer Verzögerung der expressiven Sprachentwicklung einhergehen**

Eine sprachbetonte Entwicklungsverzögerung ist u.a. ein Teilsymptom des Smith-Magenis-Syndroms (Godt, 2005; Brunet et al., 2006). Weitere Syndrome, die als Leitsymptom eine deutliche Verzögerung der expressiven Sprachentwicklung haben, sind zum Beispiel die terminale Deletion del(22)(q13.3) (Phelan-McDermott-Syndrom) oder die Duplikation der sogenannten Williams-Beuren-Syndrom Region in 7q11.2 (Phelan et al., 2001; Berg et al., 2007).

#### **1.3.1 Deletion 22q13.3**

Dieses Mikrodeletionssyndrom (OMIM: 606232) wurde zuerst von Watt et al. (1985) beschrieben. Es liegt ein Verlust von Anteilen des langen Arms des Chromosoms 22 in der Region 22q13.3 vor.

Es wurden bislang mehr als 75 Patienten mit dieser Mikrodeletion beschrieben, die nach den Erstbeschreibern auch als Phelan-McDermott-Syndrom bezeichnet wird (Phelan et al., 2001; Manning et al., 2004). Typisch für dieses Syndrom sind die expressive Sprachentwicklungsverzögerung und die mentale Retardierung. Weitere häufige Symptome sind eine muskuläre Hypotonie, autistische Züge sowie Dysmorphiezeichen (Phelan et al., 2001; Goizet et al., 2000). Hierbei zählen der Epikanthus sowie eine supraorbitale Fülle zu den häufigeren Dysmorphiezeichen. Auch ein Dolichocephalus, ein verstrichenes Philtrum und dysmorphe Ohrmuscheln wurden häufig bei den Patienten beobachtet. Weiter wurden bei mehreren Patienten Syndaktylien der Zehen 2-3 beschrieben. Als Kinder weisen die meisten Patienten normale Wachstumsparameter auf. Sowohl eine Mikro- als auch Makrozephalie kann auftreten. Häufig wurden auch dysplastische Fußnägel und relativ große Hände beobachtet (Phelan et al., 2001). Herzanomalien wie die Trikuspidalinsuffizienz, eine Corpus callosum-Agenesie und eine Anämie sind jeweils einmal berichtete Symptome (Smith et al., 1996; Delcan et al., 2004). Ein weiteres mögliches Symptom des Phelan-McDermott-

Syndroms ist der zentrale Diabetes insipidus, der bei einem Kind mit einer typischen Deletion 22q13.3 beschrieben wurde (Barakat et al., 2004).

Die für das Phelan-McDermott Syndrom typische Deletion umfasst zumeist 5-8Mb (Nesslinger et al., 1994). Als kritisch wurde von Anderlid et al., (2002) eine 100kb umfassende Region beschrieben, die die Gene *SHANK3*, *ACR*, *RABL2B* umfasst. Neben einer terminalen Deletion, die sich bei 75% der Betroffenen findet und die zumeist ein de novo Ereignis darstellt (Cusmano-Ozog et al., 2007), wurden Patienten mit einem Ringchromosom oder einer Deletion infolge einer unbalancierten Translokation beschrieben (Phelan et al., 2001).

### **1.3.2 Duplikation 7q11.23**

Somerville et al. waren 2005 die Erstbeschreiber eines Patienten mit einer de novo Duplikation maternalen Ursprungs in 7q11.23, die mit einer schweren Sprachbeeinträchtigung, milder mentaler Retardierung und Entwicklungsverzögerung einherging. Der Patient wies weiter eine perinatale Hypotonie sowie eine Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung auf. Des Weiteren wurden Schlafstörungen und eine leichte Dysmetrie bei der neurologischen Untersuchung beschrieben. Seit der Erstbeschreibung wurde von 12 weiteren Patienten berichtet (Berg et al., 2007; Depienne et al., 2007; Torniero et al., 2007).

Patienten mit einer Duplikation 7q11.23 (OMIM: 609757) zeigen ein sehr komplexes und variables klinisches Bild, welches zusammengefasst eine expressive Sprachentwicklungsverzögerung sowie eine mentale Retardierung unterschiedlichen Schweregrades und milde faziale Dysmorphiezeichen umfasst.

Die Duplikation entstand in den meisten bisher publizierten Fällen de novo (bei 8 von 14 bekannten Fällen). Bei drei Patienten wurde sie von einem Elternteil, das ebenfalls die Duplikation trug, vererbt (Kriek et al., 2006; Berg et al., 2007). Die Elternteile, welche die Duplikation trugen, waren jedoch klinisch unauffällig. Ansonsten scheint diese Duplikation sehr selten bei gesunden Menschen aufzutreten. Bei 300 gesunden Kontrollpersonen zeigte sich in dieser Region keine Veränderung (Depienne et al., 2007).

Häufige Dysmorphiezeichen bei Trägern der Duplikation 7q11.23 sind eine faziale Asymmetrie, ein kurzes Philtrum, ein dünnes Lippenrot, tief ansetzende, leicht nach hinten rotierte Ohren, eine prominente Stirn und eine breite, hoch angesetzte Nase. Infolge einer prämaturen Synostose der Sutura metopica kann es zu einem Trigonocephalus kommen

(Kriek et al., 2006). Seltener wurden eine Hüftdysplasie, eine Kyphose und ein Makrozephalus beschrieben (Torniero et al., 2007). Mehrere Patienten fielen durch Angststörungen und autistische Züge auf. Auch wurden verminderte soziale Kontaktfreude und ein Spielverhalten, das durch Wiederholungen gekennzeichnet ist, beschrieben (Berg et al., 2007). Vier der Patienten waren von einer Epilepsie betroffen (Berg et al., 2007; Torniero et al., 2007). Bei einem Patienten, bei dem diese Duplikation nachgewiesen wurde, zeigte sich eine kortikale Dysplasie des linken Temporallappens (Torniero et al., 2007).

Dieses Syndrom ist durch eine Duplikation der beim Williams-Beuren Syndrom deletierten Region gekennzeichnet. Der duplizierte Bereich umfasst in der Regel 1,55Mb und liegt in der Chromosomenregion 7q11.23 (Berg et al., 2007).

#### **1.4 Fragestellung und Ziele der Arbeit**

Bei dem Großteil der Patienten mit einer sprachbetonten Entwicklungsverzögerung ist die Ursache unbekannt. Dies erschwert eine zielgerichtete Frühförderung der Patienten und eine frühzeitige Erkennung von erkrankungsspezifischen Komorbiditäten. Für Familien mit erneutem Kinderwunsch stellt sich die Frage nach einem möglichen Wiederholungsrisiko, die nur unter Kenntnis der Ursache beantwortet werden kann. Aus den genannten Gründen sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Patientenkollektiv mit einer sprachbetonten Entwicklungsverzögerung unklarer Ursache auf submikroskopische Chromosomenveränderungen untersucht werden, um deren Häufigkeit zu bestimmen.

Konkrete Ziele dieser Arbeit waren:

- I. Bestimmung der Häufigkeit der Duplikation 7q11.2 sowie der Deletion 22q13.3 in einem Kollektiv von 76 Patienten mit einer sprachbetonten Entwicklungsverzögerung unklarer Ursache.
- II. Detektion neuer submikroskopischer chromosomaler Aberrationen durch Array-CGH bei ausgewählten Patienten des Patientenkollektivs mit Sprachentwicklungsverzögerung.
- III. Bestimmung der Häufigkeit eventuell mit der Array-CGH neu detektierter Aberrationen in dem Patientenkollektiv mit Sprachentwicklungsverzögerung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Das Kollektiv setzte sich aus 77 Patienten der Klinik für Neuropädiatrie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr. U. Stephani), sowie aus Patienten, die am Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel und der Praxis für Humangenetik Kiel (Frau Dr. M. Kautza) ambulant vorgestellt worden waren, zusammen. Die Informationen über klinische Untersuchungen sowie über anamnestische Daten wurden durch die Klinik für Neuropädiatrie (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) und durch das Institut für Humangenetik zur Verfügung gestellt. Als Einschlusskriterium dieser Arbeit galt eine Sprachentwicklungsverzögerung unklarer Genese. Eine nähere Beschreibung des Patientenkollektivs erfolgt im Ergebnisteil.

Das periphere Blut aller Patienten war mit dem Einverständnis des Patienten bzw. des/der Erziehungsberechtigten zur zytogenetischen bzw. molekularzytogenetischen Diagnostik bei unklarem Retardierungssyndrom an das Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel eingesandt worden und wurde dort nach den üblichen Standardmethoden aufbereitet. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten FISH-Analysen stand die in Carnoys-Fixativ vorliegende Zellsuspension aus dem peripheren Blut zur Verfügung. Für die Array-CGH wurde aus dem peripheren Blut bereits isolierte DNA verwendet.

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

Neben den im Labor allgemein üblichen Chemikalien, die nicht im Einzelnen aufgeführt werden, wurden folgende Reagenzien verwendet.

**Tabelle 1 Reagenzien und Hersteller**

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller/Firma, Ort, Land</b>
Acetonitrile	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Cot-1-DNA, human	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DABCO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DAPI (4,6 Diamidino-2-Phenylindol)	Merck, Darmstadt, Deutschland
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Dextransulfat 50%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dUTP-Spectrum Green	Abbott Vysis, Wiesbaden, Deutschland
dUTP-Spectrum Orange	Abbott Vysis, Wiesbaden, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Fixogum Kleber	Marabu, Tamm, Deutschland
Formamid, deionisiert	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
IGEPAL	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Natriumacetatlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg, Deutschland
Protease I 250 ng	Abbott Vysis, Wiesbaden, Deutschland
Puffer C für Restriktionsenzyme	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzym ALU I	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzym RSA I	Promega, Mannheim, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Stabilization & Drying-Solution	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

### **2.2.2 Kits**

#### **Agilent Hybridisierungs Kit**

Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

#### **Bio Prime Array-CGH Genomic Labeling Kit**

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

#### **Bio Prime DNA-Labeling System**

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

#### **DNA-Clean & Concentrator 5 TM Kit**

Zymo-Research, Freiburg, Deutschland

#### **Microcon YM Centrifugal Filter Devices**

Millipore Corporation, Schwalbach, Deutschland

#### **Perfectprep Plasmid Maxi Kit**

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

#### **Deoxynucleoside Triphosphate Set #12048500**

- Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- SO dUTP # 6J9415 Cat No 30-803200 Cot/Ch-B: 402070
- SG dUTP # Cat No 30-803000 Cot/Ch-B: 78989

### **2.2.3 Arrays**

- Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
- Zur Verwendung kamen 44K und 105K Arrays

## **2.2.4 Lösungen**

### **Antifade-Lösung**

9ml Glycerin wurden mit 230mg DABCO, 800ml Aqua dest. und 200µl Tris-HCL (1M, pH 8) gemischt und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

### **Carnoy's-Fixativ**

Gemisch aus Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1

### **DAPI-Lösung**

Zu 60ml 2x SSC wurde 6µl 4,6-Diaminido-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI-Stammlösung) gegeben und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

### **DAPI-Stammlösung**

In 1ml Aqua dest. wurden 0,2mg DAPI gelöst und bei 4°C dunkel gelagert

### **10x dNTP Mixture**

Um die Sonde mit den Farbstoffen Spectrum Orange (SO) bzw. Spectrum Green (SG) markieren zu können, erfolgte die Herstellung des dNTP Mixture in dem jeweiligen Farbspektrum. Dies geschah mit Hilfe des Deoxynucleoside Triphosphate Set der Firma Roche sowie SO-dUTP und SG-dUTP.

Zur Herstellung der spezifisch gefärbten dNTPs wurde zu 50nmol SO-dUTP bzw. zu 50nmol SG-dUTP je 50µl Aqua dest. hinzugefügt und fünf Minuten abgewartet.

In der Zwischenzeit wurden in einem Eppendorfhütchen die Deoxynucleosidtriphosphate zusammengefügt, je 5µl dATPs (10mM), 5µl dCTPs (10mM), 5µl dGTPs (10mM) sowie 2,5µl dTTPs (10mM). Dazu wurden 25µl der nun aufgelösten dUTP in dem jeweiligen Farbspektrum und je 7,5µl Aqua dest. hinzugegeben. Diese Mischung konnte für die Markierung der präparierten DNA genutzt werden.

### **LB-Medium**

In 1l Aqua dest. wurde 20g LB BROTH BASE gelöst und nach dem Autoklavieren mit Chloramphenicol versetzt, so dass für Chloramphenicol eine Endkonzentration von 20µg/ml vorlag.

**Mastermix 50%**

Zu 1,25ml 40% Dextransulfat wurde 2,5ml deionisiertes Formamid und 0,5ml 20x SSC hinzugefügt. Der pH-Wert wurde mit 5N Natronlauge auf 7,5 eingestellt. Das Gemisch wurde mit 1x SSC auf 4,5ml aufgefüllt.

**Paraformaldehydlösung 1%**

Zu 99ml 1x PBS wurde 1g Paraformaldehyd gegeben. Nach Hinzufügen von 1ml Magnesiumchlorid wurde die Lösung leicht erwärmt und mit Natronlauge bzw. Salzsäure ein pH-Wert von 7,5 eingestellt.

**PBS (Phosphat Buffered Saline)**

6,1g Di-Natriumhydrogenphosphat, 80g Natriumchlorid, 2g Kalium-Dihydrogenphosphat und 2g Kaliumchlorid wurden in Aqua dest. gelöst. Danach erfolgte mit Natronlauge bzw. Salzsäure die Einstellung des pH-Wertes auf 7,3 und mit Aqua dest. wurde das Volumen auf einen Liter aufgefüllt.

**Proteaselösung**

Zu 150ml Aqua dest. wurden 7,5mg Protease gegeben und 750µl Salzsäurelösung (0.01M) hinzugegeben.

**SSC-Lösung (20x) (standard saline citrate)**

Zu 1000ml Aqua dest. wurden 175,3g Natriumchlorid und 88,2g Natriumcitrat gegeben und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt.

**Waschlösung 1**

Zu 2ml 20x SSC-Lösung wurde 300µl IGEPAL hinzugegeben und mit Aqua dest. auf 100ml aufgefüllt.

**Waschlösung 2**

10ml 20x SSC-Lösung und 100µl IGEPAL wurden gemischt und mit Aqua dest. auf 100ml aufgefüllt.

## 2.2.5 Sonden

### Kommerziell erhältliche FISH-Sonden:

Die Williams Region Probe und die Smith Magenis Region Probe wurden von der Firma Abbott/Vysis, Des Plaines, USA bezogen. Die Sonde LSI TUPLE1/Telo22q Test ist eine Sonde der Firma Abbott/Vysis, die für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt wurde.

In den folgenden Tabellen sind die Lokalisation und die Größe der Sonden sowie die Gene bzw. Marker, die im Bereich dieser Sonden liegen, genannt, soweit sie von der Firma veröffentlicht wurden.

**Tabelle 2 Name, Lokalisation, Farbe und Größe der kommerziellen FISH-Sonden**

Sonde	Lokalisation	Farbe	Größe	Gene/Marker
<b>Williams Region Probe</b>				
LSI ELN	7q11.23	SO	180kb	<i>ELN, LIMK1, D7S613</i>
LSI D7S486	7q31.2	SG	keine Angaben veröffentlicht	<i>D7S486, D7S522</i>
<b>TUPLE1/Telo22q Test</b>				
LSI TUPLE1	22q11.21	SO	120kb	<i>TUPLE1, D22S553, D22S609, D22S942</i>
LSI Telo 22q	22q13.33	SG	96kb	<i>SHANK3</i>
<b>Smith Magenis Region Probe</b>				
LSI SMS	17p11.2	SO	140kb	<i>FLII, LLGL1, SHMT1, TOP3</i>
LSI RARA	17q12-21.1	SG	keine Angaben veröffentlicht	<i>RARA</i>

SO = Spectrum Orange; SG = Spectrum Green; kb = Kilobasen

Selbst hergestellte Sonden:

Hierbei handelt es sich um Sonden, die aus Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) von ausgewählten *Escherichia coli* Bakterienklonen hergestellt wurden. Die BAC-Klone entstehen durch das Einfügen von klonierten humanen DNA-Fragmenten in bakterielle Klone mittels Vektoren.

Die Auswahl der BACs erfolgte anhand der Datenbank des Human Genome Browser ([www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu), NCBI Build 36.1). Die ausgewählten BAC-Klone wurden von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland bezogen. Sie entstammen zwei verschiedenen BAC libraries. RP11 Klone stammen aus der **Roswell-Park-Cancer-Institute** human BAC-library **11**, CTD-Klone aus der **California Institute of Technology** human BAC library **D**.

In den folgenden Tabellen sind die einzelnen BAC-Klone, ihre Lokalisation auf den jeweiligen Chromosomen, ihre Länge und die in diesem Bereich liegenden Gene dargestellt.

Diese Daten basieren auf: [www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu), NCBI Build 36.1 (Stand 16.01.2009).

**Tabelle 3 Name, Lokalisation, Farbe und Länge der selbst hergestellten FISH-Sonden**

Sonde	Lokalisation	Farbe	Größe	Gene/Marker
<b>BAC-Klone für die Region 16p12.1</b>				
RP11-184F14	16p12.1	SO	160kb	<i>UBFD1, DCTN5, NDUFAB1, PALB2, DCTN5, PLK1, ERN2</i>
CTD-2385L22	16p12.1	SG	133kb	
<b>BAC-Klone für die Region 18p11.2</b>				
RP11-92E1	18p11.21	SO	165kb	keine bekannten Gene
RP11-1149M8	18p11.21	SG	158kb	
<b>BAC-Klone für die Region 22q13</b>				
RP11-768L22	22q13.32-q13.33	SO	221kb	<i>C22orf34</i>
CTD-3145J13	22q13.33	SG	157kb	<i>C22orf34, NM_207478</i>
CTD-3082N8	22q13.33	SO	131kb	<i>C22orf34</i>
CTD-3047N11	22q13.33	SG	183kb	<i>BRD1, ZBED4, ALG12</i>

SO = Spectrum Orange; SG = Spectrum Green; kb = Kilobasen; RP11/CTD = BAC libraries

### **2.2.6 Geräte**

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Geräte dargestellt. Geräte wie Pipetten, die allgemein gebräuchlich sind, wurden nicht im Einzelnen aufgeführt.

#### **Brutschrank**

Function Line, Heraeus, Hanau, Deutschland

#### **Filter** (für die FISH-Auswertung an dem Mikroskop)

AHF analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland

#### **Heizblock**

Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

#### **Hybridisierungskammer**

Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

#### **Hybridisierungsofen**

Shel Lab, Cornelius, USA

#### **Inkubator** (für Zellkulturen)

Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland

#### **Magnetrührer**

Ikomag, Lübeck, Deutschland

#### **Mikroskope**

Fluoreszenzmikroskop Axio Imager A1, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Phasenkontrastmikroskop, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

#### **Nano Drop**

ND-1000 Spektrophotometer, PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

#### **Scanner**

Axon Genepix 4000 B, Molecular Devices, Ismaningen, Deutschland

**Vortex**

Vortex-Genie 2, Scientific Industries, München, Deutschland

**Wasserbad**

Köttermann Labortechnik, Hänigsen, Deutschland

**Zentrifugen**

Biofuge 22R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

Hettich Rotanta/K, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Mikro200, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Jouan RC1010, Thermo- Electron Corporation, Chateau-Gontier, Frankreich

PicoFuge, Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA

Sorvall Super T21 Zentrifuge, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland

**2.2.7 Software****GeneScan Analysis Software**

Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

**ISIS 3.0 Software**

MetaSystems, Altusheim, Deutschland

**NanoDrop Software**

Version 3.2.1, PEQLab, Erlangen, Deutschland

**CGH Analytics Workstation**

G4172AANFP, Agilent Technology, Waldbronn, Deutschland

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)**

#### **2.3.1.1 Prinzip der FISH**

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ermöglicht den mikroskopischen Nachweis von DNA Sequenzen in Zellen. Die Ziel-DNA wird durch eine für diesen Genort komplementäre DNA-Sonde nachgewiesen, die direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde. Durch Erhitzen erfolgt das Aufschmelzen der Ziel- und Sonden-DNA in ihre Einzelstränge. Anschließend lagert sich die DNA-Sonde sequenzspezifisch an die nachzuweisenden Bereiche der Ziel-DNA über Basenpaarung an. Nicht gebundene DNA-Sonde wird danach ausgewaschen. Die stattgefundenene Bindung der DNA-Sonde an die Ziel-DNA kann im Fluoreszenzmikroskop durch die entsprechenden Signale nachgewiesen werden.

Die FISH erfasst chromosomale Aberrationen im Rahmen von zehn und mehr Kilobasen. Sie kann an Metaphasen sowie Interphasen durchgeführt werden. Zum Nachweis submikroskopischer Chromosomenveränderungen stellt sie ein häufig angewandtes Verfahren dar.

#### **2.3.1.2 Durchführung der FISH**

##### **2.3.1.2.1 BAC-DNA-Präparation**

Die ausgewählten BAC-Klone wurden in Form von Glycerinstocks bei -80°C gelagert.

100µl eines Bakterienglycerinstocks wurden mit 200ml LB-Medium, welches Chloramphenicol enthält, vermischt und bei 37°C im Schüttelinkubator für 16-24 Stunden inkubiert.

Dann wurde 200-250ml Bakterienkultur in ein 250ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 Minuten bei 10.000U/min bei 20°C in der Super T21 Zentrifuge zentrifugiert.

Die sich nun anschließende DNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des Perfectprep Plasmid maxi Kits. Dazu wurde zum Pellet nach dem Abgießen des Überstandes 15ml der Lösung 1 aus diesem Kit hinzugefügt und bis zum Auflösen des Pelletts hinauf- und hinunterpipettiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten und nach 5 Minuten Lagerung auf Eis wurden 15ml der Lösung 2 hinzugefügt und die Suspension vorsichtig gemischt.

Anschließend wurde die Mischung 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 15ml eisgekühlter Lösung 3 zugegeben und wieder vorsichtig gemischt. Dann wurde erneut für 20

Minuten bei 20°C und 10.000U/min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde über einen mit Filterpapier bedeckten Trichter in ein neues, sauberes 250ml Zentrifugenröhrchen gefüllt. Zu diesem Filtrat wurden 35ml gut gemischter DNA-Bindungsmatrix gegeben und nach sorgfältigem Mischen wieder für 20 Minuten bei 10.000U/min zentrifugiert.

Der Überstand wurde sehr vorsichtig abgegossen, um einen Verlust der an die Matrix gebundenen DNA zu vermeiden. Anschließend wurden 9ml der mit 100% Ethanol verdünnten Purifications Lösung zum Pellet gegeben. Nach erfolgter Resuspendierung wurde die verdünnte Matrix auf eine im Kit beigefügte Säule in ein 50ml Röhrchen pipettiert und dann bei 2.000U/min für 5-10 Minuten zentrifugiert. In dieser Zeit wurde nochmals 9ml verdünnter Purification Lösung in die 250ml Zentrifugenröhrchen gegeben, um restliche, in der Matrix gebundene DNA in Lösung zu bringen. Nachdem diese Lösung wieder auf die Filtersäulen gegeben wurde, wurde das Röhrchen mit der Säule erneut bei 2.000U/min für 5-10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde 9ml verdünnter Purification Lösung auf die Säule gegeben und diese bei 2.000U/min für 5-10 Minuten zentrifugiert, bis sie komplett trocken war. Dann wurde die Säule in ein sauberes 50ml Röhrchen überführt. Es wurden 3ml auf 85°C erhitzter Elution Lösung hinzugegeben und anschließend wurde die Säule für 10 Minuten im Wasserbad bei 85°C inkubiert.

Nach nochmaliger Zentrifugation bei 2.000U/min für 10 Minuten wurde das Eluat in ein für hohe Zentrifugationsgeschwindigkeiten geeignetes 50ml Röhrchen umgefüllt und 70µl 5M Natriumchlorid sowie 6ml 100% Ethanol dazugegeben. Nach dem Mischen wurde diese Lösung für 30 Minuten in der Super T21 Zentrifuge bei 17.000U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 5ml 70% Ethanol gewaschen, bevor es erneut bei 17.000U/min für 15 Minuten bei Raumtemperatur in der Super T21 Zentrifuge zentrifugiert wurde. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet in der Speedvac Zentrifuge für circa 15-30 Minuten getrocknet. Danach wurden 250µl Aqua dest. zum Lösen des Pellets hinzugegeben und die Suspension über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

Am nächsten Tag wurde die DNA in ein 1,5ml Röhrchen gefüllt und die Konzentration der DNA bestimmt. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Nano Drop ND-1000 Spektrophometer. Zuerst wurde ein Nullabgleich mit 1µl Aqua dest. durchgeführt. Danach wurde die Reinheit und DNA-Konzentration von 1µl DNA nach den Angaben des Herstellers photometrisch bestimmt und mit Hilfe der Nano Drop Software ausgewertet. Die DNA wurde bis zur Markierung bei -20°C gelagert.

### **2.3.1.2.2 DNA-Markierung für FISH**

Die für die DNA-Markierung notwendigen Substanzen wurden aus dem BioPrime DNA Labeling System Kit entnommen.

Zuerst wurde 1µg der isolierten DNA mit Aqua dest. auf ein Volumen von 24µg verdünnt.

Hierzu wurden 20µl 2,5 x Random Primer hinzugegeben und dann wurde die DNA für 5 Minuten im Wasserbad bei 100°C denaturiert und sofort danach für 2-3 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden zur Markierung 5µl der mit Spectrum Green oder Spectrum Orange markierten dNTPs hinzugegeben, wobei ab diesem Schritt auf ein Dunkelhalten des Eppendorfhütchens geachtet wurde. Nach dem Mischen der Probe mit der Pipette wurde 1µl Klenow Fragment vorsichtig hinzugefügt, die Lösung kurz anzentrifugiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Morgen erfolgte nach der Zugabe von 5µl Stop Puffer die Aufreinigung der DNA mit Microconsäulen. Hierzu wurden erst die markierte DNA und danach 300µl Aqua dest. auf die Säule gegeben. Die Säule wurde 10 Minuten bei 14.000U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden erneut 300µl Aqua dest. auf die Säule gegeben und diese wieder für 10 Minuten bei 14.000U/min zentrifugiert. Danach wurden 50µl Aqua dest. auf die Säule pipettiert und diese umgedreht in ein neues Röhrchen gesteckt. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 5 Minuten bei 5.000U/min wurde die markierte DNA in das Originalröhrchen überführt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

### **2.3.1.2.3 Präparation der markierten Sonden**

Für die FISH-Untersuchungen auf mögliche Duplikationen oder Deletionen wurde ein Sondengemisch aus einer im Spectrum Orange und einer im Spectrum Green markierten Sonde hergestellt. Es wurde zu jeweils 10µl der mit Spectrum Orange markierten Sonden 10µl der mit Spectrum Green markierten Sonde und 5µl human Cot-1-DNA hinzugefügt. Anschließend wurden 2,5µl Natriumacetat sowie 70µl absolutes Ethanol hinzugegeben, bevor die Suspension für 30 Minuten bei 17.000U/min zentrifugiert wurde. Danach wurde soviel wie möglich des Ethanols entfernt, ohne das DNA-Pellet zu beschädigen. Das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge bei 3.000U/min in 15-20 Minuten getrocknet. Die Zentrifuge musste bei diesem Schritt abgedunkelt werden. Zum getrockneten Pellet wurde nun 10µl 50% Mastermix hinzugefügt. Dieses fertige Sondengemisch wurde bis zur FISH-Untersuchung im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Herstellung der kommerziell erhältlichen Sonden erfolgte durch Zugabe von 2µl Aqua dest. zu 7µl sondenspezifischem Hybridisierungspuffer, welcher vom Hersteller mitgeliefert wurde. Zu diesem Gemisch wurde 1µl der kommerziellen Sonde hinzugegeben. Auch dieses Gemisch wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

#### **2.3.1.2.4 Herstellung der Auftropfpräparate für FISH**

Die PHA stimulierten Lymphozytensuspensionen wurden bei -20°C in Carnoy's Fixativ gelagert. Zur Herstellung der Präparate wurden die jeweiligen Suspensionen aufgetaut und für 30-60 Sekunden im Vortexer geschüttelt, damit sich das Sediment gleichmäßig im Fixativ verteilte. Waren nur sehr wenige Lymphozyten in der Suspension, wurde die Suspension 10 Minuten bei 1.000U/min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. War die Suspension sehr verschmutzt, wurde während des Vortexens langsam neues, sauberes Carnoy's Fixativ hinzugefügt und nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 1.000U/min die gleiche Menge des zugefügten Fixativs wieder entfernt. Nun wurde mit einer Glaspipette Suspension entnommen und je nachdem wie viele Hybridisierungen durchgeführt werden sollten, 1 bis 3 Tropfen auf einen handelsüblichen Objektträger aufgetropft. Das Auftropfen erfolgte aus möglichst großer Höhe, damit die Metaphasen nicht so dicht zusammenliegen und damit einfacher auszuwerten sind. Nach dem Trocknen erfolgte die Begutachtung im Mikroskop, wobei Bereiche mit möglichst vielen einzelnen Metaphasen und vielen sich nicht überlappenden Zellen ausfindig gemacht und mit dem Diamantschreiber auf der Rückseite der Objektträger markiert wurden. Bei einer zu geringen Dichte erfolgte ein mehrmaliges Auftropfen, bis die gewünschte Zelldichte erreicht wurde.

Bei 37°C fand für 5 Minuten ein Verdau der Zellen mit Proteaselösung in Küvetten statt, um das Zytoplasma zu entfernen. Danach wurden die Präparate für eine Minute in Wasser gewaschen, bevor die Zellen für 2 Minuten in Paraformaldehydlösung (1%) fixiert wurden. Nach nochmaligem einminütigen Waschen in Wasser wurden die Zellen für jeweils 2 Minuten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80% und absolut) dehydriert, bevor sie für 5 Minuten an der Luft getrocknet wurden.

#### **2.3.1.2.5 Hybridisierung**

Bei der Hybridisierung erfolgt die Anlagerung der Sonden-DNA an die zelluläre Patienten-DNA. Hierfür wurde auf die getrockneten Objektträger 1,3µl der jeweiligen FISH-Sonde getropft und zwar genau auf die vorher mit dem Diamantschreiber eingekreiste Stelle. Ab

diesem Schritt wurde auf einen lichtarmen Arbeitsort geachtet, um ein Ausleuchten der Präparate zu verhindern. Es wurden kleine runde Deckgläschen auf den markierten Bereich aufgelegt und Marabu-Fixogum darübergetropft, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern.

Anschließend wurden die Objektträger für 7 Minuten in einer Metallkiste, die ein feuchtes Tuch enthielt (sogenannte „feuchte Kammer“), in ein 75°C warmes Wasserbad zur DNA-Denaturierung und dann über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

#### **2.3.1.2.6 Waschen der FISH-Präparate**

Am nächsten Morgen erfolgte das Waschen der Präparate, um nicht gebundene Sonde von dem Objektträger zu entfernen.

Dazu wurde der Fixogum-Kleber mit den Deckgläschen vom Objektträger abgehoben. Für 2 Minuten erfolgte ein Waschen der Präparate bei 72°C in Waschlösung 1 und danach für eine weitere Minute bei Raumtemperatur in Waschlösung 2. Anschließend wurden die Präparate für eine Minute in 2x SSC-Lösung gestellt, bevor die Zellkerne für 5 Minuten bei Raumtemperatur in DAPI-Lösung angefärbt wurden. Danach erfolgte für einige Minuten ein letzter Waschvorgang in 2x SSC-Lösung.

Zum Eindeckeln wurde 1 Tropfen Antifade-Lösung auf das Deckglas getropft, dieses dann auf den Objektträger gelegt und mit einer stumpfen Pinzette eventuelle Luftbläschen unter dem Deckglas herausgedrückt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Objektträger nicht austrocknen.

#### **2.3.1.3 Auswertung und Dokumentation der FISH**

Die Auswertung der Fluoreszenzsignale der FISH-Sonden erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss. Hierbei wurden für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe die jeweiligen spezifischen Filter verwendet oder ein Breitbandfilter für die gleichzeitige Auswertung von roten und grünen Signalen (Filter von AHF).

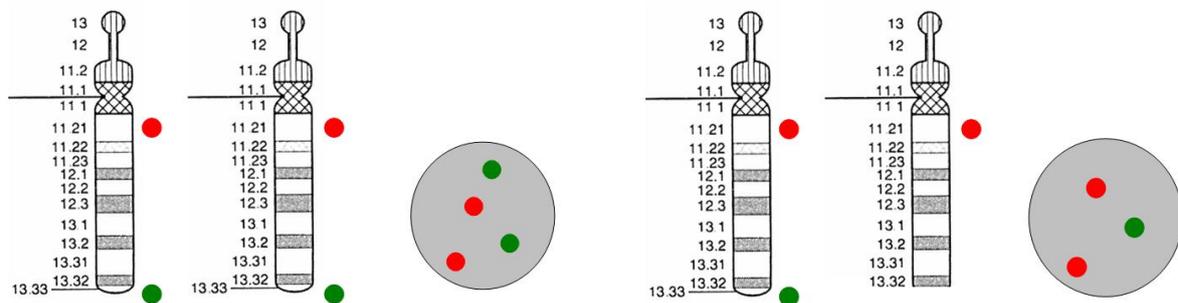
Für die Dokumentation wurde die ISIS-Software der Firma Metasystems benutzt. Es wurden jeweils mindestens drei Metaphasen sowie drei Interphasen als Bild dokumentiert.

Die Auswertung erfolgte sowohl an Metaphasen als auch an Interphasen. Bei den Kontrollen wurden 100 Interphasen bzw. 50 Metaphasen ausgewertet. Bei dem Patientenkollektiv wurden mindestens 50 Interphasen bzw. 15 Metaphasen gezählt. Waren zu wenige Metaphasen vorhanden, wurden mindestens 50 Interphasen beurteilt.

Die Nachweisgrenze zur Detektion von Aberrationen für die jeweiligen FISH-Assays wurde anhand der Kontrollen errechnet. Dies erfolgte mit Hilfe der Formel „Mittelwert der falsch-positiven Ereignisse in Kontrollen in Prozent plus drei Standardabweichungen“ und wurde für alle verwendeten Sonden so definiert. In der Regel wurden dafür Präparate von vier Probanden mit einem normalen Chromosomenbefund analysiert.

Um eine möglichst hohe Auswertungsgenauigkeit zu erzielen, wurden alle Präparate zusätzlich dazu von mindestens einer weiteren in der FISH-Diagnostik erfahrenen Person beurteilt.

**Abbildung 1** Schematische Darstellung der FISH-Assays für eine Deletion in 22q13.3 (A-B)



**A**

**B**

- A** Regelrechte Signalkonstellation in Metaphase und Interphase  
Zwei rote Signale: zweimal vorhandener *TUPLE1*-Genlocus in der Region 22q11.21  
Zwei grüne Signale: zweimal vorhandener *SHANK3*-Genlocus in der Region 22q13.33
- B** Deletion in 22q13.3  
Zwei rote Signale: zweimal vorhandener *TUPLE1*-Genlocus in der Region 22q11.21  
Ein grünes Signale: Verlust des *SHANK3*-Genlocus in der Region 22q13.33 auf dem einen Chromosom 22

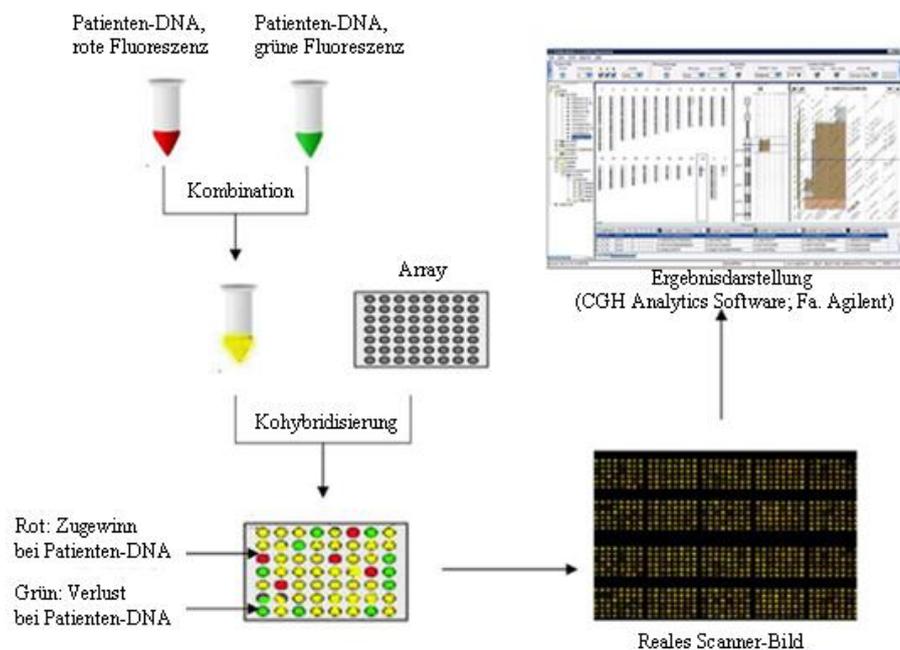
## 2.3.2 Array basierte komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH)

### 2.3.2.1 Prinzip der Array-CGH

Die Matrix (gebräuchlich: Array) basierte komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH) ist ein hochauflösendes Verfahren zum Nachweis von Zugewinnen oder Verlusten im Genom. Es beruht auf einem Vergleich der Hybridisierung der markierten Patienten-DNA mit einer unterschiedlich markierten Referenz-DNA (hier gepoolte DNA von zehn Personen mit einem unauffälligen Chromosomensatz mit dem gleichen Geschlecht wie der Patient) auf einem Array. Der in dieser Arbeit verwendete Array enthält Oligonukleotide (60mere).

Für die Array-CGH erfolgt ein Verdau der Patienten- und Referenz-DNA zur Reduktion der Komplexität. Anschließend werden beide Proben mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Auf dem Array befinden sich in einer rasterförmigen Anordnung definierte DNA-Fragmente, die das komplette Genom gleichmäßig abdecken. Die Patienten- und Referenz-DNA werden im gleichen Verhältnis auf den Array gegeben und hybridisieren an den jeweiligen komplementären DNA-Oligonukleotiden auf dem Array. Liegen Patienten- und Referenz-DNA im gleichen Verhältnis vor, zeigt sich eine Mischfarbe. Hat der Patient in einer Region einen Zugewinn (Duplikation), wird die Patienten-DNA mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an die Oligonukleotide dieser Region binden, so dass sich eine Farbverschiebung zugunsten der Farbmarkierung der Patienten-DNA zeigt. Entsprechend zeigen sich Verluste (Deletionen) durch eine Farbverschiebung zugunsten der Farbe der Referenz-DNA. Die Auflösung hängt von der steigender Anzahl und Dichte der DNA-Fragmente auf dem Array ab und kann bis zu 35kb betragen.

**Abbildung 2** Schematische Darstellung der Array-CGH



### **2.3.2.2 Durchführung der Array-CGH**

#### **2.3.2.2.1 Verdau**

Zuerst erfolgte der Verdau der bereits extrahiert vorliegenden Patienten-DNA sowie des gleichgeschlechtlichen Kontroll-DNA-Pools.

Hierzu wurde 1µg der jeweiligen DNA mit Aqua dest. auf 42,5µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 5µl Puffer C für Restriktionsenzyme, 1,25µl Restriktionsenzym RSA I sowie 1,25µl Restriktionsenzym ALU I wurde der Ansatz für zwei Stunden bei 37°C im Thermomixer inkubiert.

#### **2.3.2.2.2 Aufreinigen der verdauten DNA**

Die Aufreinigung der im vorherigen Schritt verdauten DNA geschah mit Hilfe des DNA-Clean&Concentrator 5 TM Kits.

Dazu wurde 100µl Binding Buffer zur verdauten DNA gegeben und die Lösung in den Filter der Säule pipettiert, bevor die Säule für 30 Sekunden bei 10.000U/min in der Mikro200 Zentrifuge zentrifugiert wurde. Nach Hinzugabe von 200µl Wash Buffer, anschließender Zentrifugation für 30 Sekunden bei 10.000U/min und erneutem Hinzufügen von 200µl Wash Buffer wurde die Lösung wieder für 30 Sekunden bei 10.000U/min zentrifugiert. Danach wurde der Filter der Säule in ein Eppendorfhütchen gesetzt und 11µl Aqua dest. direkt auf den Filter gegeben. Nach einminütigem Einwirken wurde für 30 Sekunden bei 10.000U/min zentrifugiert. Dann wurde 10µl Aqua dest. auf den Filter gegeben. Nach einer Minute wurde noch einmal bei 10.000U/min für 30 Sekunden zentrifugiert.

Nach dem Verwerfen des Filters wurden die gewonnenen 21µl des Eluats mit der DNA in ein Eppendorfhütchen umgefüllt.

#### **2.3.2.2.3 DNA-Markierung**

Für die Farbmarkierung der DNA wurde das Bio Prime Array-CGH Genomic Labeling Kit verwendet.

Zur aufgereinigten, verdauten DNA wurden 25µl 2,5x Random Primer gegeben und für 5 Minuten im Wasserbad bei 100°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA für mindestens eine Minute auf Eis abgekühlt. Nun wurden 5µl 10x dUTPs hinzugefügt. Im abgedunkelten Raum wurden 3µl der sehr lichtempfindlichen Cy5 markierten dUTP in das Eppendorfhütchen mit der zu untersuchenden DNA pipettiert bzw. 3µl Cy3 markierter dUTP in das Eppendorfhütchen der Referenz-DNA. Danach wurde 1µl des auf Eis aufbewahrten

Exo-Klenow hinzugefügt, bevor die DNA für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurde. Beendet wurde die Inkubation mit 5µl Stop Puffer.

#### **2.3.2.2.4     *Aufreinigung der markierten DNA***

In das Eppendorfhütchen mit der Patienten- sowie mit der Referenz-DNA wurde 400µl 1x TE-Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 gegeben. Anschließend wurde dieses Gemisch in eine Microcon YM-30 Filter Säule umgefüllt und bei 9.000U/min für 8 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Filter mit der sich im Filter befindenden Patienten- bzw. Referenz-DNA umgedreht, in neue Eppendorfhütchen gesteckt und bei 9.000U/min eine Minute zentrifugiert. In der Spitze des Hütchens befand sich nun die gereinigte Patienten- bzw. Referenz-DNA. Die Farbkorporation der DNA wurde nach Nullabgleich mit Aqua dest. am Nano Drop nach Angaben des Herstellers photometrisch gemessen und mit Hilfe der Nano Drop Software bestimmt.

Im nächsten Schritt wurden die zu untersuchende DNA und die Referenz-DNA miteinander vermischt, 400µl 1x TE-Puffer (pH 8) dazu pipettiert und diese Suspension in die Microcon Filter-Säulen gegeben. Nach 8 Minuten Zentrifugation bei 9.000U/min wurden die Filter umgedreht in neue beschriftete Eppendorfhütchen gesteckt und erneut für eine Minute bei 9.000U/min zentrifugiert.

Nach dem Messen des Volumens der kombinierten DNAs wurde das Volumen mit Aqua dest. auf 91,5µl aufgefüllt, 28,8µl human Cot-1-DNA, 30µl Agilent 10x blocking agent sowie 148,5µl Agilent 2x hybridization buffer hinzugefügt, so dass ein Endvolumen von 298,8µl entstand.

Daraufhin erfolgte die Inkubation zuerst für 3 Minuten in einem auf 100°C vorgeheizten Wasserbad und dann für 30 Minuten in einem Heizblock bei 37°C.

#### **2.3.2.2.5     *Montage der Objektträger zur Hybridisierung***

Nachdem der Dichtungsobjektträger mit der Aufschrift Agilent nach oben in die Hybridisierungskammer eingelegt wurde, wurden 300µl der aufbereiteten DNA möglichst luftblasenarm in die Gummidichtung eingefüllt. Anschließend wurde der Objektträger mit der 44K/105K-Array mit dem Barcode nach oben auf den Dichtungsobjektträger gelegt, die Hybridisierungskammer zugedeckelt und mit dem Schraubenverschluss kräftig zuge dreht.

Zur Hybridisierung wurde die Hybridisierungskammer in den Rotor des Hybridisierungsofens eingesetzt und dort für 40-48 Stunden bei 16U/min in 65°C belassen.

#### **2.3.2.2.6 Waschvorgang mit anschließender Ozonstabilisierung und Trocknung der Präparate**

Das Waschen der Arrays erfolgt unter einem Abzug. Für den Waschvorgang wurden die heißen Hybridisierungskammern aus den Agilent Ofen genommen, das Array-Dichtungsobjektträger-Sandwich der Hybridisierungskammer entnommen und in den Waschpuffer 1 gehalten. Anschließend wurde der Objektträger mit dem Barcode vorsichtig vom Dichtungsobjektträger mit Hilfe einer Pinzette in der Waschlösung gelöst und in die in Waschlösung 1 befindliche Objektträgerhalterung gestellt. Auf eine ständige Benetzung der Objektträger mit der Waschlösung wurde geachtet.

Nach 5 Minuten wurde die Objektträgerhalterung unter leichtem Schütteln zum Entfernen eventueller Luftblasen in den Waschpuffer 2 gestellt und hier für 2 Minuten belassen.

Dann wurde die Objektträgerhalterung für eine Minute in Acetonitril gestellt, gefolgt von 30 Sekunden in Stabilisation & Drying Solution. Nach vorsichtigem Herausziehen aus dieser Lösung wurden die Objektträger aus der Halterung genommen, am Rand abgetupft und in Falconröhrchen gesteckt, die mit Alufolie umwickelt waren, um die Präparate vor Licht zu schützen. Die Objektträger wurden mit dem Barcode nach oben in einen speziellen Scanner (GenePix 4000B Mikroarray Reader) gelegt, mit einer Auflösung von 5µm/Pixel eingescannt und am Computer ausgewertet.

#### **2.3.2.3 Auswertung der Array-CGH**

Zur Verwendung kamen 44K sowie 105K Arrays mit etwa 44.000 bzw. 105.000 Messpunkten (Oligonucleotide) pro Array. Das Genom umfasst etwa 3.200Mb. Die Gesamtanzahl der Megabasen des Genoms geteilt durch die Anzahl der Messpunkte (Oligonucleotide) auf dem Array entspricht der Auflösung. Aufgrund der verwendeten diagnostischen Kriterien wurde nur dann eine Region als Aberration gewertet, wenn mindestens zehn benachbarte Marker verändert waren. Somit errechnet sich die tatsächliche Auflösung aus der theoretischen Auflösung multipliziert mit zehn. Folglich wird die Auflösung für die Detektion von chromosomalen Aberrationen des 44K Arrays auf etwa 0,7Mb und die Auflösung des 105K Arrays auf etwa 0,3Mb bestimmt.

Die Messung der Signalintensität der eingescannten Bilder sowie deren Auswertung erfolgte mit Hilfe einer speziellen Software (CGH Analytics Version 3.4.27).

Regionen, die als signifikant von der Software bewertet wurden, lagen außerhalb einer festgelegten Log<sub>2</sub> Ratio von |0,5|. Als aberrant wurde diese Region bewertet, wenn sie mehr als 10 veränderte Marker umfasste und außerhalb von CNVs lag.

Bei der Auswertung wurden aberrante Regionen von sogenannten CNVs abgegrenzt. Polymorphe Kopienzahlvarianten der Chromosomen (CNVs) sind chromosomale Veränderungen ohne bisher bekannte klinische Relevanz. Die Abgrenzung von CNVs zu aberranten Veränderungen erfolgte mit Hilfe einer in der Software integrierten Datenbank der Firma Agilent.

### 3 Ergebnisse

Bis jetzt ist über die Häufigkeit der Deletion 22q13.3 und der Duplikation 7q11.23 bei Patienten mit einer sprachbetonten Entwicklungsverzögerung wenig bekannt. Aus diesem Grund wurde das Patientenkollektiv mittels FISH auf die genannten Veränderungen analysiert. In einem zweiten Schritt wurden ausgewählte Patienten mittels Array-CGH auf submikroskopische Veränderungen anderer Chromosomenregionen untersucht. Im dritten Schritt wurde die gesamte Patientengruppe mittels FISH auf die in der Array-CGH-Untersuchung nachgewiesenen Veränderungen hin überprüft. Somit sollte am Ende der Studie eine Aussage über die Häufigkeit chromosomaler Veränderungen bei Patienten mit einer sprachbetonten Entwicklungsverzögerung gemacht werden.

Abschließend erfolgt im Ergebnisteil eine Darstellung der klinischen Charakteristika der Patienten, bei denen eine chromosomale Imbalance nachgewiesen wurde, im Vergleich zu jenen, bei denen keine chromosomalen Veränderungen detektiert werden konnten.

Nachfolgend wird zunächst das Patientenkollektiv, an dem die Untersuchungen durchgeführt worden sind, näher beschrieben.

#### **3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs**

Bei dem untersuchten Kollektiv handelt es sich um 77 Patienten, die wegen einer Entwicklungsverzögerung in der Klinik für Neuropädiatrie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. U. Stephani), am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, sowie in der dem Institut für Humangenetik assoziierten Praxis für Humangenetik (Frau Dr. med. M. Kautza) vorgestellt wurden und bei denen eine zytogenetische Diagnostik eingeleitet wurde.

Alle Patienten wiesen eine sprachbetonte Entwicklungsverzögerung auf. Die Ausprägung der Verzögerung war im Kollektiv heterogen. Manche Patienten sprachen erste Worte bereits im 12. Lebensmonat, entwickelten dann aber keinen adäquaten Sprachzuwachs, andere Patienten sprachen erste Worte deutlich verspätet mit 36 bis 48 Monaten.

Von den 77 Patienten waren 24 weiblich. Das Alter bei Untersuchung reichte von 1 7/12 Jahre bis 10 4/12 Jahren. Das durchschnittliche Alter lag bei 4 3/12 Jahren.

Über die Hälfte der Patienten, bei denen Angaben zur mentalen Entwicklung gemacht wurden, war global retardiert. Die motorische Entwicklung verlief hingegen bei der Mehrzahl der Patienten unauffällig: So begannen die Patienten im Durchschnitt mit 17 Monaten zu laufen, wobei die Spanne bei 12 bis 30 Monaten lag.

Um sicherzustellen, dass sich in dem Patientenkollektiv nur Kinder mit einer Sprachentwicklungsverzögerung unklarer Genese befinden, wurden Patienten mit organischen Ursachen einer Sprachentwicklungsverzögerung, wie z.B. Hörstörungen oder Fehlbildungen des Sprechapparates, soweit dies bekannt war, ausgeschlossen.

Die folgenden Zahlen beziehen sich ausschließlich auf Patienten, bei denen Angaben zu den jeweiligen anamnestischen Daten gemacht wurden. Patienten, bei denen keine Angaben gemacht worden sind, wurden in den hier aufgeführten Zahlen nicht berücksichtigt.

Bei insgesamt 46 Patienten wurden von einem Hals-Nasen-Ohrenarzt pathologische Veränderungen, die zu einer Einschränkung der Hörleistung führen können, wie z.B. eine chronische Otitis media, ein Seromukotympanum oder adenoide Vegetation ausgeschlossen. Bei fünf Patienten zeigte sich eine Einschränkung der Hörleistung, die jedoch nicht als ursächlich für die Sprachentwicklungsverzögerung angesehen wurde. Bei den restlichen Patienten wurden keine Angaben über eine Hals-Nasen-Ohren-ärztliche Untersuchung gemacht.

Eine familiäre Sprachentwicklungsverzögerung wurde bei 19 Patienten beschrieben.

Bei 19 der Patienten erfolgten ophthalmologische Untersuchungen, die unauffällige Befunde zeigten.

Eine muskuläre Hypotonie wiesen 31 von 59 Patienten auf, 27 waren normoton und ein Patient hyperten.

Mehrere ( $\geq 2$ ) faziale Dysmorphiezeichen wurden bei 29 von 54 Patienten beschrieben. Von diesen Patienten hatten 28 dysmorphe Ohren und 17 eine dysmorphe Nase.

Weitere Informationen über klinische Charakteristika des Patientenkollektivs befinden sich im Anhang (Tabelle A6a und A6b, Anhang).

## **3.2 Häufigkeit der Duplikation 7q11.23 sowie der Deletion 22q13.3**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden 76 von 77 Patienten (alle, bis auf die Patientin mit der Duplikation 17p11.2, von der kein Sediment vorlag) mittels FISH auf eine Duplikation 7q11.23 sowie eine Deletion 22q13.3 untersucht.

### **3.2.1 Häufigkeit der Duplikation 7q11.23**

Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde LSI ELN (markiert im Spectrum Orange (SO)) sowie der Kontrollsonde D7S486 (markiert im Spectrum Green (SG)). LSI ELN hybridisiert in der Chromosomenregion 7q11.23 und D7S486 in der Region 7q31. Alle 76 Patienten wurden mit diesen Sonden auf die Duplikation dup(7)(q11.23) untersucht.

#### **3.2.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze für die Duplikation 7q11.23**

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde die Sonde bei vier Kontrollpatienten getestet. Pro Kontrolle wurden 100 Interphasen ausgezählt (siehe Tabelle A7a, Anhang).

Ist der *ELN*-Genlocus zweimal vorhanden, zeigen sich in einer Interphase zwei rote Signale. Dies traf bei 92,5% (MW: 92,5%; SD: 1,26%) der Interphasen der Kontrollindividuen zu.

Sind drei rote Signale in einem Kern sichtbar, deutet dies auf eine Duplikation eines der *ELN*-Loki hin. Eine auf eine Duplikation hinweisende Signalkonstellation trat bei 4% (MW: 4%; SD 0,82%) der Zellkerne der Kontrollen auf.

Durch diese Untersuchung konnte die Nachweisgrenze auf eine Duplikation für den *ELN*-Lokus hinweisende Signalkonstellation in Interphasen entsprechend der im Methodenteil erläuterten Formel auf **6,5%** festgelegt werden.

#### **3.2.1.2 Screening des gesamten Patientenkollektivs auf eine dup(7)(q11.23)**

Mit der Sonde LSI ELN und der Kontrolle D7S486 wurden bei 76 Patienten mindestens 50 Interphasen ausgewertet (siehe Tabelle A8a, Anhang).

Mit Ausnahme eines Patienten lag bei allen Patienten der Anteil der Zellen mit einer auf eine Duplikation in 7q11.23 hinweisenden Signalkonstellation unterhalb der Nachweisgrenze. Mit Ausnahme eines Patienten fanden sich auch keine anderen Aberrationen.

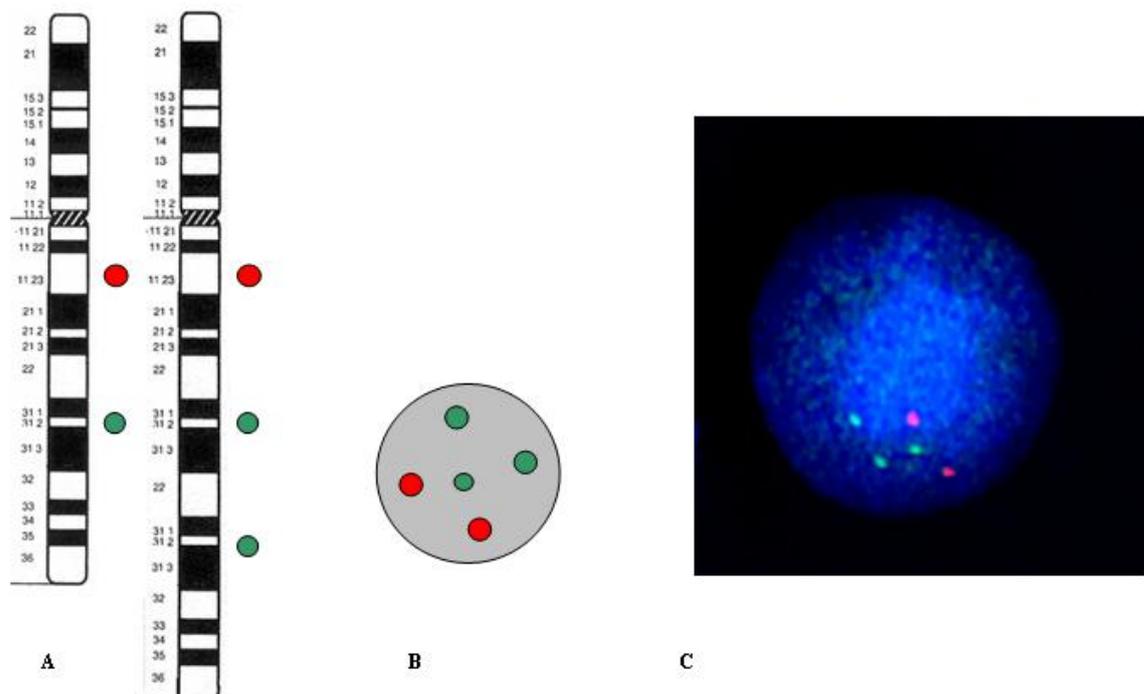
Bei einem Patienten (Patient 21) zeigte sich in 24% der Zellen (12 von 50) eine auf eine Duplikation hinweisende Signalkonstellation. Dieser Wert liegt oberhalb der Nachweisgrenze,

aber nicht in einem Bereich wie es für eine durchgehende konstitutionelle Veränderung erwartet worden wäre. In einer unabhängigen Zweitbeurteilung lag der Anteil der Zellen mit einer auf einer Duplikation hinweisenden Signalkonstellation unterhalb der Nachweisgrenze. Eine durchgehende konstitutionelle Duplikation konnte somit nicht diagnostiziert werden. Somit konnte bei keinem der 76 Patienten eine Duplikation 7q11.23 nachgewiesen werden. Allerdings konnte bei einem Patienten durch die verwendete Kontrollsonde eine Duplikation im Bereich dup(7)(q22-q31.3) bestätigt werden, die bereits aus der zytogenetischen Analyse bekannt war. Diese Duplikation wird im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

### 3.2.1.3 Patienten mit chromosomalen Aberrationen in der FISH: Patient mit einer Duplikation 7q22-q31.3

Mit der Sonde D7S486 konnte bei dem Patient Nr. 72 eine zytogenetisch bekannte Duplikation 7q22-q31.3 bestätigt werden. Es wurden in 50 Interphasen durchgehend drei grüne Signale für die Sonde LSI D7S486 gefunden (siehe Abbildung 3).

Abbildung 3 Duplikation in 7q22-q31.3 bei Patient 72



**A:** schematische Darstellung der auf eine Duplikation hinweisenden Signalkonstellation an Metaphasen

**B:** schematische Darstellung der auf eine Duplikation hinweisenden Signalkonstellation an Interphasen

**C:** FISH-Analyse einer Interphase des Patienten 72

rotes Signal: *ELN*-Genlocus in der Region 7q11.23; grünes Signal: *D7S486*-Genlocus in der Region 7q31.2

Zwei rote Signale weisen auf eine regelrechte Signalkonstellation des *ELN*-Lokus hin. Drei grüne Signale deuten auf eine Duplikation des *D7S486*-Lokus auf einem der Chromosomen 7 in der Bande 7q31.2 hin.

### 3.2.2 Häufigkeit der Deletion 22q13.3

Zum Erfassen von möglichen Deletionen in der Region 22q13.3 kamen die Sonden LSI TUPLE1 (in Spectrum Orange markiert) sowie Telo22q (in Spectrum Green markiert) zur Anwendung. Die Sonde Telo22q detektiert auf dem langen Arm des Chromosoms 22 den Abschnitt 22q13.33 im Bereich des *SHANK3*-Gens. Die Kontrollsonde LSI TUPLE1 hybridisiert in der Region 22q11.21. Untersucht wurden mit dieser Sonde 76 Patienten.

#### 3.2.2.1 Bestimmung der Nachweisgrenze für die Deletion 22q13.3

Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte wiederum an Zellen von vier gesunden Kontrollpatienten. Bei diesen wurden je 50 Metaphasen ausgewertet (siehe Tabelle A7b, Anhang).

In der Mehrzahl der Metaphasen (MW: 95,5%; SD: 3%) befanden sich zwei rote und zwei grüne Signale, es lag somit eine regelrechte Signalkonstellation der Region 22q13.3 vor.

Nur ein grünes Signal im Kern deutet auf eine Deletion in der Region 22q13.3 hin. Dies war der Fall bei 1% (MW: 1%; SD: 1,15%) der Metaphasen in den Kontrollen. Gemäß der erläuterten Formel lag die Nachweisgrenze einer Deletion 22q13.3 in Metaphasen bei **4,5%**.

Aufgrund unzureichender Metaphasen konnten bei sechs Patienten nur Interphasen ausgewertet werden. Deswegen erfolgte zur Bestimmung der Nachweisgrenze an Interphasen in den Kontrollen nach dem oben erläuterten Prinzip auch eine Auswertung von 100 Interphasen. Bei einem kleinen Anteil der Interphasen deutete die Signalkonstellation auf eine Deletion hin (MW: 2,7%, SD: 1,53%). Die Nachweisgrenze für die Detektion einer Deletion in 22q13.3 in Interphasen errechnete sich hier auf **7,3%**.

#### 3.2.2.2 Screening des gesamten Patientenkollektivs auf eine del(22)(q13.3)

Die Sonde LSI TUPLE1/Telo22q wurde bei 76 Patienten angewandt. Bei 70 Patienten wurden mindestens 15 Metaphasen ausgezählt. Aufgrund unzureichender Metaphasen wurden bei sechs Patienten 50 Interphasen ausgewertet (siehe Tabelle A8a, Anhang).

Mit Ausnahme zweier Patienten lag der Anteil der Zellen mit einer auf eine Deletion in 22q13.3 oder auf andere Aberrationen hinweisenden Signalkonstellation unterhalb der Nachweisgrenze von 4,5% in Metaphasen.

Auch bei den sechs Patienten, bei denen die Interphasen ausgewertet wurden, lag die Anzahl der Zellen mit einer auf eine Deletion hinweisenden Signalkonstellation unterhalb der Nachweisgrenze von 7,3%.

Insgesamt zwei Patienten wiesen ein pathologisches FISH-Ergebnis auf. Dieses war zum einen ein Patient mit einer bekannten Deletion 22q11.2, in dem sich der Verlust eines Signals für die Kontrollsonde zeigte (siehe Abschnitt 3.2.2.4) und zum anderen ein Patient mit einer Deletion 22q13.3 (siehe Abschnitt 3.2.2.3).

### **3.2.2.3 Patienten mit chromosomalen Aberrationen in der FISH: Patient mit einer Deletion 22q13.3**

Bei dem Patienten mit der Fallnummer 77 zeigte sich in 11 von 15 Metaphasen ein Verlust eines der beiden grünen Signale, also der Region 22q13.33. Bei vier Metaphasen fand sich eine regelrechte Signalkonstellation. Die Zahl der Metaphasen mit einer auf eine Deletion hinweisenden Signalkonstellation liegt somit deutlich über der errechneten Nachweisgrenze. In 100 ausgewerteten Interphasen lag in 74 Kernen (74%) eine auf eine Deletion hinweisende Signalkonstellation vor (siehe Abbildung 4). Auch dieser Anteil liegt deutlich oberhalb der Nachweisgrenze von 7,3% in Interphasen.

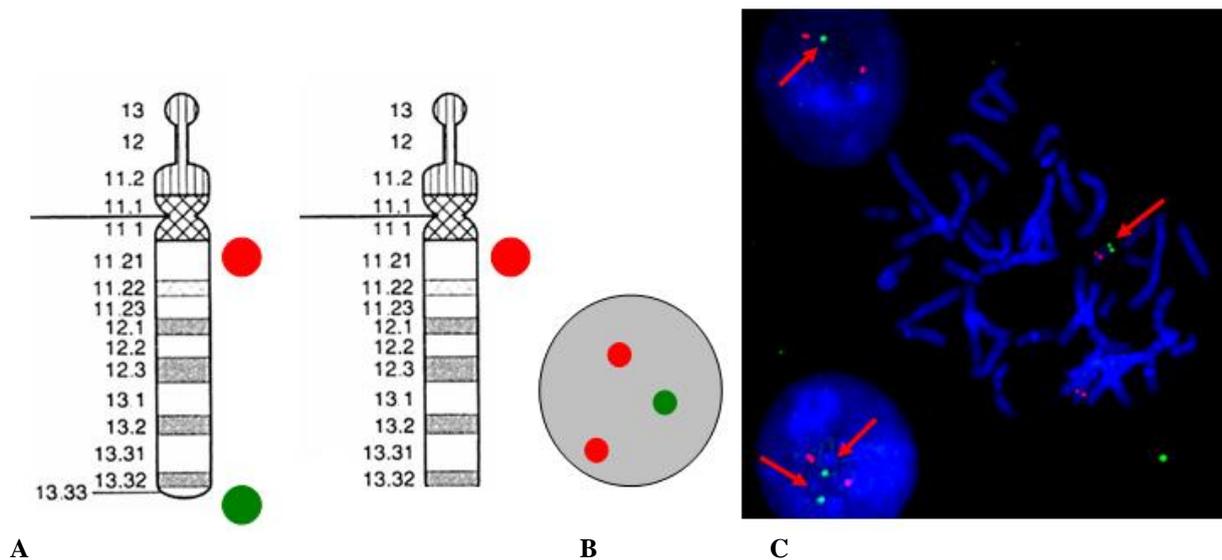
Das Nebeneinander von Zellen mit und ohne Deletion spricht für das Vorliegen eines Mosaiks. Dieser Befund wurde durch mehrmalige Kontrollen und auch an einer zweiten Blutprobe bestätigt.

Eine bei den Eltern durchgeführte FISH-Untersuchung mit der TUPLE1/Telo22q Sonde zeigte jeweils unauffällige Befunde. In 15 Metaphasen befanden sich zwei grüne (sowie zwei rote) Signale, was auf eine regelrechte Signalkonstellation der Region 22q13.3 (sowie der Region 22q11.2) hinweist.

### **3.2.2.4 Patienten mit chromosomalen Aberrationen in der FISH: Patient mit einer Deletion 22q11.2**

Durch die FISH Analyse mit der LSI TUPLE1/ Telo 22q Testsonde wurde die Diagnose mit einer Deletion 22q11.2 bei dem Patienten 73 bestätigt. Es zeigten sich in 50 Interphasen ein rotes und zwei grüne Signale (siehe Abbildung 5). Diese Signalkonstellation weist auf eine durchgängige Deletion des Bereichs 22q11.2 hin.

Abbildung 4 Deletion in 22q13.3 bei Patient 77



**A:** schematische Darstellung der auf eine Deletion hinweisenden Signalkonstellation an Metaphasen

**B:** schematische Darstellung der auf eine Deletion hinweisenden Signalkonstellation an Interphasen

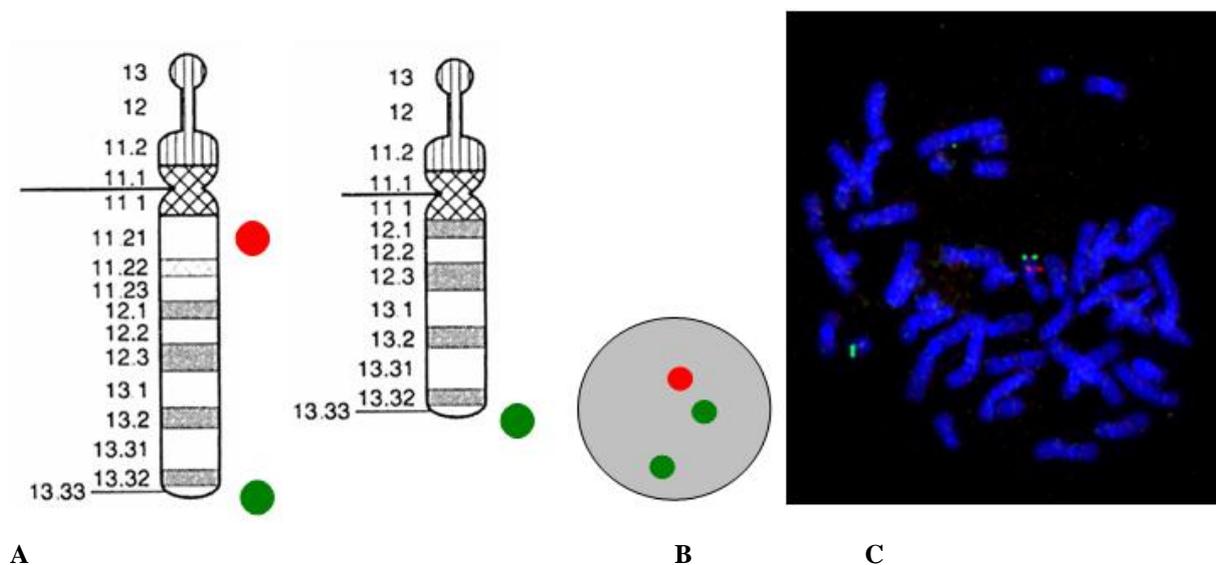
**C:** FISH-Analyse an Interphasen sowie einer Metaphase des Patienten 77

rotes Signal: *TUPLE1*-Genlokus in der Region 22q11.21

Pfeil zum grünen Signal: *SHANK3*-Genlokus in der Region 22q13.33

Zwei rote Signale weisen auf eine regelrechte Signalkonstellation des *TUPLE1*-Lokus hin. Ein grünes Signal deutet auf eine Deletion des *SHANK3*-Lokus auf einem der Chromosomen 22 in der Bande 22q13.3 hin. Gut erkennbar ist das nebeneinander von Deletionen (nur ein roter Pfeil pro Zelle) und regelrechter Signalkonstellation des *SHANK3*-Lokus (zwei rote Pfeile pro Zelle).

Abbildung 5 Deletion in 22q11.2 bei Patient 73



**A:** schematische Darstellung der auf eine Deletion hinweisenden Signalkonstellation an Metaphasen

**B:** schematische Darstellung der auf eine Deletion hinweisenden Signalkonstellation an Interphasen

**C:** FISH-Analyse an einer Metaphase des Patienten 73

rotes Signal: *TUPLE1*-Genlokus in der Region 22q11.21

grünes Signal: *SHANK3*-Genlokus in der Region 22q13.33

Zwei grüne Signale weisen auf eine regelrechte Signalkonstellation des *SHANK3*-Lokus hin. Ein rotes Signal deutet auf eine Deletion des *TUPLE1*-Lokus auf einem der Chromosomen 22 in der Bande 22q11.21 hin.

Zusammenfassend konnten durch die FISH-Untersuchungen hinsichtlich möglicher Deletionen 22q13.3 und Duplikationen 7q11.23 bei drei der 76 Patienten chromosomale Aberrationen als Ursache der Sprachentwicklungsstörung gefunden werden. Bei zwei Patienten ließen sich bekannte Veränderungen außerhalb der eigentlichen Zielregion bestätigen. Lediglich bei einem Patienten wurde die gesuchte Deletion 22q13.3 gefunden, allerdings als Mosaik.

### **3.3 Detektion neuer chromosomaler Aberrationen durch Array-CGH**

Das Array-CGH Verfahren eignet sich im Gegensatz zur FISH im besonderen Maße zur Suche nach neuen, unbekanntem chromosomalen Veränderungen, da es das gesamte Genom nach Deletionen bzw. Duplikationen untersucht.

Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden 44K bzw. 105K Arrays der Firma Agilent verwendet.

#### **3.3.1 Auswahl der Patienten für die Array-CGH Analyse**

Ausgewählt wurden für diese Untersuchung drei Patienten aus dem Patientenkollektiv, bei denen durch das erläuterte FISH-Screening eine chromosomale Aberration im Bereich 7q11.2 sowie 22q13.3 ausgeschlossen werden konnte. Die ausgewählten Patienten wiesen neben der deutlichen Sprachentwicklungsverzögerung auch verschiedene Dysmorphien auf. Bei zwei der Patienten wurde des Weiteren auch eine muskuläre Hypotonie beschrieben. Deswegen bestand ein verstärkter Verdacht auf eine Chromosomenstörung als Ursache der Symptomatik.

Zusätzlich wurde der Patient, bei dem ein Mosaik für die Deletion 22q13.3 mittels FISH nachgewiesen wurde, mit diesem Verfahren untersucht.

##### **3.3.1.1 Ergebnisse der Array-CGH**

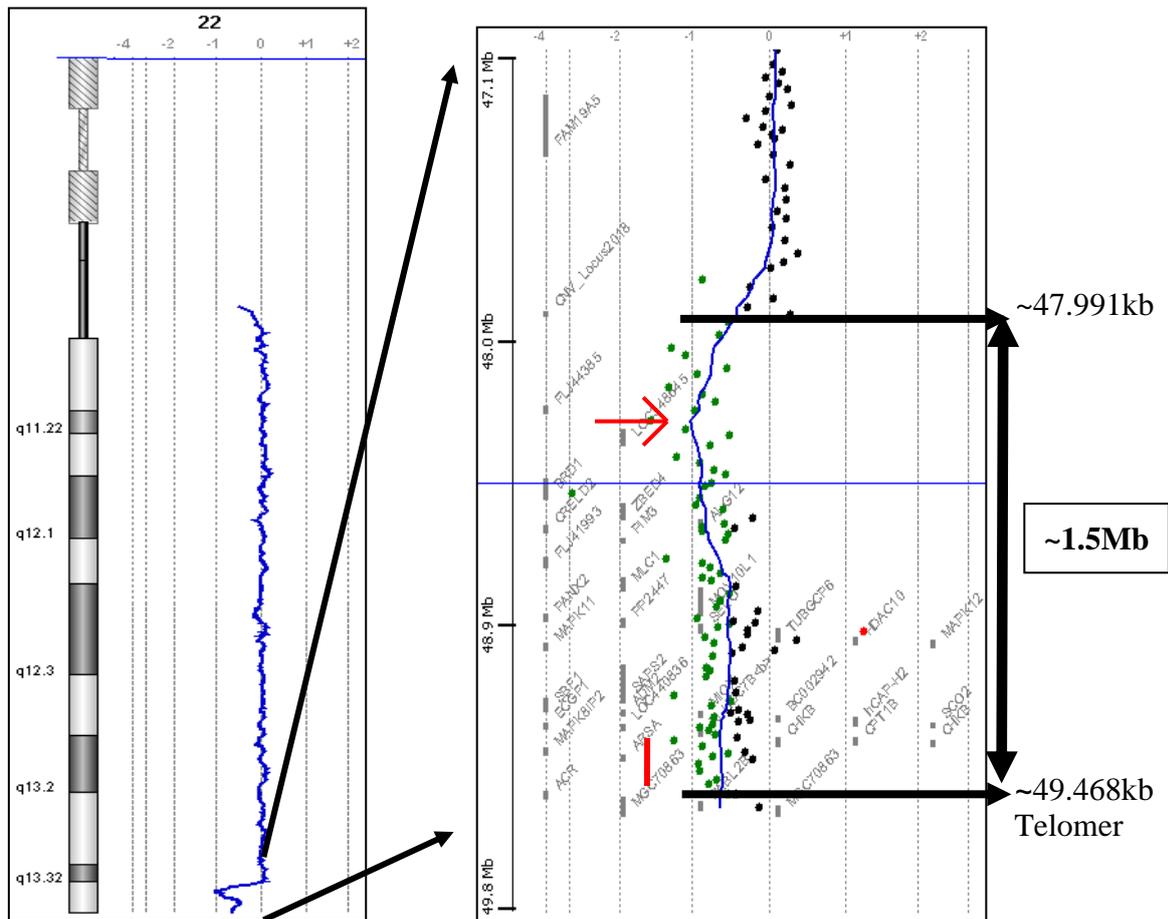
Bei den drei mit der Array-CGH untersuchten Patienten aus dem Patientenkollektiv ergab sich im Rahmen der angegebenen Diagnosegenauigkeit und der verwendeten Kriterien kein Hinweis auf eine Deletion oder Duplikation.

Bei dem Patienten, bei dem der Mosaikbefund für die Deletion 22q13.3 mittels FISH diagnostiziert worden war, zeigte sich in der Array-CGH ein Befund, der für eine Deletion spricht (siehe Abbildung 6).

### 3.3.1.1.1 Patient mit der Deletion 22q13.3

Die Array-CGH-Untersuchung erfolgte auf einem 105K Array. Es zeigte sich neben neun CNVs (siehe Anhang Tabelle A9a) eine Deletion von ungefähr 1,5Mb auf dem langen Arm eines Chromosoms 22. Deletiert war der Bereich 47.991Mb bis 49.468Mb (von pter) in der Region 22q13.32-q13.33. In dem deletierten Bereich befinden sich ungefähr 35 Gene (Agilent Software).

Abbildung 6 Array-CGH-Analyse des Patienten mit der Fallnummer 77



*links*: Array-CGH Profil des Chromosoms 22 mit Deletion (Ausschlag der blauen Mittelwertlinie von der 0-Linie aus nach links)

*rechts*: Ausschnitt des Bereichs von 47,1Mb bis 49,8Mb von pter des Chromosom 22

Gene: in grau dargestellt, Mittelwertlinie: in blau, schwarze Punkte: balanciertes Verhältnis zwischen Patienten und Referenz-DNA, rote Punkte: Zugewinne, grüne Punkte: Verluste, Mittelwertlinie im Bereich von 0 = balanciertes Verhältnis zwischen Patienten und Referenz-DNA, Ausschlag der Mittelwertlinie nach links = Deletion von Anteilen des Chromosoms 22, roter Strich: Bereich, in dem die LSI Telo22q Sonde hybridisiert, roter Pfeil: Bereich, in dem das Vorliegen einer durchgehenden Deletion vermutet wurde

Bei der Auswertung der Array-CGH zeigte sich für den Bereich des *SHANK3*-Gens (siehe Abbildung 6 roter Strich), der durch die Sonde LSI Telo22 detektiert wird, dass die Mittelwertlinie bei -0,6 liegt. Bei einer durchgehenden heterozygoten Deletion ist allerdings das Auffinden der Mittelwertlinie bei -1 zu erwarten. Dies zeigt sich für einen weiter proximal gelegenen Bereich auf dem langen Arm des Chromosoms 22 (siehe Abbildung 6, roter Pfeil). Zur Klärung der Frage, ob in diesem Bereich eine durchgehende Deletion (und kein Mosaik) vorliegt, wurde eine FISH-Untersuchung mit Sonden im Bereich des *BRD*-Genlokus (Bromidcontaining protein) durchgeführt.

Zur Verwendung kamen vier sich überlappende BAC-Klone im Bereich des *BRD*-Gens:

**Tabelle 4** BAC-Klone auf Chromosom 22 im Bereich des *BRD*-Gens sowie die Ergebnisse für die Fallnummer 77

			Anteil der Metaphasen mit:	
BAC-Klon	Lokalisation <sup>2</sup>	Farbe	2 gelben Signalen	1 gelben Signal
RP11-768L22	48031597-48252529	Spectrum Orange	33,3%	66,7%
CTD-3145J13	48211445-48368404	Spectrum Green	(5/15) <sup>1</sup>	(10/15) <sup>1</sup>
CTD-3082N8	48359881-48491095	Spectrum Orange	13,3%	86,7%
CTD-3047N11	48512701-48696030	Spectrum Green	(2/15) <sup>1</sup>	(13/15) <sup>1</sup>

<sup>1</sup>In Klammern befinden sich die Absolutwerte der Zählung.

<sup>2</sup>Die Daten basieren auf: [www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu), NCBI Build 36.1 (Stand 16.01.2009).

Der Sondenmix setzte sich aus jeweils zwei Sonden zusammen, die in SO und SG markiert wurden (siehe Tabelle 4). Da die in SO und SG markierten Sonden an gleichen bzw. sich überlappenden Genombereichen hybridisieren, entstehen keine Einzelsignale, sondern aus dem SO und SG wird ein gelbes Mischsignal. Bei normaler Signalkonstellation befinden sich in einer Metaphase also zwei gelbe Signale. Eine auf eine Deletion hinweisende Signalkonstellation wäre beim Auffinden nur eines gelben Signals gegeben.

Ausgewertet wurden 15 Metaphasen, wovon bei RP11-768L22/CTD-3145J13 in 66,7% und bei CTD-3082N8/CTD-3047N11 in 86,7% (MW: 76,7%) eine auf eine Deletion hinweisende Signalkonstellation vorlag. Bei 33,3% (RP11-768L22/CTD-3145J13) bzw. bei 13,3% (CTD-3082N8/CTD-3047N11) der Kerne zeigte sich eine unauffällige Signalkonstellation (MW: 23,3%). Somit lag auch in dieser Region eine Deletion im Mosaik vor.

Im Rahmen der Routinediagnostik wurde bei acht weiteren Patienten aus dem Patientenkollektiv die Array-CGH zur Diagnosefindung angewandt. Auf diese Patienten wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

### **3.3.2 Identifizierung zusätzlicher Patienten aus der Routinediagnostik**

Bei acht weiteren Patienten aus dem Patientenkollektiv wurde zur Klärung einer unklaren globalen Entwicklungsverzögerung parallel zur vorliegenden Arbeit die Array-CGH in der Routinediagnostik eingesetzt (Husemeyer, in Vorbereitung).

Diese Patienten wurden für die Array-CGH gewählt, da sich trotz verschiedener zytogenetischer und molekulargenetischer Untersuchungen keine Ursache für ihren auffälligen Phänotyp ergab. Die Array-CGH diente somit zur Abklärung der idiopathischen Entwicklungsverzögerung und im Speziellen der Sprachentwicklungsverzögerung in Kombination mit den verschiedenen fazialen Dysmorphiezeichen und zum Teil der muskulären Hypotonie.

#### **3.3.2.1 Ergebnisse der Array-CGH**

Bei drei der acht Patienten wurden chromosomale Aberrationen als Ursache des Phänotyps diagnostiziert.

Bei den nachgewiesenen Aberrationen handelt es sich um einen Verlust auf dem kurzen Arm eines Chromosoms 16 (Patient mit der Fallnummer 74), um eine Verdopplung auf dem kurzen Arm eines Chromosoms 17 (Patient mit der Fallnummer 75) sowie um einen Verlust auf dem kurzen Arm eines Chromosoms 18 (Patient mit der Fallnummer 76). Auf diese chromosomalen Aberrationen wird nachfolgend eingegangen.

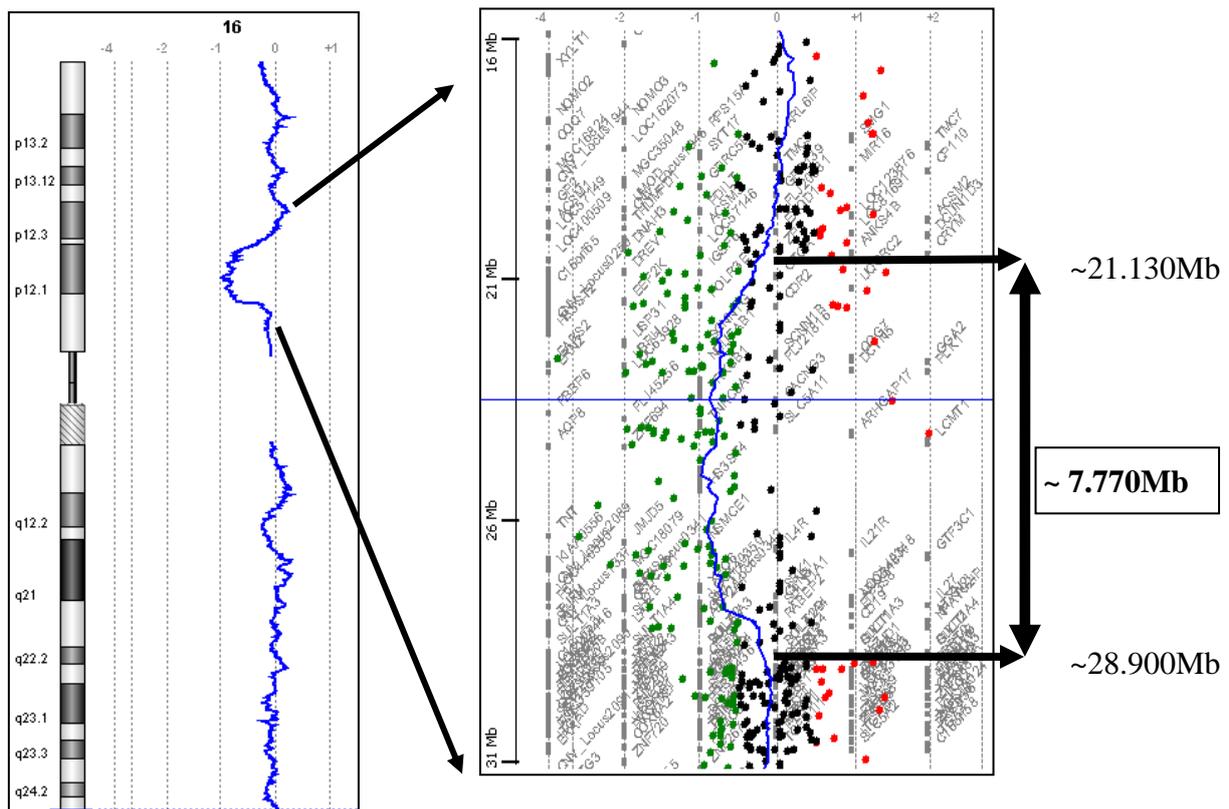
### 3.3.2.1.1 Patient mit Deletion in 16p12.1

Die Array-CGH-Untersuchung des Patienten mit der Fallnummer 74 erfolgte mit einem 44K Array.

Neben zwei CNVs (siehe Tabelle A9b, Anhang) zeigte sich eine Deletion von ungefähr 7,8Mb auf dem kurzen Arm eines Chromosom 16 im Bereich 16p12.1-p11.2. Zur besseren Lesbarkeit wird die Deletion innerhalb dieser Arbeit als del(16)(p12.1) bezeichnet. Deletiert war der Bereich 21.130Mb bis 28.900Mb (von pter) (NCBI Build 35).

Die deletierte Genregion enthielt circa 85 annotierte Gene (Agilent Software).

Abbildung 7 Array-CGH-Analyse des Patienten mit der Fallnummer 74



links: Array-CGH Profil des Chromosoms 16 mit Deletion (Ausschlag der blauen Mittelwertlinie von der 0-Linie aus nach links)

rechts: Ausschnitt des Bereichs von 16Mb bis 31Mb von pter des Chromosoms 16

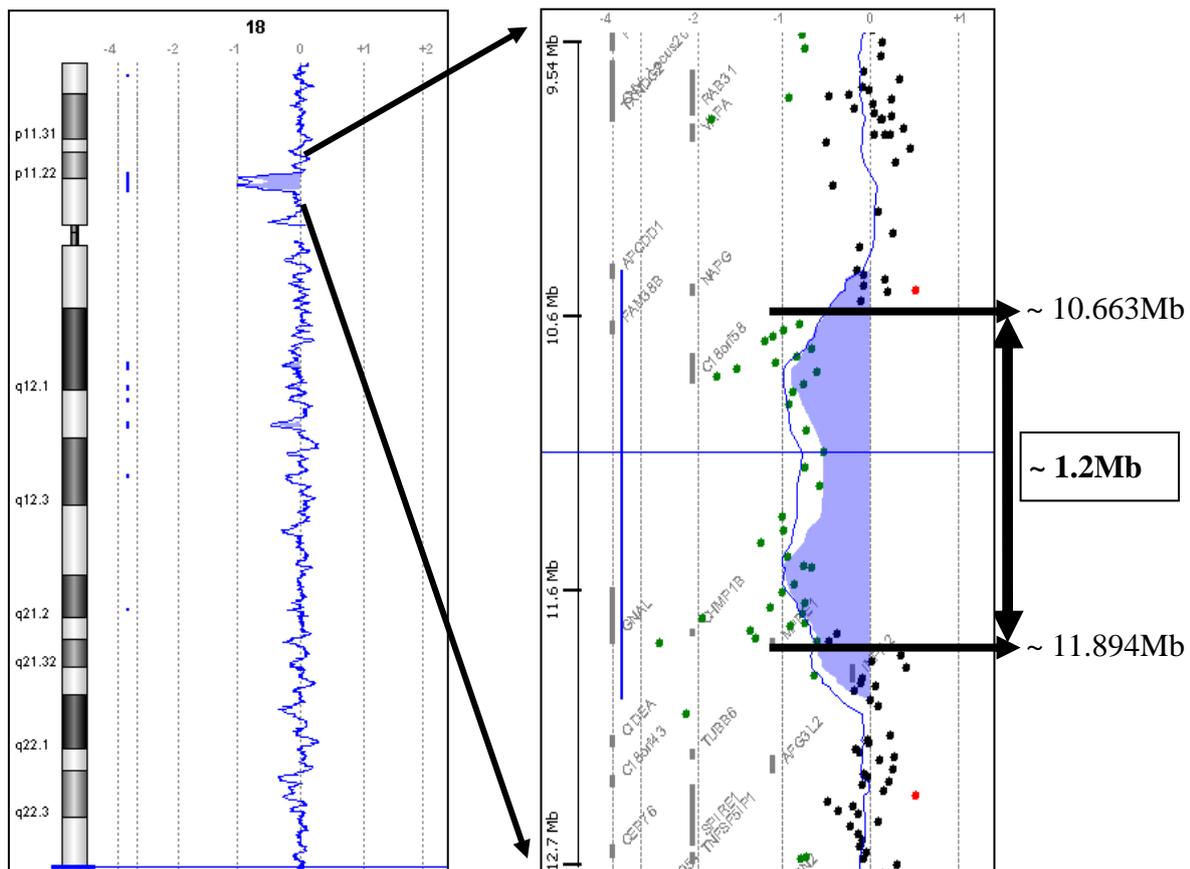
Gene in grau dargestellt, Mittelwertlinie in blau, schwarze Punkte: balanciertes Verhältnis zwischen Patienten und Referenz-DNA, rote Punkte: Zugewinne, grüne Punkte: Verluste, Mittelwertlinie im Bereich von 0 = balanciertes Verhältnis zwischen Patienten und Referenz-DNA, Ausschlag der Mittelwertlinie nach links = Deletion von Anteilen des Chromosoms 16



### 3.3.2.1.3 Patient mit der Deletion in 18p11.2

Die Array-CGH-Untersuchung des Patienten mit der Fallnummer 76 erfolgte auf einem 105K Array und zeigte bei diesem Patienten neben einer Vielzahl von CNVs (siehe Tabelle A9d, Anhang) eine Deletion von ungefähr 1,2Mb Größe von Anteilen des kurzen Arms eines Chromosoms 18 im Bereich 18p11.22-p11.21. In dieser Arbeit wird die Deletion vereinfacht als del(18)(p11.2) bezeichnet. Deletiert war der Bereich 10.663Mb bis 11.894Mb (von pter). In der deletierten Region befinden sich fünf Gene (Agilent Software).

Abbildung 9 Array-CGH-Analyse des Patienten mit der Fallnummer 76



*links:* Array-CGH Profil des Chromosoms 18 mit Deletion (Ausschlag der blauen Mittelwertlinie von der 0-Linie aus nach links)

*rechts:* Ausschnitt des Bereichs von 9,54Mb bis 12,7Mb von pter des Chromosom 18

Gene in grau dargestellt, Mittelwertlinie in blau, schwarze Punkte: balanciertes Verhältnis zwischen Patienten und Referenz-DNA, rote Punkte: Zugewinne, grüne Punkte: Verluste, Mittelwertlinie im Bereich von 0 = balanciertes Verhältnis zwischen Patienten und Referenz-DNA, Ausschlag der Mittelwertlinie nach links sowie flächig blaue Markierung = Deletion von Anteilen des Chromosoms 18

In einem weiteren Arbeitsgang wird die Häufigkeit der drei neuen chromosomalen Aberrationen im Patientenkollektiv überprüft. Dies wird im Folgenden erläutert.

### **3.4 Häufigkeit der Deletion 16p12.1, der Duplikation 17p11.2 und der Deletion 18p11.2 im gesamten Patientenkollektiv**

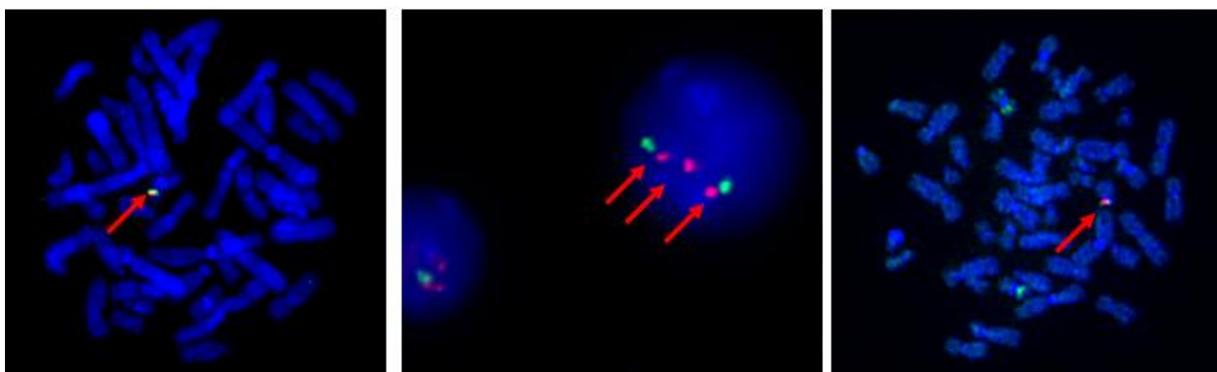
Basierend auf den Befunden der Array-CGH an ausgewählten Patienten wurde in der Folge das gesamte Patientenkollektiv mit Sprachentwicklungsverzögerung mittels FISH auf das Vorliegen einer Deletion in 16p12.1, einer Duplikation in 17p11.2 sowie einer Deletion in 18p11.2 untersucht.

Zum Nachweis der del(16)(p12.2) sowie der del(18)(p11.2) wurden BAC-Klone ausgewählt. Durch Hybridisierung dieser Sonden an Metaphasen sowie Interphasen unauffälliger Kontrollpersonen wurde überprüft, inwieweit die Sonden zuverlässige Hybridisierungssignale erzeugen, ohne an anderen Regionen zu binden, also chimär zu sein. Diese Kriterien wurden von allen BAC-Klonen erfüllt.

Zum Nachweis der dup(17)(p11.2) wurde die Sonde LSI SMS (in Spectrum Orange markiert) und als Kontrollsonde die Sonde LSI RARA (in Spectrum Green markiert) verwendet.

Mit den drei neu etablierten FISH-Assays wurden zunächst die Aberrationen der Patienten verifiziert, die in der Array-CGH identifiziert wurden. Bei dem Patienten mit der del(16)(p12.1) und dem Patienten mit der del(18)(p11.2) zeigte sich bei der Analyse mit den entsprechenden FISH-Sonden in jeweils 15 Metaphasen durchgängig eine Deletion. Bei dem Patienten mit der dup(17)(p11.2) zeigte sich in allen 100 Interphasen eine auf eine Duplikation des SMS-Lokus hinweisende Signalkonstellation (siehe Abbildung 10).

**Abbildung 10 FISH-Analysen bei den Patienten mit Inbalancen in der Array-CGH**



**A**  
FISH-Analyse einer Metaphase des Patienten 74  
Pfeil: Nur ein Mischsignal deutet auf eine Deletion in 16p12.1 hin

**B**  
FISH-Analyse einer Interphase des Patienten 75  
Pfeile: Drei rote Signale deuten auf eine Duplikation in 17p11.2 hin

**C**  
FISH-Analyse einer Metaphase des Patienten 76  
Pfeil: Nur ein Mischsignal deutet auf eine Deletion in 18p11.2  
grüne Signale: kreuzhybridisiert

Die Eltern dieser Patienten zeigten bei einer FISH-Untersuchung auf die Aberration ihrer Kinder jeweils unauffällige Befunde.

Nachfolgend erfolgte die Häufigkeitsbestimmung der genannten chromosomalen Aberrationen im Patientenkollektiv.

### **3.4.1 Bestimmung der Nachweisgrenzen der verwendeten Sonden**

Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte auch hier an Zellkernen von gesunden Kontrollindividuen. Die genauen Auswertungsergebnisse, Mittelwerte und Standardabweichungen befinden sich in den entsprechenden Tabellen im Anhang.

#### **3.4.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze für die Deletion 16p12.1**

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden die Sonden bei vier Kontrollindividuen getestet. Pro Kontrolle wurden 50 Metaphasen ausgewertet (siehe Tabelle A7c, Anhang).

Ist die Region p12.1 auf beiden Chromosomen 16 vorhanden, zeigen sich aufgrund der sich überlappenden in grün und rot markierten BAC-Klone zwei gelbe Mischsignale in den Metaphasen.

Diese regelrechte Signalkonstellation zeigte sich in 93,5% der Metaphasen (MW: 93,5%; SD: 2,52%) der Kontrollen.

Lag nur ein gelbes Signal vor, deutete dies auf eine Deletion hin. Dies war der Fall in 5% der Metaphasen (MW: 5%; SD: 2,58%) der Kontrollen.

Gemäß der im Methodenteil erläuterten Formel lag die Nachweisgrenze einer für eine Deletion 16p12.1 sprechenden Signalkonstellation in Metaphasen bei **12,7%**.

Bei sechs Patienten waren nicht ausreichend Metaphasen vorhanden. Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung der Nachweisgrenze an den Kontrollen auch bei Interphasen. Die Nachweisgrenze bei den Interphasen errechnet sich an 100 Kernen nach dem gleichen Prinzip wie bei den Metaphasen erläutert. Die Nachweisgrenze bei Interphasen lag bei **9,6%**.

#### **3.4.1.2 Bestimmung der Nachweisgrenze für die Duplikation 17p11.2**

Der FISH-Assay zum Nachweis von Duplikationen in 17p11.2 wird auf Grund der geringen Auflösung in Metaphasen nur an Interphasen durchgeführt.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze der Sonde LSI SMS erfolgte hier an Zellen von vier Kontrollen. Es wurden 100 Interphasen bei allen Kontrollen ausgezählt (siehe Tabelle A7d, Anhang).

Eine regelrechte Signalkonstellation in Interphasen ist durch zwei rote und zwei grüne Signale charakterisiert, wobei die zwei roten Signale auf ein regelrechtes Vorhandensein der Region 17p11.2 hindeuten. In 93% der Interphasen (MW: 93%; SD: 2,16%) zeigten sich regelrechte Signalkonstellationen.

Ein Auftreten von drei roten Signalen deutet auf eine Duplikation 17p11.2 hin. Dies war in 3,3% der Interphasen (MW: 3,3%; SD: 1,26%) der Kontrollen der Fall.

Gemäß der Formel errechnete sich die Nachweisgrenze für eine auf eine Duplikation 17p11.2 hinweisende Signalkonstellation auf **7,0%** der Interphasen.

### **3.4.1.3 Bestimmung der Nachweisgrenze für die Deletion 18p11.2**

Hier wurden zur Bestimmung der Nachweisgrenze für die Sonden vier Kontrollindividuen untersucht und pro Kontrolle 50 Metaphasen ausgewertet (siehe Tabelle A7e, Anhang).

Es handelt sich hier um zwei sehr dicht nebeneinander lokalisierte BAC-Klone in SO und SG. Dementsprechend liegen im Falle einer normalen Signalkonstellation zwei gelbe Mischsignale und bei einer auf eine Deletion 18p11.2 hinweisenden Signalkonstellation nur ein gelbes Mischsignal vor.

Eine regelrechte Signalkonstellation, also zwei gelbe Signale, zeigten sich in 90,5% der Metaphasen (MW: 90,5%; SD: 4,12%) der Kontrollen.

Nur ein gelbes Signal deutet auf eine Deletion 18p11.2 hin. Dies war in 4,5% der Metaphasen (MW: 4,5%; SD: 4,43%) der Kontrollen der Fall.

Gemäß der Formel lag die Nachweisgrenze einer auf eine Deletion 18p11.2 hinweisenden Signalkonstellation bei **17,8%**.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der Sonde bei den Interphasen erfolgte die Auswertung von 100 Interphasen. Die Zahl der Zellen mit einer Signalkonstellation, die auf eine Deletion hindeutet, lag bei 1,7% (MW: 1,7%, SD: 1,15%). Somit errechnete sich für die Nachweisgrenze ein Wert von **5,1%** der Interphasen.

### **3.4.2 FISH-Untersuchungen am gesamten Patientenkollektiv**

#### **3.4.2.1 Untersuchung auf die Deletion 16p12.1**

Bei 69 Patienten fand mit den BAC-Klonen RP11-184F14 und CTD-2385L22 die FISH-Analyse statt. Für jeden Patienten konnten 15 Metaphasen ausgewertet werden (siehe Tabelle A8b, Anhang).

Bei allen Patienten war die Anzahl der Zellen mit einer auf eine Deletion hinweisenden Signalkonstellation unterhalb der errechneten Nachweisgrenze. Eine regelrechte Signalkonstellation, also zwei gelbe Signale, fanden sich bei im Mittel 96,2% der Kerne.

#### **3.4.2.2 Untersuchung auf die Duplikation 17p11.2**

69 Patienten wurden mit der Sonde LSI SMS untersucht. Für jeden Patienten wurden 50 Interphasen ausgezählt (siehe Tabelle A8b, Anhang).

Mit Ausnahme von sieben Patienten befand sich bei allen Patienten der Anteil der Zellen mit einer Signalkonstellation, die auf eine Duplikation hindeutet, unterhalb der Nachweisgrenze.

Bei sieben Patienten befand sich die Anzahl der Kerne mit einer auf eine Duplikation hinweisenden Signalkonstellation oberhalb der Nachweisgrenze von 7,0% (Patient 1: 10% der Zellen mit einer Signalkonstellation, die auf eine Deletion hindeutet, Patient 13: 10%, Patient 19: 16%, Patient 21: 10%, Patient 25: 14%, Patient 27: 10% sowie Patient 66: 12%). Die Werte lagen zwar oberhalb der Nachweisgrenze, jedoch nicht in einem Bereich, wie es für eine durchgehende konstitutionelle Veränderung erwartet worden wäre. In einer unabhängigen Nachbeurteilung lag der Anteil der Zellen mit einer auf eine Duplikation hinweisenden Signalkonstellation unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Duplikation konnte hier nicht diagnostiziert werden.

#### **3.4.2.3 Untersuchung auf die Deletion 18p11.2**

Mit den Sonden RP11-92E1 sowie RP11-1149M8 wurden 65 Patienten untersucht. Für jeden Patienten wurden 15 Metaphasen beurteilt (siehe Tabelle A8b, Anhang).

Insgesamt lag die Anzahl der Zellkerne mit einer Signalkonstellation, die auf eine Deletion hindeutet, bei allen Patienten unterhalb der Nachweisgrenze. Es konnte also keine weitere Deletion in 18p11.2 im Patientenkollektiv diagnostiziert werden.

Zusammenfassend ließen sich nach Hybridisierung mit diesen drei FISH Sonden im Patientenkollektiv keine weiteren Patienten mit einer Signalkonstellation finden, die für eine Deletion in 16p12.1, Duplikation in 17p11.2 oder Deletion in 18p11.2 sprach.

### **3.5 Klinische Beschreibung der Patienten mit Aberrationen**

Bei den 77 untersuchten Patienten konnten somit insgesamt bei sechs Patienten chromosomale Aberrationen als wahrscheinliche Ursache der Sprachentwicklungsverzögerung detektiert werden (bzw. waren durch Voruntersuchungen bereits bekannt). Die Phänotypen dieser Patienten werden im Folgenden kurz beschrieben. Weitere Einzelheiten zu den Patienten befinden sich im Anhang (siehe Anhang 7.5). Die Tabelle 5 gibt abschließend einen vergleichenden Überblick über die einzelnen Phänotypen.

#### **3.5.1 Phänotyp der Patientin mit der Duplikation 7q22-q31.3**

Die Patientin wird als global retardiert mit autistischen Zügen beschrieben. Bis zum Alter von 2 10/12 Jahren benutzte sie nur Silbenketten. Bei ihr besteht des Weiteren eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie. An fazialen Dysmorphiezeichen wurden bei ihr unter anderem ein Epikanthus, dysmorphe Ohrmuscheln und eine flache Nasenwurzel beschrieben. Weitere Auffälligkeiten waren ein kurzer Damm, ein Strabismus convergens sowie eine thorakolumbale Skoliose. Bereits bei der Geburt lagen Körperlänge, Gewicht und Kopfumfang unter der dritten Perzentile. Diese Parameter blieben auch im weiteren Verlauf im unteren grenzwertigen Normalbereich.

#### **3.5.2 Phänotyp der Patientin mit der Deletion 16p12.1**

Im Alter von 3 2/12 Jahren wurde bei dieser Patientin eine Sprachentwicklungsverzögerung diagnostiziert. Sie beherrschte zu diesem Zeitpunkt sechs Wörter bei einem gut erhaltenen Sprachverständnis. Im Alter von 4 11/12 Jahren sprach sie wenig, aber gelegentlich 4-Wortsätze. An fazialen Dysmorphiezeichen waren bei ihr ein flaches Gesicht, eine kurze Lidspalte sowie ein flaches Philtrum mit einem kleinen Mund und schmalen Oberlippenrot auffällig. Nach bereits durchgeführter Strabismus dissecans Operation blieb ein leichtes Auswärtsschielen. Eine MRT-Untersuchung des Gehirns sowie ein Echokardiographie erbrachten unauffällige Befunde. Sie war kleinwüchsig und mikrozephal. Ihr Knochenalter war mit 3 10/12 Jahren um ein Jahr verzögert. Es bestand eine leichte muskuläre Hypotonie.

### **3.5.3 Phänotyp der Patientin mit der Duplikation 17p11.2**

Mit 3 4/12 Jahren sprach diese Patientin nur sehr wenig und undeutlich. Das Sprachverständnis war auf deutsch und französisch vorhanden. Sie begann verspätet festes Essen zu sich zu nehmen und wies eine muskuläre Hypotonie auf. Motorisch und feinmotorisch war sie sehr geschickt. An fazialen Dysmorphiezeichen fielen ein kleines Mittelgesicht, ein Epikanthus, nach lateral abfallende Lidachsen sowie eine breite Nasenwurzel auf. Außerdem war ein asymmetrisches Lächeln erkennbar.

### **3.5.4 Phänotyp des Patienten mit der Deletion 18p11.2**

Mit 2 4/12 Jahren wurde bei diesem Patienten eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung mit nahezu fehlender aktiver Sprache diagnostiziert. Er lautete viel und wendete Silbenverdopplung an, allerdings ohne gerichtete Wörter zu benutzen. Im dritten Lebensjahr begann dieser Patient die ersten Worte zu sprechen. Er war, genauso wie seine beiden älteren Brüder, geistig retardiert. Dysmorphiezeichen waren bei ihm außer einer breiten Nasenwurzel nicht beschrieben. Weiter wies er eine muskuläre Hypotonie und autistische Züge auf.

### **3.5.5 Phänotyp des Patienten mit der Deletion 22q13.3 (Mosaik)**

Bei dem Patient fehlte bis zum 7. Lebensjahr jegliche Wortproduktion. Er wies neben einer beidseitigen Syndaktylie der zweiten und dritten Zehe einen Strabismus convergens am rechten Auge auf. Seine Wachstumsparameter befanden sich im unteren Normalbereich. Auffällig waren außerdem der Intentionstremor sowie sein aggressives Verhalten gegenüber anderen Kindern. Im Alter von 4 1/12 Jahren erfolgte mit dem Münchner Funktionellen Entwicklungs-Diagnostik Test eine Einschätzung seiner allgemeinen Entwicklungsverzögerung. Demnach entsprach sein Entwicklungsstand dem eines 20 Monate alten Kindes. Das Röntgenbild der Hand im Alter von 7 6/12 Jahren zeigte ein Knochenalter, welches dem eines 5 10/12 Jahre alten Jungen entsprach.

### **3.5.6 Phänotyp des Patienten mit der Deletion 22q11.2**

Bei der del(22)(q11) handelt es sich um ein definiertes Mikrodeletionssyndrom (OMIM: 188400), welches auch unter dem Akronym CATCH22 (cardiac abnormality, abnormal facies, T cell deficiency, cleft palate, hypoparathyroidism resulting from 22q11 deletion)

bekannt ist. Wie typisch für dieses Deletionssyndrom wies auch dieser Patient eine submuköse Spalte im weichen Gaumen auf. Weiter wurde bei ihm ein subaortaler, perimembranöser Ventrikelseptumdefekt und ein persistierendes Foramen ovale diagnostiziert. Neben der muskulären Hypotonie zeigte der Patient Selbst- und Fremdaggressionen sowie Stereotypen wie Schaukelbewegungen. Mit 14 Monaten wurde im Denver Test der Verdacht auf einen Autismus gestellt mit einer feinmotorischen sowie sprachlichen Entwicklung entsprechend der eines sechs Monate alten Kindes. Mit 3 9/12 Jahren konnte er noch keine Wörter oder Silben sprechen. Der Patient litt an einer Epilepsie. Neben tief ansetzenden Ohren fielen bei diesem Patienten ein Hypertelorismus, eine breite Nasenwurzel sowie nach lateral abfallende Lidachsen auf.

**Tabelle 5 Vergleich der Phänotypen der Patienten mit chromosomalen Aberrationen mit den restlichen Patienten des Kollektivs**

	dup7q22-31	del16p12.1	dup17p11.2	del18p11.2	del22q11.2	del22q13.3	Patientenkollektiv <sup>1</sup>
<b>Alter</b>	2 10 /12	3 2/12	3 6 /12	2 4 /12	3 9 /12	7 6 /12	4 3/12
<b>Größe</b>	< 3. P	2. P			50. P	3. P	51. P
<b>Gewicht</b>	15. P	9.P	3. P	98. P	50. P	10. P	52. P
<b>KU</b>	5. P	<3. P	50. P	75. P		< 3 P	61. P
<b>Entwicklung</b>	Globale EV	Globale EV sprachbetont	Globale EV Expr. SEV	Globale EV SEV	Globale EV SEV	Globale EV Massive SEV	EV: 54% SEV: 100%
<b>Faziale Dysmorphiezeichen</b>	dysplastische Ohren Epikanthus hohe Stirn Telekanthus zeltförmiger Mund	enge Lidspalten flaches Philtrum schmales Oberlippenrot flaches Mittelf Gesicht	asymmetrisches Lächeln breite Nasenwurzel Epikanthus kleines Mittelf gesicht	breite Nasenwurzel	nach lateral abfallende Lidachse breite Nasenwurzel dysplastische Ohren	große, retrovertierte Ohren Synophrys	0 faz Dys: 13% ≥2 faz Dys: 54%
<b>Sonstiges</b>	kurzer Daumen				Gaumenspalte	Syndaktylie	
<b>Neurologie</b>	muskuläre Hypotonie	muskuläre Hypotonie	muskuläre Hypotonie	muskuläre Hypotonie	muskuläre Hypotonie	normotone Muskulatur Intentions-tremor	muskuläre Hypotonie: 52%

Alter in Jahren, Größe, Gewicht sowie KU in Perzentilen

<sup>1</sup>Patientenkollektiv, bei dem bis jetzt keine Ursache der Sprachentwicklungsverzögerung gefunden werden konnte, hier Angaben des durchschnittlichen Alters, Gewichts, Kopfumfangs sowie der Größe im Kollektiv  
KU: Kopfumfang, EV: globale Entwicklungsverzögerung, SEV: Sprachentwicklungsverzögerung, faz Dys: faziale Dysmorphiezeichen

## 4 Diskussion

Etwa 3-8% der Drei- bis Vierjährigen liegen um ein oder mehr Jahre hinter der normalen Sprachentwicklung zurück (Allen and Bliss, 1978). Die Ursachen sind vielfältig und häufig unbekannt. Diese Arbeit hatte zum Ziel, die Bedeutung chromosomaler Ursachen bei Kindern mit idiopathischer Sprachentwicklungsverzögerung zu untersuchen. Dafür wurde die Häufigkeit bekannter chromosomaler Aberrationen, die mit einer Sprachentwicklungsverzögerung im Zusammenhang stehen, bei einem selektierten Patientenkollektiv mittels der FISH-Technik überprüft. Zur Detektion bis jetzt unbekannter chromosomaler Ursachen einer Sprachentwicklungsverzögerung fand die Array-CGH Anwendung.

Nachfolgend sollen zunächst die verwendeten Untersuchungsmethoden kritisch beleuchtet werden. Danach wird auf die Auswahl des Patientenkollektivs und auf die Genotyp-Phänotypkorrelation eingegangen, bevor die identifizierten chromosomalen Aberrationen hinsichtlich genomischer Aspekte erörtert werden.

### **4.1 Eignet sich die FISH zur genetischen Diagnostik bei einer Sprachentwicklungsverzögerung?**

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist eine Methode, die aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität eine große Bedeutung für die Diagnose chromosomaler Zugewinne und Verluste hat (Tönnies, 2002). Sie stellt eine verlässliche Diagnostik dar, die auch bei geringen Zellzahlen und suboptimaler Zellqualität anwendbar ist.

Trotz der hohen Sensitivität ist die Aussagekraft der FISH begrenzt, da die Diagnosestellung einer Duplikation unter Umständen erschwert sein kann. Dies ist der Fall, wenn sich die Duplikation nicht durch ein zusätzliches Signal, sondern nur durch ein leicht vergrößertes Signal oder durch ein geteiltes Signal darstellt. Für die Erkennung solcher Duplikationen benötigt es viel Erfahrung. Aus diesem Grund erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Beurteilung der Zellen immer durch mindestens zwei Begutachter.

Ein weiterer Nachteil der FISH ist, dass sie nur bei Verdacht auf eine spezifische Aberration angewendet werden kann, die durch die FISH bestätigt oder ausgeschlossen wird (Tönnies, 2002). Mit dem Verfahren können keine neuen, bisher nicht vermuteten Aberrationen als Ursache einer Sprachentwicklungsverzögerung entdeckt werden. Bei dieser Arbeit wären mit einem alleinigen FISH-Screening auf die  $del(22)(q13.3)$  und die  $dup(7)(q11.23)$  daher die

del(16)(p12.1), die dup(17)(p11.2) sowie die del(18)(p11.2) nicht detektiert worden.

Des Weiteren kann durch eine FISH-Sonde nur ein sehr kleines Spektrum des Genoms analysiert werden (Tönnies, 2002). Die Telo22q Sonde (Abbott/ Vysis) ist z.B. 96kb groß und deckt damit nur einen Teil der gewöhnlichen del(22)(q13.3) ab, welche circa 5-8Mb groß ist (Nesslinger et al., 1994). Von dem insgesamt 3.500Mb großen Genom analysiert diese Sonde nur 0,0027%.

Die FISH wird in der Routinediagnostik und für Forschungsfragestellungen eingesetzt. Allerdings fand die FISH bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Verwendung für eine Screening-Untersuchung bei Patienten mit einer Sprachentwicklungsverzögerung. Bekannt ist die Technik für Screening-Untersuchungen bei Patienten mit mentaler Retardierung. Bei z.B. einem multiprobe FISH-Screening der Subtelomerregionen aller Chromosomen (Chromoprobe Multiprobe-T System Kit (Cytocell, Banbury, UK)) von 219 Patienten mit unauffälligem Karyotyp und mit einer idiopathischen mentalen Retardierung zeigten sich bei zwölf Patienten (5,5%) chromosomale Aberrationen (Baroncini et al., 2005).

Durch die vorliegende Arbeit stellte sich heraus, dass verschiedenste chromosomale Veränderungen als Ursache einer Sprachentwicklungsverzögerung in Erwägung zu ziehen sind. In dem Patientenkollektiv wurden neben der vermuteten Deletion in 22q13.3 noch fünf andere Aberrationen im Zusammenhang mit einer Sprachentwicklungsverzögerung gefunden. Insgesamt wurden folgende Aberrationen detektiert: dup(7)(q22-q31.3), del(16)(p12.1), dup(17)(p11.2), del(18)(p11.2), del(22)(q11.2). Es ist anzunehmen, dass durch weiteren Einsatz der Array-CGH noch andere chromosomale Veränderungen in dem Patientenkollektiv gefunden werden könnten. Der ökonomische und zeitliche Aufwand zum Überprüfen sehr vieler unterschiedlicher chromosomaler Veränderungen mit der FISH darf hierbei nicht unterschätzt werden. Trotz vermehrtem Einsatz der FISH können Patienten mit chromosomalen Ursachen unentdeckt bleiben. Aufgrund der heterogenen Gruppe chromosomaler Ursachen einer Sprachentwicklungsverzögerung stellt die FISH-Technik somit nicht die ideale Methode für die Diagnostik bei Kindern mit einer Sprachentwicklungsverzögerung dar.

## **4.2 Vorteile und Nachteile der Array-CGH**

Die Array-CGH ist ein Verfahren, bei dem mit einer einzigen Untersuchung das gesamte Genom auf chromosomale Zugewinne oder Verluste analysiert werden kann. Deswegen etabliert sich dieses Verfahren zunehmend in der Routinediagnostik. Hierbei findet es vor allem Verwendung bei Krankheitsbildern, bei denen kein Verdacht auf eine spezifische chromosomale Aberration besteht. Daher kommt dieses Verfahren z.B. bei Kindern mit einer unklaren mentalen Retardierung mit unspezifischem Phänotyp zur Anwendung. Bei diesen Kindern kann durch die Array-CGH bei 5 bis 17% eine chromosomale Ursache der mentalen Retardierung gefunden werden (Krepischi-Santos et al., 2006; Thuresson et al., 2007; Stankiewicz und Beaudet, 2007).

Weitere Vorteile dieses Verfahrens sind, dass durch die sich weiterentwickelnde Technik die Auflösung der Arrays und die Detektion von immer kleineren Deletionen bzw. Duplikationen möglich ist. Mittlerweile liegt die Diagnosegenauigkeit im Bereich bis zu 0,1Mb (Stankiewicz und Beaudet, 2007; Zhang et al., 2008).

Nachteilig an der Array-CGH ist, dass Polyploidien, balancierte Translokationen oder Inversionen sowie geringgradige Mosaik nicht erfasst werden können (Tönnies, 2002). Größere Mosaik können allerdings durch die Array-CGH diagnostiziert werden. Zu den Translokationen muss einschränkend erwähnt werden, dass balancierte Translokationen bei 1/250-500 phänotypisch unauffälliger Individuen auftreten und somit auch bei Patienten mit einer Sprachentwicklungsverzögerung zu erwarten sind (Stankiewicz und Beaudet, 2007).

Eine nicht zu unterschätzende Schwierigkeit bei der Array-CGH ist die Abgrenzung von pathologischen Veränderungen des Genoms zu genetischen Polymorphismen, wie z.B. polymorphen Kopienzahlvarianten der Chromosomen (CNVs). Die Abgrenzung wird durch die hohe Anzahl von CNVs erschwert (etwa 12% des Genoms) (Stankiewicz und Beaudet, 2007).

Zusammengefasst eignet sich dieses Verfahren in besonderem Maße zur Detektion unbekannter chromosomaler Duplikationen bzw. Deletionen. Es ermöglicht zum einen das Auffinden von neuen chromosomalen Aberrationen und zum anderen das Erkennen von Patienten mit einem untypischen Phänotyp bereits bekannter chromosomaler Veränderungen (Krepischi-Santos et al., 2006). Aus diesem Grund empfiehlt sich der vermehrte Einsatz der Array-CGH für die Diagnostik bei Patienten mit einer Sprachentwicklungsverzögerung.

### **4.3 Auswahl des Patientenkollektivs für die FISH-Analysen auf del(22)(q13.3) sowie dup(7)(q11.23)**

Die Auswahl der Patienten erfolgte aufgrund des Einschlusskriteriums einer idiopathischen Sprachentwicklungsverzögerung. Folglich entstand eine sehr heterogene Patientengruppe. Ungefähr die Hälfte der Patienten war global retardiert und etwa die Hälfte der Patienten wies phänotypische Stigmata auf. Diese unterschiedlichen Phänotypen der Patienten ermöglichten es zwar, unterschiedliche chromosomale Ursachen einer Sprachentwicklungsverzögerung zu finden, jedoch besteht die Vermutung, dass durch eine spezifischere Phänotypenauswahl eine größere Anzahl von Patienten mit dem gesuchten Genotyp gefunden worden wären. Allerdings muss diese Vermutung auch relativiert werden, da in dieser Studie der Patient mit der Deletion 22q13.3 und einem dafür untypischen Phänotyp durch eine spezifischere Phänotypenauswahl nicht gefunden worden wäre.

Aufgrund der geringen Detektionsrate (1,3%) von Deletionen in 22q13.3 und Duplikationen in 7q11.23 im Patientenkollektiv stellt sich die Frage, inwieweit das Kollektiv repräsentativ für diese Untersuchungen war.

Flint et al (1995) evaluierte 99 Patienten mit mentaler Retardierung auf unbalancierte Veränderungen der Subtelomerregionen. In seiner Studie fand er drei chromosomale Aberrationen, davon zwei Patienten mit einer terminalen Deletion 22q. Aus diesem Grund hätte das für eine Deletion del(22)(q13.3) spezifischere Einschlusskriterium der Sprachentwicklungsverzögerung ein häufigeres Auffinden dieser Deletion vermuten lassen. Auch wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt die Mehrzahl der Patienten durch eine FISH-Analyse diagnostiziert.

Die unspezifische Klinik der dup(7)(q11.23) lenkt nur selten den Verdacht auf diese Duplikation, wodurch die Diagnose durch eine FISH erschwert wird. So wurde der erste Patient durch eine real-time PCR entdeckt, die eigentlich wegen des Verdachts auf eine del(22)(q11.2) durchgeführt wurde (Berg et al., 2007).

Aus diesem Grund wurde die Duplikation 7q11.23 erst durch den Einsatz der Array-CGH häufiger gefunden (Torniero et al., 2007; Berg et al., 2007). Auffällig wurden die Patienten mit der Duplikation 7q11.23 durch unspezifische globale Entwicklungsverzögerung zum Teil mit Verhaltensauffälligkeiten oder mit Sprachentwicklungsverzögerung (Berg et al., 2007).

Ein Patient mit einer dup(7)(q11.23) wurde wegen Epilepsie und neuronalen Migrationsdefekten untersucht (Torniero et al., 2007). Bei der Diagnostik mit Hilfe der Array-CGH zeigte sich dann die dup(7)(q11.23). Eine weitere Studie war das Screening von 206

Patienten mit autistischen Störungen durch quantitative Mikrosatelliten-Analyse. Hierbei wurde ebenfalls ein Patient mit einer dup(7)(q11.23) gefunden. Autistische Züge wurden nur bei einem Teil der Patienten mit der Duplikation beschrieben, weswegen in dieser Arbeit Autismus nicht als zusätzliches Einschlusskriterium verwendet wurde.

Es wird vermutet, dass die dup(7)(q11.23) genauso häufig auftritt wie das William-Beuren-Syndrom (1/7.500 bis 1/20.000 Lebendgeburten) (Berg et al., 2007). Obwohl wir die Häufigkeit des Nachweises dieser Duplikation in unserem Patientenkollektiv durch das Einschlusskriterium der Sprachentwicklungsverzögerung erhöhen wollten, scheint die Duplikation so selten zu sein, dass sie bei keinem der Patienten zu finden war. Vielleicht könnten Patienten mit der dup(7)(q11.23) eher diagnostiziert werden, wenn ausschließlich Patienten mit expressiver Sprachentwicklungsverzögerung und ohne mentale Retardierung (Torniero et al., 2007) evaluiert werden. Allerdings erscheint dies schwierig, da in den meisten vorliegenden Fällen nicht zwischen expressiver und rezeptiver Sprachentwicklungsverzögerung differenziert wurde. Inwieweit die mentale Retardierung zum Krankheitsbild gehört, ist umstritten. Während Torniero (2007) eine erhöhte Detektionsrate der dup(7)(q11.23) bei einem Patientenkollektiv ohne mentale Retardierung erwartet, wurde bei den von Berg (2007) untersuchten Patienten bei fünf von sieben eine mentale Retardierung oder globale Entwicklungsverzögerung beschrieben.

Es bleibt abzuwarten, inwieweit der Phänotyp dieser Duplikation in der nächsten Zeit spezifiziert wird und somit ein leichteres Auffinden von Patienten mit der Duplikation dup(7)(q11.23) möglich ist.

#### **4.4 Wie erklärt der Genotyp den Phänotyp?**

Durch die Entdeckung des Einflusses der unterschiedlichen Gene auf die verschiedenen Krankheitsbilder und durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms spielt die Genetik in der alltäglichen Klinik eine zunehmende Rolle.

Trotz Forschung, technischer Errungenschaften und neuer Methoden wie der Array-CGH ist bei den chromosomalen Ursachen der Sprachentwicklungsverzögerung die eigentliche Bedeutung der deletierten bzw. duplizierten Gene bis zum jetzigen Zeitpunkt weitestgehend unbekannt. Im Folgenden soll versucht werden, eine mögliche Erklärung zu geben, wie vermutete Kandidatengene die Klinik des Patienten beeinflussen.

#### 4.4.1 Duplikation 7q11.23

Bei dieser zur typischen WBS-Mikrodeletion reziproken Duplikation wurde auch ein zum WBS-Syndrom gegensätzlicher Phänotyp beschrieben. Während die WBS-Patienten als wachstumsretardiert und mikrozephal beschrieben wurden, zeichneten sich die Patienten mit einer Duplikation durch einen Makrozephalus und eine normale Größe aus (Torniero et al., 2007). Ähnlich gegenteilig verhält es sich mit der Sprachentwicklung. Typisch für die Patienten mit einer Duplikation ist die Sprachentwicklungsverzögerung, typisch für die Deletion die eher gute Sprachentwicklung (Depienne et al., 2007). Auch das Verhalten wurde zum Teil gegensätzlich beschrieben. Während es sich beim WBS um extrovertierte, hypersoziale Persönlichkeiten handelt, werden Patienten mit der reziproken Duplikation als eher ängstlich und mit autistischen Zügen beschrieben (Berg et al., 2007; Depienne et al., 2007).

In dem duplizierten 1,55Mb betreffenden Bereich befinden sich 25-30 Gene (Berg et al., 2007). Vermutet wird, dass in der entsprechenden Region Gene sein müssen, die einen Einfluss auf neuronale Migrationsprozesse haben. Beim WBS-Syndrom wurde im MRT eine abnormale kortikale Dicke beschrieben und bei der Duplikation eine kortikale Dysplasie des linken Temporallappens (Thompson et al., 2005; Torniero et al., 2007). Zwei mögliche Gene, die sich im Bereich 7q11.2 befinden und mit der neuronalen Migration in Zusammenhang stehen könnten, sind das *LIMK1*-Gen (LIM domain kinase 1) sowie das *CYLN2*-Gen (CAP-GLY domain containing linker protein 2). Das *LIMK1*-Gen codiert eine Kinase, die durch Phosphorylierung und somit Inaktivierung des Cofilins das Aktinfilamentskelett stabilisiert. Das *CYLN2* codiert ein Protein, welches die Mikrotubuli mit dem Lamellenkörper der Dendriten verbindet (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, NCBI Build 36.1).

#### 4.4.2 Deletion 16p12.1

Diese Deletion wurde erstmals im August 2007 von Ballif et al. ausführlich beschrieben. In der deletierten Region befinden sich über 100 bekannte Gene. Ein Kandidatengen, eine kritische Region oder eine Geno-/Phänotypkorrelation wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht beschrieben. Das *SLC5A11*-Gen (solute carrier family 5), welches sich im deletierten Bereich befindet, wird für ein Kandidatengen für eine Epilepsie gehalten (Ballif et al., 2007). Eine Epilepsie wurde bis zum momentanen Zeitpunkt nicht bei Patienten mit der Deletion 16p12.1 erwähnt. Somit ist die Bedeutung dieses Gens für die Deletion 16p12.1 unklar.

Defekte im *SCNN1B*-Gen können eine autosomal rezessive Form des

Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 bedingen, welches bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings keine Erwähnung im Zusammenhang mit diesem Deletionssyndrom fand (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, NCBI Build 36.1). Ein weiteres Gen, das sich im deletierten Bereich befindet, ist das *ALDOA*-Gen. Es codiert für eine Aldolase, deren Isoenzyme während der embryonalen Entwicklung verstärkt exprimiert werden bzw. im Gehirn von Erwachsenen vorkommen. Ein autosomal rezessiver Verlust des *ALDOA*-Gens kann zu hämolytischer Anämie, mentaler Retardierung und Dysmorphiezeichen führen (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, NCBI Build 36.1; Ballif et al., 2007). Während die mentale Retardierung und die Dysmorphiezeichen mit den Phänotypen der Patienten in Einklang zu bringen sind, wurde die hämolytische Anämie bei dem Syndrom nicht erwähnt.

#### **4.4.3 Duplikation 17p11.2**

Bei Patienten mit dem Potocki-Lupski Syndrom (PLS) liegt eine reziproke Duplikation des beim Smith-Magenis Syndrom (SMS) deletierten Abschnitts 17p11.2 vor. Es handelt sich gewöhnlich um eine circa 3,7Mb große interstitielle Duplikation, die sich bei der typischen Duplikation durch ein 1,1Mb großes junction fragment auszeichnet (Potocki et al. 2000, 2007). Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientin hatte mit 3,9Mb wohl eine gewöhnliche Duplikation, allerdings kann dies nicht mit Sicherheit behauptet werden, da das Vorhandensein des junction fragments nicht überprüft wurde.

In der duplizierten Region befinden sich über 50 Gene, wobei die kritische Region 1,3Mb groß ist und das *RAI1*-Gen (Retinoic acid-induced protein 1) enthält (Potocki et al., 2007). Es wird vermutet, dass das *RAI1*-Gen eine Funktion als Transkriptionsregulator hat. Durch die verstärkte Expression im Gehirn wäre es möglich, dass es in der embryonalen sowie postnatalen Entwicklung eine Rolle spielt und bei der neuronalen Differenzierung integriert ist (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, NCBI Build 36.1). Allerdings wurde bis jetzt keine pathologische Bildgebung des Gehirns bei Patienten mit der Duplikation beschrieben.

#### **4.4.4 Deletion 18p11.2**

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde keine Deletion beschrieben, die identisch mit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientin ist. Auch handelt es sich mit 1,2Mb um eine kleine Deletion, die nur 5 Gene enthält (*FAM38B*, *C18ORF58*, *GNAL*, *CHMP1B*, *MPPE1*; Agilent Software). Die Funktion dieser Gene ist unklar. Daher kann bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage über eine Geno-/Phänotypkorrelation gemacht werden.

#### **4.4.5 Deletion 22q13.3**

Die gewöhnliche Deletion 22q13.3 ist circa 5-8Mb groß (Nesslinger et al., 1994). Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patient zeigt mit 1,5Mb eine deutlich kleinere Deletion, welche allerdings die kritische Region enthält. Diese umfasst circa 100kb (Anderlid et al., 2002) und enthält die Gene *ACR*, *RABL2B* und *SHANK3*.

Das acrosin-precursor-Gen (*ACR*) codiert das Acrosin Protein, welches eine Hauptproteinase im Acrosom des menschlichen Spermiums ist. Eine Deletion dieses Gens könnte Infertilität bedingen (Manning et al., 2004). Obwohl dieses Gen bei dem 22q13.3 Deletionssyndrom verloren gegangen ist, wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Fertilitätsstörung bei männlichen Patienten im Zusammenhang mit diesem Syndrom beschrieben.

Die verwendete Sonde hybridisiert im Bereich des Prolin-rich synapse-associated protein 2 (*ProSAP2* = *SHANK3*). Das *SHANK3* gilt als eines der Kandidatengene für das 22q13.3 Deletionssyndrom (Manning et al., 2004). Es ist ein 60kb großes Gen, lokalisiert zwischen dem *ARSA* und dem *ACR*-Gen. Das *SHANK3*-Gen codiert ein scaffold Protein, welches besonders im cerebralen Kortex und Cerebellum lokalisiert ist und eine Rolle in der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen spielt (Cusmano-Ozog et al., 2007). Bonaglia et al. (2001) beschrieb einen Patienten mit einer balancierten Translokation t(12;22)(q24.1;q13.3), bei dem die Bruchpunkte das Exon 21 des *SHANK3*-Gens betrafen. Dieser Patient zeigte die typische Klinik eines Patienten mit einer Deletion 22q13.3.

#### **4.5 Genetischer und phänotypischer Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Patientin mit der Deletion 16p12.1 mit bereits veröffentlichten Fällen**

Interessanterweise befand sich in dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv mit der Fallnummer 74 eine Patientin mit einem Mikrodeletionssyndrom 16p12.1, welches 2007 von Ballif et al. erstmals ausführlich beschrieben wurde. In der von diesen Autoren veröffentlichten Studie wurden 8.789 Patienten mit Entwicklungsstörungen mit einer BAC-Array-CGH untersucht, die nur die perizentrischen Regionen aller Chromosomen mit drei bis sechs sich überlappenden BAC-Klonen analysiert. In dieser Gruppe wurden vier Patientinnen mit einer perizentrischen Deletion del(16)(p11.2-p12.2) diagnostiziert. Alle vier wiesen eine expressive Sprachentwicklungsverzögerung auf. Aus diesem Grund erfolgt ein Vergleich zwischen den von Ballif beschriebenen vier Patientinnen und der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Patientin.

Alle fünf zeigten den gleichen distalen Bruchpunkt bei ungefähr 21Mb von 16pter. Dabei liegt die 7,8Mb große Deletion, der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientin, im Bereich der zuvor beschriebenen Größen von 7,1Mb, 7,9Mb und 8,7Mb.

Auffällig ist, dass alle Patienten mit diesem Deletionssyndrom weiblichen Geschlechts sind. Drei von ihnen wiesen wie die in dieser Arbeit untersuchte Patientin ein flaches Gesicht und Anomalien der Augen auf. Die Größe und das Gewicht aller Patientinnen liegen im unteren Normbereich. Bei keiner Patientin liegen diese Parametern oberhalb der 50. Perzentile. Auch die muskuläre Hypotonie wurde bei vier von fünf Patientinnen beschrieben. Des Weiteren wurde bei allen fünf von häufigen Mittelohrentzündungen berichtet.

Allerdings zeigten sich auch Unterschiede. Die Mikrocephalie wurde bei den anderen Patientinnen nicht beschrieben. Dysmorphie Ohrmuscheln bzw. nach lateral abfallende Lidachsen wie sie bei den von Ballif beschriebenen drei bzw. vier Patientinnen aufgefallen waren, wurden bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientin nicht genannt. Auch wurde bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientin weder eine Brady- noch eine Tachykardie oder eine Ebsteinanomalie beobachtet wie sie jeweils bei einer in der Studie von Ballif untersuchten Patientin aufgeführt wurde. Die in dieser Studie untersuchte Patientin litt im Gegensatz zu den anderen vier an keinen Ernährungsschwierigkeiten.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Gesichter (siehe Abbildung 11 und 12) sind jedoch Ähnlichkeiten der Gesichtszüge erkennbar.

**Abbildung 11** Abbildungen der Patientinnen mit der Deletion 16p11.2-p12.2 aus der Studie von Ballif et al.



Aus: Ballif et al., Nature Genetics, Vol. 39 (9), 2007

**Abbildung 12** Abbildungen, der in dieser Arbeit untersuchten Patientin mit der Deletion 16p12.1



#### **4.6 Phänotypen von Patienten mit einer Duplikation 17p11.2**

Die Patientin mit der Fallnummer 75 weist ein typisches Potocki-Lupski-Syndrom (PLS) auf. Nach einzelnen, isoliert berichteten Fällen wurden erstmals von Potocki et al. 2002 sieben Patienten und 2007 zusätzlich 28 Patienten beschrieben. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Häufigkeit dieses Syndroms unklar. Es wird vermutet, dass aufgrund des eher milden Phänotyps bei einem Teil der Duplikationsträger keine chromosomale Diagnostik durchgeführt wird und somit ein Teil der Patienten mit diesem Syndrom unentdeckt bleibt.

Typisch für dieses Syndrom ist die Kombination aus sprachlicher Beeinträchtigung, Entwicklungsverzögerung, muskulärer Hypotonie sowie Ernährungsschwierigkeiten in der Kindheit. Diese Merkmale fanden sich bei allen Patienten einschließlich unserer Patientin. Die nachfolgenden Merkmale wurden nicht bei allen Patienten evaluiert. Die Angaben beziehen sich nur auf zehn Patienten, die von Potocki genauer beschrieben wurden.

Bei sieben von acht Patienten wurden von Potocki autistische Züge berichtet. Bei der in dieser Arbeit untersuchten Patientin bestehen diesbezüglich unterschiedliche Angaben. In einem Bericht wird das Nichtvorhandensein von autistischen Zügen bei dieser Patientin genannt. Andere Ärzte deuten die eingeschränkte Kontaktaufnahme und schnelle Abwehr der Patientin als durchaus mit autistischen Zügen vereinbar.

Weitere Charakteristika der Patienten aus der Studie von Potocki (2007) sind eine Schlafapnoe, eine oro-pharyngeale Dysphagie sowie Veränderungen im EEG, die bei der Patientin der vorliegenden Arbeit nicht auftraten. In der augenärztlichen Untersuchung wurde bei acht Patientinnen eine Hypermetropie diagnostiziert, bei der in dieser Arbeit untersuchten Patientin wurden diesbezüglich keine Angaben gemacht. Bei ihr sowie bei vier von Potocki beschriebenen Patienten fiel bei der Geburt ein geringes Gewicht auf. Eine Anomalie des Herzens trat bei vier von Potocki beschriebenen Patienten auf. Anomalien der Niere konnten bei einem Patienten gefunden werden, während eine Skoliose im Zusammenhang mit dem PLS häufiger zu finden war.

Bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientin fielen nach der Diagnosestellung auch das typische asymmetrische Lächeln und die Zahnanomalien in Form eines engen Zahnabstands auf.

Interessant ist, dass die Duplikation dieser Region eine zur Deletion entgegengesetzte Klinik aufweist, ähnlich wie es bereits bei der dup(7)(q11.23) und dem WBS beschrieben wurde. Die del(17)(p11.2) ist mit dem Smith-Magenis-Syndrom (SMS) assoziiert. Patienten mit dem SMS zeigen häufig eine Myopie und eine Hyperlipidämie, während bei Patienten mit einem

PLS gehäuft eine Hypermetropie und ein niedriger Cholesterolspiegel beschrieben wird (Potocki et al., 2007). Bei der in dieser Arbeit untersuchten Patientin wurde jedoch weder eine Hypermetropie noch ein auffallend niedriger Cholesterolspiegel im peripheren Blut beobachtet. Ein niedriger Cholesterolspiegel wurde bei Potocki bei drei Patienten identifiziert.

#### **4.7 Phänotypen von Patienten mit einer Deletion 18p11.2**

Die Monosomie des kurzen Arms des Chromosoms 18 ist mit mehr als 150 berichteten Fällen eine der häufigsten autosomalen Deletionen (Brenk et al., 2007). Erstmals wurde die Deletion von de Grouchy et al. 1963 beschrieben (De-Grouchy Syndrom Typ I). Als typisch für die Monosomie des kurzen Arms des Chromosoms 18 werden die mentale Retardierung, die Wachstumsretardierung, kraniofaziale Dysmorphien sowie Anomalien der Genitalien, des Herzens, des Gehirns und der Augen beschrieben. Weitere charakteristische Merkmale sind der Wachstumshormonmangel sowie die Holoprosencephalie (Portnoi et al., 2007). Eine milde Sprachentwicklungsverzögerung wurde bei einem Patienten mit terminaler Deletion beobachtet. Bei ihm lag der Bruchpunkt zwischen 10.300Mb und 10.400Mb von pter im Bereich 18p11.22, also außerhalb des deletierten Bereichs des in dieser Arbeit untersuchten Patienten (10.663Mb-11.894Mb deletiert). Die Mehrzahl der von Wester et al. (2006) diagnostizierten Patienten litt an einer ausgeprägten Sprachentwicklungsverzögerung.

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patienten scheint die Deletion so klein zu sein, dass er mit Ausnahme der mentalen Retardierung mit den Patienten mit der Monosomie des kurzen Arms des Chromosoms 18 keine weiteren Gemeinsamkeiten teilt. Bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten wurden außer einer breiten Nasenwurzel keine kraniofazialen Dysmorphien beschrieben. Er lag mit seiner Geburtsgröße auf der 97. Perzentile und zeigte auch keine Organanomalien auf. Auch die von Brenk et al. (2007) in den proximalen 8Mb des kurzen Arms des Chromosoms 18 liegenden Gene für Ptosis und den kurzen Nacken scheinen außerhalb des bei unserem Patienten deletierten Bereichs zu liegen, da sie bei ihm nicht beschrieben worden sind. Wester et al. (2006) vermuteten die für die mentale Retardierung kritische Region in dem Bereich zwischen 18p11.1 und 18p11.21. Dies könnte in Einklang mit der bei unserem Patienten vorliegenden Deletion 18p11.22-p11.21 und der mentalen Retardierung zu bringen sein.

Trotzdem besteht bei dem für diese Arbeit untersuchten Patienten eine gewisse Diskordanz zwischen der kleinen Deletion mit wenigen Genen bis jetzt unbekannter Funktion und dem

ausgeprägten Phänotyp mit psychomotorischer Retardierung und der Sprachentwicklungsverzögerung (erste Worte mit 36 Monaten). Dies könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass die deletierten Gene doch eine größere Bedeutung haben als bisher angenommen. Andererseits könnte die Deletion aber auch ohne eine Bedeutung für den Phänotyp sein. Dann würde der Phänotyp eine andere Ursache als die Deletion haben. Für diese Annahme würde auch die Tatsache sprechen, dass die beiden Brüder ebenfalls geistig retardiert sind (siehe 7.5.4, Anhang). Beschrieben wurde bei ihnen allerdings keine Sprachentwicklungsverzögerung. Interessanterweise konnte bei den Brüdern durch FISH auch keine Deletion 18p11.2 nachgewiesen werden. Durch eine weiterführende Diagnostik der Brüder könnten somit Rückschlüsse über die Bedeutung dieser Deletion für die Sprachentwicklungsverzögerung und die mentale Retardierung gewonnen werden.

#### **4.8 Vergleich des Patienten mit einem Mosaik für die Deletion (22)(q13.3) mit bereits veröffentlichten Fällen**

Bei dem Patienten mit der Fallnummer 77, bei dem die Deletion 22q13.3 diagnostiziert wurde, fand sich bei der FISH Untersuchung in 11 von 15 Metaphasen eine Deletion der Region 22q13.3. Diese Signalkonstellation liegt in einem Mosaik vor. Der Patient weist in Bezug auf dieses Gen zwei verschiedene Zelllinien auf. Mosaik in diesem Bereich des Chromosoms wurden bereits früher beschrieben.

Yong et al. (1997) diagnostizierten bei einem 5 ½ Jahre alten Mädchen das erste Mal ein Mosaik im Bereich 22q13.3. Sie litt unter einer globalen Entwicklungsverzögerung, Epilepsie und einer Pigmentationsstörung. An fazialen Dysmorphiezeichen wies sie prominente Ohren und ein langes Philtrum auf.

Riegel et al. (2000) beschrieben einen durch pränatale Chromosomenanalyse diagnostizierten Fall eines Mosaiks. Bei 10 von 11 Zellen zeigte sich eine Deletion des langen Arms auf einem der Chromosomen 22. Dieser Fetus wurde wegen eines zystischen Tumors im fetalen Nacken und der oberen Thoraxöffnung in der 21. Schwangerschaftswoche auffällig. Die Schwangerschaft wurde daraufhin beendet, das Tumorgewebe war Schilddrüsengewebe. Der Fetus wies neben leichten fazialen Dysmorphiezeichen keine weiteren organischen Malformationen auf.

In beiden Fällen zeigten die Eltern unauffällige Befunde in der Region 22q13.3, was somit auf ein de novo Ereignis hinweist. Auch bei unserem Patienten zeigten die Eltern keine Deletion 22q13.3. Wahrscheinlich handelt es sich um eine postzygotische Deletion des genannten

Abschnitts auf Chromosom 22.

Die Klinik des in dieser Studie untersuchten Patienten weist Gemeinsamkeiten mit der typischen del(22)(q13.3) auf. Dazu gehören die Sprachentwicklungsverzögerung, die dysmorphen Ohrmuscheln und die Syndaktylie der 2. und 3. Zehen (Cusmano-Ozog et al., 2007) genauso wie die autistischen Züge (Goizet et al., 2000). Eher untypisch bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patienten sind der Mikrozephalus und die normotone Muskulatur. Inwieweit das Mosaik zu dem eher untypischen Phänotyp beiträgt, ist bis jetzt unklar.

## **4.9 Fazit**

In der vorliegenden Arbeit wurden somit die in der Einleitung definierten Fragen bearbeitet, wobei zusammengefasst, die folgenden Ergebnisse ermittelt wurden.

1. Die Häufigkeit der Duplikation 7q11.23 sowie der Deletion 22q13.3 wurde bei 76 von 77 Patienten mit einer sprachbetonten Entwicklungsverzögerung unklarer Ursache bestimmt. Von 76 Patienten fand sich bei einem Patienten eine Deletion 22q13.3 im Mosaik, aber bei keinem Patienten eine Duplikation 7q11.23. Mit den verwendeten Kontrollsonden konnten bei zwei Patienten andere chromosomale Aberrationen bestätigt werden. Dies waren zum einen eine Duplikation in 7q22-q31.3 und zum anderen eine Deletion in 22q11.2.
2. Mit der Array-CGH wurden zwölf Patienten untersucht. Bei acht Patienten zeigten sich keine Imbalancen, bei einem Patienten konnte die bekannte Deletion 22q13.3 bestätigt werden und bei drei Patienten konnten durch die Array-CGH neue chromosomale Aberrationen im Zusammenhang mit der Sprachentwicklungsverzögerung detektiert werden. Dies sind eine Deletion in 16p12.1, eine Duplikation in 17p11.2 und eine Deletion in 18p11.2.
3. Die Häufigkeit der Deletion 16p12.1, der Duplikation 17p11.2 und der Deletion 18p11.2 wurde mit der FISH-Technik in dem gesamten Patientenkollektiv analysiert. Die durch die Array-CGH detektierten Aberrationen konnten verifiziert werden. Es wurden aber keine weiteren Patienten mit diesen chromosomalen Aberrationen gefunden.

Folglich konnten bei sechs von 77 Patienten chromosomale Aberrationen als Ursache der Sprachentwicklungsverzögerung detektiert werden. Durch ein kombiniertes Verwenden der FISH mit der selektiven Analyse mittels Array-CGH liegt die Detektionsrate in dieser Patientengruppe bei 8%.

#### **4.10 Ausblick**

Die Detektion von chromosomalen Aberrationen bei Kindern mit einer Sprachentwicklungsverzögerung ist für die differenzialdiagnostische Abgrenzung sowie für eine optimale Therapie von entscheidender Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene chromosomale Ursachen einer Sprachentwicklungsverzögerung analysiert. Diese unterschiedlichen chromosomalen Aberrationen machen den Einsatz der FISH-Diagnostik schwierig. Besteht kein konkreter Verdacht auf ein gut charakterisiertes Syndrom, erscheint nach den vorliegenden Ergebnissen der Einsatz diverser FISH-Sonden wenig erfolgsversprechend.

Stattdessen erscheint die bereits zur Diagnostik der mentalen Retardierung eingesetzte Array-CGH ein in der Zukunft vermehrt angewandtes Verfahren darzustellen. Bei der mentalen Retardierung konnten bei bis zu 17% der Patienten durch die Array-CGH Ursachen des Krankheitsbildes gefunden werden (Stankiewicz und Beaudet, 2007).

Im Rahmen dieser Studie wurde bei 8% der Patienten mit einer Sprachentwicklungsverzögerung eine chromosomale Ursache gefunden. Es ist zu erwarten, dass durch ein verstärktes Einsetzen der Array-CGH bei Patienten mit einer Sprachentwicklungsverzögerung eine höhere Anzahl an chromosomalen Ursachen detektiert werden wird.

## 5 Zusammenfassung

Etwa 3-8% der drei- bis vierjährigen Kinder liegen ein oder mehrere Jahre in der altersentsprechenden Sprachentwicklung zurück. Die Gründe hierfür sind vielfältig und häufig unbekannt. Duplikationen der chromosomalen Region 7q11.23 sowie Deletionen in der Region 22q13.3 sind in Zusammenhang mit einer Sprachentwicklungsverzögerung beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) sowie die Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH) bei 77 Patienten mit einer idiopathischen Sprachentwicklungsverzögerung angewandt, um chromosomale Ursachen für den Phänotyp zu identifizieren. Es wurden FISH-Assays für fünf verschiedene chromosomale Regionen etabliert. Pro Assay und Patient wurden mindestens 50 Interphasen bzw. 15 Metaphasen ausgewertet.

Im Einzelnen wurden zuerst je 76 von 77 Patienten auf eine dup(7)(q11.23) sowie eine del(22)(q13.3) analysiert. Hierbei konnte ein Patient mit einer del(22)(q13.3) identifiziert werden, allerdings keiner mit der gesuchten dup(7)(q11.23). Des Weiteren wurde ein Patient mit einer dup(7)(q22-q31.3) und ein Patient mit einer del(22)(q11.2) durch die verwendeten Kontrollsonden detektiert.

Nachfolgend wurde die Array-CGH bei zwölf Patienten aus dem Kollektiv angewandt. Bei elf von ihnen wurde mit zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen keine Ursache für den Phänotyp gefunden. Dadurch wurden, neben dem durch die FISH-Analyse detektierten Patienten mit der del(22)(q13.3), zusätzlich drei neue chromosomale Aberrationen im Zusammenhang mit einer Sprachentwicklungsverzögerung diagnostiziert: Dies waren eine del(16)(p12.1), eine dup(17)(p11.2) und eine del(18)(p11.2).

Anschließend wurde das Patientenkollektiv mit Hilfe der FISH auf diese Veränderungen hin untersucht. Es fand sich jedoch kein weiterer Patient mit einer del(16)(p12.1), dup(17)(p11.2) oder del(18)(p11.2). Die FISH-Analyse der jeweiligen Eltern zeigte, dass die Aberrationen de novo entstanden sind.

Insgesamt konnte somit bei sechs von 77 Patienten mit einer idiopathischen Sprachentwicklungsverzögerung eine chromosomale Aberration nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Detektionsrate von 8%.

Durch diese Arbeit wurde gezeigt, dass bei Patienten mit einer Sprachentwicklungsverzögerung verschiedene chromosomale Aberrationen als Ursache eine Rolle spielen. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, in Zukunft die Array-CGH zur Diagnostik von Patienten mit einer ungeklärten Sprachentwicklungsverzögerung einzusetzen, sofern nicht ein klinisch hochgradiger Verdacht auf ein definiertes Syndrom besteht.

## 6 Literaturverzeichnis

Allen D. V., Bliss L. S. (1978): *Evaluation of procedures for screening preschool children for signs of impaired language development*. Bethesda: National Institute of Communicative Disorders and Stroke, Report of Project No. N01-NS-6-2355

Anderlid B. M., Schoumans J., Annerén G., Tapia-Paez I., Dumanski J., Blennow E., Nordenskjöld M. (2002): *FISH-mapping of a 100-kb terminal 22q13 deletion*. Human Genetics 110: 439-443

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 M. J., 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 syndrom of 16p11.2-p12.2*. Nature Genetics 39: 1071-1073

Barakat A. J., Pearl P. J., Acosta M. T., Runkle B. P. (2004): *22q13 deletion syndrome with central diabetes insipidus: A previously unreported association*. Clinical Dysmorphology 13: 191-194

Baroncini A., Rivieri F., Capucci A., Croci C., 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: 388–396

Berg J. S., Brunetti-Pierri N., Peters S. U., Sung-Hae L. Kang, Fong Chin-To, Salamone J., Freedenberg D., Hannig V. L., Prock L. A., Miller D. T., Raffalli P., Harris G.J., Erickson R. P., Cunniff C., Clark G. D., Blazo M. A., Peiffer D. A., Gunderson K. L., Sahoo T., Patel A., Lupski J. R., Beaudet A. L., Cheung S. W. (2007): *Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren Syndrome region*. Genetics Medicine 9: 427-441

Boenninghaus H.-G., Lenarz T. (2007): *HNO*. Springer, Heidelberg

Bonaglia M. C., Giorda R., Borgatti R., Felisari G., Gagliardi C., Selicorni A., Zuffardi O. (2001): *Disruption of the ProSAP2 Gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 Deletion Syndrom*. American Journal of Human Genetics 69: 261-268

Brenk C. H., Prott E.-C., Trost D., Hoischen A., Walldorf C., Radlwimmer B., Wieczorek D., Propping P., Gillessen-Kaesbach G., Weber R .G., Engels H. (2007): *Towards mapping phenotypical traits in 18p- syndrome by array-based comparative genomic hybridisation and fluorescent in situ hybridisation*. European Journal of Human Genetics 15: 35-44

Brunet A., Gabau E., Perich R. M., Valdesoiro L., Brun C., Caballín M. R., Guitart M. (2006): *Microdeletion and Microduplication 22q11.2 Screening in 295 Patients with clinical features of DiGeorge Syndrome*. American Journal of Medical Genetics 140: 2426-2432

Crosley C. J. (1999): *Speech and language disorders*. In: Pediatric Neurology Principles and Practice. Scraiman K. F. (Hrsg.)

Cusmano-Ozog K., Manning M. A., Hoyme H. E. (2007): *22q13.3 Deletion Syndrom: A recognizable Malformation syndrom associated with marked speech and language delay*. American Journal of Medical Genetics 145: 393-398

Delcan J., Orera M., Linares R., Saavedra D., Palomar A. (2004): *A case of a ring chromosome 22 with deletion of 22q13.3 region associated with agenesis of the corpus callosum, fornix and septum pellucidum*. Prenatal Diagnostics 24: 635-637

Depienne C., Heron D., Betancur C., Benyahia B., Trouillard O., Bouteiller D., Verloes A., LeGuern E., Leboyer M., Brice A. (2007): *Autism, language delay and mental retardation in a patient with 7q11 duplication*. Journal of Medicine Genetics 44: 452-458

Federspil P., Delb W. (2002): *Hör-, Stimm-, und Sprachstörungen*. In: Pädiatrie. Sitzmann F. C. (Hrsg.)

Flint J., Wilkie A. O. M., Buckle V. J., Winter R. M., Holland A. J., Mc Dermend H. E. (1995): *The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation*. Nature Genetics 9: 132-140

Godt, C. J. (2005): *Smith-Magenis-Syndrom (Deletion 17p11.2) und Monosomie 1p36, zwei Mikrodeletionssyndrome mit ähnlichem klinischen Phänotyp. Versuch einer Diagnosestellung bei Patienten mit einer Entwicklungsverzögerung unklarer Ätiologie*. Medizinische Dissertation, Kiel

Göbel E., Straßburg H. M., Birzer D., Schupp U. (1999): *Akustisch evozierte Potentiale (P300) bei Kindern mit zentraler Sprachentwicklungsstörung*. In: Aktuelle Neuropädiatrie. Millner M. (Hrsg.)

Goizet C., Excoffier E., Taine L., Taupiac E., El Moneim A. A., Arveiler B. (2000): *Case with autistic syndrom and chromosome 22q13.3 deletion detected by FISH*. American Journal of Medical Genetics 96: 839-844

Grouchy L., Lamy M., Theffry S., Arthuis M., Salmon C. (1963): *Dysmorphic complexe avec oligophrenie: deletion des bras courts d'un chromosome 18*. Comptes rendus de l'Académie des Sciences Série III: 1028-1029

Husemeyer N., Medizinische Dissertation, Kiel, in Vorbereitung

Kriek M., White S. J., Szuhai K., Knijnenburg J., van Ommen G. J., den Dunnen J. T., Breuning M. H. (2006): *Copy number variation in regions flanked by duplications among patients with developmental delay and/ or congenital malformations; detection of reciprocal and partial Williams Beuren duplication*. European Journal of Human Genetics 14: 180-189

Krepischi-Santos A. C. V., Vianna-Morgante A. M., Jehee F. S., Passos-Bueno M. R., Knijnenburg J., Szuhai K., Sloos W., Mazzeu J. F., Kok F., Cheroki C., Otto P. A., Mingroni-Netto R. C., Varela M., Koiffmann C., Kim C. A., Bertola D. R., Pearson P. L., Rosenberg C. (2006): *Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations*. Cytogenetic and Genome Research 115: 254-261

Koolen D. A., Reardon W., Rosser E. M., Lacombe D., Hurst J. A., Law C. J., Bongers E. M. H. F., van Ravenswaaij-Arts C. M., Leisink M. A. R., Van Kessel A. G., Veltman J. A., de Vries B. B. (2005): *Molecular characterisation of patients with subtelomeric 22q abnormalities using chromosome specific array-based comparative genomic hybridisation*. European Journal of Human Genetics 13: 1019-1024

Kumar R. A., Kar aMohamed 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: 628-638

Manning M. A., Cassidy S. B., Clericuzio C., Cherry A. M., Schwarz S., Hudcins L., Enns G. M., Hoyme H. E. (2004): *Deletion Syndrom: A newly Recognized Cause of Speech and Language Disability in the Autism Spectrum*. Pediatrics 114: 451-457

Meinecke P. (2001): *Mentale Retardierungssyndrome- vom Symptom zur Diagnose*. In: Aktuelle Neuropädiatrie. Aksu F. (Hrsg.)

Nesslinger N. J., Gorski J. L., Kurczynski T. W., Shapira S. K., Siegel-Bartelt J., Dumanski J. P., Cullen R. F Jr., French B. N., Mc Dermid H. E. (1994): *Clinical, cytogenetic, and molecular characterization of seven patients with deletions of chromosome 22q13.3*. American Journal of Human Genetics 54: 464-472

Phelan M. C., Rogers R. C., Saul R. A., Stapleton G. A., Sweet K., McDermid H., Shaw S. R., Claytor J., Willis J., Kelly D. P. (2001): *22q13 Deletion Syndrom*. American Journal of Medical Genetics 101: 91-99

Portnoi M.-F. Gruchy N., Marlin S., Finkel L., Denoyelle F., Dubourg C., Odent S., Siffroi J.-P., Le Bouc Y., Houang M. (2007): *Midline defects in deletion 18p syndrome: clinical and molecular charakterization of three patients*. Clinical Dysmorphology 16: 247-252

Potocki L., Bi W., Treadwell-Deering D., Carvalho C. M. B., Eifert A., Friedmann 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)(p11.2)) and Delineation of a Dosage-Sensitive Critical Interval that can convey an Autism Phenotype*. American Journal of Human Genetics 80: 633-647

Potocki L., Chen K.-S., Park S.-S., Osterholm D. E., Withers M. A., Kimonis V., Summers A. M., Meschino W. S., Anyane-Yeboa K., Kashork C. D., Shaffer L. G., Lupski J. R. (2000): *Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombinant reciprocal of the Smith- Magenis microdeletion*. Nature Genetics 24: 84-87

Remschmidt H., Quaschner K., Wehmeier P. M. (2002): *Sprachentwicklungsstörungen*. In: Pädiatrie. Sitzmann F. C. (Hrsg.)

Riegel M., Baumer A., Wisser J., Achermann J., Schinzel A. (2000): *Prenatal diagnosis of mosaicism for a del (22)(q13)*. Prenatal Diagnosis 20: 76-79

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

Smith D. I., Ployd M., Say B. (1996): *Detection of a familial cryptic translocation by fluorescent in situ hybridization*. Journal of Medical Genetics 33: 84-88

Somerville M. J., Mervis C. B., Young E. J., Seo E. J., del Campo M., Bamforth S., Peregrine E., Loo W., Lilley M., Perez-Jurado L. A., Morris C. A., Scherer S. W., Osborne L. R. (2005): *Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus*. New England Journal of Medicine 353: 1694-1701

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

Tariverdian G., Buselmaier W. (2003): *Humangenetik*. Springer, Berlin

Tönnies H. (2002): *Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostic*. Trends in Molecular Medicine 8: 246-250

Torniero C., Bernardina B., Novara F., Vetro A., Ricca I., Darra F., Pramparo T., Guerrini R., Zuffardi O. (2007): *Cortical dysplasia of the left temporal lobe might explain severe*

*expressive-language delay in patients with duplication of Williams-Beuren locus.* European Journal of Human Genetics 15: 62-67

Thuresson A. C., Bondeson M. L., Edeby C, Ellis P., Langford C, Dumanski J. P., Annerén G. (2007): *Whole-genome array-CGH for detection of submicroscopic chromosomal imbalances in children with mental retardation.* Cytogenetic and Genome Research 118: 1-7

Thompson P. M., Lee A. D., Dutton R. A., Geaga J. A., Hayashi K. M., Eckert M. A., Bellugi U., Galaburda A. M., Korenberg J. R., Mills D. L., Toga A. W., Reiss A. L. (2005): *Abnormal cortical complexity and thickness profiles mapped in Williams syndrome.* Journal of Neurosciences 25: 4146-4158

Watt J. L., Olson I. A., Johnston A. W., Ross H. S., Couzin D. A., Stephen G. S. (1985): *A familial pericentric inversion of chromosome 22 with a recombinant subject illustrating a 'pure' partial monosomy syndrom.* Journal of Medical Genetics 22: 283-287

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.* New England Journal of Medicine 358: 737-739

Wester U., Bondeson M.-L., Edeby C., Annerén G. (2006): *Clinical and Molecular Characterization of Individuals with 18p Deletion: A Genotype-Phenotype Correlation.* American Journal of Medical Genetics 140: 1164-1171

Wu Y, Jiang Y. W., Wang X. Z., Wang H. F., Wang J. M., Yang Y. L., Qin J., Zhong N., Wu X. R. (2007): *Detection of subtelomeric rearrangements in patients with idiopathic mental retardation/developmental delay.* Chinese Journal of Pediatrics 45: 906-911

Yong Y. P., Knight L. A., Yong M. H., Lam S., Ho L. Y. (1997): *Partial monosomy for chromosome 22 in a girl with mental retardation.* Singapore Medical Journal 38: 85-86

Yatsenko S. A., Treadwell-Deering D., Krull K., Lewis R. A., Glaze D., Stankiewicz P., Lupski J. R., Potocki L. (2005): *Trisomy 17p10-p12 Due to Mosaic Supernumerary Marker Chromosome: Delineation of Molecular Breakpoints and Clinical Phenotype, and Comparison to other proximal 17p segmental Duplication.* American Journal of Medical Genetics 138: 175-180

Zhang Z.-F., Ruivenkamp C., Staaf J., Zhu H., Barbaro M., Petillo D., Khoo S. K., Borg A., Fan Y.-S., Schoumans J. (2008): *Detection of submicroscopic constitutional chromosome aberrations in clinical diagnostics: a validation of the practical performance of different array platforms.* European Journal of Human Genetics 16: 786-792

## 7 Anhang

### 7.1 Patientenbeschreibung

Tabelle A6a Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs

Fallnummer	Aufnahmebefund				Geburtsanamnese					
	Alter (in Jahren)	Körpergröße (in P.)	Gewicht (in P.)	Kopfumfang (in P.)	Geburt < 37. SSW	Geburt > 41. SSW	Spontangeburt	Geburtsgröße (in P.)	Geburtsgewicht (in P.)	Kopfumfang (in P.)
1	4	25	20	60	0	1	1	100	95	k.A.
2	4 2 /12	10	50	25	0	0	1	100	100	100
3	3 8 /12	50	60	50	0	0	0	0	0	k.A.
4	5 6 /12	0	10	15	0	0	1	90	93	97
5	5 3 /12	100	100	k.A.	1	0	1	k.A.	15	k.A.
6	5 3 /12	k.A.	k.A.	100	0	0	1	75	75	97
7	4 10 /12	k.A.	k.A.	k.A.	1	0	0	40	90	75
8	4 3 /12	50	50	97	0	1	0	25	75	25
9	4 3 /12	10	50	0	0	0	1	25	25	0
10	4 11 /12	90	100	25	0	0	1	50	30	0
11	3 11 /12	50	0	97	1	0	1	50	5	k.A.
12	2 11 /12	50	60	3	0	0	0	90	20	90
13	1 10 /12	50	50	k.A.	0	0	1	50	25	k.A.
14	5 11 /12	k.A.	k.A.	0	0	0	k.A.	k.A.	75	k.A.
15	5 7 /12	97	k.A.	0	0	1	1	k.A.	k.A.	k.A.
16	3 9 /12	60	80	60	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
17	3 9 /12	90	97	75	0	0	0	75	25	k.A.
18	4 9 /12	25	50	50	k.A.	k.A.	k.A.	10	15	k.A.
19	2 8 /12	10	5	0	0	1	1	5	10	0
20	4 2 /12	35	30	75	0	0	0	k.A.	k.A.	k.A.
21	4 4 /12	50	100	85	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
22	2 1 /12	50	50	80	0	0	1	100	100	30
23	5 9 /12	97	100	50	0	0	0	100	10	100
24	6 1 /12	75	90	100	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
25	3 1 /12	25	90	90	0	1	1	50	93	k.A.
26	5 10 /12	3	k.A.	50	0	0	1	75	50	30
27	8 2 /12	50	80	93	1	0	1	50	20	k.A.
28	1 7 /12	25	30	100	1	0	0	75	60	75
29	4 3 /12	100	100	90	0	0	1	60	40	30
30	4	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	k.A.	55	25	k.A.
31	2 8 /12	97	50	75	1	0	k.A.	70	50	25
32	2 4 /12	50	80	k.A.	0	0	k.A.	50	50	30
33	3 1 /12	3	15	k.A.	0	0	0	75	75	55
34	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
35	4 8 /12	25	50	12	0	1	0	30	20	10
36	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
37	3 6 /12	35	40	50	0	0	1	25	75	k.A.
38	2 2 /12	75	97	90	1	0	0	97	97	100

Fallnummer	Aufnahmebefund				Geburtsanamnese					
	Alter (in Jahren)	Körpergröße (in P.)	Gewicht (in P.)	Kopfumfang (in P.)	Geburt < 37. SSW	Geburt > 41. SSW	Spontangeburt	Geburtsgröße (in P.)	Geburtsgewicht (in P.)	Kopfumfang (in P.)
39	4 5/12	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
40	4 6/12	92	100	97	0	0	1	k.A.	90	k.A.
41	6 6/12	25	50	20	0	0	0	20	10	10
42	5	80	100	k.A.	0	0	1	25	15	0
43	1 11/12	45	55	75	0	0	k.A.	75	60	75
44	2 11/12	10	25	k.A.	0	0	1	75	80	k.A.
45	9	50	k.A.	20	1	0	1	k.A.	k.A.	k.A.
46	2 11/12	50	75	100	0	0	1	80	75	90
47	6/12	25	10	40	k.A.	k.A.	k.A.	25	10	k.A.
48	4 2/12	25	75	50	0	0	1	50	50	k.A.
49	3 10/12	25	50	50	0	0	1	10	17	10
50	6 3/12	95	100	100	0	0	1	75	40	k.A.
51	3 8/12	100	100	k.A.	1	0	1	100	75	100
52	3 3/12	75	93	75	0	0	1	90	55	k.A.
53	3 9/12	75	55	75	0	1	1	75	60	93
54	2 11/12	100	100	90	0	0	1	97	90	k.A.
55	7 10/12	80	93	83	0	0	1	80	80	100
56	4 11/12	90	97	50	1	0	1	100	100	25
57	6 10/12	75	50	60	0	0	1	50	10	k.A.
58	3 7/12	25	45	25	0	0	0	6	25	5
59	5 2/12	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	k.A.	50	25	10
60	6 1/12	k.A.	k.A.	90	0	0	1	75	60	80
61	3 6/12	30	35	3	1	0	k.A.	100	97	100
62	3 4/12	95	90	93	0	0	1	75	55	75
63	3 2/12	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
64	2 9/12	85	60	75	0	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
65	4 8/12	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
66	6 8/12	25	10	20	1	0	1	50	40	100
67	6 7/12	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
68	6 10/12	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
69	4 6/12	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
70	10 4/12	75	90	97	0	0	0	55	50	75
71	2	75	10	50	0	1	1	k.A.	k.A.	k.A.
72	2 10/12	0	13	5	0	0	0	0	0	0
73	3 9/12	66	55	k.A.	1	0	1	100	90	100
74	3 2/12	0	9	0	0	0	1	65	31	30
75	3 6/12	k.A.	5	50	0	0	1	17	13	50
76	2 4/12	k.A.	89	75	0	0	k.A.	97	91	100
77	7 6/12	7	6	0	0	1	1	41	4	10
	MW: 4 3/12	MW:51	MW:52	MW:59	20,3%	14,1%	72,7%	MW: 55	MW: 49	MW:47

SSW: Schwangerschaftswoche, P.: Perzentile, k.A.: wurden keine Angaben erhoben, diese Daten blieben bei der Summenberechnung außen vor, 1: vorhanden, 0: nicht vorhanden, %: Prozent, MW: Mittelwert, 100: wurde bei der Mittelwertberechnung ausgeschlossen, da es sich hierbei um die Angabe >97. P. handelt, 3: wurde bei der Mittelwertberechnung ausgeschlossen, da es sich hierbei um die Angabe <3. P. handelt

Tabelle A6b Weitere klinische Charakteristika des Patientenkollektivs

Fallnummer	Entwicklungsdaten							Hörtest unauffällig	familiäre SEV	Muskulatur			Dysmorphien		
	SEV	erstes Wort mit (in Monaten)	gutes Sprachverständnis	mentale Retardierung	globale Retardierung	Laufen mit (in Monaten)	hypoton			hyperton	normoton	keine fazialen Stigmata	≥ 2 faziale Stigmata	dysmorphe Ohren	dysmorphe Nase
1	1	30	0	0	0	<sup>2</sup>	1	0	0	0	1	1	0	0	0
2	1	12	0	1	1	19	1	0	0	0	1	0	1	1	1
3	1	24	k.A.	1	0	23	1	0	0	1	0	0	1	0	1
4	1	12	0	1	0	14	1	1	0	0	1	1	0	0	0
5	1	12	1	0	0	18	1	1	0	0	1	0	0	1	0
6	1	36	0	1	1	rasch	1	0	0	0	1	0	1	1	0
7	1	12	1	1	1	14	k.A.	k.A.	1	0	0	1	0	0	0
8	1	k.A.	1	1	1	k.A.	1	1	0	1	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
9	1	24	1	0	1	18	1	k.A.	1	0	0	0	0	1	0
10	1	24	0	k.A.	0	k.A.	1	0	0	0	1	0	1	1	0
11	1	18	0	1	1	13	1	0	0	0	1	k.A.	k.A.	0	0
12	1	30	1	k.A.	0	24	1	1	1	0	0	0	1	0	0
13	1	18	0	1	1	k.A.	k.A.	0	0	0	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
14	1	18	k.A.	1	0	12	1	1	k.A.	k.A.	k.A.	0	1	1	0
15	1	k.A.	k.A.	1	1	12	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	1	0
16	1	18	k.A.	k.A.	0	12	k.A.	0	0	0	1	0	0	0	1
17	1	23	1	1	0	15	1	0	0	0	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
18	1	12	k.A.	1	1	18	1	1	0	0	1	1	0	0	0
19	1	30	1	1	1	18	1	k.A.	1	0	0	0	1	1	0
20	1	12	1	0	0	18	1	0	1	0	0	0	0	0	0
21	1	12	0	1	0	k.A.	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	1	0
22	1	k.A.	1	0	0	25	k.A.	k.A.	1	0	0	0	0	1	0
23	1	12	1	0	0	22	1	0	1	0	0	0	1	1	1
24	1	24	k.A.	k.A.	1	18	k.A.	k.A.	1	0	0	0	1	1	0
25	1	24	0	1	1	24	1	0	1	0	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
26	1	k.A.	k.A.	k.A.	1	16	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	1	0
27	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	30	1	1	1	0	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
28	1	19	0	1	1	<sup>3</sup>	1	1	1	0	0	0	1	1	0
29	1	14	k.A.	k.A.	1	18	1	k.A.	0	0	1	0	1	1	0
30	1	12	1	0	0	18	1	1	1	0	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
31	1	24	0	k.A.	k.A.	18	1	k.A.	1	0	0	0	1	0	1
32	1	12	k.A.	0	0	16	k.A.	k.A.	0	0	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
33	1	24	1	0	0	12	1	1	0	0	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
34	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
35	1	18	1	1	1	15	1	1	0	0	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
36	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	1	k.A.	k.A.
37	1	k.A.	0	1	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	1	0	1
38	1	20	1	0	0	20	1	k.A.	1	0	1	1	0	0	0
39	1	k.A.	k.A.	k.A.	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
40	1	k.A.	0	1	1	k.A.	1	1	0	0	1	0	0	1	0
41	1	k.A.	1	0	0	13	1	1	0	0	1	0	1	1	1

Fallnummer	Entwicklungsdaten						Hörtest unauffällig	familiäre SEV	Muskulatur			Dysmorphien			
	SEV	erstes Wort mit (in Monaten)	gutes Sprachverständnis	mentale Retardierung	globale Retardierung	Laufen mit (in Monaten)			hypoton	hyperton	normoton	keine fazialen Stigmata	≥ 2 faziale Stigmata	dysmorphe Ohren	dysmorphe Nase
42	1	24	0	1	1	16	k.A.	k.A.	0	0	1	0	0	0	0
43	1	16	0	1	0	12	0	0	0	0	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
44	1	36	0	1	1	24	0	0	1	0	0	0	1	1	0
45	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	<sup>1</sup>	1	1	1	0	0	0	1	0	1
46	1	22	1	1	1	18	1	k.A.	1	0	0	0	0	0	1
47	1	k.A.	k.A.	k.A.	1	k.A.	k.A.	k.A.	1	0	0	0	0	1	0
48	1	24	1	1	1	20	1	1	1	0	0	0	0	k.A.	k.A.
49	1	12	0	1	1	14	1	0	1	0	0	0	1	1	0
50	1	48	1	0	0	13	1	0	0	0	1	0	1	1	0
51	1	36	1	0	0	18	k.A.	0	1	0	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
52	1	24	0	1	0	<sup>2</sup>	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	1	0
53	1	24	1	0	0	<sup>3</sup>	1	k.A.	1	0	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
54	1	18	1	1	0	16	0	1	1	0	0	1	0	0	0
55	1	12	0	k.A.	0	12	k.A.	0	0	0	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
56	1	18	1	0	0	15	1	k.A.	0	0	1	0	0	0	0
57	1	14	1	k.A.	0	12	k.A.	0	0	0	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
58	1	24	k.A.	1	0	13	1	k.A.	0	0	1	0	1	1	1
59	1	k.A.	0	k.A.	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
60	1	18	0	k.A.	k.A.	16	k.A.	1	k.A.	k.A.	k.A.	0	1	k.A.	0
61	1	k.A.	1	k.A.	0	20	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	1	0	1
62	1	15	1	0	0	12	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
63	1	k.A.	k.A.	k.A.	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	0	0	0
64	1	15	0	k.A.	0	13	1	0	0	0	1	0	1	1	k.A.
65	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
66	1	k.A.	k.A.	k.A.	1	18	0	k.A.	1	0	0	1	0	0	0
67	1	k.A.	k.A.	k.A.	1	18	k.A.	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
68	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
69	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
70	1	36	0	1	1	12	1	k.A.	1	0	0	0	1	k.A.	1
71	1	12	0	1	1	<sup>1</sup>	1	k.A.	1	0	0	0	0	1	0
72	1	<sup>1</sup>	0	1	1	27	k.A.	k.A.	1	0	0	0	1	1	1
73	1	<sup>1</sup>	k.A.	1	1	k.A.	1	0	1	1	0	0	1	1	1
74	1	k.A.	1	k.A.	1	18	1	k.A.	1	0	0	0	1	0	1
75	1	k.A.	1	k.A.	1	k.A.	k.A.	k.A.	1	0	0	0	1	0	1
76	1	36	1	k.A.	1	15	1	k.A.	1	0	0	0	0	0	1
77	1	<sup>1</sup>	0	1	1	16	1	1	0	0	1	0	1	1	0
	100%	MW:21	51,9%	67,3%	54,4%	MW:17	90,2%	47,5%	52,5%	5,1%	45,8%	13%	53,7%	54,9%	32,7%

SEV: Sprachentwicklungsverzögerung, k.A.: wurden keine Angaben erhoben, diese Daten blieben bei der Summenberechnung außen vor, 1:vorhanden, 0 nicht vorhanden

<sup>1</sup> noch nicht, <sup>2</sup> normal, <sup>3</sup> verzögert, %: Prozent, MW: Mittelwert

## 7.2 Bestimmung der Nachweisgrenzen für die FISH-Sonden

In den nachfolgenden Tabellen (A7a bis A7e) wurden andere Signalkonstellationen als die regelrechte und die auf eine Deletion bzw. auf eine Duplikation hinweisende nicht separat aufgeführt.

**Tabelle A7a Bestimmung der Nachweisgrenze der Sonden LSI ELN/LSI D7S486 zur Detektion der dup(7)(q11.23)**

	Interphasen mit regelrechter Signalkonstellation für ELN-Lokus	Interphasen mit Signalkonstellation, die für eine Duplikation spricht
Kontrolle 1	90% (90/100)	3% (3/100)
Kontrolle 2	93% (93/100)	4% (4/100)
Kontrolle 3	94% (94/100)	4% (4/100)
Kontrolle 4	93% (93/100)	5% (5/100)
Mittelwert in %	92,5%	4%
SD in %	1,26%	0,82%
<i>Nachweisgrenze</i>		<b>6,5%</b>

**Tabelle A7b Bestimmung der Nachweisgrenze der Sonden LSI TUPLE1/Telo 22 zur Detektion der del(22)(q13.3)**

	Metaphasen mit regelrechter Signalkonstellation für Telo22q-Lokus	Metaphasen mit Signalkonstellation, die für eine Deletion spricht	Interphasen mit regelrechter Signalkonstellation für Telo 22-Lokus	Interphasen mit Signalkonstellation, die für eine Deletion spricht
Kontrolle 1	98% (49/50)	0% (0/50)	-	-
Kontrolle 2	98% (49/50)	0% (0/50)	92% (92/100)	4% (4/100)
Kontrolle 3	92% (46/50)	2% (1/50)	94% (94/100)	3% (3/100)
Kontrolle 4	94% (47/50)	2% (1/50)	95% (95/100)	1% (1/100)
Mittelwert in %	95,5%	1%	93,7%	2,7%
SD in %	3%	1,15%	1,53%	1,53%
<i>Nachweisgrenze</i>		<b>4,5%</b>		<b>7,3%</b>

**Tabelle A7c Bestimmung der Nachweisgrenze der Sonden RP11-184F14/CTD-2385L22 zur Detektion der del(16)(p12.1)**

	Metaphasen mit regelrechter Signalkonstellation für RP11-184F14/CTD-2385L22	Metaphasen mit Signalkonstellation, die für eine Deletion spricht	Interphasen mit regelrechter Signalkonstellation für RP11-184F14/CTD-2385L22	Interphasen mit Signalkonstellation, die für eine Deletion spricht
Kontrolle 1	94% (47/50)	6% (3/50)	-	-
Kontrolle 2	96% (48/50)	4% (2/50)	94% (94/100)	4% (4/100)
Kontrolle 3	94% (47/50)	2% (1/50)	93% (93/100)	1% (1/100)
Kontrolle 4	90% (45/50)	8% (4/50)	94% (94/100)	5% (5/100)
Mittelwert in %	93,5%	5%	93,7%	3,3%
SD in %	2,52%	2,58%	0,58%	2,08%
<i>Nachweisgrenze</i>		<b>12,7%</b>		<b>9,6%</b>

**Tabelle A7d Bestimmung der Nachweisgrenze der Sonden LSI SMS/LSI RARA zur Detektion der dup(17)(p11.2)**

	Interphasen mit regelrechter Signalkonstellation für SMS-Lokus	Interphasen mit Signalkonstellation, die für eine Duplikation spricht
Kontrolle 1	95% (95/100)	2% (2/100)
Kontrolle 2	94% (94/100)	3% (3/100)
Kontrolle 3	90% (90/100)	5% (5/100)
Kontrolle 4	93% (93/100)	3% (3/100)
Mittelwert in %	93%	3,3%
SD in %	2,16%	1,26%
<i>Nachweisgrenze</i>		<b>7,0%</b>

**Tabelle A7e Bestimmung der Nachweisgrenze der Sonden RP11-92E1/RP11-1149M8 zur Detektion der del(18)(p11.2)**

	Metaphasen mit regelrechter Signalkonstellation für RP11-92E1/-1149M8	Metaphasen mit Signalkonstellation, die für eine Deletion spricht	Interphasen mit regelrechter Signalkonstellation für RP11-92E1/-1149M8	Interphasen mit Signalkonstellation, die für eine Deletion spricht
Kontrolle 1	88% (44/50)	10% (5/50)	97% (97/100)	1% (1/100)
Kontrolle 2	94% (47/50)	6% (3/50)	-	-
Kontrolle 3	94% (47/50)	0% (0/50)	90% (90/100)	3% (3/100)
Kontrolle 4	86% (43/50)	2% (1/50)	97% (97/100)	1% (1/100)
Mittelwert in %	90,5%	4,5%	94,7%	1,7%
SD in %	4,12%	4,43%	4,04%	1,15%
<i>Nachweisgrenze</i>		<b>17,8%</b>		<b>5,1%</b>

### 7.3 FISH-Ergebnisse des Patientenkollektivs

Tabelle A8a Auswertungsergebnisse der FISH auf eine Deletion del(22)(q13.3) und eine Duplikation dup(7)(q11.23)

FISH-Untersuchung auf dup(7)(q11.23) Ausgewertete Zellen: 50 Interphasen			FISH-Untersuchung auf del(22)(q13.3) Ausgewertete Zellen: idR. 15 Metaphasen		
Pat. Nr.	Interphasen mit regelrechter Signalkonstellation für ELN-Lokus	Interphasen mit Signalkonstellation des ELN-Lokus, die für eine Duplikation spricht*	Pat. Nr.	Metaphasen mit regelrechter Signalkonstellation für Telo22q-Lokus	Metaphasen mit Signalkonstellation des Telo22q-Lokus, die für eine Duplikation spricht*
1	43	3	1	15	0
2	49	1	2	13	0
3	43	1	3	<sup>1</sup> 39	2
4	48	1	4	15	0
5	46	0	5	<sup>1</sup> 48	1
<sup>2</sup> 6	47	0	<sup>2</sup> 6	14	0
<sup>2</sup> 7	48	0	<sup>2</sup> 7	14	0
8	50	0	8	15	0
9	48	2	9	15	0
10	48	1	10	13	0
11	46	1	11	13	0
12	46	1	12	15	0
13	47	2	13	15	0
14	47	1	14	15	0
15	48	1	15	14	0
16	48	0	16	15	0
17	46	1	17	15	0
18	46	3	18	15	0
19	46	2	19	14	0
20	47	2	20	15	0
21	35	<b>12!!!</b>	21	15	0
22	46	2	22	15	0
23	47	2	23	15	0
24	48	2	24	14	0
25	45	1	25	14	0
26	47	2	26	14	0
27	46	0	27	<sup>1</sup> 43	0
<sup>2</sup> 28	47	0	<sup>2</sup> 28	15	0
29	50	0	29	15	0
30	48	1	30	15	0
31	48	2	31	15	0
32	49	0	32	<sup>1</sup> 50	0
33	46	1	33	15	0
34	46	1	34	15	0
35	47	0	35	15	0
36	47	1	36	13	0
37	48	2	37	15	0
38	46	3	38	15	0
39	45	2	39	15	0

Pat. Nr.	Interphasen mit regelrechter Signalkonstellation für <i>ELN</i> -Lokus	Interphasen mit Signalkonstellation des <i>ELN</i> -Lokus, die für eine Duplikation spricht*	Pat. Nr.	Metaphasen mit regelrechter Signalkonstellation für Telo22q-Lokus	Metaphasen mit Signalkonstellation des Telo22q-Lokus, die für eine Duplikation spricht*
240	48	2	240	15	0
41	46	2	41	15	0
42	48	2	42	14	0
43	46	0	43	15	0
244	49	1	244	15	0
45	48	0	45	14	0
46	49	1	46	15	0
47	46	0	47	15	0
48	48	1	48	15	0
49	48	0	49	15	0
50	50	0	50	15	0
51	50	0	51	15	0
52	50	0	52	15	0
53	49	1	53	15	0
54	46	1	54	15	0
55	48	1	55	14	0
56	46	0	56	<sup>1</sup> 46	3
57	49	0	57	15	0
58	50	0	58	14	0
59	49	0	59	15	0
60	49	3	60	15	0
261	43	0	261	15	0
62	49	0	62	15	0
63	45	2	63	15	0
64	46	0	64	15	0
65	48	0	65	15	0
66	48	0	66	15	0
67	50	2	67	15	0
68	47	2	68	15	0
269	45	1	269	15	0
70	47	1	70	15	0
271	48	0	271	15	0
72	0 <sup>3</sup>	0 <sup>3</sup>	72	15	0
73	48	3	73	0 <sup>3</sup>	0
74	15 Metaphasen	0 Metaphasen	74	15	0
75	kein Sediment	--	75	kein Sediment	--
76	47	1	76	<sup>1</sup> 47	1
77	45	3	77	4	<b>!!!</b>

Pat. Nr.: Patientenummer; idR: in der Regel

\* andere Signalkonstellationen wurden nicht separat aufgeführt

<sup>1</sup> bei fehlenden Metaphasen wurden 50 Interphasen ausgewertet

<sup>2</sup> Array negativ

<sup>3</sup> Aberration nicht in der Zielregion, sondern in Regionen, die durch die Kontrollsonde untersucht wurden mit !! markierte Ergebnisse: die Anzahl der Zellen mit einer Signalkonstellation, die auf eine Aberration hindeutet, liegt oberhalb der Nachweisgrenze

**Tabelle A8b** Auswertungsergebnisse der FISH auf eine Deletion del(16)(p12.1), auf eine Duplikation dup(17)(p11.2) sowie einer Deletion del(18)(p11.2)

Pat. Nr.	FISH-Untersuchung auf del(16)(p12.1) Ausgewertete Zellen: idR. 15 Metaphasen		FISH-Untersuchung auf dup(17)(p11.2) Ausgewertete Zellen: 50 Interphasen		FISH-Untersuchung auf del(18)(p11.2) Ausgewertete Zellen: idR. 15 Metaphasen	
	Metaphasen mit regelrechter Signalkonstellation für RP11-184F14, CTD-2385L22	Metaphasen mit Signalkonstellation, die für eine Deletion spricht*	Interphasen mit regelrechter Signalkonstellation für SMS-Lokus	Interphasen mit Signalkonstellation des SMS-Lokus, die für eine Duplikation spricht*	Metaphasen mit regelrechter Signalkonstellation für RP11-92E1, RP11-1149M8	Metaphasen mit Signalkonstellation, die für eine Deletion spricht*
1	15	0	43	<b>5!!</b>	15	0
2	<sup>1</sup> 48	2	48	2	15	0
3	14	1	47	2	15	0
4	14	0	44	0	14	1
5	<sup>1</sup> 48	2	45	0	<sup>1</sup> 43	3
<sup>2</sup> 6	15	0	46	1	15	0
<sup>2</sup> 7	15	0	45	4	<sup>2</sup>	<sup>2</sup>
8	13	1	47	0	14	1
9	15	0	46	0	15	0
10	13	0	49	0	15	0
11	14	0	45	4	15	0
12	<sup>1</sup> 46	0	47	0	15	0
13	14	0	44	<b>5!!</b>	15	0
14	14	1	47	0	15	0
15	15	0	48	0	15	0
16	15	0	49	0	15	0
17	13	0	44	0	15	0
18	14	0	47	2	14	0
19	14	1	40	<b>8!!</b>	14	0
20	14	0	44	3	15	0
21	14	1	44	<b>5!!</b>	15	0
22	12	0	45	0	15	0
23	14	0	43	0	15	0
24	11	1	48	2	15	0
25	14	1	42	<b>7!!</b>	15	0
26	13	0	42	0	15	0
27	14	0	43	<b>5!!</b>	15	0
<sup>2</sup> 28	15	0	46	3	<sup>2</sup>	
29	15	0	49	1	15	0
30	14	1	44	0	15	0
31	15	0	41	0	14	1
32	14	1	47	0	15	0
33	15	0	47	2	15	0
34	15	0	42	0	15	0
35	15	0	45	1	15	0
36	15	0	48	0	15	0
37	15	0	47	0	15	0
38	15	0	46	0	15	0
39	15	0	48	1	15	0
<sup>2</sup> 40	<sup>1</sup> 47	1	47	1	<sup>2</sup>	
41	15	0	46	0	14	1
42	13	0	48	0	15	0
43	15	0	46	1	15	0
<sup>2</sup> 44	15	0	47	0	<sup>2</sup>	
45	15	0	47	0	15	0
46	15	0	49	0	15	0
47	<sup>1</sup> 48	2	47	0	15	0

Pat. Nr.	Metaphasen mit regelrechter Signalkonstellation für RP11-184F14, CTD-2385L22	Metaphasen mit Signalkonstellation, die für eine Deletion spricht*	Interphasen mit regelrechter Signalkonstellation für SMS-Lokus	Interphasen mit Signalkonstellation des SMS-Lokus, die für eine Duplikation spricht*	Metaphasen mit regelrechter Signalkonstellation für RP11-92E1, RP11-1149M8	Metaphasen mit Signalkonstellation, die für eine Deletion spricht*
48	15	0	49	0	15	0
49	15	0	44	1	15	0
50	14	0	43	0	15	0
51	15	0	47	0	15	0
52	15	0	46	0	15	0
53	15	0	45	3	15	0
54	15	0	47	1	15	0
55	13	0	47	2	15	0
56	<sup>1</sup> 43	3	45	2	15	0
57	15	0	47	0	15	0
58	13	0	44	4	15	0
59	15	0	45	3	15	0
60	15	0	47	1	14	1
<sup>2</sup> 61	2		2		2	
62	15	0	44	4	15	0
63	15	0	47	3	15	0
64	15	0	45	0	15	0
65	15	0	46	1	15	0
66	15	0	42	<b>6!!</b>	15	0
67	15	0	44	4	15	0
68	15	0	45	3	15	0
<sup>2</sup> 69	15	0	45	2	15	0
70	15	0	43	4	14	1
<sup>2</sup> 71	2	2	2	2	2	2
72	3	3	3	3	3	3
73	3	3	3	3	3	3
74	0	<b>15!!</b>	3	3	3	3
75	3	3	0	<b>100!!</b>	3	3
76	3	3	3	3	0	<b>15!!</b>
77	3	3	3	3	3	3

Pat. Nr.: Patientenummer; idR: in der Regel

\* andere Signalkonstellationen wurden nicht separat aufgeführt

<sup>1</sup> bei fehlenden Metaphasen wurden Interphasen ausgewertet

<sup>2</sup> Array negativ

<sup>3</sup> chromosomale Aberration durch vorherige Untersuchungen bekannt

mit !! markierte Ergebnisse: die Anzahl der Zellen mit einer Signalkonstellation, die auf eine Aberration hindeutet, liegt oberhalb der Nachweisgrenze

## 7.4 Polymorphe Kopienzahlvarianten (CNVs)

Tabelle A9a

chr1	q31.3
chr3	p14.2
chr6	p21.31
chr8	p11.23-p11.22
chr10	q11.23
chr10	q11.23
chr14	q11.2
chr14	q32.33
chr16	q12.2

polymorphe Kopienzahlvarianten bei Patient 77 mit der del(22)(q13.3)

Tabelle A9c

chr1	q31.3
chr3	p22.3
chr3	p22.1
chr12	p12.1

polymorphe Kopienzahlvarianten bei Patient 75 mit der dup(17)(p11.2)

Tabelle A9b

chr1	q21.2
chr12	q24.33

polymorphe Kopienzahlvarianten bei Patient 74 mit der del(16)(p12.1)

Tabelle A9d

chr3	q26.1
chr4	q13.2 - q13.3
chr4	q31.21
chr5	p15.2
chr6	p21.2
chr6	p11.2
chr6	q16.3
chr7	q36.3
chr8	q12.1
chr9	p21.3
chr10	p12.1
chr10	p11.22
chr10	q26.3
chr11	q23.2 - q23.3
chr12	p13.31
chr12	p12.3
chr15	q26.1
chr22	q12.3

polymorphe Kopienzahlvarianten bei Patient 76 mit der del(18)(p11.2)

## **7.5 Klinische Charakteristika der Patienten mit chromosomalen Aberrationen**

### **7.5.1 Phänotyp der Patientin mit der Duplikation 7q22-q31.3**

Sonographisch fiel bei dieser Patientin in der Schwangerschaft eine intrauterine Wachstumsretardierung auf. Sie kam in der 37. +4 Schwangerschaftswoche bei vorzeitigem Blasensprung als erstes Kind gesunder Eltern durch Sektio zur Welt. Auffällig war, dass Gewicht, Größe sowie Kopfumfang unterhalb der 3. Perzentile lagen (1.965g; 45cm; 30,5cm). Das Fruchtwasser war grün, der Apgar lag bei 5/8/9, der Nabelschnur pH-Wert bei 7,27. Sonographisch wurde eine erstgradige Blutung im linken Seitenventrikel festgestellt. Des Weiteren besteht seit der Geburt eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie. Mit 1 Jahr waren die untersuchten Werte für Schilddrüsenhormone, Biotinidase, Acylcarnitin, very long chain fatty acids und Phytansäure im Normalbereich. Im MRT zeigte sich eine Aufweitung der äußeren Liquorräume bei altersentsprechender Myelinisierung. Mit 1 6/12 Jahren wurde bei ihr eine globale Entwicklungsverzögerung diagnostiziert. Bis zum Alter von 2 10/12 Jahren blieben die Wachstumsparameter im unteren Grenzbereich (Länge: 85cm (<3. P.), Gewicht: 11,9kg (13. P.), Kopfumfang: 47cm (5. P.)). Bis zu diesem Zeitpunkt benutzte die Patientin Silbenketten und keine Wörter, was zur Diagnose der Sprachentwicklungsverzögerung führte. Das freie Laufen mit 28 Monaten zeigte sich ebenfalls verzögert. Im Labor ergaben sich unauffällige Routineparameter und ein unauffälliges weißes Blutbild. Grenzgradig erhöht war die GOT und leicht erhöht die CHE. An Dysmorphiezeichen wies sie neben dem leichten Epikanthus dysplastische Ohren mit hypoplastischer Helix, eine hohe, vorgewölbte Stirn, einen zeltförmigen Mund mit nach unten gerichteten Mundwinkeln und einen Telekanthus auf. Weitere Auffälligkeiten waren ein kurzer Damm sowie eine thorakolumbale Skoliose. Sie litt mehrmals an lateralen Patellaluxationen, einer Pronationsstellung der Füße und wies zwei kleine Neuropori am Sacrum auf. Auch wurde bei ihr ein Strabismus convergens diagnostiziert.

### **7.5.2 Phänotyp der Patientin mit der Deletion 16p12.1**

Diese Patientin kam nach einer unauffälligen Schwangerschaft zum Termin spontan aus Schädellage zur Welt. Ihr Gewicht betrug 3.080g (31. P.) bei einer Länge von 47cm (3. P.) und einem Kopfumfang von 34cm (30. P.). Der Apgar betrug 9/10/10 und der Nabelschnur pH-Wert 7,22. Sie war das zweite Kind gesunder Eltern. Eine ältere Schwester entwickelt sich laut Angaben der Eltern unauffällig. Die Geburt sowie die Neonatalperiode verliefen unauffällig. Das reaktive Lächeln wurde bei ihr mit 4-6 Wochen beobachtet, das Wenden mit 5 Monaten, das Krabbeln mit 11 Monaten und frei Laufen konnte sie verzögert mit 18 Monaten, häufig im Zehenspitzenengang. An fazialen Dysmorphiezeichen waren bei ihr ein flaches Gesicht, eine kurze Lidspalte sowie ein flaches Philtrum mit einem kleinen Mund und schmalen oberen Lippenrot auffällig. Im Alter von 3 2/12 Jahren wurde bei ihr eine Sprachentwicklungsverzögerung in Kombination mit einer hypotonen Muskulatur diagnostiziert. Sie beherrschte zu diesem Zeitpunkt sechs Wörter bei einem gut erhaltenen Sprachverständnis. Eine Hörprüfung erbrachte unauffällige Befunde. Sie wog 12,15kg (9. P.), war 88,5cm lang (3. P.) und hatte einen Kopfumfang von 46,2cm (<3. P.). Eine MRT Untersuchung des Gehirns sowie eine Echokardiographie waren ohne pathologischen Befund. Eine mit 3 10/12 Jahren durchgeführte Knochenalterbestimmung war um ein Jahr verzögert. Im Alter von 4 11/12 Jahren sprach sie wenig, aber gelegentlich 4-Wortsätze. Sie schielte leicht nach auswärts nach bereits durchgeführter Strabismus dissecans Operation. Es bestand

bei ihr eine verstärkte Infektanfälligkeit, insbesondere eine erhöhte Neigung für Otitiden. Im Labor fanden sich Normalwerte für Elektrolyte, GOT, GPT, gGT, gesamt Bilirubin, Glucose, CRP und IgA. Pathologisch erhöht war das AP mit 282 U/l.

### **7.5.3 Phänotyp der Patientin mit der Duplikation 17p11.2**

Die Geburt dieser Patientin erfolgte nach einer unauffälligen Schwangerschaft spontan, termingerecht und mit unauffälligen Wachstumsparametern (Größe: 49cm (17. P.), Gewicht 2.780g (13. P.), Kopfumfang: 34,5cm (50. P.)). Die Apgar-Werte lagen bei 7/9/10. Die Neonatalzeit war, bis auf eine muskuläre Hypotonie, unauffällig, das Neugeborenen-Screening ohne pathologischen Befund. Sie begann verspätet festes Essen zu sich zu nehmen und litt durch ein vermehrtes Mundöffnen an einem starken Speichelfluss. Sie schrie viel und zeigte schnell Abwehrmechanismen. Auf Lichtreize reagierte sie empfindlich, z.B. auf Lichtenmachen in einem dunklen Raum. Des Weiteren fiel auf, dass die Patientin starke Reize brauchte, um Außenreize wahrzunehmen. An fazialen Dysmorphiezeichen fielen ein kleines Mittelgesicht, ein Epikanthus, lateral abfallende Lidachsen sowie eine breite Nasenwurzel auf. Des Weiteren waren ein enger Zahnabstand sowie ein asymmetrisches Lächeln erkennbar. Seit dem dritten Lebensjahr erhielt sie aufgrund der muskulären Hypotonie Krankengymnastik und im Kindergarten Frühförderung. Im Alter von 3 4/12 Jahren wurde sie als ein freundliches Mädchen mit gutem Blickkontakt beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt sprach sie sehr wenig und undeutlich, während das rezeptive Sprachverständnis auf deutsch und französisch vorhanden war. Motorisch und feinmotorisch war sie sehr geschickt. Ein MRT sowie ein Hörtest waren unauffällig. Im Alter von 3 6/12 Jahren war die Patientin 11,2kg schwer (5. P.) und hatte einen Kopfumfang von 49,5cm (50. P.).

### **7.5.4 Phänotyp des Patienten mit der Deletion 18p11.2**

Dieser Patient wurde als dritter Sohn nach einer unauffälligen Schwangerschaft zum Termin geboren. Seine Geburtsmaße lagen im oberen Grenzbereich (Länge: 56cm (97. P.), Gewicht: 4.000g (91. P.), Kopfumfang: 38cm (>97. P.)). Die Apgar-Werte betragen 10/10. Er fiel durch einen Ikterus sowie eine Neugeboreneninfektion auf. Relativ früh im Säuglingsalter machte sich eine Entwicklungsverzögerung bemerkbar. Diese war im motorischen Bereich gering ausgeprägt (Krabbeln mit 12 Monaten, freies Laufen mit 15 Monaten). Er war genauso wie seine beiden älteren Brüder geistig retardiert. Dysmorphiezeichen wurden außer einer breiten Nasenwurzel nicht beschrieben. Im Alter von 2 4/12 Jahren war der Patient 15kg schwer (89. P.) und hatte einen Kopfumfang von 51cm (75. P.). Zu diesem Zeitpunkt wurde bei ihm eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung mit einer ausgeprägten sprachlichen Entwicklungsverzögerung bei nahezu fehlender aktiver Sprache diagnostiziert. Er lauterte viel und wendete Silbenverdopplung an, allerdings ohne gerichtete Wörter zu benutzen. Der Patient begann verspätet im dritten Lebensjahr die ersten Worte zu sprechen. Bei der neurologischen Untersuchung fiel eine muskuläre Hypotonie auf. Des Weiteren benutzte der Patient häufig den Zehenspitzenang. Der Hörbefund war unauffällig, eine Innenohrschwerhörigkeit, eine zentrale Schwerhörigkeit sowie eine Schalleitungsschwerhörigkeit wurden ausgeschlossen. Im Labor waren das Blutbild, die Elektrolyte, Kreatinin, GOT, GGT, CK, die Schilddrüsenhormone und das Acylcarnitin genauso wie die organischen Säuren im Urin unauffällig. Die Alaninwerte waren leicht erhöht.

### **7.5.5 Phänotyp des Patienten mit der Deletion 22q11.2**

Es handelt sich um einen männlichen Patienten, der nach unkomplizierter Schwangerschaft 3 Wochen vor Termin spontan aus Schädellage zur Welt kam. Seine Maße waren im oberen Grenzbereich (Gewicht: 3.560g (90. P.), Länge: 60cm (>97. P.), Kopfumfang: 36cm (>97.P.)). Die Geburt verkomplizierte sich durch eine Nabelschnurumschlingung. Der Apgar betrug 9/10/10. In der Neonatalperiode wurde eine muskuläre Hypertonie, eine submuköse Spalte im weichen Gaumen sowie ein subaortaler, perimembranöser Ventrikelseptumdefekt und ein persistierendes Foramen ovale diagnostiziert. Bis zum 6. Monat verlief die Entwicklung unauffällig. Danach fremdelte der Patient nicht. Weiter auffällig waren die Selbst- und Fremdaggressionen. Ab dem 3. Lebensmonat begann der Patient mit den Zähnen zu knirschen und Stereotypen wie Schaukelbewegungen zu zeigen. Im 14. Lebensmonat wurden nach einem unauffälligen EEG im MRT temporal und frontal relativ betonte Liquorräume beschrieben. Die Laborwerte lagen im Normalbereich für Quick, Fibrinogen, Elektrolyte, Kreatinin, GOT, GPF, GGT, AP, Glu, Laktat, Ammoniak und CRP. Weiter diagnostiziert wurden eine Tubensekretionsstörung und ein beidseitiger Paukenerguss ohne Hörminderung. Eine augenärztliche Untersuchung und eine Lumbalpunktion waren unauffällig. Im Alter von 14 Monaten wurde im Denver Test der Verdacht auf einen Autismus gestellt mit einer feinmotorischen sowie sprachlichen Entwicklung entsprechend der eines sechs Monate alten Kindes. Mit 3 9/12 Jahren galt er als psychomotorisch retardiert und konnte noch keine Wörter oder Silben sprechen. Wachstumsparameter waren im Normalbereich (Größe: 104cm (66. P.), Gewicht: 16,5kg (55. P.)). Es wurde eine muskuläre Rumpfhypotonie und eine Hypertonie der Extremitätenmuskeln beschrieben. Der Patient litt an Epilepsie. Neben tief ansetzenden Ohren fielen bei diesem Patienten ein Hypertelorismus, eine breite Nasenwurzel sowie nach lateral abfallende Lidachsen auf.

### **7.5.6 Phänotyp des Patienten mit der Deletion 22q13.3**

Der Patient wurde nach einer unauffälligen Schwangerschaft eine Woche nach Termin spontan aus Schädellage geboren. Auffällig war das grüne Fruchtwasser. Seine Maße waren im unteren Normbereich (Länge: 51cm (41. P.), Gewicht: 2.520g (4. P.), Kopfumfang: 34cm (10. P.)). Bei einem Apgar von 10/10 wirkte er dystroph.

Die kurdischen Eltern sind entfernt verwandt, die Urgroßväter der Eltern waren Cousins. Seine beiden älteren Schwestern sowie seinen jüngeren Bruder beschrieben die Eltern als gesund. Sitzen konnte der Patient mit 7 Monaten, Krabbeln mit 9 Monaten, stehen mit 13 Monaten und laufen mit 16 Monaten. Der Patient wurde bis zum dritten Lebensjahr „zwangsgefüttert“, er weinte viel und brauchte wenig Schlaf. Im Alter von 4 1/12 Jahren erfolgte mit dem Münchner funktionellen Entwicklungs-Diagnostik Test eine Einschätzung seiner allgemeinen Entwicklung. Demnach entsprach sein Entwicklungsstand dem eines 20 Monate alten Kindes. Mit 4 1/12 Jahren erfolgte der Ausschluss einer Hörstörung. Auch wurden keine vermehrten Infektionen im HNO Bereich beschrieben. Mit 4 6/12 Jahren wurde ein aggressives Verhalten gegenüber anderen Kindern beobachtet und es bestanden Einschlafschwierigkeiten. Des Weiteren fiel ein Strabismus convergens am rechten Auge auf sowie eine beidseitige Syndaktylie der zweiten und dritten Zehe. Diese soll auch bei seiner Mutter vorliegen. Im Alter von 7 6/12 Jahren zeigte eine MRT Untersuchung einen regelrechten Befund. Beim Röntgen der Hand war diese normal strukturiert und entsprach dem Knochenalter eines 5 10/12 Jahre alten Jungen. Seine Wachstumsparameter lagen im unteren Grenzbereich: 119cm (7. P.), 21kg (9. P.) Kopfumfang 50cm (<3. P.). Die Schilddrüsenhormone waren für FT4 leicht erhöht und für FT3 leicht erniedrigt bei einem TSH im Normalbereich. Bis zum siebten Lebensjahr fehlte jegliche Sprachproduktion. Eine familiäre Sprachentwicklungsverzögerung wurde mütterlicherseits beschrieben.

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Siebert danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, für seine stetige Unterstützung und für die Möglichkeit, die Ergebnisse auf dem Norddeutschen Humangenetiker Treffen in Rostock vorstellen zu können.

Frau Dr. A. Caliebe spreche ich meinen herzlichen Dank aus für ihre Hilfe und Betreuung bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit sowie ihrer Unterstützung bei der Auswertung der FISH-Präparate.

Herrn Prof. Dr. U. Stephani und Frau Dr. K. Bruhn danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung der Patientendaten aus der Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Herrn Dr. S. Gesk gilt ein besonderer Dank dafür, dass er mit mir für die Auswertung der FISH-Präparate viele Abende hungrig vor dem Mikroskop verbrachte, mir bei der Auswahl der FISH-Sonden half, mich in hilfreiche Internetseiten einführte und er sich immer Zeit für mich nahm.

Frau Dr. M. Kautza danke ich für das Überlassen von Patientendaten und für ihre unkomplizierte Hilfe beim Auffinden von Patienteninformationen.

Herrn Dr. JI. Martin-Subero sage ich „muchísimas gracias“ für die immer gut gelaunte Hilfe bei der Auswertung der Arrays sowie der stets prompten Beantwortung meiner Emailanfragen.

Herrn Dr. H. Tönnis danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der FISH-Präparate.

Den Mitarbeitern der einzelnen Labore danke ich sehr herzlich für die Einführung und Unterstützung bei der FISH- sowie Array-CGH-Technik, insbesondere Frau C. Becher und Frau D. Schuster seien hier erwähnt.

Des Weiteren möchte ich ganz herzlich Frau M. Krusek danken, die aus der hässlichsten Zellsuspension 15 schöne Metaphasen hervorzaubern konnte und mir immer psychologischen Beistand leistete sowie bei Frau M. Ratjen mit ihrem Wissensschatz zu FISH und Array-Technik, mit dem sie mich stets unterstützte.

Herrn C.-P. Blohm danke ich für seine bereitwillige Wissensweitergabe, Stichwort TIFF: Tag Image File Format.

Frau Dubrowski danke ich für die freundliche, fröhliche Hilfe in den Aktenbergen des Archiv der Klinik für Pädiatrie, die mich selbst in den schönsten Frühlingstagen motivierte, einige Stunden länger bei ihr im Archiv zu verweilen.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Angela Sternkopf

Geburtsjahr: 1983

### Schulausbildung:

1994-2003  
Gymnasium  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulstudium:

2003-2010  
Studium der Humanmedizin an der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2010  
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2009-2010  
Praktisches Jahr

2006  
Auslandssemester in Spanien

2005  
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Kiel, den 20.07.2010