

Aus der Abteilung Humangenetik  
(Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Engel)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Subtelomere Chromosomenveränderungen  
mittels quantitativer Real-Time PCR bei Patienten mit mentaler Retardierung und  
normalem zytogenetischem Chromosomensatz

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Verena Brümmer  
aus  
Filderstadt

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. I. Bartels

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. P. Huppke

Tag der mündlichen Prüfung: 13. April 2011

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	3
Abbildungsverzeichnis .....	4
Abkürzungen .....	5
1. Einleitung .....	8
1.1 Mentale Retardierung .....	8
1.2 Ätiologie der mentalen Retardierung .....	8
1.3 Diagnosestellung .....	9
1.4 Die Subtelomerregion .....	10
1.5 Polymorphismen .....	13
1.6 Score nach de Vries et al. (2001) .....	14
1.7 Methoden zur Untersuchung der Subtelomere .....	15
1.7.1 Multiprobe Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung .....	15
1.7.2 Multiplex Amplifiable Probe Hybridization .....	15
1.7.3 Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification .....	16
1.7.4 Array-Comparative Genome Hybridization .....	17
1.8 Ziel dieser Arbeit .....	17
2. Material und Methoden .....	19
2.1 Isolierung humaner genomischer DNA aus Blutlymphozyten .....	19
2.2 Die quantitative Real-Time-PCR mit SYBR-Green Dye .....	19
2.3 Detektoren .....	20
2.4 Untersuchung der elterlichen DNA .....	23
2.5 Bestätigung der Ergebnisse mittels FISH oder MLPA .....	23
2.6 Patientenkollektiv .....	23
2.6.1 Patienten .....	23
2.6.2 Einschlusskriterien .....	23
3. Ergebnisse .....	25
3.1 Detektionsrate .....	25
3.2 Bestätigung der Ergebnisse der Real-Time-PCR .....	27
3.3 Größe der subtelomeren Veränderungen .....	27
3.3.1 Fall 1 .....	29
3.3.2 Fall 2 .....	30
3.3.3 Fall 3 .....	30
3.3.4 Fall 4 .....	30
3.3.5 Fall 5 .....	30
3.3.6 Fall 6 .....	30
3.3.7 Fall 7 .....	30
3.3.8 Fall 8 .....	31
3.3.9 Fall 9 .....	31

3.3.10 Fall 10.....	31
3.3.11 Fall 11.....	31
3.3.12 Fall 12.....	31
3.3.13 Fall 13.....	31
3.3.14 Fall 14.....	32
3.3.15 Fall 15.....	32
3.3.16 Fall 16.....	32
3.3.17 Fall 17.....	32
3.4 Klinische Beschreibung der Patienten mit subtelomeren Veränderungen.....	32
3.4.1 Fall 1.....	32
3.4.2 Fall 2.....	33
3.4.3 Fall 3.....	34
3.4.4 Fall 4.....	34
3.4.5 Fall 5.....	35
3.4.6 Fall 6.....	35
3.4.7 Fall 7.....	36
3.4.8 Fall 8.....	36
3.4.9 Fall 9.....	36
3.4.10 Fall 10.....	37
3.4.11 Fall 11.....	37
3.4.12 Fall 12.....	37
3.4.13 Fall 13.....	37
3.4.14 Fall 14.....	37
3.4.15 Fall 15.....	37
3.4.16 Fall 16.....	38
3.4.17 Fall 17.....	38
3.5 Auswertung des De-Vries-Scores.....	38
4. Diskussion .....	40
4.1 Die submikroskopischen, subtelomeren Veränderungen.....	40
4.1.1 Untersuchungsmethoden.....	40
4.1.2 Polymorphismen.....	40
4.2 Klinische Beschreibung der Patienten.....	42
4.3 Detektionsrate.....	42
4.4 Der Score nach de Vries et al. (2001).....	43
4.5 Bedeutung der Subtelomerdiagnostik und Ausblick .....	43
Zusammenfassung.....	47
Anhang.....	48
Literaturverzeichnis.....	68

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Checkliste nach de Vries et al. (2001).....	14
Tabelle 2: Detektoren Set A und B.....	21
Tabelle 3: Übersicht über die Patienten mit subtelomerer Aberration.....	25
Tabelle 4: Verifizierung der gefundenen subtelomeren Aberrationen.....	27
Tabelle 5: Fall 6, Detektoren.....	28
Tabelle 6: Fall 6, Deletion 6q.....	28
Tabelle 7: Absolute Verteilung des Scores nach de Vries et al. (2001).....	38
Tabelle 8: Absolute und prozentuale Verteilung des Scores nach de Vries et al. (2001).....	39
Tabelle 9: Überblick über Studien zum subtelomeren Screening.....	42
Tabelle 10: Anteil subtelomerer Aberrationen in genomweiten Array-Studien.....	44
Tabelle 11: Gendichte der Subtelomere.....	45
Tabelle 12: Fall 1, Detektoren.....	48
Tabelle 13: Fall 1, Duplikation 9p.....	49
Tabelle 14: Fall 1, Deletion 13q.....	50
Tabelle 15: Fall 2, Detektoren.....	51
Tabelle 16: Fall 2, Duplikation 6p.....	51
Tabelle 17: Fall 2, Deletion 11q.....	52
Tabelle 18: Fall 3, Detektoren.....	53
Tabelle 19: Fall 3, Deletion 4p.....	53
Tabelle 20: Fall 4, Detektoren.....	54
Tabelle 21: Fall 4, Deletion 1q.....	54
Tabelle 22: Fall 4, Duplikation 2p.....	55
Tabelle 23: Fall 5, Detektoren.....	56
Tabelle 24: Fall 5, Duplikation 19q.....	57
Tabelle 25: Fall 7, Detektoren.....	58
Tabelle 26: Fall 7, Deletion 1q.....	58
Tabelle 27: Fall 10, Detektoren.....	59
Tabelle 28: Fall 10, Deletion 20q.....	59
Tabelle 29: Fall 11, Detektoren.....	60
Tabelle 30: Fall 11, Duplikation 10q.....	60
Tabelle 31: Fall 12, Detektoren.....	61
Tabelle 32: Fall 12, Duplikation 7p.....	62
Tabelle 33: Fall 13, Detektoren.....	63
Tabelle 34: Fall 13, Duplikation 7p.....	63
Tabelle 35: Fall 15, Detektoren.....	64
Tabelle 36: Fall 15, Duplikation 7p.....	64
Tabelle 37: Fall 16, Detektoren.....	65
Tabelle 38: Fall 16, Deletion 5p.....	65
Tabelle 39: Fall 17, Detektoren.....	66
Tabelle 40: Fall 17, Deletion 8p.....	67

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ätiologie der mentalen Retardierung.....	9
Abbildung 2: Klinische und genetische Evaluation mentaler Retardierung.....	10
Abbildung 3: Die Subtelomerregion.....	11
Abbildung 4: Anzahl subtelomerer Imbalancen bezogen auf das Chromosom.....	12
Abbildung 5: Prinzip der MAPH.....	16
Abbildung 6: Prinzip der MLPA.....	17
Abbildung 7: Fall 6, Deletion 6q.....	29
Abbildung 8: Fall 6, Deletion 6q.....	29
Abbildung 9: Photographien von Patient 1.....	33
Abbildung 10: Fotografien von Patientin 2.....	34
Abbildung 11: Fotografien von Patientin 4.....	35
Abbildung 12: Fall 1, Duplikation 9p.....	49
Abbildung 13: Fall 1, Deletion 13q.....	50
Abbildung 14: Fall 2, Duplikation 6p.....	51
Abbildung 15: Fall 2, Deletion 11q.....	52
Abbildung 16: Fall 3, Deletion 4p.....	53
Abbildung 17: Fall 4, Deletion 1q.....	55
Abbildung 18: Fall 4, Duplikation 2p.....	56
Abbildung 19: Fall 5, Duplikation 19q.....	57
Abbildung 20: Fall 7, Deletion 1q.....	59
Abbildung 21: Fall 10, Deletion 20q.....	60
Abbildung 22: Fall 11, Duplikation 10q.....	61
Abbildung 23: Fall 12, Duplikation 7p.....	62
Abbildung 24: Fall 13, Duplikation 7p.....	63
Abbildung 25: Fall 15, Duplikation 7p.....	65
Abbildung 26: Fall 16, Deletion 5p.....	66
Abbildung 27: Fall 17, Deletion 8p.....	67

## Abkürzungen

A	Adenin
ABI	Applied Biosystems
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom
al.	alii
ASD	Atriumseptumdefekt
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Konzentration/Absorption
C	Cytosin
C <sub>t</sub>	Schwellenwertzyklus
CCT	kraniales Computertomogramm
CDG	Carbohydrate-Deficient Glykoprotein
CGH	Comparative Genome Hybridization
cm	Zentimeter
CNP	Copy Number Polymorphism
CNV	Copy Number Variation
d	Tag
d. h.	das heißt
del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dup	Duplikation
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EV	Entwicklungsverzögerung
f	Verdünnungsfaktor
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
g	Gramm
G	Guanin
GM	German Modification
H <sub>2</sub> O	Wasser
ICD	International Classification of Disease
IQ	Intelligenzquotient
j	Jahre
K	Konzentration
kb	Kilobasen
k. E.	keine Einordnung möglich
kg	Kilogramm

M	männlich
m	Monat
MAPH	Multiplex Amplifiable Probe Hybridization
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MoM	Multiple of Median
MR	Mentale Retardierung
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n. b.	nicht bestimmt
n. e.	nicht erfolgt
n. u.	nicht untersucht
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OFC	Okzipitofrontaler Kopfumfang
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men
p	kurzer Arm des Chromosoms
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
Pt.	Patient
PTPN11	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11
q	langer Arm des Chromosoms
Q	Quantität
ROX	X-Rhodamin
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
S.	Seite
SCA	Segmentale chromosomale Aneusomie
SDS	Sequenz-Detektionssystem-Software
SE-Puffer	Saline-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
SNP	Single Number Polymorphism
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
UCSC	University of California Santa Cruz
UPD	Uniparentale Disomie
UTP	Uridintriphosphat
vgl.	vergleiche
W	weiblich

WHS  
z. B.

Wolf-Hirschhorn-Syndrom  
zum Beispiel

## 1. Einleitung

### 1.1 Mentale Retardierung

In der Internationalen Klassifikation der Krankheiten, der sogenannten „ICD-10-GM Version 2010“, wird mentale Retardierung als „ein Zustand von verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten“ definiert. „Besonders beeinträchtigt sind Fertigkeiten, die sich in der Entwicklungsperiode manifestieren und die zum Intelligenzniveau beitragen, wie Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten“ (Graubner 2010, S. 366). Bei Kindern ist eine Einordnung des Schweregrades der mentalen Retardierung anhand standardisierter Verfahren erst ab einem Alter von 5 Jahren zuverlässig möglich, weswegen man bei kleineren Kindern den Begriff „Entwicklungsverzögerung“ bevorzugt (Schroeder et al. 2002).

In den Industrieländern gelten 1-3 % der Bevölkerung als mental retardiert, wobei leichte Formen der mentalen Retardierung am Häufigsten vorkommen.

### 1.2 Ätiologie der mentalen Retardierung

Eine ätiologische Klärung ist nur in circa 40 % der Fälle möglich (Rauch et al. 2006). Zu den Ursachen der mentalen Retardierung zählen genetische und exogene Faktoren. Letztere können prä-, peri- und postnatal durch fetale Infektionen (z. B. Rötelymbryopathie), Intoxikationen (z. B. Alkoholymbryopathie), Frühgeburten, Traumata sowie perinatale Komplikationen eine mentale Retardierung des Kindes verursachen (Chelly et al. 2006).

Eine genetische Ätiologie findet sich, abhängig vom jeweiligen Kollektiv, in 19,9 % bis 39,5 % (Hunter 2000; Rauch et al. 2006) der Fälle. Die genetischen Ursachen sind sehr heterogen. Mit der konventionellen Zytogenetik lassen sich strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen, wie eine Trisomie 21, nachweisen. Submikroskopische, d. h. kryptische Chromosomenveränderungen, können in den subtelomeren oder interstitiellen Chromosomenabschnitten zu Imbalancen führen. Es kommen auch Dysregulationen von Genen in Frage, wie beispielsweise beim Prader-Willi-Syndrom. Weitere Ursachen stellen monogenetische Erkrankungen wie das Fragile-X-Syndrom dar (Chelly et al. 2006). Eine Übersicht über die Häufigkeit der zu Grunde liegenden Ätiologien geben Rauch et al. (2006) (s. Abbildung 1). Insgesamt haben Inlow und Restifo (2004) in der Datenbank OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man (National Center for Biotechnology Information: Online Mendelian Inheritance in Man, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>, Stand 30.08.2010), über eintausend Einträge gefunden, die phänotypisch mit mentaler Retardierung einhergehen können. Eine ätiologische Einordnung der mentalen Retardierung eines Patienten gestaltet sich folglich aufgrund der Vielfalt der möglichen Ursachen häufig schwierig.

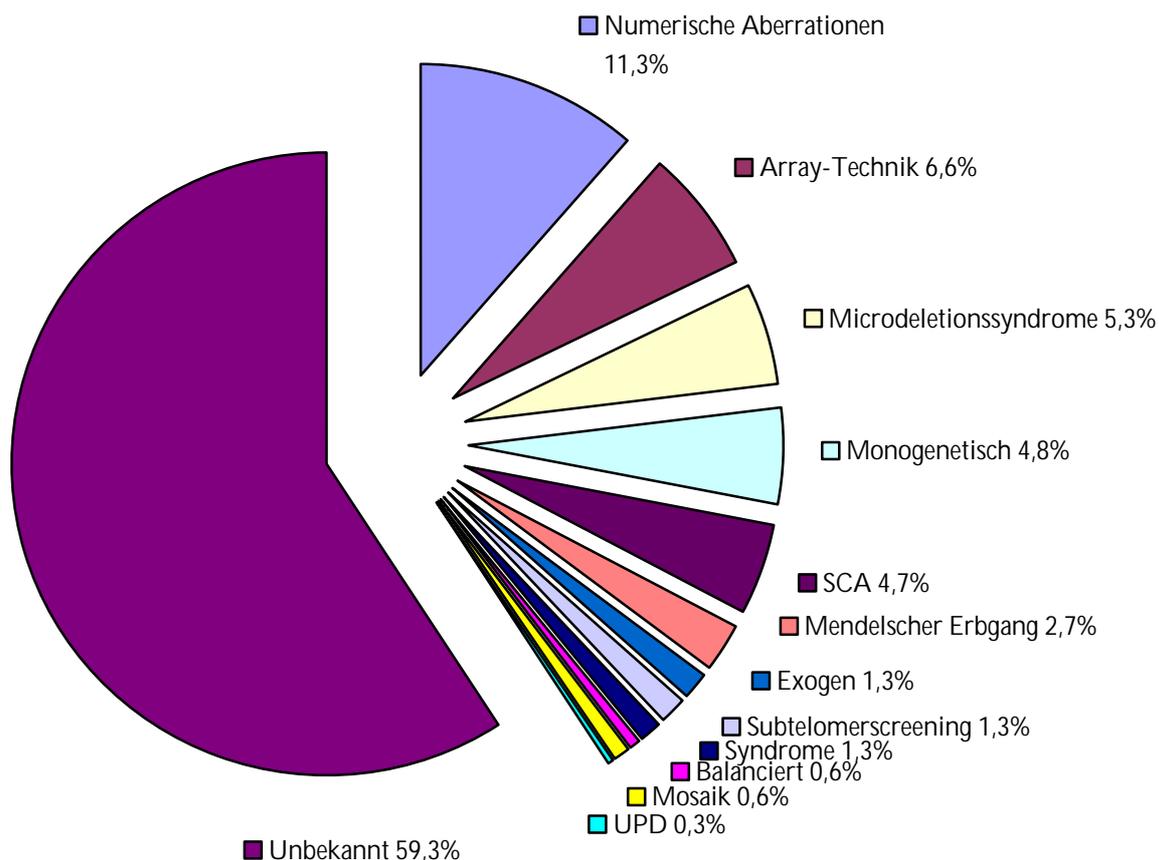


Abbildung 1: Ätiologie der mentalen Retardierung

Einteilung der ätiologischen Ursachen anhand verschiedener diagnostischer Gruppen: Array-Technik = mit Array-CGH festgestellte Aberration; Mikrodeletionssyndrome = klinische Syndrome, mit FISH-Sonden nachgewiesen; Monogenetisch = nachgewiesene monogen bedingte Ursache; SCA = segmentale chromosomale Aneusomie; Mendelscher Erbgang = unklassifizierte MR mit nachgewiesener Mendelscher Vererbung; Exogen = Exogen bedingte mentale Retardierung; Subtelomerscreening = bei Untersuchung der Subtelomere festgestellte Aberration; Syndrome = klinisch diagnostizierte Syndrome ohne bekannte Ätiologie; Balanciert = konventionell zytogenetisch oder mit subtelomerer FISH-Analyse festgestellte, de novo entstandene, balancierte Aberrationen; Mosaik = Gewebemosaik, nicht im Blut nachweisbar ; UPD = uniparentale Disomie; Unbekannt = mentale Retardierung unklarer Ätiologie (Rauch et al. 2006, S. 2071).

### 1.3 Diagnosestellung

Die Kenntnis der Ursache der mentalen Retardierung hat große Bedeutung. Sie hat Einfluss auf die betroffene Person und ihre Familie. Lenhard et al. (2005) haben gezeigt, dass eine ätiologische Diagnose für die Beratung der Familien essentiell ist. Mit dem Wissen über die Ursache der mentalen Retardierung können die Familien über die Wahrscheinlichkeit der Vererbung, die Prognose und Behandlungsmöglichkeiten aufgeklärt werden. Zusätzlich kann der Kontakt zu anderen Betroffenen für die Familien eine Erleichterung der Situation bedeuten. All diese Aspekte erleichtern den Weg der Familien zur Akzeptanz der Erkrankung (Lenhard et al. 2005). Die einzelnen Aspekte der mentalen Retardierung mit ihren medizinischen und sozialen Konsequenzen haben zusätzlich einen wichtigen Stellenwert in der Gesellschaft, da eine adäquate Förderung der Betroffenen gewährleistet werden sollte.

Die genetische Diagnostik bei mentaler Retardierung ist sehr komplex. Mittlerweile steht die Array-Technik zur Verfügung, welche die Untersuchung des gesamten Genoms ermöglicht. Zu Beginn dieser Studie war diese Technik jedoch keineswegs ein gängiges Verfahren im Bereich der Diagnostik bei mentaler Retardierung. Aus diesem Grund war ein diagnostischer Leitfaden von Nöten, um die Nützlichkeit diagnostischer Schritte abzuschätzen. Sofern das klinische Bild sowie die Patienten- und Familiengeschichte keinen Hinweis auf ein bestimmtes Erkrankungsbild liefern oder wenn ein klinisch vermutetes Syndrom durch die entsprechende Diagnostik nicht bestätigt werden kann, folgen Chromosomenanalyse, Subtelomerdiagnostik und die Untersuchung auf Fragiles-X-Syndrom (Moeschler und Shevell 2006; van Karnebeek et al. 2005)(s. Abbildung 2).

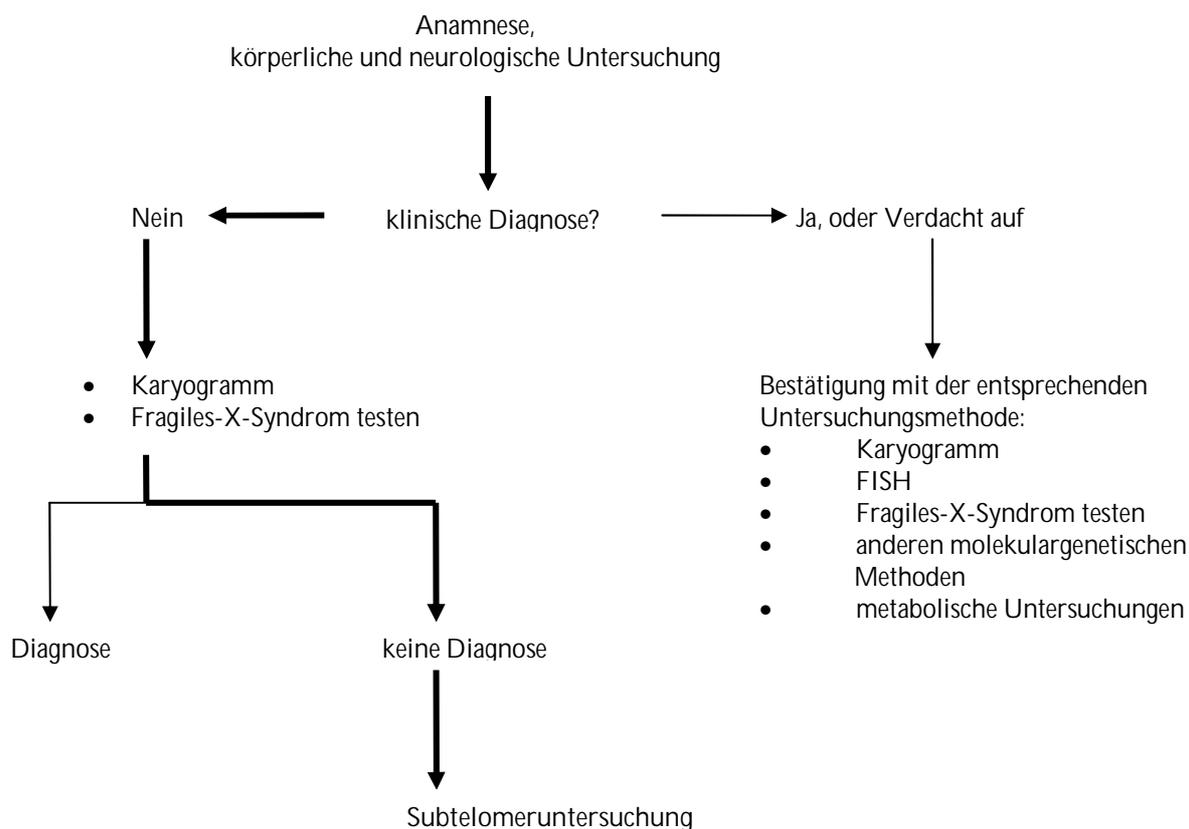


Abbildung 2: Klinische und genetische Evaluation bei mentaler Retardierung

Das Schema zeigt den diagnostischen Weg bei Patienten mit mentaler Retardierung (Moeschler und Shevell 2006, S. 2307).

#### 1.4 Die Subtelomerregion

Am Ende jedes Chromosomenarms befinden sich 2-20 Kilobasenpaare repetitiver Sequenzen mit der Basenfolge  $(TTAGGG)_n$  – die Telomere. Sie sollen das Genom bei der Replikation vor Verlust kodierender Bereiche schützen und eine Zusammenlagerung zweier Chromosomen verhindern. Direkt proximal zu diesen repetitiven Sequenzen liegen die subtelomeren Bereiche (A, B und C, s. Abbildung 3). An diese wiederum schließt sich in Richtung Zentromer die spezifische genomische Sequenz des entsprechenden Chromosoms an. Innerhalb der subtelomeren Bereiche befinden sich Blöcke repetitiver DNA, die starke Homologien zu anderen Chromosomenbereichen zeigen. Für die Chromosomen 4p, 4q, 16p, 18p, 20p und 22q ist die Aufteilung der Subtelomere in zwei Bereiche beschrieben (s. Abbildung 3). Der distale Anteil A besteht aus der repetitiven DNA und zeigt viele

Homologien. Durch  $(TTAGGG)_n$ -Sequenzen getrennt, liegt der weniger repetitive Anteil B, der distal in die chromosomenspezifische nicht-repetitive Subtelomersequenz C übergeht (Chute et al. 1997; Flint et al. 1997; Flint und Wilkie 1996). Die subtelomeren kryptischen Aberrationen und deren Quantifizierung, um die es in dieser Studie geht, liegen in diesen spezifischen Abschnitten C.

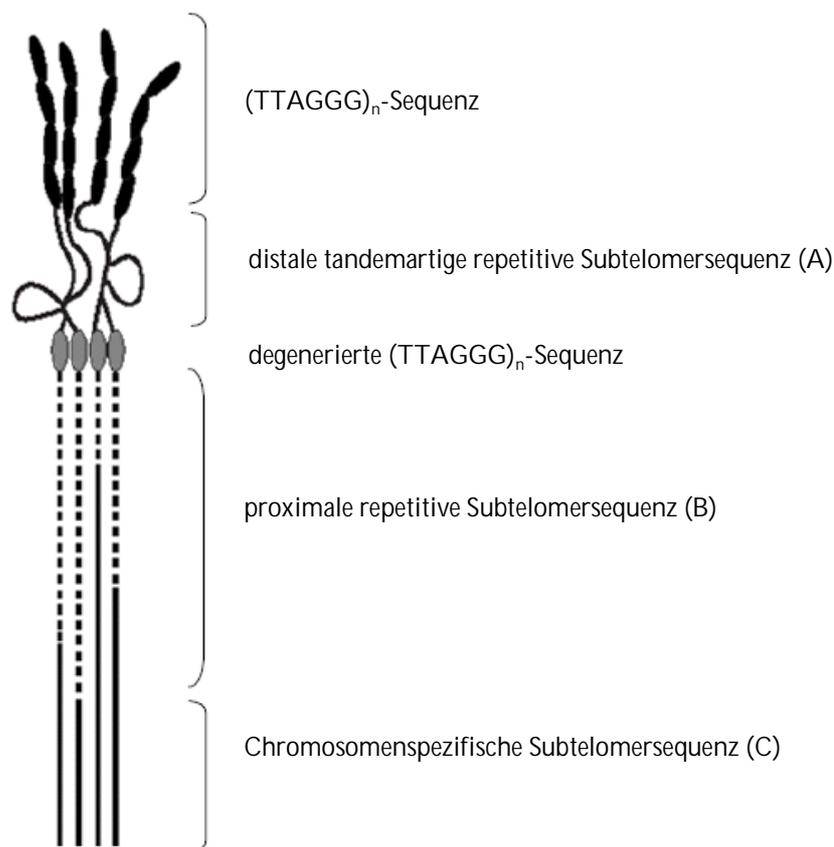


Abbildung 3: Die Subtelomerregion

Schematische Darstellung der Struktur der Subtelomerregion (vgl. Flint et al. 1997, S. 1311; vgl. Zahn 2004, S. 14).

Saccone et al. (1992) haben in ihrer Arbeit die Guanin- und Cytosin-reichsten Regionen des menschlichen Genoms mittels In-Situ-Hybridisierung gesucht und diese in den subtelomeren Bereichen gefunden. Sie schlossen daraus, dass es sich um die genreichsten Bereiche des menschlichen Genoms handele und dass die höchsten Transkriptions- und Rekombinationsraten dort zu finden seien. Die Ergebnisse dieser Arbeit führten dazu, dass die subtelomeren Bereiche ins Interesse der genetischen Diagnostik bei mentaler Retardierung rückten. In den letzten fünfzehn Jahren wurde eine Vielzahl von Untersuchungen der Subtelomerregionen durchgeführt. Knight et al. (1999) haben als erste ein Kollektiv 466 mental retardierter Kinder untersucht, die alle einen normalen Karyotyp aufwiesen. Sie fanden bei ungefähr 5 % eine subtelomere Imbalance. Viele entsprechende Studien folgten, die Häufigkeiten zwischen 2 % und 29 % zeigten (Biesecker 2002), je nach Zusammensetzung des Kollektivs. Jüngere Untersuchungen an größeren Kollektiven wie die von Ravnan et al. (2006) und Ballif et al. (2007), die zusammengenommen circa 19000 Patienten untersuchten, fanden bei ungefähr 2,5 % der mental retardierten Patienten eine subtelomere Imbalance. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass subtelomere Aberrationen zusammen mit der Trisomie 21

und dem Fragilen-X-Syndrom zu den häufigsten genetischen Ursachen mentaler Retardierung gehören.

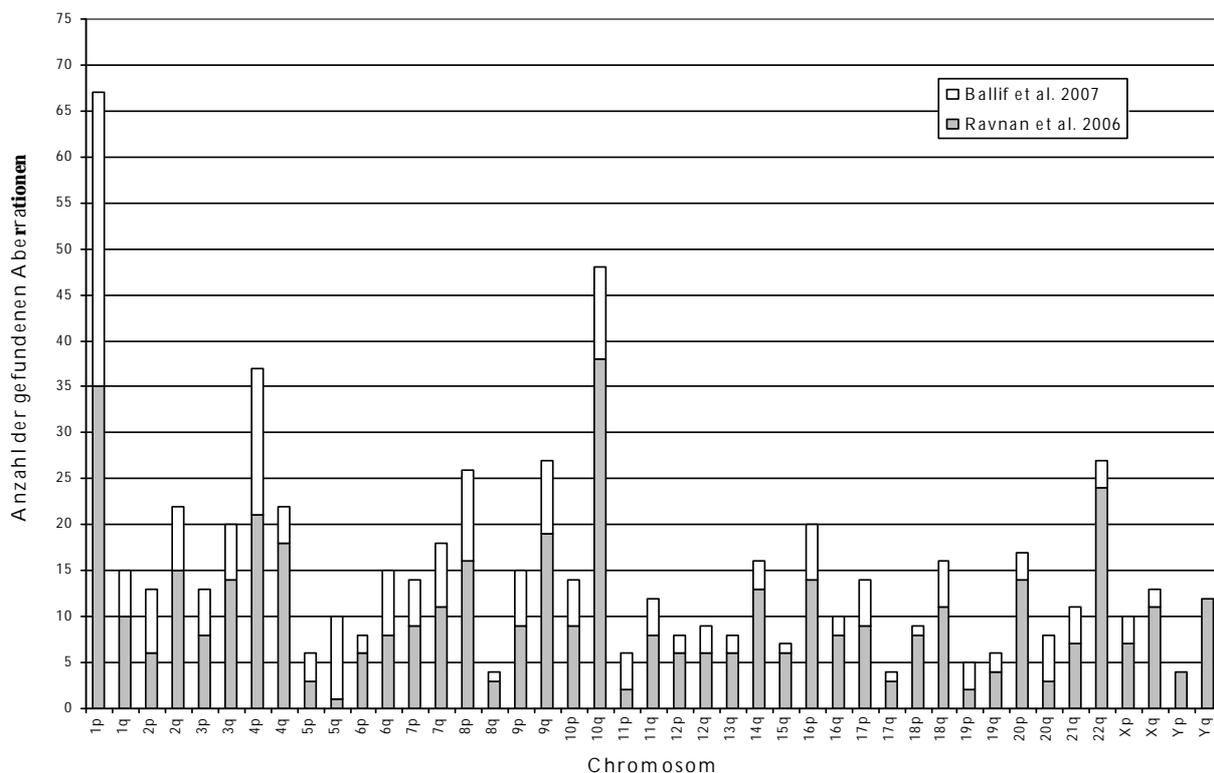


Abbildung 4: Anzahl subtelomerer Imbalancen bezogen auf das Chromosom

Daten zweier großer Studien zu subtelomeren Imbalancen. Ravnan et al. (2006) (grau) und Ballif et al. (2007) (weiß). Die Anzahl subtelomerer Imbalancen auf dem entsprechenden Chromosom unabhängig von der Art der Imbalance ist auf der y-Achse aufgetragen (vgl. Ledbetter und Martin 2007, S. 329).

Die am häufigsten betroffenen Telomere sind 1p, 2q, 4p, 4q, 8p, 9q, 10q, 22q (s. Abbildung 4) (Ledbetter und Martin 2007). Einigen subtelomeren Imbalancen konnten definierte Phänotypen zugeordnet werden:

**Deletion 1p:** Meist werden schwere mentale Retardierung, muskuläre Hypotonie, Wachstumsretardierung, Mikrozephalie und Fettleibigkeit beschrieben. Die fazialen Dysmorphien sind große anteriore Fontanelle, prominente Stirn, tief liegende Augen, flacher Nasenrücken, Mittelgesichtshypoplasie, Asymmetrie der Ohren, spitzes Kinn, Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. Weiterhin sind kardiale Fehlbildungen, Kardiomyopathie, zerebrale Krampfanfälle, Ventrikeldilatation, retrokochläre Hörstörung und visuelle Störungen von Fall zu Fall benannt (de Vries et al. 2003).

**Deletion 4p:** Der resultierende Phänotyp wird als Wolf-Hirschhorn-Syndrom bezeichnet. Die kritische Region befindet sich bei 4p16.3. Deletionen mit einer Größe von weniger als 3,5 Mb wurden beschrieben, die mit einem weniger ausgeprägten Phänotyp einhergehen, dem Pitt-Rogers-Danks-Syndrom, mit mentaler Retardierung, Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, zerebralen Krampfanfällen und charakteristischen fazialen Dysmorphien wie evertierte untere Augenlider, kurze Nase und kurzes Philtrum (de Vries et al. 2003).

**Deletion 5p:** Bekannt unter dem Namen Cri-du-Chat-Syndrom, umfasst der typische Phänotyp mit Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, rundem Gesicht, Epikanthus, Hypertelorismus und Mikrognathie, die mentale Retardierung und den katzenähnlichen Schrei bei Neugeborenen (de Vries et al. 2003).

**Deletion 9q:** Alle Kinder sind neben der mentalen Retardierung muskulär hypoton. Bei fast allen finden sich eine Mikrozephalie oder Brachyzephalie, Hypertelorismus, flaches Gesicht,

Mittelgesichtshypoplasie, Synophrys, stark gebogene oder sehr gerade Augenbrauen, Anomalien der Augen, nach vorne gerichtete Nasenlöcher, flacher Nasenrücken, kurze Nase, offenstehender Mund mit heraushängender Zunge, dicke Unterlippe, schmale Oberlippe und nach unten hängende Mundwinkel. Außerdem finden sich häufig Herzfehler, Epilepsie, Fettleibigkeit, antisoziales bzw. autistisches Verhalten und Genitalfehlbildungen (Stewart und Kleefstra 2007).

Deletion 18q: Das De-Grouchy-Syndrom ist gekennzeichnet durch mentale Retardierung, Hörstörungen, Mittelgesichtshypoplasie, Wachstumsverzögerung und verschiedene Anomalien der Gliedmaßen wie proximal sitzende Daumen, Klinodaktylie, spitz zulaufende Finger, Coxa valga und abnorme Position der Zehen. Die meisten dieser Patienten haben eine Deletion in 18q21, aber es gibt auch weiter distal gelegene in 18q23, die diesen typischen, jedoch sehr variablen Phänotyp zeigen (de Vries et al. 2003).

Deletion 22q: Die Monosomie 22q13.3 ist normalerweise mikroskopisch sichtbar. Allerdings wurde seit Einführung der subtelomeren Untersuchungen über mehrere Fälle mit kryptischen Deletionen berichtet. Die mentale Retardierung ist bei diesen Patienten mit muskulärer Hypotonie, Sprachstörungen, abnormem Verhalten und uncharakteristischen fazialen Dysmorphien vergesellschaftet (de Vries et al. 2003).

In diesen wenigen Fällen kann der Diagnostiker seine molekulargenetischen Untersuchungen aufgrund eines durch den Phänotyp bedingten Verdachts auf eine bestimmte subtelomere Region konzentrieren. Bei einer großen Anzahl von Patienten mit mentaler Retardierung ist es jedoch nötig, alle subtelomeren Bereiche zu untersuchen.

## 1.5 Polymorphismen

Mit dem Begriff Copy Number Variation (CNV) wird die Sequenzvariabilität von Allelen bezeichnet, d. h. dass an einer bestimmten Stelle im menschlichen Genom mehr als eine Variante der Basensequenz vorliegt. Davon abzugrenzen ist die benigne Form dieser Kopienzahlveränderung, die klinisch keine Relevanz zeigt und in dieser Arbeit als Copy Number Polymorphism (CNP) bezeichnet wird. Zur Definition dieser benignen Sequenzvarianten gehört weiterhin, dass sie mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Bevölkerung auftreten um sie von wiederholten Neumutationen abzugrenzen (vgl. Strachan und Read 2005, S. 366). Dennoch ist die Begriffszuordnung in der Literatur schwierig, da die Begriffe nicht einheitlich gebraucht werden. Unter den Polymorphismen können zwei Formen unterschieden werden. Ein Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ist der Austausch eines einzelnen Nukleotids gegen ein anderes oder die Insertion bzw. Deletion eines einzelnen Nukleotids. Davon abzugrenzen sind die größeren CNP, die Genomsequenzen von mehreren Megabasen betreffen können. In den letzten Jahren zeigte sich, dass diese großen Genomvarianten mit Millionen von Basen eine ebenso wichtige Rolle in der genetischen Variabilität spielen wie die SNPs oder andere kleine Genomveränderungen (Feuk et al. 2006). Da diese strukturellen Genomveränderungen teilweise Veränderungen in der Genexpression hervorrufen, die in dieser Studie für die mentale Retardierung verantwortlich sind, andere aber ohne Konsequenz in Bezug auf den Phänotyp bleiben, ist eine Unterscheidung zwischen benignen und krankheitsrelevanten Veränderungen schwierig. Zum einen kann eine genaue Evaluation durch große Populationsstudien erfolgen, die mit der Zeit eine vollständigere Kartierung von CNP in Datenbanken zulassen werden, wie in der Database of Genomic Variants (Department of Genetics and Genomic Biology, <http://projects.tcag.ca/variation/>, 17.07.2010). Zum anderen sollte bei Vorliegen einer Sequenzvariation immer auch die Untersuchung der Eltern erfolgen, um zwischen de novo entstandenen und vererbten Varianten zu unterscheiden. Liegt bei einem Elternteil die gleiche Variante ohne den entsprechenden Phänotyp vor, ist es unwahrscheinlich, dass es sich hierbei

um eine Krankheit verursachende Sequenzvariante handelt. Diese benignen Varianten sollen fortan als CNP bezeichnet werden.

### 1.6 Score nach de Vries et al. (2001)

Um die Untersuchung der subtelomeren Bereiche effizienter zu machen, haben de Vries et al. (2001) die phänotypischen Merkmale von 29 mental retardierten Patienten mit bekannter subtelomerer Imbalance mit den Merkmalen von 110 Kindern mit idiopathischer mentaler Retardierung, unauffälligem Karyotyp und unauffälligem Subtelomerbefund verglichen und eine Liste klinischer Kriterien erstellt, die die Geburt, faziale Dysmorphien, angeborene Fehlbildungen und die Familienanamnese einschließt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine pränatal beginnende Wachstumsretardierung und eine positive Familienanamnese für mentale Retardierung Merkmale zu sein scheinen, die in der Kontrollgruppe weniger häufig sind. Eine pränatal beginnende Wachstumsretardierung war bei 37 % der Patienten mit subtelomerer Veränderung zu finden, im Gegensatz zu 9 % bei der Kontrollgruppe ( $p < 0,005$ ). Eine positive Familienanamnese war in 50 % zu finden im Gegensatz zu 21 % bei der Kontrollgruppe ( $p = 0,002$ ). Fehlgeburten waren bei 8 % der Mütter der Patienten mit subtelomerer Aberration aufgetreten, bei der Kontrollgruppe in 30 %, was sich jedoch als nicht signifikant herausstellte. Weitere Merkmale wie Mikrozephalie, geringe Körperlänge, Hypertelorismus, Nasen-, Ohr- und Handanomalien und Kryptorchismus wurden bei über 30 % der Patienten mit subtelomerer Aberration gefunden. Zwei oder mehr dieser Merkmale wurden bei 83 % beobachtet. Keines dieser Merkmale ist signifikant unterschiedlich von der Kontrollgruppe. Aus den Ergebnissen haben de Vries et al. (2001) eine 5-Punkte-Checkliste entwickelt (s. Tabelle 1), die eine Präselektion mental retardierter Patienten für die Subtelomerdiagnostik ermöglichen soll.

Tabelle 1: Checkliste nach de Vries et al. (2001)

Erstellt anhand phänotypischer Merkmale für Patienten mit kryptischen subtelomeren Imbalancen (vgl. de Vries et al. 2001, S. 148).

Merkmal	Punkte
Familienanamnese mit mentaler Retardierung	
Der Mendelschen Vererbungslehre folgend	1
Nicht der Mendelschen Vererbungslehre folgend	2
Pränatal beginnende Wachstumsretardierung	2
Postnatale Wachstumsabweichungen	
für jedes der folgenden Merkmale 1 Punkt (maximal 2)	
Mikrozephalie (1), kurze Körperlänge (1)	
Makrozephalie (1), lange Körperlänge (1)	2
≥2 faziale Dysmorphiemerkmale	
insbesondere Hypertelorismus, Nasen- und Ohranomalien	2
Nicht-faziale Dysmorphien und kongenitale Anomalien	
für jede Anomalie 1 Punkt (maximal 2)	
insbesondere Handanomalien (1), Herzfehler (1),	
Hypospadie +/- nicht deszendierte Testes (1)	2

Bei einer Punktzahl von 3 oder weniger hätten de Vries et al. (2001) 20 % der mental retardierten Patienten von weiteren Untersuchungen ausschließen können, ohne dass ein Patient mit subtelomerer Aberration darunter gewesen wäre (Sensitivität 1,00 und Spezifität 0,27). Knight et al. (1999) fanden außerdem eine höhere Rate subtelomerer Aberrationen bei

mittel bis schwer mental retardierten Patienten als bei solchen mit leichter mentaler Retardierung.

## 1.7 Methoden zur Untersuchung der Subtelomere

Um Deletionen und Duplikationen der subtelomeren Bereiche bei mental retardierten Patienten molekulargenetisch oder molekularzytogenetisch nachzuweisen, wurden Multiprobe Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH), Multiplex Amplifiable Probe Hybridization (MAPH), Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) und Array Comparative Genome Hybridization (Array-CGH) in Studien eingesetzt.

### 1.7.1 Multiprobe Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung

Multiprobe-FISH auf Metaphasechromosomen hat sich als Goldstandard etabliert. Die Untersuchung der Subtelomere erfordert den Einsatz spezifischer Sonden für beide Arme der 23 Chromosomen. Mit Entwicklung eines ersten Sets durch das National Institute of Health und das Institute of Molecular Medicine Collaboration (Ning et al. 1996) und die Optimierung dieses Sets durch Knight et al. (2000) ist dies ermöglicht. Es ist kommerziell erhältlich und umfasst 24 chromosomale Regionen, sogenannte 24 Felder. In jedem dieser Felder befinden sich die fluoreszenzmarkierten, spezifischen Sonden für p- und q-Arm für eines der 23 Chromosomen. Die p-Arme der akrozentrischen Chromosome 13, 14, 15, 21, and 22 sind aufgrund ihrer Beschaffenheit aus repetitiver und ribosomaler DNA nicht berücksichtigt. Es ist möglich, alle subtelomeren Bereiche in einem Ansatz zu hybridisieren.

### 1.7.2 Multiplex Amplifiable Probe Hybridization

Bei der MAPH wird die denaturierte genomische DNA des Patienten auf einer Nylonmembran fixiert und mit spezifischen Sonden und daran gebundener Linker-DNA hybridisiert. Nach der Waschung können die Sequenzen in einer PCR mittels fluoreszenzmarkierter Primer amplifiziert werden. Die in der PCR eingesetzten Primer sind spezifisch für die jeweilige Linker-DNA. Die relative Kopienzahl kann nach Auftragen auf ein Gel bestimmt werden. Die verschiedenen Sequenzen und damit die verschiedenen Subtelomerbereiche können mit dem gleichen Primer-Paar in einem PCR-Durchlauf amplifiziert werden (s. Abbildung 5)(Rooms et al. 2005).

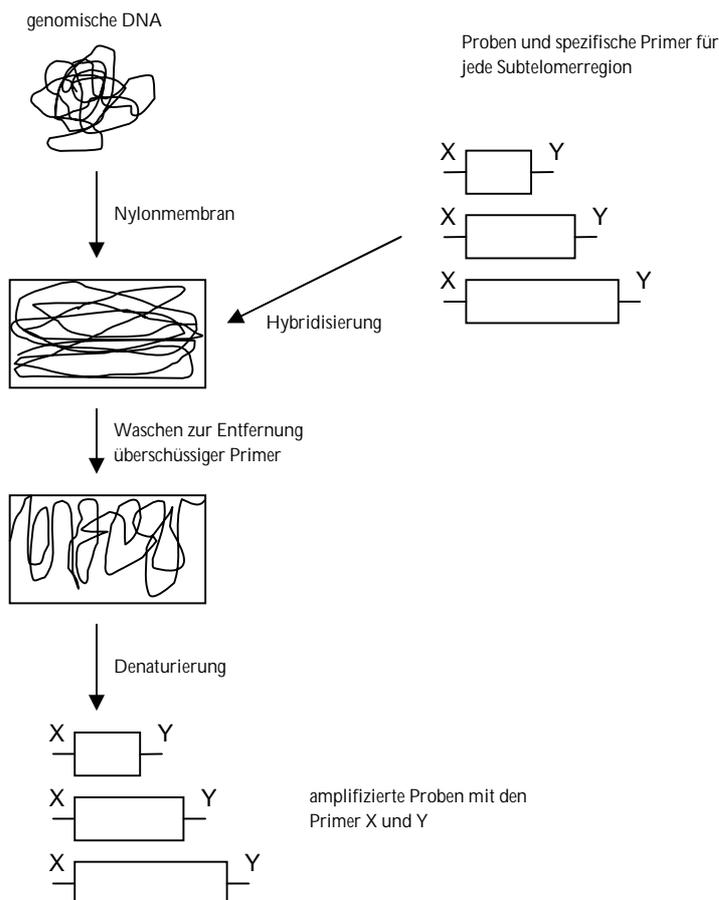


Abbildung 5: Prinzip der MAPH

Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Multiplex Amplifiable Probe Hybridization (vgl. Rooms et al. 2005, S. 516).

### 1.7.3 Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

Bei dieser Technik werden zunächst zwei Primer mit dem zu untersuchenden Subtelomerbereich hybridisiert. Die Primer werden in einer anschließenden Ligationsreaktion verbunden. Nach der Denaturierung kann die entstandene Sequenz in einer PCR mittels weiterer spezifischer Primer amplifiziert werden. Nur die Primer, die zu Beginn an eine spezifische Sequenz der Subtelomere binden konnten, werden amplifiziert. Durch eine nachfolgende Kapillargelelektrophorese können die PCR-Produkte analysiert werden. Deletionen bzw. Duplikationen können also relativ anhand der Menge des PCR-Produkts identifiziert werden (s. Abbildung 6)(Rooms et al. 2005).

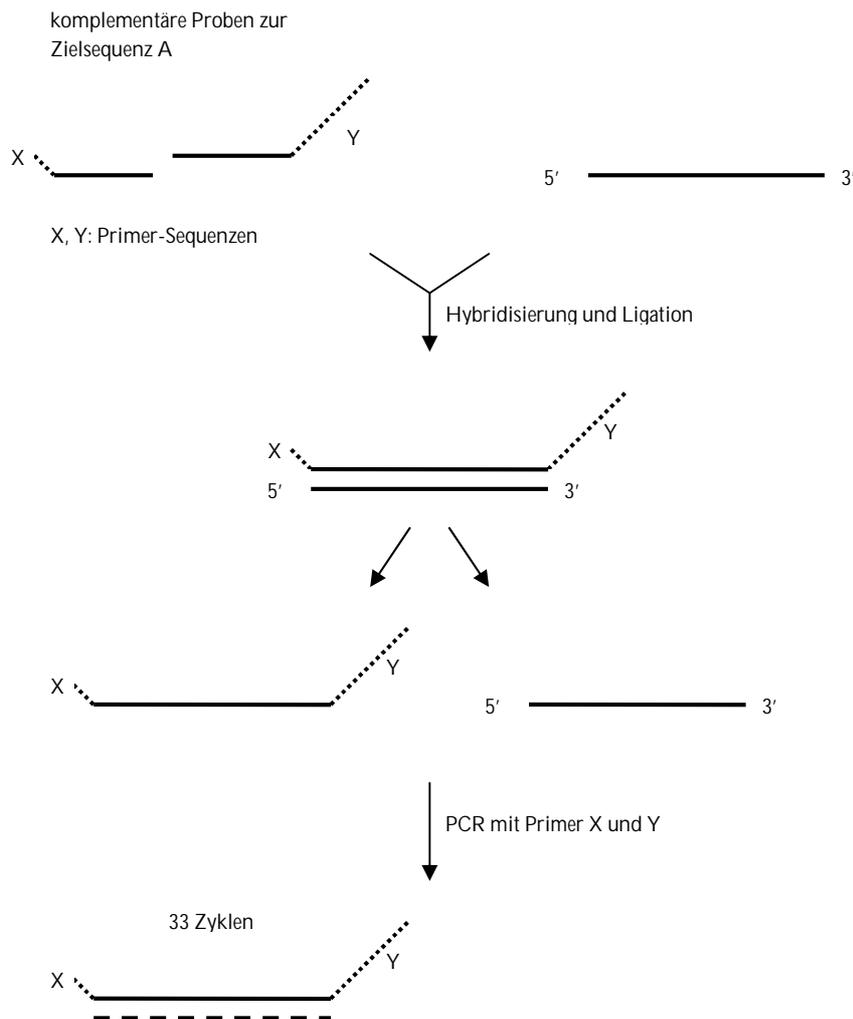


Abbildung 6: Prinzip der MLPA

Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Multiplex Ligation-Dependent Probe Hybridization (vgl. Rooms et al. 2005, S. 517).

#### 1.7.4 Array-Comparative Genome Hybridization

Erstmals wurde diese Methode von Ballif et al. (2003) und Yu W et al. (2003) angewendet. Bei der Array-CGH werden enzymatisch geschnittene Patienten-DNA und eine unauffällige Referenz-DNA mit verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert und auf einem Chip mit einer Vielzahl immobilisierter Oligonukleotide cohybridisiert. Durch Messung der Fluoreszenzintensitätsunterschiede zwischen Patienten-DNA und Referenz-DNA lassen sich Kopienzahlveränderungen feststellen. Unterschieden wird die Array-CGH, die auf kurzen, über das gesamte Genom verteilten Oligonukleotiden beruht und die Array-CGH, bei der wie bei der FISH-Untersuchung BAC-Klone eingesetzt werden.

#### 1.8 Ziel dieser Arbeit

Am Institut für Humangenetik Göttingen wurde von Boehm et al. (2004) die quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR) mit dem Farbstoff SYBR-Green Dye zur Untersuchung der Subtelomere eingeführt. Dabei wurden 20 Patienten mit mindestens einer durch Multiprobe-FISH bekannten subtelomeren Imbalance und 20 unauffällige Patienten als Negativkontrollen blind mit der Methode untersucht. Es wurden alle subtelomeren Imbalancen erkannt und es gab keine falsch-positiven Befunde unter den

Negativkontrollen. Die Ergebnisse von Boehm et al. (2004) haben somit gezeigt, dass die quantitative Real-Time-PCR mit SYBR Green Dye neben den oben genannten Techniken eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Subtelomere bei mentaler Retardierung bietet. Sie wird seither bei der Untersuchung der DNA von Patienten mit unklarer mentaler Retardierung und normalem Chromosomensatz erfolgreich am Institut für Humangenetik Göttingen eingesetzt.

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit soll auf der Vorstellung des mit der quantitativen Real-Time-PCR auf subtelomere Imbalancen untersuchten Patientenkollektivs liegen. Teile der Arbeit wurden bereits von Auber et al. (2009) unter dem Titel "Identification of subtelomeric genomic imbalances and breakpoint mapping with quantitative PCR in 296 individuals with congenital defects and/or mental retardation" publiziert (Auber et al. 2009). Die in diesem Kollektiv gefundene Detektionsrate von Duplikationen und Deletionen soll im Vergleich zu anderen Studien diskutiert werden. Bei den gefundenen Imbalancen wird diskutiert, ob es sich um einen benignen Polymorphismus (CNP) oder eine pathogene Kopienzahlveränderung handelt. Außerdem soll der Phänotyp und die Entwicklungsgeschichte der Patienten mit auffälligem subtelomerem Befund kurz beschrieben und, soweit dies möglich ist, mit in der Literatur beschriebenen Fällen mit kryptischer Chromosomenaberration an gleicher Stelle verglichen werden. Weiterhin soll neben den methodischen Vor- und Nachteilen der quantitativen Real-Time-PCR in der subtelomeren Diagnostik auf die Bedeutung der Checkliste zur Präselektion der für eine Subtelomerdiagnostik in Frage kommenden Patienten, die von de Vries et al. (2001) vorgestellt wurde, eingegangen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Isolierung humaner genomischer DNA aus Blutlymphozyten

Zur Lyse der Erythrozyten werden 10 ml EDTA-Blut und 30 ml 4°C kalter Lyse-Puffer in einem Polypropylen-Röhrchen gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird für 15 Minuten bei 2000 x g in der Zentrifuge (SIGMA 4K15 Tischkühlzentrifuge) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird abgegossen, das Röhrchen ausgetropft. Anschließend wird das Pellet in 10 ml SE-Puffer resuspendiert und bei 2000 x g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, das Röhrchen ausgetropft und wieder mit SE-Puffer resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird 2-3 Mal wiederholt. Im Anschluss werden 5 ml SE-Puffer auf das Pellet gegeben, bis es sich löst. Dann folgt die Zugabe von 250 µl Proteinase K (1mg/ml) und 500 µl 10 %igem Natriumdodecylsulfat. Bei 55°C im Wasserbad über Nacht erfolgt die Proteolyse. Danach werden 1,5 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben, genau 15 Sekunden gevortext und für weitere 15 Minuten bei 25°C und 3000 x g in der Zentrifuge (SIGMA 4K15 Tischkühlzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Röhrchen mit 20 ml Ethanol überführt. Die geknäulte DNA wird mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und 5 Minuten bei 21 000 x g zentrifugiert. Das Ethanol wird abgegossen. Im Thermoblock wird das Pellet für 5-10 Minuten bei 56°C getrocknet und dann in 500 µl Ampuwa resuspendiert.

Die Konzentration der DNA wird photometrisch bestimmt (8452 Photometer, Hewlett Packard, Hamburg). 4 µl der Probe werden in 400 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und bei 260 nm und 320 nm (Kontrolle) in einer Quarzküvette gegen 400 µl H<sub>2</sub>O gemessen. Die Konzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$K=(E_{260}-E_{320}) \times f \times c.$$

- K: Konzentration der Probe in ng/µl
- c: Konzentration/Absorption (für doppelsträngige DNA 0,05 ng/µl)
- f: Verdünnungsfaktor
- E320: Absorption bei 320 nm
- E260: Absorption bei 260 nm

Die Lagerung der DNA erfolgt bei 4°C. Kurz vor Gebrauch erfolgt die Verdünnung auf 10 ng/µl.

### 2.2 Die quantitative Real-Time-PCR mit SYBR-Green Dye

In der Untersuchung der Subtelomere mit der quantitativen Real-Time-PCR wird zur Detektion SYBR-Green I („QuantiTect™ SYBR®-Green PCR Master Mix“, Firma Qiagen, Hilden), ein Doppelstrang-DNA bindender Farbstoff, eingesetzt. Dieser bindet sequenzunspezifisch in die kleinen Furchen doppelsträngiger DNA. Gebundenes SYBR-Green fluoresziert und macht auf diese Weise die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte sichtbar. SYBR-Green zeigt ein Emissionsmaximum bei 520 nm. Die Analyse erfolgt mit dem ABI Prism 7900T Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) und 384-well Platten (ABgene, Hamburg, Deutschland). Dieses System arbeitet mit einem Temperatur-Cycler und einem Laser. Die Fluoreszenz jeder Probe wird über ein ladungsempfindliches Detektionssystem gemessen und die Daten mit der Sequenz-Detektionssystem-Software (SDS Version 2.1, PE Applied Biosystems) quantifiziert, exportiert und in Microsoft® Office Excel 2003 graphisch ausgewertet.

Die Reaktionsansätze enthalten je 25 pmol Primer und 5 µl 2 x QuantiTect™ SYBR®-Green PCR Master Mix. Dieser Master Mix enthält HotStarTaq™ DNA-Polymerase, dNTP-Mix (mit

UTP-Additiv), den SYBR<sup>®</sup>-Green-I-Fluoreszenz-Farbstoff und ROX-Farbstoff als passive Referenz. Jedem Ansatz wurden 25 ng genomische DNA zugefügt (Endkonzentration 2,5 ng/μl).

Anhand der DNA-Verdünnungen (5, 2,5, 1,25 und 0,625 ng/μl) eines männlichen unauffälligen Individuums wurde eine Standardkurve für jedes Amplikon konstruiert. Um das Auftreten von unspezifischen Produkten auszuschließen, wurde nach der Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Die relative Quantifizierung der initialen Kopienzahl erfolgt bei der Real-Time-PCR anhand des Verhältnisses der Kopienzahl des zu untersuchenden Amplikons und zweier Referenzamplikons, die unter identischen Bedingungen amplifiziert werden. Bei der Auswertung wird ein Signal-Schwellenwert definiert, bei welchem sich jede Einzelreaktion in der exponentiellen Phase befindet. Der Schwellenwert-Zyklus ( $C_t$ -Wert) ist der Zeitpunkt, an dem das Signal diesen Schwellenwert erreicht. Dieser korreliert mit der Anzahl der Kopien der eingesetzten Startsequenz. Jede höhere oder niedrigere Anfangskopienzahl geht mit einem signifikant späteren oder früheren Anstieg der Fluoreszenz einher. Anhand der importierten Daten wurde in Microsoft<sup>®</sup> Office Excel 2003 der Multiple of Median (MoM) jedes Amplikons bestimmt. Idealerweise liegt bei einem MoM-Wert von 1,0 ein diploider Chromosomensatz vor. Ideelle Werte von 0,5 oder 1,5 bedeuten partielle Monosomie oder Triploidie der amplifizierten Chromosomenbereiche. Die Grenzwerte für eine Duplikation oder Deletion für die Auswertung der Real-Time-PCR Ergebnisse wurden von Boehm et al. (2004) statistisch auf Basis der Ergebnisse vieler Negativkontrollen festgelegt auf MoM-Werte von unter 0,78 für Deletionen und MoM-Werte von über 1,24 für Duplikationen. Die statistische Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR wurde in Microsoft<sup>®</sup> Office Excel 2003 durchgeführt. Die Quantität gibt an, in welcher Menge welcher Detektor vervielfältigt wurde. Aus den beiden gemessenen Quantitäten  $Q_{nA}$  und  $Q_{nB}$  jedes Detektors wurde der MoM berechnet. Er gibt das Verhältnis der Quantität eines Detektors im Vergleich zu der aller Detektoren an.

$$\text{MoM} = Q_n / \text{MW} (Q_{1A}, Q_{1B}, Q_{2A}, Q_{nB})$$

MoM: Multiple of Median

$Q_n$ : Quantität des Detektors n

MW: Mittelwert

Im Anschluss wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der beiden MoM-Werte jedes Amplikons berechnet (Boehm et al. 2004).

### 2.3 Detektoren

Für jede Subtelomerregion wurden zwei Detektoren designt. Die entsprechenden Primer-Sequenzen wurden in die genomische Sequenz des FISH-Telomersets der bei Knight et al. (2000) angegebenen Primer-Sequenzen mit Hilfe einer BLAST-Suche gelegt (Knight et al. 2000; National Center for Biotechnology Information: Blast Human Sequences, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606>, 15.07.2008) bzw. mittels der Datenbank Human Genome Resources (National Center for Biotechnology Information: Human Genome Resources, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>, 15.07.2008) und nach dem Protokoll von Boehm et al. (2004) konstruiert. Im Detektorenset ist je ein Amplikon für die p-Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 enthalten (s. Tabelle 2). Die Primer erfüllen außerdem folgende Kriterien:

- Länge: 25-27 Nukleotide
- Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C): 50-70 %

- Schmelztemperatur: 65-70°C
- PCR-Produktlänge: 100-200 bp
- Gehalt von G und C im PCR-Produkt: 40-60 % und
- Schmelztemperatur des PCR-Produkts: 75-85°C.

Nur diese Kriterien erfüllende und in einer erneuten BLAST-Suche in der oben genannten Datenbank für ihre Sequenz spezifische Detektoren werden ausgewählt und verwendet. Die Primer-Bestellung erfolgt bei Eurogenetic (Köln, Deutschland). Außerdem wurde die Distanz der Primer zum Telomer des p- und q-Arms des Chromosoms bestimmt. Zwischenzeitlich wurden auch einige Detektoren der von Boehm et al. (2004) veröffentlichten ausgetauscht. Insgesamt wurden zwei Sets Detektoren konstruiert, die aus je zwei Detektoren pro Chromosomenarm bestehen. Das Set A wurde primär zur subtelomeren Untersuchung der Patienten-DNA verwendet. Wurden subtelomere Veränderungen gefunden, erfolgte eine erneute Untersuchung mit dem Set B.

Tabelle 2: Detektoren Set A und B

Zusammenfassung der Detektoren von Set A und B, ihrer Primer-Sequenz und der Position der Primer auf dem Chromosom. Der Detektorname ist zusammengesetzt aus der Chromosomnummer und der subtelomeren Position (p oder q). Detektoren, die anhand des FISH-Telomersets (Knight et al. 2000) designt wurden, sind mit F benannt.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		Position
	Vorwärts	Rückwärts	
Set A			
1p008	TGCAGTTCCTCCGCTGGCCTCCACG	GGTTTGCAGCTCTGCGCCTGGCAC	888.104
1q2	AATCACAGCCCCACCCACACCTTCC	GCCATCTTGGGTACGGTGGTGCAGA	246.433.047
2pFISH	AGGAGGGGTACCCTCACGCAGTGC	CATCCCTGCCTCAGCCTGTCCCCCA	151.502
2q2EUR	TGCGCCCAGACGCCAGCTCATAAA	TCCACAAGCGCCACCATCACCACA	240.988.816
3pFISH	TCCTCCGGCCCGTGGTTTTTCGCAG	TGTGAGTGTGCGTGGGGAGGCAGCA	214.575
3q500	CTCCCCAGCTCCCAGCCAGCCTGTAA	TGTCCCATCGCCCTCCTCTCTGCC	196.443.993
4p	TGTCCAGCGACTCATCGCACGTCTC	AGAAAGCCGACAGCCGAGAAGGAA	739.120
5pFISH	GCCCCCACACTCCCACCACAGTCA	CGCCCAGCACTCCACCTGCATCCA	2.219.508
5q4	GGGCACCAACGGCAAACGCTATCAG	AGGAAAGACACGCTCGCCCAGGAAG	180.594.144
6pFISH	GGGCTGGACAGAGCCAATCGGGGA	GAGACACAGGGTGGGTGGGGGTGGA	171.059
6qFISH	CACAGCACCAGCCCCCTCCCATCA	TGCCATCGTGAGGAGCAGGTGCCA	170.689.569
7p290	GGTGCTGAAGTGCAGAAATTCCTCT	CTGGAGTACAGCTCGTACCGGTTGAT	290.647
7q	GCACAAGAGAGTGCGCCGAGCAGAA	TGCCAGGCTCCACAGGACACTTGA	158.496.996
8p	AGGTGACTTTCCAGGACGCTGCTGC	TGACTGACTGCCCTCTGTGCTCCCA	321.044
8q	CAGCCATGCCCTACTCACACCGGAA	GGCGGCCAGAAAGCCTGAAGTAGA	146.041.999
9pFISH 553	TGGCATGGGAAGGGGATGAGGCCGA	GGCAAATCCCGGTGGAACCCCGACC	340.993
9q	ATGCAAGCCGGCTGGAGACATGA	TCCTTGGCCTCTCACACCGCCATTC	138.274.701
10p	GCAGCAGCAAAGAGGCAGCACTGGA	TCTGCCGCCACTAATCGTTCCCCA	313.658
10q20	GTTGGTGCAGGTGCCAGGCAGGA	GCAGCAGCCGAGGTGAGCACTGGAA	135.104.878
11p	TTAAGGAGCACTGGACGCCACGCA	GGTTTCGGTTTCATGCGGCCCAAG	262.298
11q	GCCGACAGACACCCACGAAAGGGAA	GAGCATGAGCTGCCACAGGTCCACA	133.802.622
12p	CCAGAGGGTCAACATTCGCACCCCA	GGCCCCAGCTTCTCAACCATAGCA	92.048
12q	ACATCCAGGGGCCGTGAACATGAGG	AAGACGCATCACTGGCAGGACAGG	131.756.416
13p	ACTCTGTTGCGAGGGCTCCTCCACA	TACAGGCCAGCTCCAGGCTCAACCA	20.624.506
13q	TCAGGAGGTGATGCTTGGGACGCCA	AGGCAAAAGCAGGCTGTGGGGACAC	114.012.377
14p2	CAGCCCCAGTGGCCTGAGAGAAAA	GCGCCCATTAGAGACCTGCACCAGA	20.195.836
14qF250	AGGAGAACGGGTGGAAAGGAGCCCCCTGA	CGCACCCAGCCGATCCAGTAGCTGGTAA	106.105.955
15p205	CCTGTCCATGTTTGGAGTCACTCTG	GTGAAACTCCACACACTCGTCCACAT	20.550.836
15q	TTCTGCTCAGCCTCCTTTGCAGCC	TGTTCCAGCCTCTGCACCTGCTCAC	99.971.680
16pFISH	ATCGTCCCCAGCCCTCCCTCCACA	GCCGAGCACCACCTGCCTTCCCAAC	57.047
16qFISH250	TGGGAGGATCGCAGAGCCCGCAGA	TGCTCTTCGCGCATCCCCATCAGCC	88.468.436
17p265	CGACCTGGTCCCAGGCCATCAGA	GCCCCGGCCTTATCCTCCCAGTCCA	1.145.788
17q	TGGGACGCCCTCATTATCTGGGGCA	ATCCACCCGCCATTGGCATCGAAGC	78.587.921
18pEUR	CAGTTCAATCCGCACAGCCCTCCA	GGGGTTTGGCAAGGGAAGGCAAGGA	263.912
18q	TTTGTGGTCTGGGAGCGGTGAGTG	TGATCCTGCCGGTCTGACACACAGC	76.042.372
19p	AGTGACGCCAGCCACTATACCTGCC	TTCCAAACCATCCACCCCTCAGCC	244.803
19qF250	GCGCCGGAAGACGCCAGAGGAGCTA	ACAGCAACCTGCCGACCACCCAC	63.757.194

Fortsetzung von Tabelle 2:

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'	Position	Detektor (Bezeichnung)
20p2	GGCATCCAGCTCCCACGCAGTCATA	CATGGCACCAGCAGGGAAGGGATTC	78.177
20qFISH2	ATACCCCAGACCCCGCCCCACCAAC	TGGGCAGGAGGTGCAGCCCAGACA	62.161.784
21p	TCCCACTCTAGCCTTCCCTGCATGG	GCCACAGGGCAGTCTGTCCATGAGA	14.613.956
21qFISH100	AGGGACCTCCCCTCAACCGTCCCA	CGCCCCTGCATGGCAGCGTCTGAAA	46.809.192
22p16.0	ACCTGCTCACCTCCCCACTGTTCCC	ACCTGCCACTCCCAACTCTCCCCAC	16.047.836
22qFISH50	TGCCCTGCTTTCCAGAACCCGGA	TTCCCGCCGACGATGCGGACACC	49.524.429
Xp2	CCTCCTATCTGGCACCCCTCCCGCA	GCACAGGCTCGGCTTGGCTGTTTGC	3.920.513
Xq	CAATCCTGTGGCAGCAGTGGTG	TCGGCAGGAAGACCAAAGAGGGGAA	154.167.292
YpEUR	CCTGCCTCCCATTGTCAATTGGTGC	CCGGCTGCAGAGGTAATGAAGCTGG	7.031.294
Set B			
1pFISH	CCCCACCCATGAGCTGGCACCAGA	CACGCTGCCACCTCGCTGTCCATC	1.030.272
1q	TGGGTGCATGGGTGCTGACATGGTG	AGGCTCCAGGCTGCCTTGCAAACAC	245.845.108
2p963	AGGGAGCAGCGTGAATGGTGGCAGGA	CAGGGGAAGGTGAGGCAGAGGACTGGG	963.035
2q269	GGGCATTGTTGCCCTCCTTGCCCA	ACACAGCAGAGGCCAGGGCTCCA	240.638.788
3p1200	CCAGGGCTCCCCTCACCGTCTGA	GGCTGGCAGTGAAGCTGAGCCA	707.445
3q2	CACAAACGCATCCTTCTGCTGGGC	ACCTGGGCAGAGGCTGTTTCCCATC	198.555.073
4qFISH	CCCCAGCAGGTAACCAGGCTCCCTC	TCGTGGCTCCCCTCCCGGTGAAA	191.124.943
5p3	CCAACCTCGGGAAAGTGACAGGCTG	AGGCTCTCGTGGTGGCTGGAATG	194.944
5q3	TAAAGACAGGGCTCCGAGGGTTGGG	CCTTCTCCAGCCATAAACCGGTGGG	178.835.382
6p943	GGAGCATGACGAGGGTGGCCCTGGAA	TGACGGAGGAGGTAGCAGCGACCTGGA	858.213
6q	GCGTCCACTTGTGTGACTGTGCTA	TGGGGCACCATGACTGCGAGAAGAG	170.079.572
7p	CCCGTGCATAACAAGCACCCCAA	ACATGACACTGAGCCACCTGCCTG	791.647
7q500	ACGGCTGACCCGAGGACATGCCTCC	TTGCGCCCTGAGACCCACCCCTTCC	158.304.069
8q170	TCCAGCACCCAGCCCCACTACCCCAA	TCCCCTCACCCACCCCTTAGGCAGC	146.087.066
9pFISH187	TTCCCCGAACAACCTCGCCGCTCC	TTCCCCCGCGCTCAGACTTGCCCTC	205.285
9q520	CCCGTCCCCTCGGTTACACGACCA	GGCCCGCTGCCAGGATGCACAAG	137.788.282
10p390	GTCGCACCCTCCCCTCTCTGTGCCA	GCCTGTTGTTCCACCCACCCCTCCA	425.269
10qF3	TCACTTGGCACTGAGCCCCGAAACC	GCCCCAACTCTGCCTGCCTGTCAAC	135.261.618
11p155	GTCCCCAGCCACGCAGTGAACCTCC	GCCTGCACAGCCATCCCAGCCTAC	201.191
11q800	TCCACTGACACCCGAGAAGGGGCA	AGCACCGGGACTTCTCAAGGGCCA	134.142.465
12pFISH186	ACCTACCAGCCCCACCCAGCTTCC	AGCAGCCCCATGTGCTTCCCTGCC	200.117
12qFISH400	TGAACTCCACCGAGCGGTGGAGCA	GGAAGTGCGGGCGACCAGACAGCAG	132.041.928
13q200	TCCGTACCCCGCATCCATCACCCC	TGCCACGCCCCAGTGACTCAGAA	113.892.069
14q	AAGCACAGCCCCATCCACGAGGAAG	GGCCCCATGAAATGATCCCAGGACCA	105.375.613
15p	ACAGGACATGGGAACACGGAGGGGA	CCACGGGGCAAGTGGGATTGACAA	26.168.736
15q1200	AGACCCAGAGGAAGCGGAGCCAGCG	TGCGGCCTCCACTGCCCTGCATTG	98.557.766
16p	TCAGCAGCTCCTTACAAGGTGCCG	GTTGAATCCCAGGCCCCAGCACTCA	1.051.724
16q	AGCTCCCCAAGAGACAAGGCAGCA	AGCCACACCCGGCAGGATCTGATGA	88.602.960
17p	AAGGGAGGGGCTGGAGTGGAAAGTCA	TGTTTCAGGCAGGTGCGGGACAAGG	387.232
17qFISH	CCAGAGCCACAGCCCCCTGGAGAA	TGGGGTGGGTGTGGCTCCGTAGA	77.739.799
18pFISH2	ACTCCCCAGCTGTCCCACGCCAA	GCCAGGGGCTGACCTTGACCGCTCA	648.757
18q800	TGTGCCCCGCCACACAGCATCTGG	AGCAGGCAGTGCCCACCTTCCCTGA	75.199.430
19pF300	GGGAAGCGGCTGGGAACGGCAGAA	AGGCAGGGGCAGCGGGAGGAAGA	292.434
19qFISH2	CCCGCTGTGGGTGGGACTGGGGAAA	GGCACGAAATCTCGGAGGGGGCCA	63.723.434
20p291	AAACAGCCCCATCGCCCCTCGACG	GGCACCCGCGCCACTTCTCTGA	275.962
20q	GGAAGGGCAAAGGCAAAGGGAAGGC	CACGGGGCAGAGGCTAAACTACA	62.340.694
21q	TTCGTTCTGCTGTGAAAGGCCAG	CCCCAAAACCCGCATCGTGAGTTC	46.905.828
22q	TCCAGGTGCCAGGAACTTCGGTCCAG	AAGGATGGCCTTGGACCCTGTCCAGG	49.174.201

Eine genaue Bruchpunktbestimmung erfolgte durch erneutes Primer-Design entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise für die Bereiche um die Deletionen und Duplikationen. Die Menge der enthaltenen Gene wurde anhand des Map Viewers des National Centers for Biotechnology Information, Built 37.1 (National Center for Biotechnology Information: Map Viewer, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9606](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606), 17.07.2010) bestimmt.

## 2.4 Untersuchung der elterlichen DNA

In unser Kollektiv wurden sowohl isoliert betroffene Patienten aufgenommen als auch jene, in deren Familien es weitere Betroffene gab. Bei allen Patienten erfolgte, soweit DNA zur Verfügung stand, die Untersuchung der Eltern bzw. weiterer betroffener Verwandter. Anhand dieses Schrittes konnte herausgestellt werden, ob eine de novo entstandene Imbalance vorlag oder diese von einem der Elternteile stammte. Im letzteren Fall ließ sich anhand klinischer Daten der Eltern oder Verwandten eine Aussage treffen, ob die veränderte genomische Sequenz ursächlich für die mentale Retardierung war oder ob es sich um einen nicht pathogenen Copy Number Polymorphism (CNP) handeln könnte.

## 2.5 Bestätigung der Ergebnisse mittels FISH oder MLPA

In den Fällen mit auffälligem subtelomeren Befund in der quantitativen Real-Time-PCR sowohl mit dem Primer-Set A als auch mit dem Primer-Set B wurde eine Bestätigung der Aberration mittels entsprechender FISH-Sonden, spezifisch für die auffällige subtelomere Sequenz, vorgenommen. Diese Verifizierung erfolgte in den molekularzytogenetischen Laboren der Institute für Humangenetik in Göttingen und Jena. Die Verifizierung mittels MLPA erfolgte im molekulargenetischen Labor des Instituts für Humangenetik in Göttingen.

## 2.6 Patientenkollektiv

### 2.6.1 Patienten

Alle Patienten, die im Zeitraum vom 1. Januar 2003 bis zum 30. April 2007 mittels quantitativer Real-Time-PCR am Institut für Humangenetik Göttingen untersucht wurden, wurden in das Kollektiv aufgenommen. Die klinischen Daten der Patienten wurden den Patientenakten im Archiv des Instituts für Humangenetik, Göttingen, entnommen. Die Daten wurden direkt im Institut bei persönlicher Vorstellung der Patienten dokumentiert oder entstammen fachärztlichen Dokumenten aus der Patientengeschichte. Soweit vorhanden wurden Informationen zum Schweregrad der mentalen Retardierung, zu motorischer bzw. sprachlicher Entwicklungsverzögerung, Frühgeburtlichkeit sowie zu Wachstumsabnormalitäten und muskulärem Status erfasst. Weiterhin wurden Informationen über faziale und nicht faziale Dismorphien und Fehlbildungen, über zerebrale Anfälle und auffälliges Verhalten berücksichtigt. Die Familiengeschichte mit Informationen über weitere Betroffene, früh verstorbene Kinder und Fehlgeburten wurde eruiert. Alle Daten wurden in Microsoft® Excel 2002 tabellarisch gesammelt und der Score nach de Vries et al. (2001) berechnet. Die Blutproben zur DNA-Extraktion für das subtelomere Screening der Patienten wurden am Institut für Humangenetik (35,5 %), im Uniklinikum Göttingen (47,3 %), im Sozialpädiatrischen Zentrum Kassel (6,4 %) oder anderen externen Stellen (10,8 %) gewonnen. Die 296 untersuchten Patienten waren zwischen einem Tag und 45 Jahre alt. Der Altersmedian liegt bei 5 Jahren und 3 Monaten. Unter den Patienten waren 123 weiblich (41,6 %) und 173 männlich (58,4 %).

### 2.6.2 Einschlusskriterien

Voraussetzungen für die Aufnahme in das Kollektiv waren Blutprobeneingang zwischen 1. Januar 2003 bis einschließlich 30. April 2007. Alle Patienten waren nach fachärztlicher Beurteilung mental retardiert mit unterschiedlichem Schweregrad oder Neugeborene und Kinder mit Entwicklungsverzögerung bzw. angeborenen Anomalien. Bei allen Patienten war bereits eine konventionelle Karyotypisierung mit unauffälligem Ergebnis bei einer Auflösung von mindestens 550 Banden durchgeführt worden – entweder am Institut für Humangenetik

Göttingen oder extern. In unterschiedlichem Ausmaß waren auch differentialdiagnostisch in Frage kommende Syndrome wie zum Beispiel ein Fragiles-X-Syndrom oder ein Di-George-Syndrom bereits ausgeschlossen worden. Folgende Punkte führten zum Ausschluss aus dem Kollektiv:

- auffälliger Karyotyp
- bekanntes Syndrom, das mit mentaler Retardierung einhergeht
- bekannte exogene Ursachen wie z. B. Alkoholembryopathie.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Detektionsrate

An dieser Stelle soll ein Überblick über die gefundenen subtelomeren Aberrationen gegeben werden. Unter den 296, mittels quantitativer Real-Time-PCR untersuchten, Patienten waren 123 weiblich (41,6 %) und 173 männlich (58,4 %). Der Altersmedian der untersuchten Patienten liegt bei 5 Jahren und 3 Monaten. Bei 17 Patienten (5,7 %) wurde eine subtelomere Imbalance gefunden. Die klinische Beschreibung der Patienten und die erhobenen Befunde sind in Tabelle 3 zusammengeführt. Insgesamt wurde bei 17 Patienten eine subtelomere Imbalance festgestellt (s. Tabelle 3): 10 subtelomere Deletionen (1q, 1q, 4p, 5p, 6q, 8p, 11q, 13q, 20q und 21q) und 10 subtelomere Duplikationen (1p, 2p, 6p, 7p, 7p, 7p, 9p, 10q, 10q und 19q).

Tabelle 3: Übersicht über die Patienten mit subtelomerer Aberration

Übersicht der 17 Patienten mit den subtelomeren Deletionen (del) oder Duplikationen (dup) sowie klinische Merkmale und De-Vries-Scores (s. Kapitel 1.6). CNP = Copy Number Polymorphism; d = Tage; j = Jahre; k. E. = keine Einordnung möglich; n. b. = nicht bestimmt; M = männlich; m = Monate; MR = Mentale Retardierung; W = weiblich. \*die Mutter war auch mental retardiert, die Deletion war bei der Mutter de novo entstanden.

Fall	Alter	Geschlecht	Aberration	Vererbung	Größe der Aberration	Klinische Merkmale (zusätzlich zu MR und Entwicklungsverzögerung)	De-Vries-Score
1	5m	M	del 13q dup 9p	de novo de novo	7,6-8,3 Mb 9,1-11,8 Mb	Hypotrophie bei Geburt, postnatale Wachstumsretardierung, Ptosis, Enophthalmus, Epikanthus, Hypertelorismus, Strabismus, Mikrozephalie, Kleinwuchs, Kinking der Aorta, Klumpfüße, Mikropenis, Kryptorchismus, muskuläre Hypotonie, Schwerhörigkeit, Fehlstellung 2. und 4. Zehe	8
2	1j 5m	W	del 11q dup 6p	de novo de novo	≥3,9 Mb 177 bp–1,4 Mb	Hypotrophie bei Geburt, Hypertelorismus, rundes Gesicht, tief sitzenden und nach hinten rotierte Ohren, Mikrozephalie, flacher Nasenrücken mit antevierten Nasenlöchern, offenstehender Mund, Kleinwuchs, Klinodaktylie bds., Schwerhörigkeit, muskuläre Hypotonie, weiter Mamillenabstand, komplexer Herzfehler	6
3	10d	M	del 4p	de novo	1,7-7,6 Mb	Hypotrophie bei Geburt, postnatale Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, auffällige Glabella, hohe Stirn, breite Nasenwurzel, Hypertelorismus, Mikrognathie, Vierfingerfurche bds., Klumpfüße	5
4	1j 11m	W	del 1q dup 2p	de novo paternal	5,6-7,1 Mb n. b. (CNP)	Mikrozephalie, Kleinwuchs, Körpergewicht < 3. Perzentil, muskuläre Hypotonie, hohe Stirn, Synostose der frontalen Sutur, große Ohren, hoher Gaumen, gespaltene Uvula, hypoplastische Finger- und Fußnägel,	4
5	2j 7m	W	dup 19q	de novo	4,8-5,0 Mb	hohe Stirn, tiefer Haaransatz, breite Nasenwurzel, Epikanthus, antimongoloide Lidachsen, tief sitzende und nach hinten rotierte Ohren, kurzer Hals, Mittelgesichtshypoplasie, Dystrophie, Pectus carinatum	2
6	5j 4m	M	del 6q	maternal*	4,0-5,3 Mb	hohe Stirn, langes Philtrum, auffällige Ohrhelix bds., muskuläre Hypotonie, Epilepsie	1

Fortsetzung von Tabelle 3:

Fall	Alter	Geschlecht	Aberration	Vererbung	Größe der Aberration	Klinische Merkmale (zusätzlich zu MR und Entwicklungsverzögerung)	De-Vries-Score
7	14j 3m	W	del 1q	k. E. gesunde Schwester zeigte keine Aberration	3,0-4,2 Mb	Hypotrophie bei Geburt, breite und flache Nasenwurzel, nach vorne orientierte Nasenlöcher, Eikanthus, Refraktionsanomalie, flaches Philtrum, Zahnfehlstellungen, ASD, Mikrozephalie, Epilepsie, Schwerhörigkeit, muskuläre Hypotonie, Knick-Senk-Füße, spitz zulaufende Finger, kortikale Atrophie, Hüftluxation	7
8	5m	W	dup 1p	k. E.	1,3-3,1 Mb	Retrogenie, hoher Gaumen, Pterygium colli, breite Nasenwurzel, antevertierte Nasenlöcher, verkürztes Zungenbändchen, Hypertelorismus, Strabismus, tief sitzende Ohren, auffällige Ohrhelix, Mikrozephalie, ASD, Urachuszyste, weiter Mamillenabstand, ventral positionierter Anus, muskuläre Hypotonie	5
9	13j 5m	M	del 21q	k. E.	2,4-4,9 Mb	tief sitzende Ohren, breite Nasenwurzel, antevertierte Nasenlöcher, Refraktionsanomalie, retardiertes Knochenalter, Autismus, lange und schlanke Finger, lange Zehen	4
10	10j 9m	W	del 20q	k. E.	0,2-1,4 Mb	keine auffälligen Merkmale	0
11	7j 1m	M	dup 10q	k. E.	0,1-0,4 Mb	postnatale Wachstumsretardierung, Hypertelorismus, Balkonstirn, Hyperopie, muskuläre Hypotonie, Hypothyreose, Schwerhörigkeit, Klinodaktylie, überstreckbare Gelenke, Myelinisierungsstörung	5
12	9j 8m	M	dup 7p	k. E.	0,01-0,2 Mb	Epikanthus	0
13	9j 2m	W	dup 7p	maternal	n. b. (CNP)	keine auffälligen Merkmale	0
14	7j 2m	W	dup 10q	maternal	n. b. (CNP)	Schwerhörigkeit, Epilepsie, Mikrognathie, Strabismus, Zahnanomalien	3
15	10m	M	dup 7p	paternal	n. b. (CNP)	Mikrozephalie bei Geburt, Epilepsie, kurze und spitz zulaufende Finger, Klinodaktylie, Mikroretrognathie, tief sitzende und nach hinten rotierte Ohren, Klumpfüße bds., Sandalenlücke bds., Strabismus	6
16	4j 4m	M	del 5p	paternal	n. b. (CNP)	Mikrozephalie, Kleinwüchsigkeit, Hypotonie, Hypertelorismus, große Ohren, breiter Nasenrücken, Klinodaktylie, Sandalenlücke, Pes adductus, Rachenzyste, Arachnoidalzyste, Wachstumshormonmangel, Körpergewicht < 3. Perzentil, vergrößerte Gyri und Leukenzephalopathie	5
17	3j 11m	M	del 8p	maternal	n. b. (CNP)	Hemihypertrophie	0

Bei fünf der Patienten, Fall 1 bis 5, konnte nachgewiesen werden, dass die Aberrationen de novo entstanden sind. Diese werden als ursächlich für den Phänotyp der Patienten angesehen. Bei Fall 6 ist die Mutter des Patienten ebenfalls mental retardiert und trägt die gleiche Deletion des Chromosoms 6q. Die Großeltern mütterlicherseits zeigten keine entsprechende Aberration. Die Imbalance ist de novo in der Mutter entstanden und an den Sohn vererbt worden.

In sechs der Fälle (Fälle 7 bis 12) konnte keine weitere Einordnung der subtelomeren Aberration bezüglich ihrer klinischen Relevanz erfolgen, da entweder die DNA der Eltern für eine Untersuchung nicht zur Verfügung stand oder das Institut nicht über die klinischen Daten der Eltern verfügte.

Sechs (Fall 4, Fälle 13 bis 17) der 20 festgestellten Duplikationen bzw. Deletionen konnten als CNP klassifiziert werden, da sie in den phänotypisch unauffälligen Eltern der Patienten zu finden waren. Ein Patient (Fall 4) trägt eine de novo entstandene Deletion des langen (q-)

Arms von Chromosom 1 und eine geerbte Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 2. Bei zwei Patienten (Fälle 13 und 15) zeigte sich eine Duplikation von 7p als CNP. Weiterhin konnte die Duplikation 10q bei Fall 14, die Deletion in 5p bei Fall 16 und die Deletion 8p bei Fall 17 als CNP klassifiziert werden.

Für die Detektionsrate im Patientenkollektiv bedeutet dies, dass bei 6 Fällen (Fälle 1 bis 6) (2,0 %) die subtelomere Aberration mit hoher Wahrscheinlichkeit ursächlich für den Phänotyp ist. Sechs Fälle (Fälle 7 bis 12) bleiben unklar. Die Detektionsrate liegt also zwischen 2 % und 4,05 %.

### 3.2 Bestätigung der Ergebnisse der Real-Time-PCR

Die mittels des Primer-Sets A gefundenen subtelomeren Aberrationen wurden mit dem Set B bestätigt. Außerdem erfolgte bei acht Aberrationen eine Verifizierung mittels FISH, in vier Fällen mittels MLPA. Sofern ein familiärer Polymorphismus (CNP) gefunden wurde, wurde keine weitere Methode angewendet (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Verifizierung der gefundenen subtelomeren Aberrationen

Angegeben sind die Fallnummer, die mittels Real-Time-PCR gefundenen subtelomeren Aberrationen sowie die Methode, mit der das Ergebnis (neben der Bestätigung durch das zweite Primer-Set) verifiziert wurde. Bei Vorliegen eines CNP unterblieb dieses Vorgehen. CNP = Copy Number Polymorphism; del = Deletion; dup = Duplikation; FISH = Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung; MLPA = Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification; n. e. = nicht erfolgt.

Fall	Aberration	Methode zur Verifizierung
1	del 13q dup 9p	MLPA MLPA
2	del 11q dup 6p	FISH MLPA
3	del 4p	FISH
4	del 1q dup 2p (CNP)	MLPA und FISH -
5	dup 19q	FISH
6	del 6q	FISH
7	del 1q	n. e.
8	dup 1p	FISH
9	del 21q	FISH
10	del 20q	FISH
11	dup 10q	n. e.
12	dup 7p	n. e.
13	dup 7p (CNP)	-
14	dup 10q (CNP)	-
15	dup 7p (CNP)	-
16	del 5p (CNP)	-
17	del 8p (CNP)	-

### 3.3 Größe der subtelomeren Veränderungen

Exemplarisch soll anhand der Ergebnisse von Patient 6 die Größenbestimmung der subtelomeren Aberrationen hier dargestellt werden. Die Real-Time-PCR zeigte bei der Untersuchung aller subtelomeren Chromosomenbereiche mit dem Primer-Set A bzw. B eine terminale Deletion in 6q. Um die Deletion in 6q näher einzugrenzen, wurden folgende Detektoren zusätzlich in den subtelomeren Bereich von Chromosom 6q gelegt (s. Tabelle 5):

Tabelle 5: Fall 6, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 6. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
6q			
6q165.71	GGGCACAATATCTTCTCCACTCTGAGC	CGGTCTGGTACATCTCTTCCAACCTGC	135
6q166.76	TGTGTACCTGGTAATGGAGCTGATGC	AATGGAGGTAGTCCATGGTCTTGGTG	130
6q168.04	CCATCACTGTGACCTTACCAACATGG	GATCCTGACTGGGGTCCACAACTTA	175
6q169.39	CAGATGACCTCAGCAAGATCACCAAG	AATCCAGTAGGTGAGATCCAGCGTGT	187
6q	GCGTCCACTTGCTGTGACTGTGCTG	TGGGGCACCATGACTGCGAGAAGAG	179
6qF	CACAGCACCAGCCCCTCCCATCA	TGCCCATCGTGAGGAGCAGGTGCCA	185
6q170.74	TGCCTCAGCTCCTAAACTACCTGAA	GTAGACACTGTGTAAGCAATCTGTCAA	291
6q170.75	CGGACGCCTTCCACCGCTGCATCTT	GTCCCCTGGTCGCTCCCGGAATTA	148
6q170.8	GGAAAAGACCAACAGAAGGTGAGA	AGAAGAGGGTGACACACAGTTAGAA	201

Tabelle 6: Fall 6, Deletion 6q

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 6 mittels Real-Time-PCR bei Fall 6. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (=schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von <0,78 (=rot) entspricht der Deletion des subtelomeren Bereichs von 6q, die von 6q170.8 bis einschließlich 6q166.76 alle Detektoren einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
6q165.71	1,00	0,02
6q166.76	0,44	0,05
6q168.04	0,58	0,04
6q169.39	0,64	0,00
6q	0,59	0,03
6qF	0,56	0,05
6q170.74	0,71	0,06
6q170.75	0,60	0,08
6q170.8	0,56	0,06

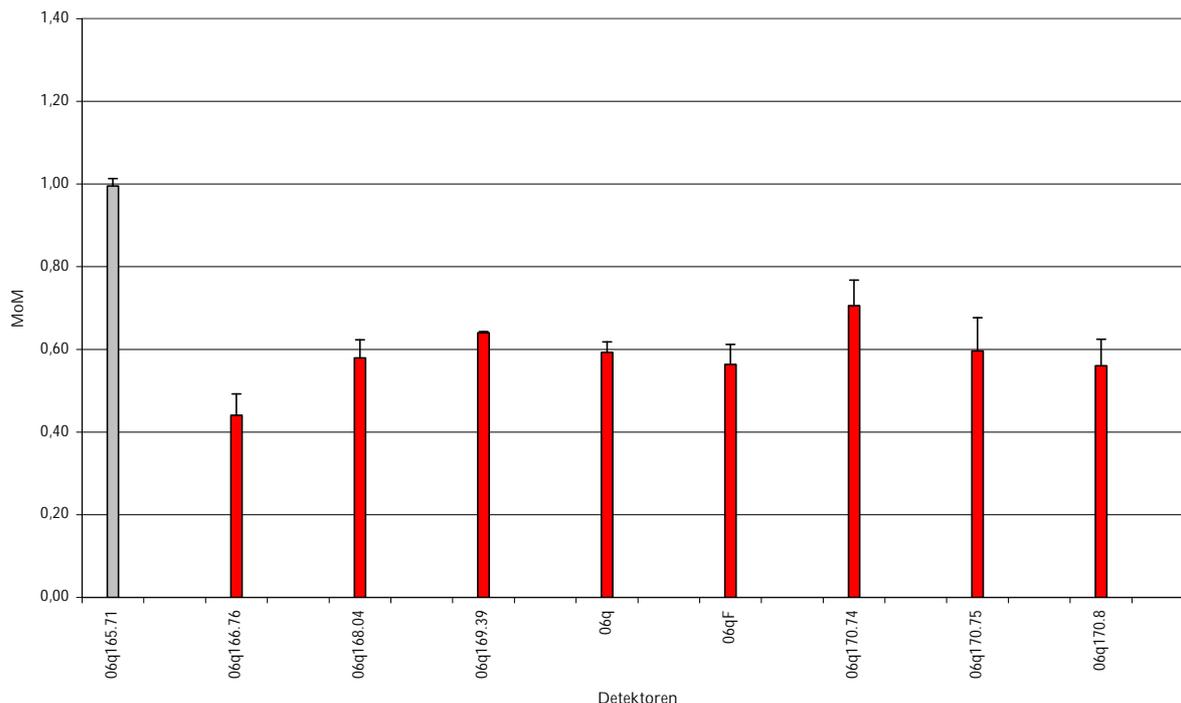


Abbildung 7: Fall 6, Deletion 6q

Subtelomeranalyse des langen (q-) Arms von Chromosom 6 mittels Real-Time-PCR bei Fall 6. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Verlust an DNA, entsprechend einer Deletion (<0,78 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 6q. Die Monosomie reicht vom Detektor 6q170.8 bis einschließlich zu 6q166.76 (4,0-5,3 Mb).



Abbildung 8: Fall 6, Deletion 6q

Darstellung des Chromosoms 6 mit dem Bereich der Deletion in ihrer geringsten Ausdehnung von 4,0 Mb am q-Ende des Chromosoms (University of California Santa Cruz: UCSC Genome Browser, [http://genome.ucsc.edu/trash/hgtIdeo/hgtIdeo\\_genome\\_49c0\\_a6dda0.png](http://genome.ucsc.edu/trash/hgtIdeo/hgtIdeo_genome_49c0_a6dda0.png), 5.08.2010).

Die Subtelomeruntersuchung mit der Real-Time-PCR zeigte eine Deletion des langen Arms von Chromosom 6, die die Detektoren 6q170.8, 6q170.75, 6q170.74, 6qF, 6q, 6q169.39, 6q168.04 und 6q166.76 einschließt und eine Größe von 4,0-5,3 Mb hat. Die Deletion enthält mindestens 46 Gene. Diese Deletion wurde mit FISH ebenfalls nachgewiesen. Die Untersuchung der Eltern ergab bei der Mutter sowohl mit Real-Time-PCR als auch mit FISH die gleiche Deletion in 6q wie bei ihrem Sohn. Der Vater war unauffällig. Die Mutter ist lernbehindert, zeigte aber sonst keine weiteren Symptome oder epileptische Episoden. Die Großeltern mütterlicherseits des Patienten waren beide gesund und von normaler Intelligenz. Sie zeigten einen normalen Karyotyp und waren auch in der Subtelomeruntersuchung mittels Real-Time-PCR unauffällig. Die Deletion in 6q ist demnach bei der betroffenen Mutter de novo entstanden und maternal an den Patienten vererbt worden.

### 3.3.1 Fall 1

In der Subtelomeruntersuchung zeigte sich eine Duplikation in 9p mit einer Ausdehnung von 7,6-8,3 Mb und eine Deletion in 13q mit einer Ausdehnung von 9,1 Mb bis 11,8 Mb. Beide Aberrationen wurden mittels MLPA bestätigt. Bei den Eltern zeigten FISH und Real-Time-PCR normale Ergebnisse. Die Duplikation auf Chromosom 9p umfasst mindestens 68 Gene, die Deletion auf Chromosom 13q mindestens 59 Gene (s. Anhang, Fall 1, S. 48).

### 3.3.2 Fall 2

Die Untersuchung der Chromosomen auf Mikrodeletion in 22q11.2 (Di-George-Syndrom) und Mutation im PTPN11 Gen (Noonan-Syndrom) war unauffällig. Mit der Real-Time-PCR wurde eine Duplikation im p-Arm von Chromosom 6 mit 177 bp bis 1,4 Mb und eine Deletion im q-Arm von Chromosom 11 mit einer Größe von mindestens 3,9 Mb festgestellt. Die Duplikation 6p konnte mit MLPA bestätigt werden. Die 11q Deletion konnte mit FISH bestätigt werden und es zeigte sich eine Translokation des duplizierten Segments auf den langen Arm des derivativen Chromosoms 11. Diese Aberrationen sind bei der Patientin de novo entstanden. Sowohl Real-Time-PCR als auch FISH zeigten bei den Eltern unauffällige Ergebnisse. Die Duplikation 6p umfasst mindestens 16 Gene, die Deletion 11q mindestens 275 Gene (s. Anhang, Fall 2, S. 51).

### 3.3.3 Fall 3

Die Real-Time-PCR ergab eine terminale Deletion im p-Arm von Chromosom 4 von mindestens 1,7 Mb, in der auch die kritische Region für das Wolf-Hirschhorn-Syndrom (WHS) liegt. Mit FISH konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Da beide Eltern in der Real-Time-PCR als auch in der FISH-Untersuchung unauffällig sind, ist die für das Wolf-Hirschhorn-Syndrom verantwortliche Deletion de novo entstanden. Die nähere Eingrenzung der Bruchpunkte war leider nicht möglich, da keine weitere DNA des Patienten zur Verfügung stand. Somit ist die maximale Ausdehnung der Deletion mit 7,7 Mb anzugeben, entsprechend der Position des nächsten regulär vervielfältigten Detektors in 3'-Richtung 04p7.6 (s. Anhang, Fall 3, S. 53).

### 3.3.4 Fall 4

Die Untersuchung auf ein Fragiles-X-Syndrom zeigte ein normales Ergebnis. In der Real-Time-PCR wurde eine Deletion in 1q und eine kleine Duplikation in 2p festgestellt. Die Deletion 1q hat eine Ausdehnung von 5,6 Mb bis 7,1 Mb und konnte mit MLPA und FISH bestätigt werden. Beide Eltern hatten einen normalen Karyotyp und waren für 1q in der FISH-Untersuchung unauffällig, weshalb die Deletion in 1q de novo entstanden ist. Die Deletion 1q umfasst 124 Gene. Die kleine Duplikation in 2p konnte beim gesunden Vater der Patientin nachgewiesen werden und wird als CNP gewertet (s. Anhang, Fall 4, S. 54).

### 3.3.5 Fall 5

Die Real-Time-PCR zeigte eine terminale Duplikation im langen Arm von Chromosom 19, die 4,8 Mb bis 5,0 Mb groß ist. Sie umfasst mindestens 182 Gene. Die Duplikation konnte mittels FISH-Sonde für 19q bestätigt werden. Es zeigte sich ein zusätzliches Signal für das 19q-Subtelomer auf Chromosom 6. Es war jedoch kein Verlust von 6q nachweisbar. Die Eltern der Patientin hatten einen unauffälligen Karyotyp und normale FISH-Ergebnisse. Die Duplikation 19q ist bei der Patientin folglich de novo entstanden. Dieser Fall wurde bereits als Kasuistik publiziert (Sauter et al. 2007)(s. Anhang, Fall 5, S. 56).

### 3.3.6 Fall 6

Diese Ergebnisse sind im Kapitel 3.3 beschrieben.

### 3.3.7 Fall 7

Die Untersuchung der subtelomeren Bereiche ergab eine Deletion im langen Arm von Chromosom 1. Die Deletion umfasst mindestens 3,0 Mb und schließt mindestens 94 Gene ein. Die subtelomere Untersuchung der gesunden Schwester der Patientin ergab keine

Auffälligkeiten. Eine Untersuchung der DNA der gesunden, nicht verwandten Eltern war leider nicht möglich. Die klinische Wertigkeit der subtelomeren Deletion von 1q kann bei der Patientin deshalb nicht näher klassifiziert werden (s. Anhang, Fall 7, S. 58).

### 3.3.8 Fall 8

Die in der Real-Time-PCR festgestellte Duplikation der subtelomeren Region des kurzen Arms von Chromosom 1 umfasst 1,3 Mb bis 3,1 Mb. In dieser Region liegen mindestens 90 Gene. Die Duplikation wurde auch mit FISH nachgewiesen. Die Untersuchung der elterlichen DNA war nicht möglich, deshalb kann keine genauere Einordnung der Aberration bei der Patientin erfolgen.

### 3.3.9 Fall 9

Nach Ausschluss eines Fragilen-X-Syndroms zeigen die Ergebnisse der Real-Time-PCR, dass die Deletion des langen Arms von Chromosom 21 eine Ausdehnung von 2,4 Mb bis 4,9 Mb hat. Dieses Ergebnis konnte mittels FISH bestätigt werden. Die MoM-Werte für die einzelnen Detektoren lagen im Mittel jedoch bei 0,70 und bei der FISH-Untersuchung zeigten 3 von 25 Zellen die Monosomie 21q. Diese Befunde bestätigen den Verdacht auf ein hochgradiges Mosaik. Die DNA der gesunden Eltern war für eine Untersuchung nicht verfügbar. Somit bleibt eine genauere Einordnung der Deletion von 21q bei dem Jungen aus.

### 3.3.10 Fall 10

Bei unauffälligem Karyogramm konnte mittels Real-Time-PCR eine terminale Deletion im langen Arm von Chromosom 20 der Patientin festgestellt werden. Diese Deletion, die mittels FISH bestätigt wurde, hat eine Größe von 0,2 Mb bis 1,4 Mb und schließt mindestens 10 Gene ein. Jedoch war weder die Untersuchung der DNA der gesunden Eltern, noch die der Schwester mit einseitiger Hirnatrophie möglich. Eine nähere Klassifizierung der subtelomeren Deletion von Chromosom 20q der Patientin bleibt aus (s. Anhang, Fall 10, S. 59).

### 3.3.11 Fall 11

Der Karyotyp sowie eine Untersuchung auf Fragiles-X-Syndrom und CDG-Syndrom waren unauffällig. Die Ergebnisse der Real-Time-PCR zeigten eine Duplikation des terminalen Abschnitts von Chromosom 10q, die eine Größe von 0,1 Mb bis 0,4 Mb hat und mindestens 17 Gene einschließt. Die Untersuchung der Eltern war in diesem Fall nicht möglich und eine genauere Einordnung der Duplikation bleibt aus (s. Anhang, Fall 11, S. 60).

### 3.3.12 Fall 12

Die in der Real-Time-PCR festgestellte Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 7 ist 0,01 Mb bis maximal 0,2 Mb groß und schließt mindestens 5 Gene ein. Ein Fragiles-X-Syndrom wurde vorher ausgeschlossen. Der Karyotyp war unauffällig. Die Untersuchung der Eltern war in diesem Fall nicht möglich und eine genauere Einordnung der Duplikation von Chromosom 7p bleibt aus (s. Anhang, Fall 12, S. 61).

### 3.3.13 Fall 13

Mit Hilfe der Real-Time-PCR konnte eine Duplikation des terminalen Bereichs von Chromosom 7p sowohl bei der Patientin als auch ihrer gesunden Mutter nachgewiesen werden (s. Anhang, Fall 13, S. 63).

### 3.3.14 Fall 14

In der Vorgeschichte waren bei der Patientin ein Angelmann-Syndrom, ein Fragiles-X-Syndrom, ein Rett-Syndrom und ein CDG-Syndrom ausgeschlossen worden. Die Real-Time-PCR zeigte eine terminale Duplikation in 10q. Bei der Untersuchung der Eltern konnte bei der Mutter die gleiche Duplikation im langen Arm von Chromosom 10 nachgewiesen werden. Beim Vater waren keine subtelomeren Aberrationen nachzuweisen. Die Duplikation ist also mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Mutter an die Tochter vererbt worden. Da die Mutter aber keinen Phänotyp ähnlich dem der Tochter aufweist, ist die Duplikation in 10q als CNP zu werten.

### 3.3.15 Fall 15

Mit Hilfe der Real-Time-PCR konnte die Duplikation des terminalen Bereichs von Chromosom 7p nachgewiesen werden. Die Untersuchung der subtelomeren Chromosomenabschnitte bei der Mutter war unauffällig. Beim gesunden Vater des Jungen konnte die gleiche Duplikation von 7p nachgewiesen werden und ist demnach als CNP zu werten (s. Anhang, Fall 15, S. 64).

### 3.3.16 Fall 16

Nach Ausschluss eines Di-George-Syndroms und eines Coffin-Lowry-Syndroms konnte mit der Real-Time-PCR eine Deletion des kurzen Arms (p-Arm) von Chromosom 5 nachgewiesen werden. Diese konnte mit einer erneuten Analyse an einer frischen Blutprobe bestätigt werden und umfasst mindestens den Detektor 05pF. Auch der Detektor 05p3 zeigt einen verminderten MoM. Ungewöhnlich ist, dass zwischen diesen Deletionen bestimmte chromosomale Regionen - zu sehen am normal replizierten Detektor 05p0.5 - erhalten geblieben zu sein scheinen. Die DNA der gesunden Eltern des Jungen wurde ebenfalls untersucht. Es zeigte sich beim Vater des Jungen die gleiche Deletion in Chromosom 5p, die Mutter war unauffällig. Da der Vater keine Symptome hat, die denen des Jungen entsprechen, gehen wir davon aus, dass es sich hier um einen benignen Polymorphismus (CNP) handelt, der vom Vater an den Sohn weitergegeben wurde (s. Anhang, Fall 16, S. 65).

### 3.3.17 Fall 17

Der Karyotyp des Jungen zeigt eine Robertsonsche Translokation mit einem Karyotyp 45,XY,der(14;15)(q10;q10) im 450 Banden Level. Nach Ausschluss eines Fragilen-X-Syndroms konnte mit der Real-Time-PCR bei dem Patienten eine Deletion des terminalen Bereichs von Chromosom 8p nachgewiesen werden. Die gleiche Deletion fand sich bei der gesunden Mutter. Es handelt sich also bei der gefundenen Deletion 8p um einen CNP (s. Anhang, Fall 17, S. 66).

## 3.4 Klinische Beschreibung der Patienten mit subtelomeren Veränderungen

### 3.4.1 Fall 1

Patient 1, mit einer terminalen Duplikation von 9p (7,6 Mb bis 8,3 Mb) und einer terminalen Deletion von 13q (9,1 Mb bis 11,8 Mb), wurde termingerecht nach komplikationsloser Schwangerschaft als Kind gesunder Eltern geboren. Der psychomotorisch retardierte Junge war bei Geburt hypotroph und Körperlänge, Körpergewicht und Kopfumfang lagen unter dem 3. Perzentil. Bei der Untersuchung im Alter von 5 Monaten (Körperlänge 66cm, Körpergewicht 6340 g, OFC 40,5cm) waren Hypertelorismus, Epikanthus, Strabismus, Ptosis und Enophthalmus des linken Auges (s. Abbildung 9, a-c),

Mikropenis mit Kryptorchismus, Klumpfüße und Fehlstellung der 2. und 4. Zehe beidseits auffällig. Der Patient war muskulär hypoton, konnte aber alle Extremitäten spontan bewegen, Objekte greifen und sie von einer Hand zur anderen geben. Das Hören war eingeschränkt. In der kranialen MRT waren leicht erweiterte Ventrikel und Subarachnoidalräume zu sehen. Die Sonografie des Herzens zeigte ein mildes Kinking der Aorta. Eine Sonografie des Abdomens war unauffällig.

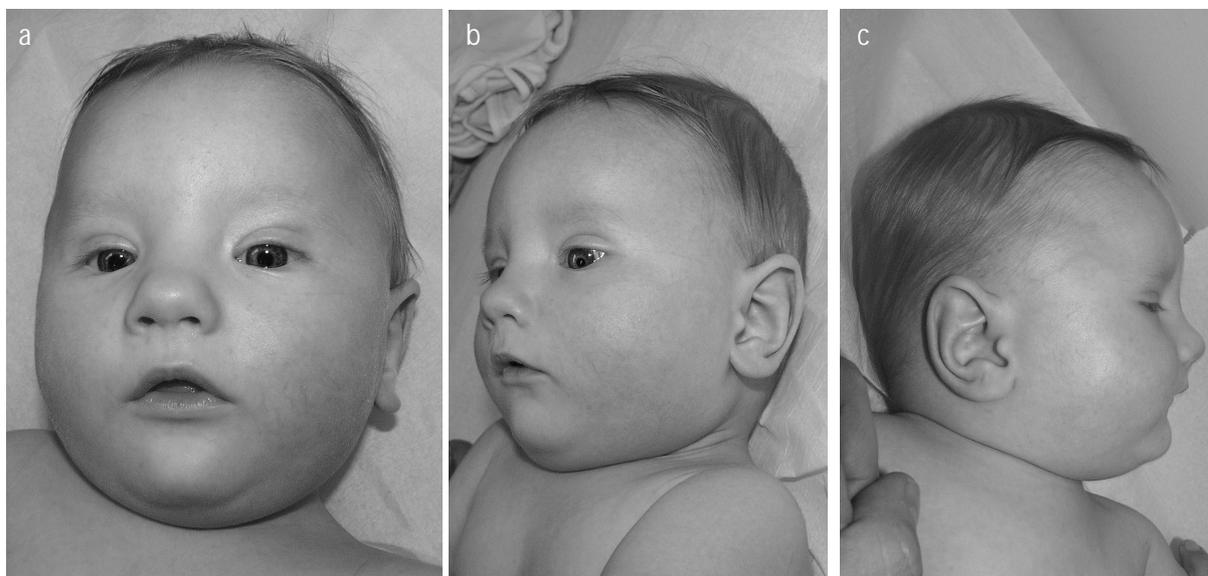


Abbildung 9: Fotografien von Patient 1  
Im Alter von 5 Monaten (a-c).

### 3.4.2 Fall 2

Patientin 2, mit einer terminalen 11q Deletion (mindestens 3,9 Mb) und einer terminalen 6p Duplikation (177 kb bis 1,4 Mb), ist ein psychomotorisch entwicklungsverzögertes Mädchen mit einem komplexen Herzfehler (Double Outlet Right Ventricle, Pulmonalisstenose, Vorhofseptumdefekt). Das Kind gesunder Eltern war bei Geburt hypotroph und muskulär hypoton. In der körperlichen Untersuchung im Alter von 17 Monaten lagen alle Körpermaße unter dem 3. Perzentil (Körperlänge 69 cm, Körpergewicht 7800 g, OFC 44,5 cm). Das Mädchen zeigte folgende fazialen Dysmorphien: rundes Gesicht, tief sitzende und nach hinten rotierte Ohren, flacher Nasenrücken und antevertierte Nasenlöcher, Hypertelorismus und offenstehender Mund (s. Abbildung 10, a-c). An beiden Händen zeigte sie eine Klinodaktylie der 4. Finger beidseits. Es war ein weiter Mamillenabstand bemerkbar. Der Herzfehler wurde im Alter von 7 Monaten operativ korrigiert und eine beidseitige mittel- bis hochgradige Innenohrschwerhörigkeit wurde mit Hörgeräten versorgt. Mit 12 Monaten konnte sie krabbeln, mit 16 Monaten ohne Unterstützung laufen und mit 17 Monaten erste Worte sprechen.



Abbildung 10: Fotografien von Patientin 2  
Patientin 2 im Alter von 2 Jahren und 4 Monaten (a) und im Alter von 5 Jahren und 1 Monat (b und c).

### 3.4.3 Fall 3

Der Junge, mit einer terminalen Deletion von 4p (1,7 Mb bis 7,6 Mb), ist schwer psychomotorisch retardiert. Er wurde in der 35. Schwangerschaftswoche als hypotrophes Kind geboren. Alle Geburtsmaße lagen unter dem 3. Perzentil (Körpergewicht 1490 g, Körperlänge 43,5 cm, OFC 30 cm). Die körperliche Untersuchung des Jungen im Alter von 10 Tagen zeigte eine Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, prominente Glabella, hohe Stirn, breite Nasenwurzel, Hypertelorismus, Mikrognathie, Vierfingerfurchen und Klumpfüße beidseits.

### 3.4.4 Fall 4

Patientin 4, mit einer terminalen Deletion von 1q (5,5 Mb bis 7,1 Mb), ist psychomotorisch retardiert. Die gefundene Duplikation in Chromosom 2p wird als CNP gewertet. Sie wurde termingerecht (39. SSW) mit einem Körpergewicht von 2900 g (25. Perzentil) und einem okzipitofrontalen Kopfumfang von 32 cm (3. Perzentil) geboren. Die Entwicklung verlief primär verzögert. Im Alter von 18 Monaten konnte sie frei sitzen. Im Alter von 24 Monaten wog das Mädchen 13 kg (90. Perzentil), war 84 cm (25. Perzentil) groß und hatte einen okzipitofrontalen Kopfumfang von 41,3 cm (unter dem 3. Perzentil). An Dismorphien zeigte sie Mikrozephalie, hohe Stirn, Synostose der frontalen Sutur, große Ohrmuscheln, hoher Gaumen, gespaltene Uvula und eine dünne Oberlippe (s. Abbildung 11). Die Finger- und Zehnnägel waren hypoplastisch. Eine im Alter von 23 Monaten durchgeführte kraniale MRT zeigte eine globale Myelinisierungsverzögerung und eine Dysgenese des Corpus callosum.

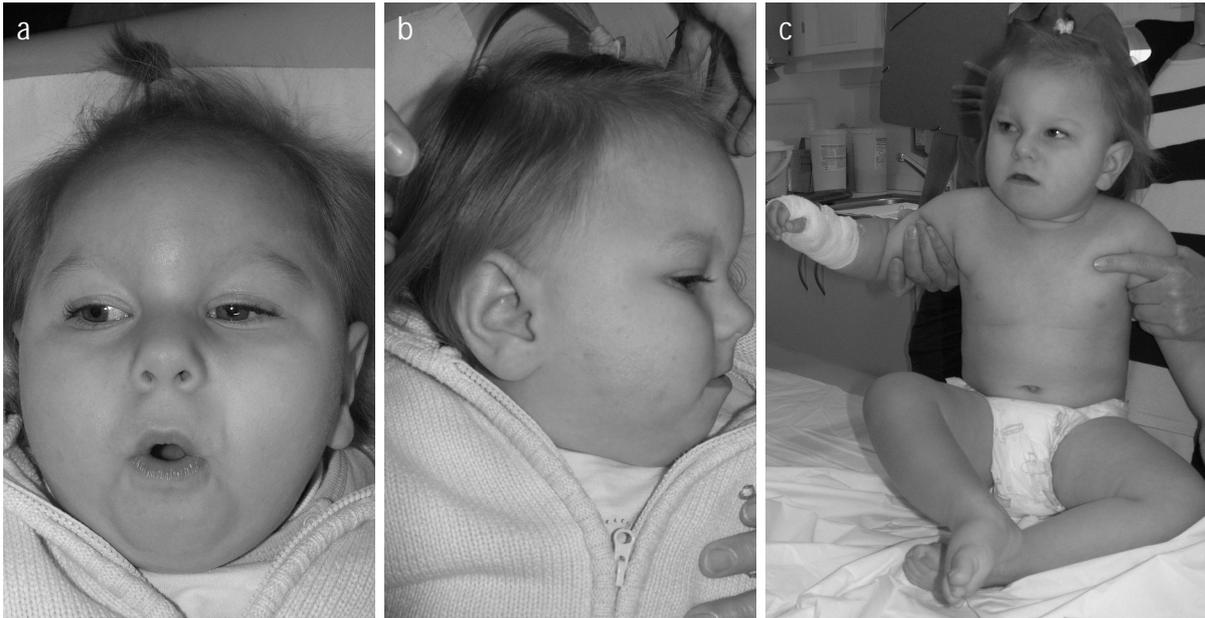


Abbildung 11: Fotografien von Patientin 4  
Patientin 4 im Alter von 1 Jahr und 11 Monaten (a-c).

#### 3.4.5 Fall 5

Die Patientin 5, mit einer terminalen Duplikation von 19q (4,8 Mb bis 5,0 Mb), wurde als Kasuistik schon detailliert von Sauter et al. (2007) beschrieben. Sie wurde als zweites Kind gesunder, nicht verwandter Eltern mit normalen Körpermaßen in der 39. Schwangerschaftswoche geboren. Die psychomotorische Entwicklung verlief primär verzögert. Krabbeln konnte sie mit 16 Monaten, Laufen mit 2 Jahren und 4 Monaten und die ersten fünf Wörter konnte sie im Alter von 2 Jahren und 7 Monaten sprechen. Bei der Untersuchung im Alter von 2 Jahren und 7 Monaten waren eine hohe Stirn, tiefer Haaransatz, breite Nasenwurzel, Epikanthus, nach lateral abfallende Lidachsen, tief sitzende und nach hinten rotierte Ohren, ein kurzer Hals und eine Mittelgesichtshypoplasie feststellbar. Das Körpergewicht lag unter dem 3. Perzentil und die Patientin war muskulär hypoton. Sie zeigte ein Pectus carinatum. In der kranialen MRT zeigte sich ein dünnes Corpus callosum. Stoffwechselscreening, EEG, Echokardiografie, Sonografie des Abdomens und die Röntgenuntersuchung der linken Hand waren unauffällig.

#### 3.4.6 Fall 6

Der Patient 6, mit einer terminalen Deletion von 6q (4,0 Mb bis 5,3 Mb), wurde termingerecht geboren. Bei der Mutter des Jungen war eine Lernbehinderung bekannt. Der Vater befand sich zum Untersuchungszeitpunkt in psychiatrischer Behandlung, jedoch ist keine geistige Behinderung oder Symptome ähnlich denen des Sohnes bekannt. Nach komplikationsloser Schwangerschaft wurde der Junge termingerecht mit einem Körpergewicht von 3100g (25. Perzentil), einer Körperlänge von 48 cm (25. Perzentil) und einem okzipitofrontalen Kopfumfang von 35 cm (50. Perzentil) geboren. Die weitere Entwicklung verlief primär verzögert. Im Alter von 18 Monaten konnte er frei sitzen und mit 2 Jahren begann er zu gehen. Auch die Sprachentwicklung war verzögert. Der Junge entwickelte in der frühen Kindheit Absencen ähnliche, epileptische Anfälle, die unter medikamentöser Einstellung in geringer Frequenz persistierten. Zum Untersuchungszeitpunkt im Alter von 6 Jahren und 6 Monaten wog er 21,5 kg (50. Perzentil), war 116 cm (25. Perzentil) groß und hatten einen okzipitofrontalen Kopfumfang von 50 cm

(3.-10. Perzentil). Der Grad seiner mentalen Retardierung war zwischen Lernbehinderung und leichter geistiger Behinderung anzusiedeln. Die auffälligen Dismorphien waren eine hohe Stirn, langes Philtrum und eine verstärkt gefaltete Ohrhelix auf beiden Seiten. Zudem war der Junge muskulär hypoton und leicht dysmetrisch im Finger-Nase-Versuch. Eine Sonografie des Abdomens war ohne pathologischen Befund.

#### 3.4.7 Fall 7

Die Patientin, mit einer terminalen Deletion von 1q (mindestens 3,0 Mb), wurde termingerecht als zweites Kind gesunder, nicht konsanguiner Eltern mit Mikrozephalie und einem Körpergewicht von 2380 g (2. Perzentil) geboren. Sie hatte einen ASD II und war muskulär hypoton. Im CCT, bei dem damals einjährigen Mädchen, zeigte sich eine kortikale Atrophie. Bei der Untersuchung im Alter von 13 Jahren und 11 Monaten fielen Mikrozephalus, breite, flache Nasenwurzel mit angehobener Spitze, Epikanthus, flaches Philtrum, lückenhaft stehende Zähne, spitz zulaufende Finger und Knick-Senk-Füße beidseits auf. Anamnestisch sind eine symptomatische Epilepsie mit generalisierten Krampfanfällen, eine beidseitige Innenohrschwerhörigkeit, versorgt mit Hörgeräten, und eine Refraktionsanomalie berichtet. Im Alter von 14 Jahren und 4 Monaten wog sie 27,5 kg, war 133 cm groß und hatte einen Kopfumfang von 46 cm (alle unter dem 3. Perzentil). Sie zeigte rezidivierende Hüftluxationen und konnte am Rollator oder mit Unterstützung gehen. Die expressive Sprache fehlte.

#### 3.4.8 Fall 8

Die Patientin, mit einer terminalen Duplikation von 1p (mindestens 1,3 Mb), wurde im Alter von 4 Monaten dem Institut vorgestellt. An fazialen Dismorphien waren Mikrozephalus, hoher gotischer Gaumen, verkürztes Zungenbändchen, Retrognathie, schmale Oberlippe, breite Nasenwurzel mit antevvertierten Nasenlöchern, Hypertelorismus, Strabismus convergens und tief stehende und dysplastische Ohren zu sehen. Weiterhin fielen Pterygium colli, weiter Mamillenabstand, ventral positionierter Anus und muskuläre Hypotonie auf. Die Geburt der Patientin war termingerecht und alle Geburtsmaße lagen über dem 3. Perzentil (Körpergewicht 3260g, Körperlänge 50 cm, Kopfumfang 33 cm). In der Sonografie des Abdomens, im Alter von einem Monat, wurde eine Urachuszyste diagnostiziert. In der Echokardiografie zeigte sich ein ASD II. Sie war das dritte Kind gesunder Eltern. Eine Schwester litt an einer einseitigen Hirnatrophie und Epilepsie, die andere war gesund.

#### 3.4.9 Fall 9

Der Junge, mit einer terminalen Deletion von 21q (2,4 Mb bis 4,9 Mb), war das dritte Kind gesunder, nicht konsanguiner Eltern. Die Geburt nach unauffälliger Schwangerschaft in der 40. Schwangerschaftswoche verlief komplikationslos. Zum Untersuchungszeitpunkt war der Patient 13 Jahre und 6 Monate alt. Der Junge zeigte bei der Untersuchung autistische wie mutistische Züge. Er hatte tief sitzende Ohren, eine breite Nasenwurzel mit angehobener Nasenspitze, eine Refraktionsanomalie, lange und schlanke Finger und lange Großzehen. Im Röntgen der Handwurzelknochen im Alter von fast 6 Jahren war das Knochenalter retardiert. Vor allem die Sprachentwicklung des Jungen verlief primär verzögert. Er sprach erst mit 3 Jahren erste Wörter. Sowohl ein Onkel mütterlicherseits als auch eine Tante väterlicherseits sind anamnestisch ebenfalls mental retardiert. Weitere augenärztliche und ohrenärztliche Untersuchungen sowie eine MRT waren unauffällig.

#### 3.4.10 Fall 10

Patientin 10, mit einer terminalen Deletion von 20q (0,2 Mb bis 1,4 Mb), wies, abgesehen von der mentalen Retardierung, keine zusätzlichen Merkmale auf. Die Untersuchung der DNA mittels Real-Time-PCR erfolgte im Alter von 10 Jahren und 9 Monaten.

#### 3.4.11 Fall 11

Der männliche Patient hatte eine Duplikation des terminalen Bereichs von Chromosom 10q (0,1 bis 0,4 Mb). Er wurde spontan in der 41. Schwangerschaftswoche mit normalen Maßen (Körpergewicht 3270 g, Körperlänge 55 cm, Kopfumfang 34 cm) aber muskulär hypoton geboren. Die Mutter war psychisch erkrankt. Eine Schwester war verhaltensauffällig, sonst aber körperlich gesund. Die andere Schwester war in ihrer motorischen Entwicklung retardiert. Außerdem erlitt die Großmutter mütterlicherseits des Jungen drei Fehl- und eine Totgeburt. Ein weiteres Kind ist an seinem ersten Lebenstag verstorben. Laufen konnte der Junge mit 24 Monaten, mit 42 Monaten konnte er einzelne Wörter sprechen. Die Entwicklung verlief primär verzögert, vor allem die Feinmotorik war eingeschränkt. Bei der Untersuchung im Alter von 7 Jahren und 1 Monat waren Balkonstirn, Hypertelorismus, schmale Oberlippe, überstreckbare Gelenke und Klinodaktylie beidseits auffällig. Außerdem waren eine Hyperopie und eine schwere Hörstörung rechts bei normal angelegtem Labyrinth bekannt. Körpergewicht, Körperlänge und Kopfumfang lagen auf bzw. unter dem 3. Perzentil. Der Junge hatte eine latente Hypothyreose. Eine MRT im Alter von dreieinhalb Jahren zeigte eine verzögerte Myelinisierung. Herz und Nieren waren sonografisch unauffällig.

#### 3.4.12 Fall 12

Der männliche Patient, mit einer terminalen Duplikation von Chromosom 7p (0,01 Mb bis 0,2 Mb), wurde im Alter von 9 Jahren und 8 Monaten bei uns im Institut vorgestellt. An äußeren Merkmalen war ein Epikanthus auffällig.

#### 3.4.13 Fall 13

Die Patientin, mit einer Duplikation des subtelomeren Bereichs von Chromosom 7p, war ein mental retardiertes Kind mit Störung der expressiven Sprache.

#### 3.4.14 Fall 14

Die Patientin, mit einer terminalen Duplikation von 10q, ist das Kind gesunder, nicht konsanguiner Eltern. Sie wurde in der 38. Schwangerschaftswoche mit einem Körpergewicht von 2650 g (25. Perzentil), einer Körperlänge von 48 cm (90. Perzentil) und einem Kopfumfang von 32 cm (9. Perzentil) geboren. Bei der körperlichen Untersuchung mit 8 Jahren und 2 Monaten waren Strabismus divergens, auffälliges Gebiss mit auseinander stehenden Schneidezähnen und Mikrognathie zu sehen. Sie wog 31 kg (91. Perzentil) und war 132 cm groß (75. Perzentil). Der Kopfumfang war 53 cm (75. Perzentil). Das Mädchen war ataktisch und litt an Krampfanfällen bei unauffälligem EEG. Eine nicht näher bezeichnete Schallempfindungsstörung war beschrieben. In der kranialen MRT mit 3 Jahren und 9 Monaten war kein Hinweis auf eine Myelinisierungsstörung zu sehen. In der Familie litt der Halbbruder des Mädchens an ADHS und Legasthenie, der Bruder hatte eine Leserechtschreibschwäche.

#### 3.4.15 Fall 15

Der männliche Patient, mit einer terminalen Duplikation des kurzen Arms (p-Arm) von Chromosom 7, war das Kind gesunder, nicht konsanguiner Eltern. Die Geburt erfolgte

spontan in der 39. Schwangerschaftswoche mit einem Körpergewicht von 2980 g (25. Perzentil), einer Körperlänge von 51 cm (75. Perzentil) und einem Kopfumfang von 31 cm (unter dem 2. Perzentil). Im Alter von 10 Monaten waren Mikrozephalie, Mikroretrognathie, Strabismus, Nystagmus, tief sitzende und nach hinten rotierte Ohren, kurze und spitz zulaufende Finger, Klinodaktylie beidseits, Klumpfüße und Sandalenlücke beidseits auffällig. Außerdem war ein Anfallsleiden seit dem dritten Lebensmonat bekannt.

#### 3.4.16 Fall 16

Der Patient, mit einer terminalen Deletion von Chromosom 5p, war das erste Kind gesunder Eltern und wurde termingerecht mit 3470g Körpergewicht (25. Perzentil) und 54 cm Körperlänge (91. Perzentil) geboren. Bei der Untersuchung im Alter von 4 Jahren und 2 Monaten wog er 13 kg, war 94 cm groß und hatte einen Kopfumfang von 49 cm. Er lag damit mit allen Maßen unter dem zweiten Perzentil. Fazial waren Hypertelorismus, große Ohren und breiter Nasenrücken auffällig. Weitere körperliche Merkmale waren Klinodaktylie, Sandalenlücke und Sichelfüße beidseits. Der Junge war von Geburt an muskulär hypoton. Im Alter von 24 Monaten konnte er Laufen und erste Worte sprechen. Die kraniale MRT mit 2 Jahren zeigte ein vergrößertes Großhirnwindungsrelief, eine Arachnoidalzyste rechts temporal und eine okzipital betonte Leukenzephalopathie. In der Sonografie fand sich eine Splenomegalie. Außerdem hatte er eine Rachenzyste. Seit er 3 Jahre und 8 Monate alt war, wurde er aufgrund eines Wachstumshormonmangels substituiert.

#### 3.4.17 Fall 17

Der Patient, mit einer terminalen Deletion des kurzen Arms von Chromosom 8, zeigte neben der deutlichen Sprachentwicklungsverzögerung und einer im Alter von 4 Jahren festgestellten Hemihypertrophie keine Auffälligkeiten. Er war das Kind gesunder Eltern.

### 3.5 Auswertung des De-Vries-Scores

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben (s. Kapitel 1.6), wurde der Checkliste von de Vries et al. (2001) folgend für alle 296 Patienten ein Score anhand der Familienanamnese für mentale Retardierung, prä- bzw. postnataler Wachstumsstörungen, fazialer Dysmorphien und anderer angeborener Fehlbildungen berechnet. Für das Kollektiv ergab sich folgende Verteilung (s. Tabelle 7):

Tabelle 7: Absolute Verteilung des Scores nach de Vries et al. (2001)

Pt. = Patienten. \*Patienten mit subtelomerer Deletion bzw. Duplikation, die als CNP gewertet wurden, wurden nicht gesondert aufgelistet und sind bei den Patienten ohne subtelomere Aberration eingeschlossen.

De-Vries-Score	Anzahl der Pt. insgesamt*	Pt. mit ursächlicher subtelomerer Aberration	Pt. mit subtelomerer Aberration ungeklärter Relevanz
0	61	0	2
1	47	1	0
2	48	1	0
3	41	0	0
4	39	1	1
5	20	1	2
6	19	1	0
7	7	0	0
8	8	1	1
9	1	0	0

Tabelle 8: Absolute und prozentuale Verteilung des Scores nach de Vries et al. (2001)

Zusammenfassung der Verteilung des De-Vries-Scores in Gruppen und Angabe der Zeilenhäufigkeit absolut und prozentual. Pt. = Patienten. \*Patienten mit subtelomerer Deletion bzw. Duplikation, die als CNP gewertet wurden, wurden nicht gesondert aufgelistet und sind bei den Patienten ohne subtelomere Aberration eingeschlossen.

De-Vries-Score	Anzahl der Pt. mit unauffälligem Subtelomerbefund*		Pt. mit ursächlicher subtelomerer Aberration		Pt. mit subtelomerer Aberration ungeklärter Relevanz	
		in %		in %		in %
0	64	96,97	1	1,56	1	1,56
1-2	93	98,94	1	1,06	0	0,00
3-4	78	97,50	1	1,25	1	1,25
5-9	50	89,29	3	5,36	3	5,36
Summe	285	96,28	6	2,03	5	1,69

Der Median des De-Vries-Scores aller 296 Patienten liegt bei 2 Punkten (zu erreichen sind 0-9 Punkte). Drei der Patienten mit einer für den Phänotyp ursächlichen subtelomeren Aberration haben De-Vries-Scores mit mehr als 5 Punkten. 50 Patienten mit unauffälligem Subtelomerbefund haben mehr als 5 Punkte. Ein Patient mit einer ursächlichen subtelomeren Aberration hat 0 Punkte. 64 Patienten ohne subtelomere Aberration haben ebenfalls 0 Punkte. Zwei Drittel der Patienten mit subtelomerer Aberration erreichten einen Score von mindestens 3 Punkten (s. Tabelle 8).

## 4. Diskussion

### 4.1 Die submikroskopischen, subtelomeren Veränderungen

#### 4.1.1 Untersuchungsmethoden

Das subtelomere Screening kann mit den Techniken FISH, MLPA, MAPH und Array-CGH erfolgen. Die am weitesten verbreitete und bisher wahrscheinlich am häufigsten genutzte Technik ist FISH. Mit dieser Methode werden Duplikationen und Deletionen in balancierter und unbalancierter Form registriert (Rooms et al. 2005). Zur Charakterisierung und Verifizierung der gefundenen Aberrationen können zusätzlich zu den bestehenden Sets Bruchpunktbestimmungen mit weiteren Klonen erfolgen. Jedoch ist die Technik labortechnisch sehr aufwändig und teuer. Da in der klinischen Praxis Untersuchungen großer Kollektive nötig sind, wurden alternative Strategien entwickelt, die auf einer PCR basieren wie MAPH und MLPA. Diese ermöglichen die Untersuchung aller subtelomeren Chromosomenbereiche in einer einzigen Reaktion. Mit beiden Techniken kann jedoch eine balancierte Translokation nicht erfasst werden. Die genomweite Untersuchung mit Array-CGH bietet die Möglichkeit das gesamte Genom auf Aberrationen zu überprüfen und bietet damit weitere diagnostische Möglichkeiten im Vergleich zu den oben genannten Techniken. Eine Erfassung dieser Aberrationen ist prinzipiell mit den anderen Techniken ebenso möglich. Die Array-CGH war und ist aufgrund der hohen Anschaffungskosten und hoher Kosten pro Untersuchung nicht für alle diagnostischen Zentren erhältlich und damit nicht ausreichend einsetzbar.

Diese Studie ist die erste, die zur Untersuchung eines Kollektivs von Patienten mit mentaler Retardierung die quantitative Real-Time-PCR mit SYBR-Green Dye eingesetzt hat und Teile wurden bereits von Auber et al. (2009) publiziert. Die Technik vermindert den Arbeitsaufwand erheblich, da sie teilautomatisiert erfolgt. Sie ist in allen Laboren, die für molekulargenetische Untersuchungen eingerichtet sind und über eine PCR-Einheit verfügen durchführbar und vergleichsweise kostengünstig. Weiterhin ist eine genaue Bruchpunktbestimmung der Aberrationen durch Einsatz individuell ausgewählter zusätzlicher Primer jederzeit möglich (Boehm et al. 2004; Sauter et al. 2007). Die PCR ist in anderen Bereichen ein etabliertes Messverfahren. So fanden Boehm et al. (2004) bei der Etablierung der Methode unter den 20 Patienten mit bekannter subtelomerer Imbalance keine falsch negativen Befunde bzw. unter den 20 Negativkontrollen keine falsch positiven. In unserem Kollektiv erfolgte bei mit der Real-Time-PCR für unauffällig befundenen Subtelomerbefunden grundsätzlich keine weitere Verifizierung dieser Ergebnisse. Durch dieses Vorgehen, bedingt durch die hohe Anzahl der untersuchten Patienten, ist die Angabe von Spezifität und Sensitivität der Real-Time-PCR für dieses Kollektiv nicht möglich. Bei gefundenen subtelomeren Aberrationen erfolgte immer eine Verifizierung mittels des zweiten vorhandenen Primer-Sets, und in den meisten Fällen wurde eine zusätzliche Bestätigung mit einer grundsätzlich anderen Methode wie FISH oder MLPA durchgeführt. Sofern es sich um einen familiären CNP handelte, erfolgte keine weitere Untersuchung mit MLPA oder FISH (s. Tabelle 4, S. 27).

#### 4.1.2 Polymorphismen

Als Copy Number Polymorphisms (CNP) werden neutrale Sequenzvariationen im menschlichen Genom bezeichnet. Die endgültige Unterscheidung zwischen klinisch relevanten Variationen und neutralen Veränderungen ist erst möglich, wenn viele Patienten aber auch Gesunde auf diese Variationen hin untersucht wurden. Breitere Genotyp-

Phänotyp-Untersuchungen müssen erfolgen um zu verstehen welche Konsequenzen solche, oft großen Copy Number Variations haben (Balikova et al. 2007). Bei 6 der Aberrationen konnte die Duplikation oder Deletion auch bei einem gesunden Elternteil nachgewiesen werden und selbige wurden als CNP gewertet. Die Duplikationen finden sich in den Chromosomen 2p, 7p, und 10q, die Deletionen in 5p und 8p. In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass diese als benigne gewerteten Polymorphismen häufiger sind als angenommen (Adeyinka et al. 2005). Deshalb ist die Untersuchung der elterlichen DNA zu einem wesentlichen Bestandteil in der subtelomeren Diagnostik geworden (Adeyinka et al. 2005). So wurde erst kürzlich die Duplikation im subtelomeren Bereich von Chromosom 10q mit einer enormen Ausdehnung von bis zu 7,8 Mb als familiäre Variante bei gesunden Personen beschrieben (Balikova et al. 2007; Ravnan et al. 2006). Im Fall 14 zeigt sich eine entsprechende Duplikation von 10q, die auch bei der gesunden Mutter gefunden wurde. Im Fall 11, ebenfalls mit einer Duplikation 10q, war eine Untersuchung der Eltern nicht möglich, jedoch wäre das Vorliegen eines benignen Polymorphismus damit möglich. Drei der untersuchten Patienten (Fall 12, Fall 13 und Fall 15) trugen eine Duplikation des subtelomeren Bereichs von Chromosom 7p. Bei Patientin 13 trägt die gesunde Mutter die gleiche Aberration, bei Patient 15 der gesunde Vater. Bisher wurde auch in großen Studien, wie rückblickend von Balikova et al. (2007) zusammengefasst (Balikova et al. 2007), kein CNP im subtelomeren Bereich von 7p beschrieben, ebenso nicht in der Database of Genomic Variants (Department of Genetics and Genomic Biology: Database of Genomic Variants, <http://projects.tcag.ca/variation/>, 17.07.2010). Es ist also anzunehmen, dass wir einen weiteren CNP gefunden haben. Auch bei Patient 12 könnte demnach ein benigner Polymorphismus vorliegen. Im Fall 4 zeigt sich eine Duplikation in 2p, im Fall 16 eine familiäre Deletion in 5p und im Fall 17 eine familiäre Deletion von 8p, die alle bisher nicht in der Database of Genomic Variants (Department of Genetics and Genomic Biology: Database of Genomic Variants, <http://projects.tcag.ca/variation/>, 17.07.2010) zu finden sind.

In den Fällen 7, 8, 9, 10, 11 und 12 war eine nähere Einordnung der subtelomeren Veränderungen bezüglich ihrer klinischen Relevanz nicht möglich, da keine DNA der Eltern für eine subtelomere Diagnostik zur Verfügung stand.

Bisher ist die Häufigkeit dieser CNP noch unklar, da die Untersuchung der Eltern in der Vergangenheit nicht immer stattfand. Außerdem erfolgte in der Vergangenheit nicht regelmäßig eine genaue Bruchpunktbestimmung der Aberrationen, was eine genaue Genotyp-Phänotyp-Beschreibung erschwert. Auch wenn das familiäre Auftreten einer Aberration mit immer dem gleichen Phänotyp ein deutlicher Hinweis auf die Relevanz dieser sein kann, sollte die Bewertung vorsichtig erfolgen.

Bei Balikova et al. (2007) fiel auf, dass die gefundenen Polymorphismen Größen von bis zu 7,6 Mb aufwiesen und bis zu 78 Gene einschlossen (Balikova et al. 2007). Es bleibt fraglich ob Genomvariationen dieser Größe ohne Konsequenz bleiben können (Balikova et al. 2007). Eine andere Erklärung für den unauffälligen Phänotyp der Eltern der Patienten, die die gleiche Aberration aufweisen, ist die mögliche variable Expressivität der Aberrationen. So zeigt im Fall 6 die Mutter des Patienten die gleiche Deletion 6q, jedoch einen mildereren Phänotyp im Sinne einer Lernbehinderung. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Demaskierung eines rezessiven Allels durch die Deletion. Auch dies würde nur beim Indexpatienten zu einem entsprechenden Phänotyp führen. Auch das Vorliegen eines somatischen Mosaiks bei den Eltern und auch epigenetische Veränderung müssen in Betracht gezogen werden. Auch eine Größenzunahme der Duplikation bzw. Deletion von einer Generation zur nächsten ist nicht auszuschließen (Adeyinka et al. 2005; Balikova et al. 2007).

## 4.2 Klinische Beschreibung der Patienten

Eine genaue Phänotyp-Genotyp-Korrelation ist bisher kaum möglich, da die Größen der Deletionen und Duplikationen nicht immer genau bestimmt wurden. Einige der bisher in der Literatur beschriebenen Copy Number Polymorphisms sind sehr groß und es scheint unwahrscheinlich, dass diese ohne phänotypische Konsequenz bleiben (Balikova et al. 2007). Theoretisch kann das familiäre Auftreten einer Aberration nicht vollständig ausschließen, dass diese Einfluss auf den Phänotyp hat. Die Untersuchung großer Patientenkollektive und genaue Eingrenzung der Aberrationsgröße werden bei der Korrelation von Phäno- und Genotyp zukünftig eine große Rolle spielen.

## 4.3 Detektionsrate

Insgesamt konnten wir bei 17 der 296 mittels Real-Time-PCR untersuchten Patienten eine oder zwei subtelomere Aberrationen feststellen. Bei 5 der 17 Patienten liegt eine de novo entstandene Aberration vor. Die familiäre Untersuchung auf subtelomere Veränderungen erbrachte keine Auffälligkeiten. Zwei dieser Patienten (Fall 1 und Fall 2) zeigen komplexe Veränderungen mit sowohl einer Duplikation als auch einer Deletion. Die Kombination einer Deletion und Duplikation kann eine unbalancierte Translokation sein, die während der Meiose entsteht, wenn bei einem Elternteil eine balancierte Translokation besteht. Große Studien zeigen, dass ungefähr die Hälfte der unbalancierten subtelomeren Aberrationen familiären Ursprungs ist (Knight et al. 1999; Ravnan et al. 2006). In unserer Studie zeigte keiner der untersuchten Elternteile eine balancierte Translokation. Vaterschaftsuntersuchungen wurden keine durchgeführt.

Nach Ausschluss der CNP liegt die Detektionsrate bei 2 bis 4 %, unter Einschluss der unklaren Fälle. Vorausgegangene Studien zeigen große Unterschiede der gemessenen Detektionsraten von 2 % bis 29 % (Joly et al. 2001)(s. Tabelle 9, S. 42), wobei die Auswahlkriterien für die untersuchten Patienten verschieden waren, der Karyotyp mit unterschiedlichen Auflösungen untersucht wurde und nicht alle Autoren CNP von der Berechnung konsequent ausschlossen. In unserem Kollektiv haben wir nach Ausschluss der benignen Polymorphismen Deletionen in 1q, 4p, 6q, 11q und 13q sowie Duplikationen in 6p, 9p und 19q gefunden. Ravnan et al. (2006) fanden die häufigsten Aberrationen in 1p, gefolgt von 22q, 4p, 9q, 8p, 2q und 20p. Die Häufigkeit der registrierten Duplikationen oder Deletionen ist jedoch nicht zuletzt abhängig von der diagnostischen Methode. So registrierten Ballif et al. (2007) mit der Array-CGH ebenfalls die meisten Aberrationen in 1p (s. auch S. 12, Abbildung 4). Jedoch wurde für dieses Chromosom ein subtelomerer Abschnitt mit einer Ausdehnung von ~15 Mb mit BAC-Klonen untersucht im Gegensatz zu ~5 Mb bei den anderen Chromosomen (Ledbetter und Martin 2007).

Tabelle 9: Überblick über Studien zum subtelomeren Screening

Studien zum subtelomeren Screening bei Patienten mit mentaler Retardierung und normalem Karyotyp in chronologischer Reihenfolge, der diagnostischen Methode, Anzahl der Patienten, Auswahlkriterien zum Einschluss in die Studie und Anzahl der gefundenen subtelomeren Aberrationen. EV = Entwicklungsverzögerung; FISH = Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung; MLPA = Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification; MR = Mentale Retardierung; Pt. = Patienten.

Studie	Mess-technik	Anzahl der Pt.	Auswahlkriterien	Anzahl der Pt. mit klinisch relevanter Aberration absolut (in %)
Vorsanova et al. (1998)	FISH	209	Kinder mit MR	8 (3,8 %)
Knight et al. (1999)	FISH	466	Kinder und Jugendliche mit MR	22 (4,7 %)
Riegel et al. (2001)	FISH	254	MR und Dysmorphien	13 (5,1 %)
Joly et al. (2001)	CGH	17	MR und Dysmorphien	5 (29,4 %)

Fortsetzung von Tabelle 9:

Studie	Mess- technik	Anzahl der Pt.	Auswahlkriterien	Anzahl der Pt. mit klinisch relevanter Aberration absolut (in %)
Baker et al. (2002)	FISH	250	MR/EV mit und ohne Dysmorphien	9 (3,6 %)
van Karnebeek et al. (2002)	FISH	266	MR	29 (10,9 %)
Jalal et al. (2003)	FISH	372	MR/EV mit und ohne Dysmorphien	24 (6,5 %)
Koolen et al. (2004)	MLPA	210	MR	7 (4,3 %)
Yu S et al. (2005)	FISH	543	MR/EV mit und ohne Dysmorphien, Neugeborene mit Malformationen oder Dysmorphien	7 (1,3 %)
Ravnan et al. (2006)	FISH	11 688	MR/EV mit einer großen Indikationsbreite	303 (2,6 %)
Rooms et al. (2006)	MLPA	275	MR	8 (2,9 %)
diese Studie	Real- Time- PCR	296	MR/EV mit und ohne Dysmorphien	6 (2,0 %)

#### 4.4 Der Score nach de Vries et al. (2001)

Anhand des untersuchten Kollektivs sollte auch geprüft werden, ob mit der von de Vries et al. (2001) vorgeschlagenen Checkliste, die eine Vorauswahl der für eine subtelomere Diagnostik in Frage kommenden Patienten ermöglichen soll, höhere Detektionsraten erreicht werden und damit eine gezieltere Indikationsstellung ermöglicht wird. Obwohl zwei Drittel unserer Patienten mit ursächlicher subtelomerer Aberration einen Score von mindestens 3 Punkten erreichten, zeigten zwei Patienten (Patient 5 und 6) bei Orientierung an den vorgeschlagenen Kriterien bezüglich familiärer Vorgeschichte, Wachstumsabnormalitäten und körperlichen Merkmalen nur wenige Auffälligkeiten und erreichten nur Scores von zwei Punkten (Fall 5) bzw. einem Punkt (Fall 6). Die Vorauswahl der Patienten anhand der vorgeschlagenen Auswahlkriterien wird die Sensitivität eines Screenings, wie diese Studie vermuten lässt, erhöhen. Jedoch sind in der Literatur durchaus Fälle beschrieben, die bei subtelomerer und für die mentale Retardierung ursächlicher Aberration keine der genannten klinischen Merkmale aufweisen (Baker et al. 2002). Da die Erstellung des De-Vries-Scores stark von der Qualität der klinischen Untersuchung abhängig ist und das subtelomere Screening heute eine relativ unkomplizierte diagnostische Möglichkeit bietet, ist es auch in Zukunft wichtiger Bestandteil und sollte bei allen Patienten mit mentaler Retardierung bisher ungeklärter Ursache erfolgen.

#### 4.5 Bedeutung der Subtelomerdiagnostik und Ausblick

Die Untersuchung der subtelomeren Bereiche bei Patienten mit mentaler Retardierung oder Kindern mit Entwicklungsverzögerungen mit oder ohne Dysmorphien und normalem Karyotyp hat sich nach den ersten Veröffentlichungen unter anderem von Knight et al. (1999) rasch verbreitet. In 3-6 % der Fälle lässt sich so eine submikroskopische Aberration im subtelomeren Bereich feststellen (Ledbetter und Martin 2007). Nach Untersuchung der ersten großen Patientenkollektive mittels Multiprobe-FISH (Knight et al. 1999) und der Verfügbarkeit eines käuflich erhältlichen Sets galt diese Technik als Standarddiagnostik in der

Untersuchung auf subtelomere Aberrationen. Eine Beschreibung dieser und anderer molekulargenetischer Methoden findet sich im Kapitel 1.7. Die hochauflösende Untersuchung des gesamten Genoms auf Aberrationen ist nicht Stärke dieser Techniken, sondern es erfolgt gezielt die Untersuchung bestimmter genomischer Bereiche.

Mit der Entwicklung der Comparative Genomic Hybridization (CGH), die ursprünglich nur eine Auflösung von ~10 Mb hatte (Kallioniemi et al. 1992), war der Grundstein für die Untersuchung des gesamten Genoms auf Kopienzahlveränderungen gelegt. Eine große Weiterentwicklung war die Anwendung der CGH mit individuellen BAC-Klonen einer Länge von ~100 kb und der Möglichkeit einzelne Kopienzahlveränderungen an hunderten Genomstellen gleichzeitig zu untersuchen. Durch die Registrierung von sehr kleinen Mikrodeletionen und -duplikationen, die Möglichkeit der Bruchpunktbestimmung im Gegensatz zu FISH, die gleichzeitige Untersuchung aller subtelomeren Bereiche und die Möglichkeit das gesamte Genom hochauflösend auf Aberrationen zu untersuchen, kam es zu einer rasanten Entwicklung dieser Array-Technik. Sie ermöglicht auch eine genaue Bruchpunktbestimmung und die Entdeckung von Mosaiken (Baris et al. 2007). Nur balancierte Translokationen und sehr kleine Aberrationen werden grundsätzlich nicht erkannt (Shaffer et al. 2006). Mit der hohen Auflösung der Array-CGH von bis zu 100 kb (de Vries et al. 2005) steigt allerdings auch die Anzahl der gefundenen benignen Copy Number Variations. Daher bleibt ein wichtiges Ziel auch in Zukunft bestehen: eine möglichst detaillierte und valide Auflistung bekannter benigner CNVs zu schaffen.

In den bisher publizierten Whole Genome Arrays an DNA von Patienten mit mentaler Retardierung liegt der Anteil subtelomerer Aberrationen an den insgesamt gefundenen Veränderungen zwischen 0 und über 40 % (s. Tabelle 10). Durchschnittlich ergibt sich daraus für die aufgelisteten Studien mit insgesamt 1604 untersuchten Patienten ein Anteil von 14,3 % subtelomerer Aberrationen an allen genomweit gefundenen Veränderungen.

Tabelle 10: Anteil subtelomerer Aberrationen in genomweiten Array-Studien

Anteil der gefundenen subtelomeren Aberrationen von den insgesamt mittels genomweiter Array-CGH ermittelten Aberrationen in den verschiedenen Studien. Aufl. = Auflösung; EV = Entwicklungsverzögerung; kb = Kilobasen; Mb = Megabasen; MR = Mentale Retardierung; Pt. = Patienten.

Studie	Einschlusskriterien	Aufl.	Anzahl der Pt.	auffällige Befunde	auffällige subtelomere Befunde	Anteil
Vissers et al. (2003)	MR + Fehlbildungen	1 Mb	20	5	0	0 %
Shaw-Smith et al. (2004)	EV/MR + Dysmorphien	1 Mb	50	12	5	41,7 %
de Vries et al. (2005)	MR	50 kb	100	10	0	0 %
Schoumans et al. (2005)	MR + Dysmorphien	1 Mb	41	4	0	0 %
Rosenberg et al. (2006)	MR + Dysmorphien	1 Mb	81	20	6	30,0 %
Pickering et al. (2008)	MR/EV/kongenitale Anomalien/Schwangerschaftskomplikationen	1 Mb	1101	163	23	14,1 %
gesamt			1604	239	35	14,3 %

Die sogenannten Targeted Arrays zur Diagnostik der mentalen Retardierung wurden designt um die Messung von Copy Number Polymorphisms zu verringern (Bejjani et al. 2005) und gezielt häufige und klinisch wichtige Chromosomenaberrationen aufzudecken. Sie umfassen ausgesuchte Genorte, von denen man weiß, dass sie eine Rolle bei der Ätiologie der mentalen Retardierung spielen. Sie schließen die subtelomeren Regionen ein (Shaffer et al. 2006), neben Genloci für bekannte Mikrodeletionssyndrome und den perizentromeren Bereiche (Bejjani et al. 2005).

Zu Beginn der Subtelomerdiagnostik war ein Argument für die Untersuchung der Subtelomere die Arbeit von Saccone et al. (1992), die die subtelomeren Bereiche als sehr genreich beurteilten. Zum heutigen Zeitpunkt muss angemerkt werden, dass die Arbeit über zehn Jahre vor Fertigstellung des Human Genome Projects 2004 und der „Entschlüsselung“ des menschlichen Genoms veröffentlicht wurde, und dass die verwendete In-Situ-Hybridisierung den heutigen Methoden weit unterlegen ist. Um die Ergebnisse von Saccone et al. (1992) an neueren Daten über das menschliche Genoms zu überprüfen wurde in Tabelle 11 eine Auflistung der Gendichte der einzelnen Subtelomerregionen im Vergleich zum entsprechenden restlichen Chromosom vorgenommen, bestimmt anhand des Map Viewers, Built 37.1, des National Institutes for Biotechnology Information (National Institute for Biotechnology Information: Map Viewer, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9606](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606), 17.07.2010).

Tabelle 11: Gendichte der Subtelomere

Bestimmung der Gendichte für die einzelnen Subtelomerregionen (5 Mb) und das gesamte Chromosom sowie deren Verhältnis. bp = Basenpaare; Chr. = Chromosom; ges. = gesamt; Mb = Megabasen.

Chr.	Basenzahl ges. Chr.	Genzahl ges. Chr.	Gendichte ges. Chr. (in $\times 10^{-6}$ Gene/bp)	Arm	Genzahl im Subtelomer (5 Mb)	Gendichte im Subtelomer (in $\times 10^{-6}$ Gene/bp)	Verhältnis
1	249250621	3380	1,4	p	143	2,9	2,1
				q	110	2,2	1,6
2	243199373	2204	0,9	p	29	0,6	0,6
				q	85	1,7	1,9
3	198022430	1760	0,9	p	22	0,4	0,5
				q	87	1,7	2,0
4	191154276	1361	0,7	p	105	2,1	2,9
				q	46	0,9	1,3
5	180915260	1536	0,8	p	41	0,8	1,0
				q	153	3,1	3,6
6	171115067	1959	1,1	p	65	1,3	1,1
				q	63	1,3	1,1
7	159138663	1764	1,1	p	64	1,3	1,2
				q	44	0,9	0,8
8	146364022	1247	0,9	p	28	0,6	0,7
				q	134	2,7	3,1
9	141213431	1435	1,0	p	43	0,9	0,8
				q	142	2,8	2,8
10	135534747	1305	1,0	p	31	0,6	0,6
				q	56	1,1	1,2
11	135006516	2051	1,5	p	193	3,9	2,5
				q	32	0,6	0,4
12	133851895	1629	1,2	p	65	1,3	1,1
				q	62	1,2	1,0
13	115169878	649	0,6	q	56	1,1	2,0
14	107349540	1453	1,4	q	267	5,3	3,9
15	102531392	1202	1,2	q	58	1,2	1,0
16	90354753	1318	1,5	p	264	5,3	3,6
				q	100	2,0	1,4
17	81195210	1714	2,1	p	140	2,8	1,3
				q	123	2,5	1,2

Fortsetzung von Tabelle 11:

Chr.	Basenzahl ges. Chr.	Genzahl ges. Chr.	Gendichte ges. Chr. (in $\times 10^{-6}$ Gene/bp)	Arm	Genzahl im Subtelomer (5 Mb)	Gendichte im Subtelomer (in $\times 10^{-6}$ Gene/bp)	Verhältnis
18	78077248	517	0,7	p	47	0,9	1,4
				q	31	0,6	0,9
19	59128983	1992	3,4	p	204	4,1	1,2
				q	287	5,7	1,7
20	63025520	857	1,4	p	106	2,1	1,6
				q	105	2,1	1,5
21	48129895	425	0,9	q	116	2,3	2,6
22	51304566	835	1,6	q	72	1,4	0,9
x	155270560	1606	1,0	p	40	0,8	0,8
				q	151	3,0	2,9
y	59373566	397	0,7	p	35	0,7	1,0
				q	28	0,6	0,8
ges.	5766869553	64628	1,1		4073	1,9	1,7

Die Gendichte der Subtelomere ist bei den subtelomeren Bereichen von 1p, 1q, 2q, 3q, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 7p, 8q, 9q, 10q, 11p, 12p, 13q, 14q, 16p, 16q, 17p, 17q, 18p, 19p, 19q, 20p, 20q, 21q und Xq im Vergleich zur Gendichte des gesamten Chromosoms höher, insgesamt bei 28 der 43 subtelomeren Bereiche. Die Gendichte der subtelomeren Bereiche liegt bei  $1,9 \times 10^{-6}$  Gene/bp im Vergleich zur Gendichte von  $1,1 \times 10^{-6}$  Gene/bp für das gesamte Genom. Allerdings zeigte sich bei der Untersuchung großer Kollektive von Patienten mit mentaler Retardierung mit Targeted Arrays, die sowohl die Subtelomere als auch andere klinisch wichtige Genomsequenzen abdeckten, dass mehr als die Hälfte der gefundenen Aberrationen nicht in den subtelomeren Bereichen lagen und bei einer reinen Subtelomerdiagnostik unentdeckt geblieben wären (Shaffer et al. 2006). Die sehr schnelle Weiterentwicklung der Array-CGH und die fallenden Kosten lassen die alleinige Subtelomerdiagnostik immer weiter in den Hintergrund treten, ohne Zweifel aufkommen zu lassen, dass diese Regionen weiter eine wichtige Rolle in der ätiologischen Klärung mentaler Retardierung spielen werden.

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Vorstellung des mittels der quantitativen Real-Time-PCR am Institut für Humangenetik Göttingen auf subtelomere Imbalancen untersuchten Patientenkollektivs. Teile der Arbeit wurden bereits von Auber et al. 2009 mit dem Titel "Identification of subtelomeric genomic imbalances and breakpoint mapping with quantitative PCR in 296 individuals with congenital defects and/or mental retardation" publiziert. Insgesamt konnte in diesem Kollektiv bei 17 (5,7 %) der 296 untersuchten Patienten eine subtelomere Aberration gefunden werden. Darunter waren 10 Deletionen (1q, 1q, 4p, 5p, 6q, 8p, 11q, 13q, 20q und 21q) und 10 Duplikationen (1p, 2p, 6p, 7p, 7p, 7p, 9p, 10q, 10q und 19q), wobei drei der Patienten sowohl eine Duplikation als auch eine Deletion trugen. Bei sechs der Patienten stehen die subtelomeren Aberrationen in kausalem Zusammenhang mit dem Phänotyp der mentalen Retardierung, diese zeigten Größen von bis zu 11,8 Mb. Bei weiteren sechs der Patienten konnte keine weitere Einordnung der subtelomeren Aberration bezüglich ihrer klinischen Relevanz erfolgen. Die Detektionsrate für subtelomere Aberrationen als Ursache der mentalen Retardierung bei den 296 Patienten beträgt also 2 % bis 4,05 %, unter Einschluss der unklaren Fälle, wobei ein Vergleich mit vorausgegangenen Studien schwer fällt, da diese in der Vergangenheit weite Spannen aufwiesen, die nicht zuletzt auf der Verschiedenheit der Kollektive beruhen.

Sechs der 20 festgestellten Duplikationen bzw. Deletionen konnten als benigne Copy Number Polymorphisms (CNP) klassifiziert werden. Bisher ist die Häufigkeit dieser CNP noch unklar, da die Untersuchung der Eltern in der Vergangenheit nicht immer stattfand. Außerdem erfolgte in der Vergangenheit nicht regelmäßig eine genaue Bruchpunktbestimmung der Aberrationen, was eine genaue Genotyp-Phänotyp-Beschreibung erschwert. Auch wenn das familiäre Auftreten einer Aberration mit immer dem gleichen Phänotyp ein deutlicher Hinweis auf die klinische Relevanz einer Aberration sein kann, sollte die Bewertung in Bezug auf den Kausalzusammenhang immer vorsichtig erfolgen.

Die Auswertung des De-Vries-Scores zeigte, dass zwei der Patienten mit ursächlicher subtelomerer Aberration nur Scores von unter zwei Punkten erreichten. Da die Erstellung des De-Vries-Scores stark von der Qualität der klinischen Untersuchung abhängig ist und das subtelomere Screening heute eine relativ unkomplizierte diagnostische Möglichkeit bietet, ist es auch in Zukunft wichtiger Bestandteil und sollte bei allen Patienten mit mentaler Retardierung bisher ungeklärter Ursache erfolgen.

Diese Studie ist die erste, die zur Untersuchung eines Kollektivs von Patienten mit mentaler Retardierung die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt hat. Die Technik ist in anderen Bereichen ein etabliertes Messverfahren und vermindert den Arbeitsaufwand erheblich, da sie teilautomatisiert erfolgt. Sie ist in allen Laboren, die für molekulargenetische Untersuchungen eingerichtet sind und über eine PCR-Einheit verfügen, durchführbar und vergleichsweise kostengünstig. Weiterhin ist eine genaue Bruchpunktbestimmung der Aberrationen durch Einsatz individuell ausgewählter zusätzlicher Primer jederzeit möglich.

In den vergangenen Jahren hat die Array-Technik eine rasante Entwicklung durchgemacht. Sie ermöglicht die Registrierung von sehr kleinen Mikrodeletionen und -duplikationen, die Bruchpunktbestimmung im Gegensatz zu FISH, die gleichzeitige Untersuchung aller subtelomeren Bereiche und vor allem die hochauflösende Untersuchung des gesamten Genoms. Diese schnelle Weiterentwicklung und die fallenden Kosten dieser Technik lassen die alleinige Subtelomerdiagnostik immer weiter in den Hintergrund treten, ohne Zweifel aufkommen zu lassen, dass diese Regionen weiter eine wichtige Rolle in der ätiologischen Klärung mentaler Retardierung spielen werden.

## Anhang

## Fall 1

Tabelle 12: Fall 1, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 9 und der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 13. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
<b>9p</b>			
09pFISH187	TTCCCCGAACAACCTCGCCCGCTCC	TTCCCCCGCGCTCAGACTTGCCTC	153
09pFISH553	TGGCATGGGAAGGGGATGAGGCCGA	GGCAAATCCCAGTGGAAACCCCGACC	169
09p	GCAGGATTGGCACCCACACCCCTAA	TGGGGCTATGAGTGGCAACCCCAAC	185
09p410	CAAAGGGGAGGACTTCACTTGCTTCT	CCAGAGTGGACTCTCATGTGGATCAG	101
09p507	GAGATGTGCCGGTATGACCCTCTAC	CAGCACTGTAGCACACTCCCTTGACT	171
09p591	CCTTCCACAGGTAGAAATGCTCTTGC	AGGCTGCACCTGAATCTTTACAGAGC	191
09p6.24	GTGCAGAGTGGGATTGATGGTCTAT	GACCCCTGATATACCAAAGGCAAAGC	134
09p6.40	CATTTTCGTTCCCTCGGGTCTGTAAC	TTATAGAGCTGGAGCTCCCACATGGA	125
09p6.52	ACATAGGGATGCTTAACAGGGGTGGT	GCTGTGAGATGTTCTGGGAGGTTTCT	190
09p7.16	GCTCGATTTGTAAGTGCTGGCAGATG	CCAAGTATGTTTCTGCTGGGCTTG	99
09p7.79	GGAGGAGAACTTCATTTCCAGCAG	ATAGGACTCAAAGGCTGGGACAACC	187
09p8.30	GCACTAGAGTACCTGGGCAGCTTGA	CTCAAGTGCCCTGTATGGCTCAGAA	123
09p8.99	AGGAAGCGTTGGTACATTGTGGTGAC	TTACTGGGCTTCCGCCTACTTCTTTG	178
09p10.6	TCCCCATCACTATAGCCACAGAGGAC	TCCCCAGCTATTAACACCCACTACC	156
09p13.09	GCTGTCAATGGGCAGAGTCTAGAAGG	ACAGTAGGAGGTGAGCTAGGGGTTGG	148
<b>13q</b>			
13q14.11	GTGGGGGATGAGGGGCTGCTGAGGA	CGGGCCAGGCACTGAGGGGACATGA	199
13q21.31	CCACCAGGGCTTAGGGCAAGGAAGCCA	CCCCATGCCTCTCCCTGCTGAGCAA	188
13q31.3	CGGCACCAACCAGGGAACACGCAACA	GGCTTGCAGCTTGCCAGGGAGTGTCC	153
13q100.9	AAAAGTCAGCTGAGTGCCGTACCTTG	AAGCAAACAGGTATCACCCACCAGAG	196
13q102.3	GTGGGCTTGTGAAAGAGTCCCTGTAA	AATTAGGGCTCCACAGTCAGGGATTC	113
13q104.9	GGTGCTGATTCTCTCCAGCTTTTCAG	AACCCTGACATGTTCCACTTCTGTGTC	144
13q105.9	CCAGTGACATTATCATCCCGCTAAGG	GACATTAGGTGTCCTCTGGGAAAGCA	192
13q106.6	CAGTGTCACTCAGCAACAAGACTGTGC	GTGGTGACACTCGTCCTTCCGTTACT	184
13q107.3	TCGAGGCTTACCAGGACTATGACCAC	ACCCCAACCAAGCAGAGATAGGAAAG	181
13q108.1	ACAGTGCTCCTTCTCACGCTTCAGTT	ACTAGTGAGCTGCCTCTGGAACAGGA	161
13q109.6	AATGAGAGTCACAGACTGGGGGTGAT	GCCTGGGAAGTGGCATTGTAGAGT	190
13q110.7	CTGCAGACCTGCCTTAATGCTCAGAT	CCGAGGAAGATACTGGATCCACAGAA	143
13q111.7	GTTCTGTTAACTCACCGGGACCTTGA	TCTTGAGCCAAGACCTAGATGCCAAC	189
13q112.6	TGCACAGCAGAGAGACGTATGAGCTT	CACGTGTGTTTACACGTCTGGGAACT	145
13q112.8	ATGTTTGAGGCTGTAGCTCCCAGGAT	TTAGTGATGCGTGTGTCCCTGACTC	130
13q113.5	CGCCCAGACCTTCTCCTTATCTTGTT	AGTAAAAAGTCACTGGGCCTGGGAAG	166
13q200	TCCGTCACCCCGCATCCATCACCCC	TGCCAGCCGCCAGTACTCAGAA	187
13qFISH	GAAGCAAGGACGCCCTCGCCAGCCA	GCCTGCAACCCCACTGCTCACAA	137
13q	TCAGGAGGTGATGCTTGGGACGCCA	AGGCAAAGCAGGCTGTGGGACAC	194

Tabelle 13: Fall 1, Duplikation 9p

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 9 mittels Real-Time-PCR bei Fall 1. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von >1,24 (rot) entspricht der Duplikation des subtelomeren Bereichs von 9p, die von 09pF187 bis mindestens 09p7.79 alle Detektoren einschließt. Die grün markierten MoM Werte sind nicht eindeutig zu beurteilen.

Detektor	MoM	Standardabweichung
09pF187	1,63	0,04
09pF553	1,30	0,13
09pF553	1,56	0,09
09p	1,42	0,01
09p410	1,91	0,08
09p410	1,85	0,24
09p507	1,64	0,10
09p591	1,69	0,14
09p6.24	1,66	0,13
09p6.4	1,63	0,06
09p6.52	1,80	0,12
09p6.52	1,60	0,18
09p7.16	1,88	0,08
09p7.16	1,69	0,19
09p7.79	1,53	0,12
09p8.3	1,28	0,03
09p8.3	1,08	0,07
09p8.99	1,46	0,28
09p8.99	1,21	0,36
09p10.6	1,36	0,01
09p10.6	1,07	0,04
09p13.09	1,05	0,07

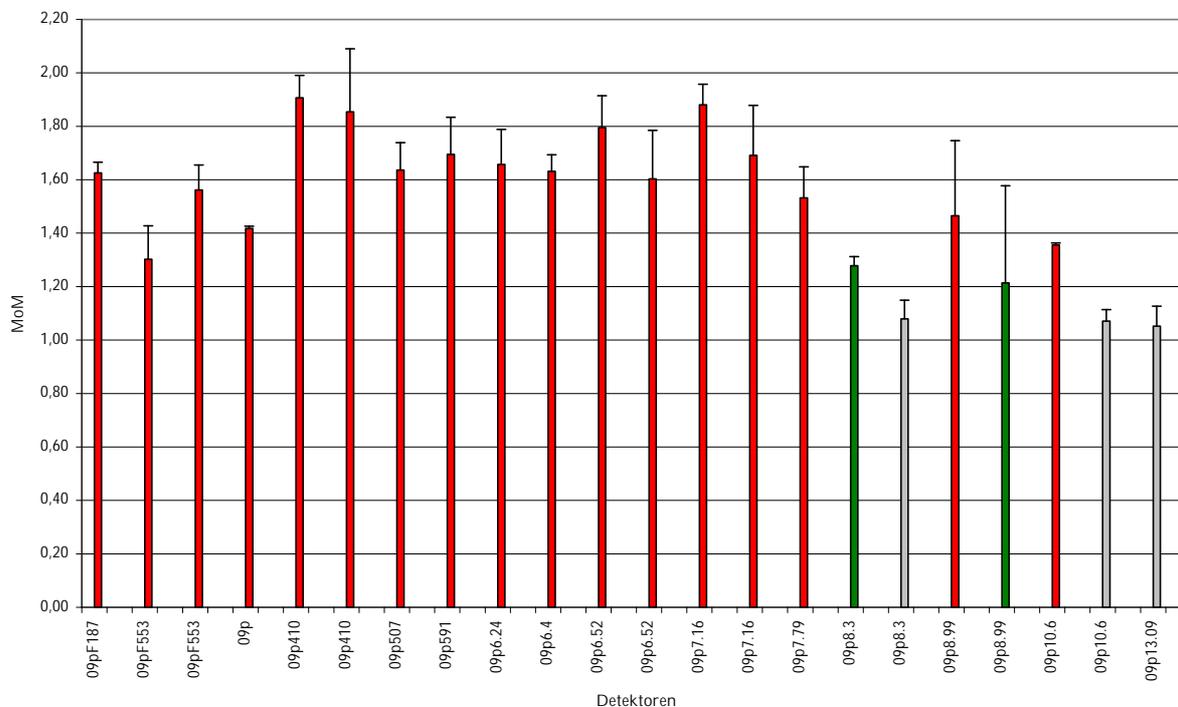


Abbildung 12: Fall 1, Duplikation 9p

Subtelomeranalyse des kurzen (p-) Arms von Chromosom 9 mittels Real-Time-PCR bei Fall 1. In definierten Abständen zum Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms 9p. Rote Säulen markieren den Zugewinn an DNA, entsprechend einer Duplikation (>1,24 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 9p. Die Duplikation reicht vom

Amplikon 09pF187 bis mindestens zu 09p7.79 (entsprechend 7,6-8,3 Mb). Grüne Säulen markieren nicht eindeutige Messwerte.

Tabelle 14: Fall 1, Deletion 13q

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 13 mittels Real-Time-PCR bei Fall 1. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von <0,78 (rot) entspricht der Deletion des subtelomeren Bereichs von 13q, die von 13q bis 13q104.9 alle Detektoren einschließt. Die grün markierten MoM Werte sind nicht eindeutig zu beurteilen.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
13q14.11	0,95	0,02
13q21.31	1,15	0,08
13q31.3	1,01	0,07
13q100.9	1,30	0,18
13q100.9	1,08	0,01
13q102.3	1,03	0,13
13q104.9	0,57	0,11
13q105.9	0,61	0,15
13q106.6	0,48	0,01
13q107.3	0,53	0,03
13q108.1	0,56	0,23
13q109.6	0,54	0,10
13q110.7	0,61	0,03
13q111.7	0,34	0,04
13q112.6	0,45	0,14
13q112.8	0,43	0,05
13q113.5	0,52	0,03
13q200	0,44	0,06
13qF	0,87	0,15
13qF	0,63	0,14
13q	0,48	0,08

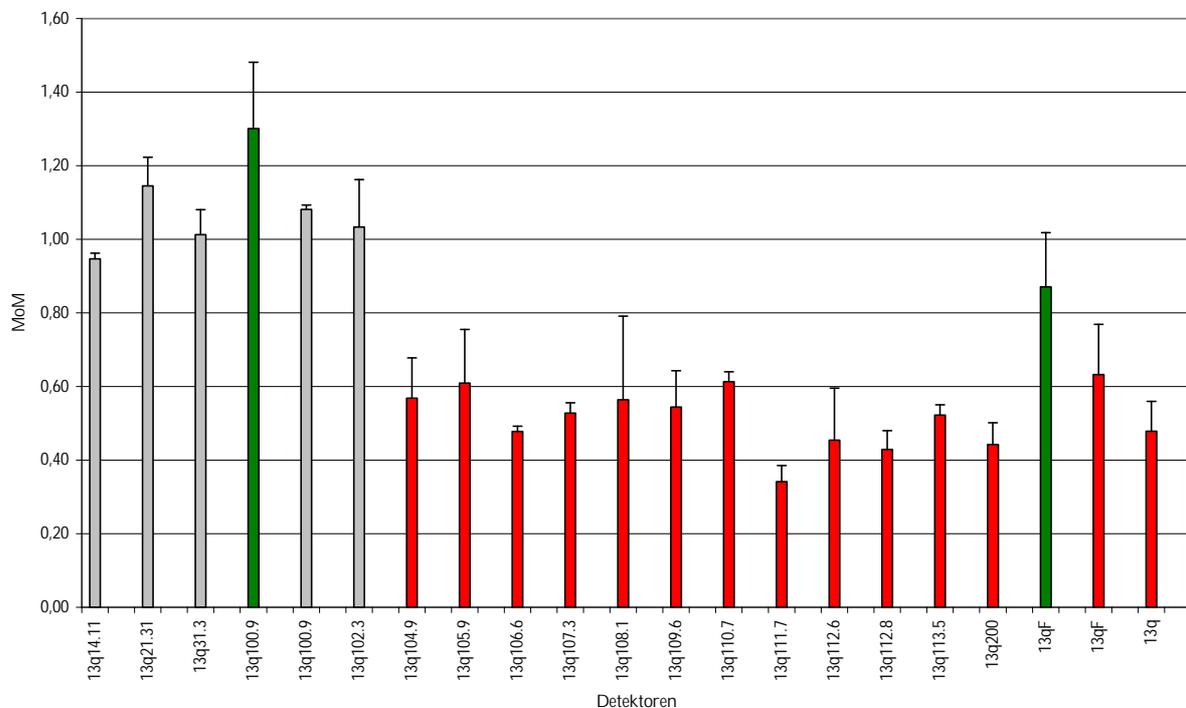


Abbildung 13: Fall 1, Deletion 13q

Subtelomeranalyse des langen (q-) Arms von Chromosom 13 mittels Real-Time-PCR bei Fall 1. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Verlust an DNA, entsprechend einer Deletion (<0,78 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 13q. Die Deletion reicht vom Amplikon 13q bis mindestens zu 13q104.9 (entsprechend 9,1-11,8 Mb). Grüne Säulen markieren nicht eindeutige Messwerte.

## Fall 2

Tabelle 15: Fall 2, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 6 und der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 11. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
<b>6p</b>			
06p	AGCTCCTGAACCCGGCTCAGGCTA	AGAAGCCCTGCCAGTGTCCCCTGAA	117
06p1.3	CGGCCAAGGCACCCAGGTCTCAGGAAA	ACTCCTACCCCATCCGCTCCCCATCA	142
06p1.8	ACGACAGGCTCCACCCACAGCAGACA	TCTCCTCCTGCCTCTCCCTGCCAGTGA	134
06p2	TGGGAATGAGGAAGGACGGTGACAGC	TGAGCAACTGAAGGACCAGGGGC	188
<b>11q</b>			
11q	GCCGACAGACACCCACGAAAGGGAA	GAGCATGAGCTGCCACAGGTCCACA	182
11q130	GCACAGGCATGGTGAGGGGGAGAGGA	GGCCAGAGGGCAGGACACACAGGA	140

Tabelle 16: Fall 2, Duplikation 6p

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 6 mittels Real-Time-PCR bei Fall 2. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von >1,24 (rot) entspricht der Duplikation des subtelomeren Bereichs von 6p, die 06p einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
06p	1,54	0,08
06p1.3	1,21	0,03
06p1.8	0,98	0,00
06p2	0,88	0,10

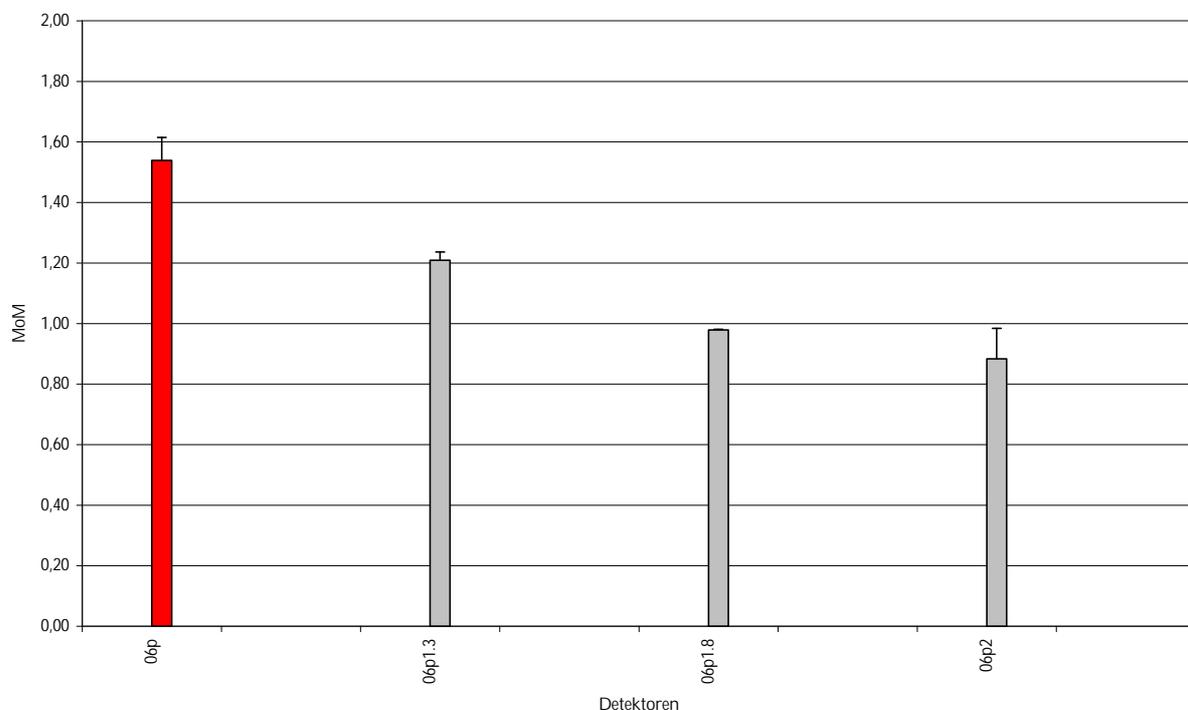


Abbildung 14: Fall 2, Duplikation 6p

Subtelomeranalyse des kurzen (p-) Arms von Chromosom 6 mittels Real-Time-PCR bei Fall 2. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-

Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Zugewinn an DNA, entsprechend einer Duplikation ( $>1,24$  MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 6p. Die Duplikation schließt das Amplikon 6p ein und hat eine Ausdehnung von 177 bp bis 1,4 Mb.

Tabelle 17: Fall 2, Deletion 11q

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 11 mittels Real-Time-PCR bei Fall 2. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von  $<0,78$  (rot) entspricht der Deletion des subtelomeren Bereichs von 11q, die die Detektoren 11q und 11q130 einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
11q	0,50	0,01
11q 130	0,48	0,00

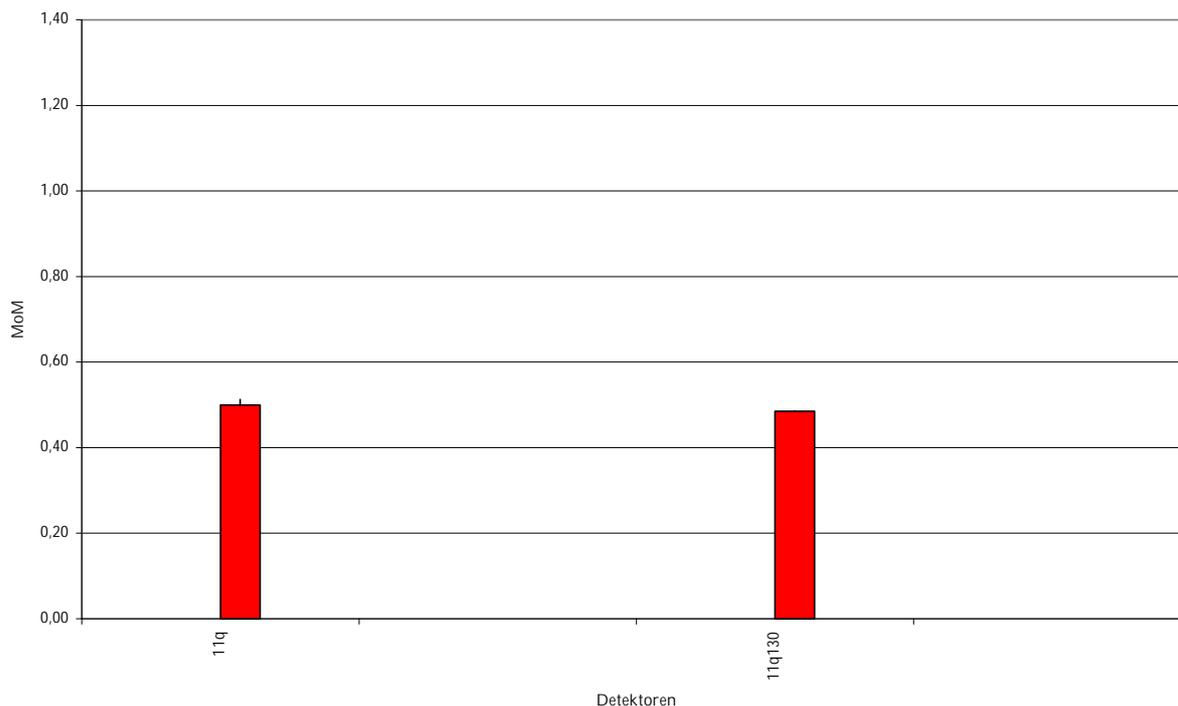


Abbildung 15: Fall 2, Deletion 11q

Subtelomeranalyse des langen Arms (q-Arm) von Chromosom 11 mittels Real-Time-PCR bei Fall 2. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Verlust an DNA, entsprechend einer Deletion ( $<0,78$  MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 11q. Die Deletion reicht vom Amplikon 11q und 11q130 (mindestens 3,9 Mb).

### Fall 3

Tabelle 18: Fall 3, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Deletion des kurzen (p-) Arms von Chromosom 4. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
<b>4p</b>			
04pF	CGGCGTTTTCTCTGGCTCCTGCGA	GCCCCGCACACTCACCATTTCCTCGA	189
04pF2	CGCGAATGCTGTCCAAGCACTGCGTGA	GCAGACCCCAGGAGCCGCTGTGAA	135
04p	TGTCCAGCGACTCATCGCACGTCTC	AGAAAGCCGACAGCCGAGAAGGAA	180
WHS1 1.85	TAGAGCAGGGAGCAGAGAGCAGAACGGGA	TGATACTACCCCCACCCTCATGGAGCAA	66
WHS2 1.98	CCCTCTAGGTCATCACACACCAGCAGCCA	TTCTCCAGCTTCCAGGAGCCGCTAGCA	70
04p7.6	GAGCAGACCCAGCCCCACAGACCA	CGGGACCAGAGCCTATTCTCAGCGCA	184

Tabelle 19: Fall 3, Deletion 4p

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Deletion des kurzen (p-) Arms von Chromosom 4 mittels Real-Time-PCR bei Fall 3. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von <0,78 (rot) entspricht der Deletion des subtelomeren Bereichs von 4p, die von 4pF2 bis WHS2 1.98 alle Detektoren einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
04pF	0,87	0,03
04pF2	0,58	0,06
04p	0,52	0,02
04p	0,61	0,02
WHS1 1.85	0,44	0,06
WHS2 1.98	0,42	0,02
04p7.6	1,05	0,10

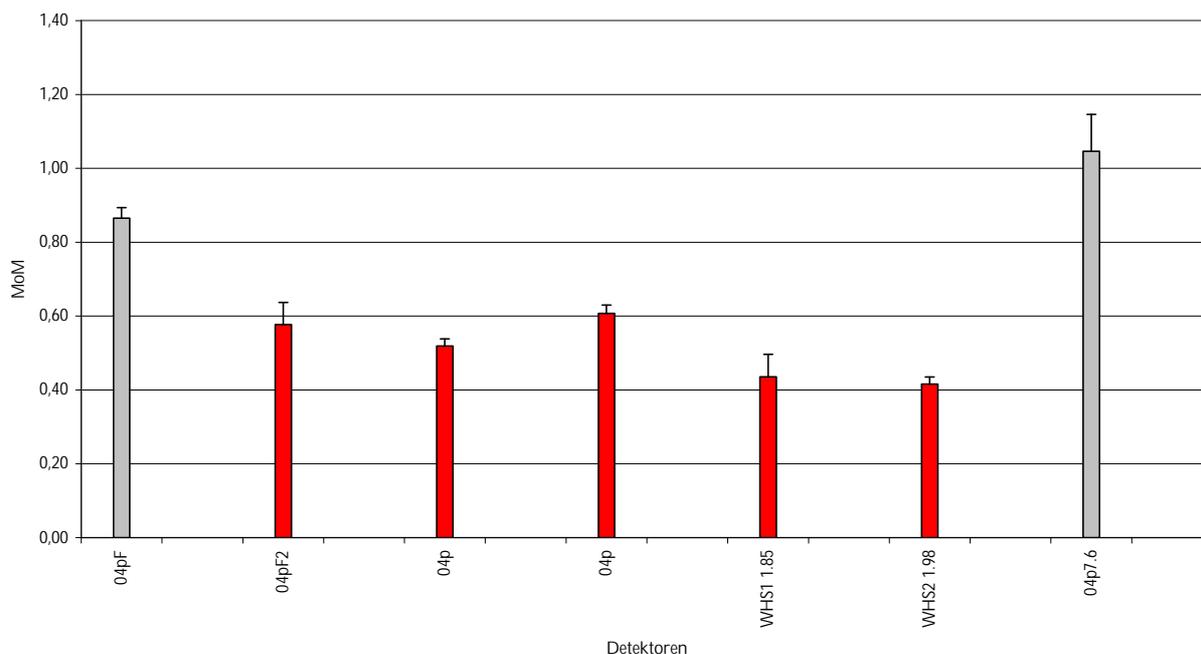


Abbildung 16: Fall 3, Deletion 4p

Subtelomeranalyse des kurzen (p-) Arms von Chromosom 4 mittels Real-Time-PCR bei Fall 3. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-

Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Verlust an DNA, entsprechend einer Deletion (<0,78 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 4p. Die Deletion reicht vom Amplikon 04pF2 bis WHS2 1.98 (1,7-7,6 Mb).

#### Fall 4

Tabelle 20: Fall 4, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 1 und der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 2. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
<b>1q</b>			
01q240.1	CCACCCACTTTGGGAACACTAAGAAG	CTCGCTCTTTAACTGCGACACATCAG	176
01q241.6	AACACTTGGAAACAGGAGCAGCAGAAG	GTGAGGTGCAGTTGGTGCTCAGATT	99
01q243.0	CGACCAGATGGAGCTAGGAGAGGAG	AGCTCATCTTCCCCTTCCCTGGAAC	131
01q2.2	AGAGACACAGTGTGAAATCGCTGCTC	AGTGAGGACCTGAGCAGGTTCCGATTA	152
01q2.17	GCTCGCCACAGCTTCCCTTACTAAAT	TTCCTTGGAACTTCTGACGCTGGAG	131
01q	TGGGTGCATGGGTGCTGACATGGTG	AGGCTCCAGGCTGCCTTGCAAACAC	183
01q1.35	ACCCTGGCCATAGGGGACTTTATTCT	GGGTCACCACTGTGAGATGAGATGAG	135
01q0.9	TCGTCTCCACACACCGATGTACTTTC	GGTCAGGAAGAAGAAGCTTTGCACAC	159
01q2	AATCACAGCCCCACCCACACCTTCC	GCCATCTTGGGTACGGTGGTGCAGA	190
01q3	AGACAACCCTTCTCCCCGACCTGA	TTCTGGGGGCTGCCAGCATTCTGA	182
01q338	ATCCAGTGTGATCCACCAGTTCCTTCC	CTCGACTCTGTCTGAAGGGATTCTG	193
01q0.1	CTGTACAACACCTGAGCAGAAGCAC	CAATGGTTAGGGATCTGGGAGTGAGA	157
01qF	CTTTCCCCACCCCAGCAGCCACAC	GGAGGGAGGCAGAGAAGGGCAGGCA	186
<b>2p</b>			
02pF	AGGAGGGGTCACCCCTACGCAGTGC	CATCCCTGCCTCAGCCTGTCCCCCA	186
02p0.253	CTGAGTTGGAAAGTGACACGAAGCTG	GCCTCGAGACCTGTCTCTCAACTGT	188
02p0.255	CACCCTGAGAGGAAGGCCTAAATTGT	GTGAAGTGCTACCGAACAACGAAAGG	180
02p2	AACACCGCGAGGGACGTGCTAGAAG	CTGCAAAGTGGACAGCCGTGCAGTG	149
02p963	AGGGAGCAGCGTGAATGGTGGCAGGA	CAGGGGAAGGTGAGGCAGAGGACTGGG	146
02p402	CCACAGGGGGGAGCGTCAGGGATCA	CACGGCTGAGCGAGGACAGGGAGGA	190

Tabelle 21: Fall 4, Deletion 1q

Subtelomeralanalyse und Bruchpunktbestimmung der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 1 mittels Real-Time-PCR bei Fall 4. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von <0,78 (rot) entspricht der Deletion des subtelomeren Bereichs von 1q, die von 01q0.1 bis 01q241.6 alle Detektoren einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
01q240.1	1,08	0,14
01q240.1	0,90	0,03
01q241.6	0,61	0,09
01q241.6	0,57	0,07
01q243.0	0,55	0,00
01q243.0	0,57	0,03
01q2.17	0,75	0,01
01q1.35	0,56	0,01
01q338	0,56	0,04
01q0.1	0,52	0,01

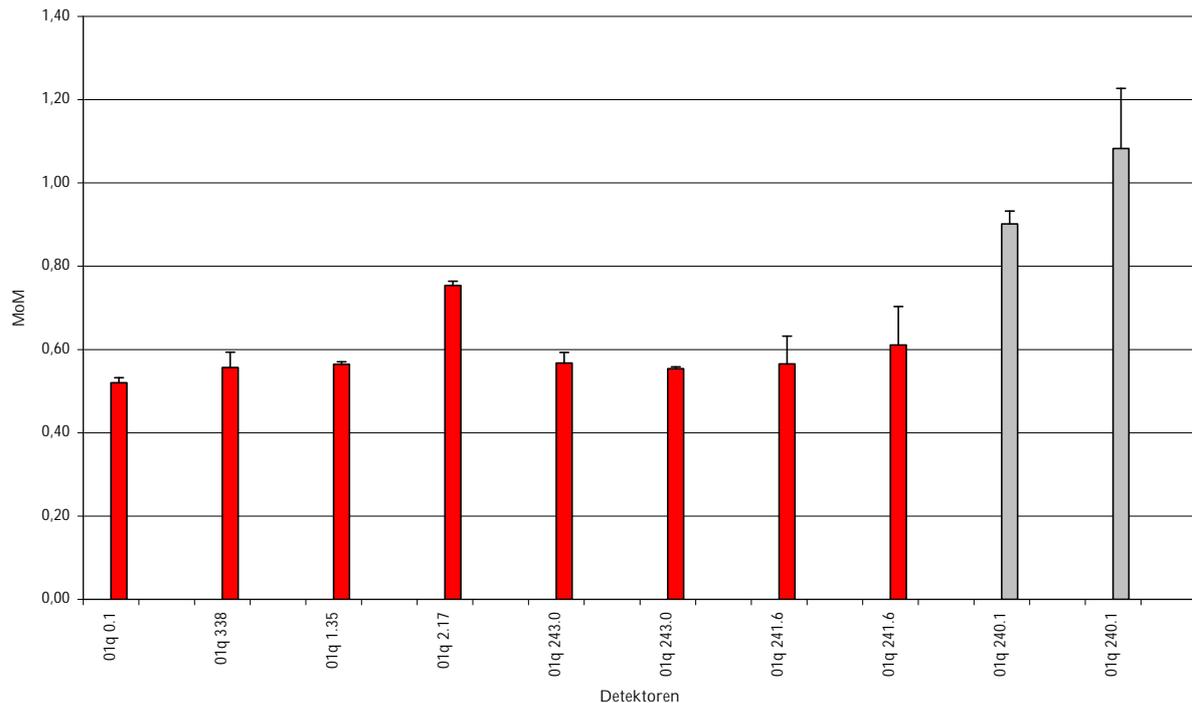


Abbildung 17: Fall 4, Deletion 1q

Subtelomeranalyse des langen (q-) Arms von Chromosom 1 mittels Real-Time-PCR bei Fall 4. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Verlust an DNA, entsprechend einer Deletion (<0,78 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 1q. Die Deletion reicht vom Amplikon 01q0.1 bis 01q241.6 (5,5–7,1Mb).

Tabelle 22: Fall 4, Duplikation 2p

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 2 mittels Real-Time-PCR bei Fall 4. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von >1,24 (rot) entspricht der Duplikation des subtelomeren Bereichs von 2p, die 02pF einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
02pF	1,75	0,17
02p0.253	0,92	0,02
02p0.255	1,09	0,05
02p2	1,13	0,02
02p963	1,01	0,04
02p402	1,07	0,03

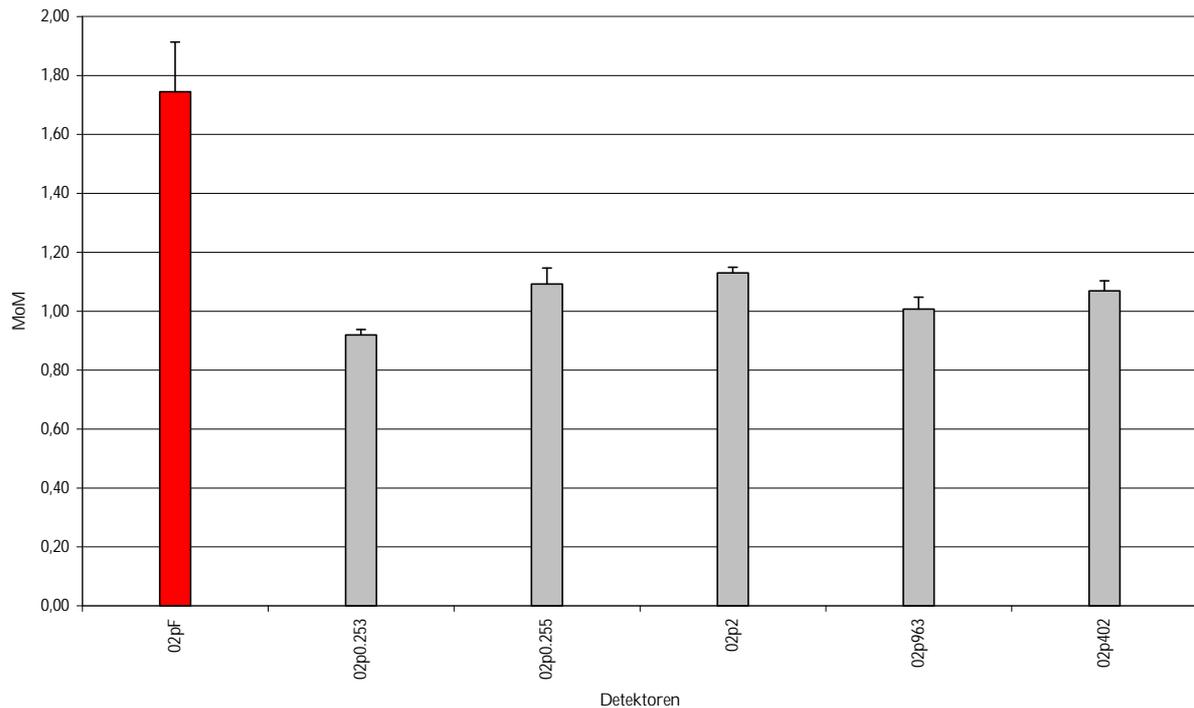


Abbildung 18: Fall 4, Duplikation 2p

Subtelomeranalyse des kurzen (p-) Arms von Chromosom 2 mittels Real-Time-PCR bei Fall 4. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Zugewinn an DNA, entsprechend einer Duplikation (>1,24 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 2p. Die Duplikation schließt den Detektor 02pF ein.

## Fall 5

Tabelle 23: Fall 5, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des langen (q-) Arms von Chromosom 19. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
<b>19q</b>			
19q53.0	CCCCAAAAGCCACGACCCCCCAA	CGGAGTGCCTAGTGCCTCCACCTGCAA	145
19q54.8	CCCTCCACTCCCTCCCCATTCTCCA	CCACCCACCCCCCAGCCATACATA	195
19q56.9	GAAGGTGGAGAAGGGCCAGGGCCAGA	ACCGCCAACAGGCACAGAGCAGGA	105
19q57.4	GGGGCACCACCCAGAGCCACAACA	ACCCTCTACCCAAAGGCCAGCAGCA	137
19q58.8	AGGGAGCCCGAGCTACGGGGACAGA	ACGGAGCCAGATGATGGGGAGTGGGGA	153
19q59	CGCATCCCCTCAGCCTGTGGCACTCAA	ATCCTGCTACCCGCCCCCTCACCCAA	149
19q59.7	GCAAACACAGACCCACGGAAGGCCAA	TGAAGGCAGGGGCACTGGGAATGGGA	109
19q60.35	CCACCTACCCGAAAGCCCCACCCA	AGGTCCCCTCCACCGTCGTCTCCGAA	193
19q61	GCCCAAGGACAGGCCCCACCACAAA	GCTGTGTGAGGCATTGAGCCACCCGGA	176
19q62	ACCAGGGCAGCACCTGCACAGCAAA	TATGGGGCGGGCAAGGCTGAAGTGA	125
19q	GGCCAGGGACAGCCTGACAGAAACA	CAGGCCGAGAATCCCCTGCCTTGAA	186
19qF2	CCCCTGTGGGTGGGACTGGGGAAA	GGCACGAAATCTCGGAGGGGGCCA	198
19qF250	GCGCCGGAAGACGCCAGAGGAGCTA	ACAGCAACCTGCCGACCACCCAC	180

Tabelle 24: Fall 5, Duplikation 19q

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des langen (q-) Arms von Chromosom 19 mittels Real-Time-PCR bei Fall 5. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von >1,24 (rot) entspricht der Duplikation des subtelomeren Bereichs von 19q, die alle Detektoren von 19qF250 bis 19q59 einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
19qF250	1,38	0,13
19qF2	1,42	0,05
19q	1,34	0,10
19q62	1,66	0,13
19q61	1,37	0,12
19q60.35	1,57	0,06
19q59.7	1,70	0,05
19q59	1,43	0,19
19q58.8	1,15	0,21
19q57.4	1,03	0,03
19q56.9	1,23	0,00
19q54.8	1,11	0,16
19q53.0	1,01	0,04

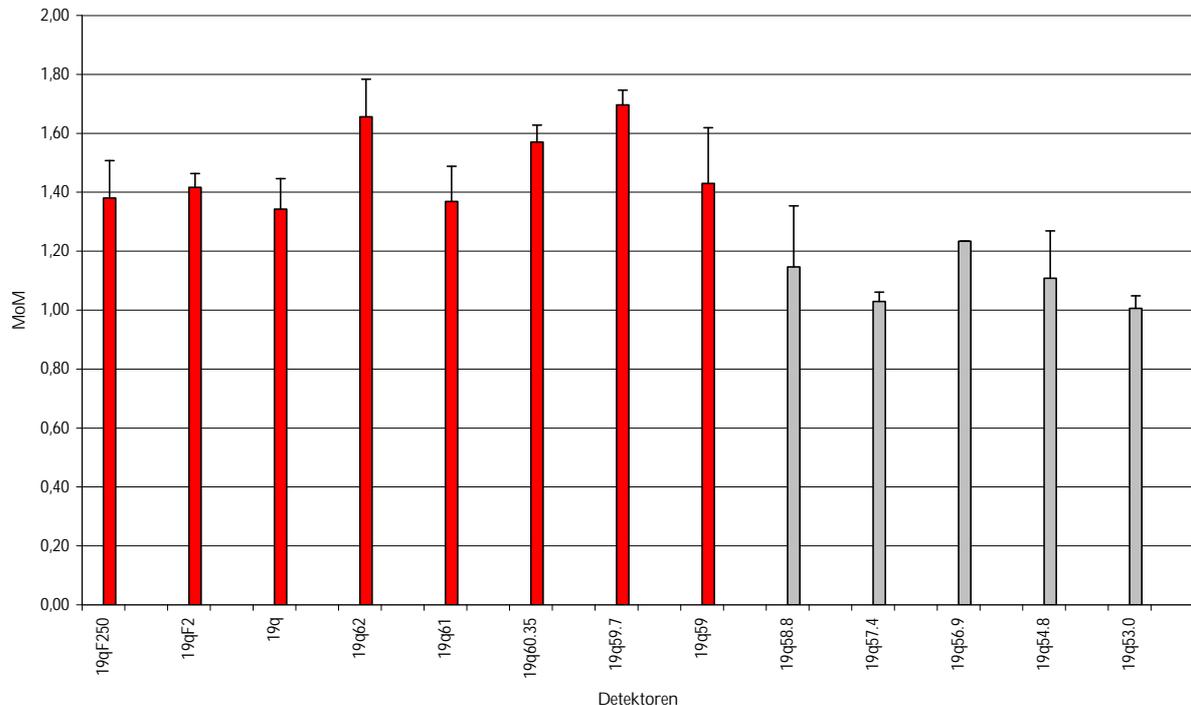


Abbildung 19: Fall 5, Duplikation 19q

Subtelomeranalyse des langen (q-) Arms von Chromosom 19 mittels Real-Time-PCR bei Fall 5. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Zugewinn an DNA, entsprechend einer Duplikation (>1,24 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 19q. Die Duplikation reicht vom Detektor 19qF250 bis einschließlich 19q59 (entsprechend 4,8-5,0Mb).

## Fall 7

Tabelle 25: Fall 7, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 1. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
1q			
01q240.1	CCACCCACTTTGGGAACACTAAGAAG	CTCGCTCTTTAACTGCGACACATCAG	176
01q241.6	AACACTTGGAACAGGAGCAGCAGAAG	GTGAGGTGCAGTTGGTGCTCAGATT	99
01q243.0	CGACCAGATGGAGCTAGGAGAGGAG	AGCTCATCTTCCCCTTCTGGAAAC	131
01q3.16	GGCTTCCCAGATATCAACATCTACCAG	TCCGAGTACCATAGAACAAGGCTTCC	104
01q244.0	GGCTTCCCAGATATCAACATCTACCAG	TCCGAGTACCATAGAACAAGGCTTCC	104
01q2.2	AGAGACACAGTGTGAAATCGCTGCTC	AGTGAGGACCTGAGCAGTTTCGATTA	152
01q2.17	GCTCGCCACAGCTTCTTCACTAAAT	TTCCTTGGAACTTCTGACGCTGGAG	131
01q1.59	TTGTACGAGATGCAGGAGGAGGACTT	GACTCCACCCGATGACAGTTCTCAAT	133
01q	TGGGTGCATGGGTGCTGACATGGTG	AGGCTCCAGGCTGCCTTGCAAACAC	183
01q1.35	ACCCTGGCCATAGGGGACTTTATTCT	GGGTCACCACTGTGAGATGAGATGAG	135
01q1.14	AGAGTGGGGTTTAGGGTCTGTCAAG	CTTCCAGTTGAGAAGAGGCACTGA	152
01q0.9	TCGTCTCCACACCCGATGTACTTTC	GGTCAGGAAGAAGAAGCTTTGCACAC	159
01q2	AATCACAGCCCCACCCACACCTTCC	GCCATCTTGGGTACGGTGGTGACAGA	190
01q3	AGACAACCCTTCTCCTCCCGACCTGA	TTCTGGGGGCTGCCAGCATTCTGA	182
01q393	GCTCATCCCATCTCTATCATCTCCA	ACGTATGTGTAGAAGGCAGCCCCATA	158
01q338	ATCCAGTGTGATCCACCAGTTCTTCC	CTCGACTCTGTCTGAAGGGATTCTG	193
01q280	GTAACGCCACCTGTGAGTTCTGTCT	CCAAGAGGTAGAGGGAAGCTTTGGAG	155
01q0.1	CTGTACAACACCCTGAGCAGAAGCAC	CAATGGTTAGGGATCTGGGAGTGAGA	157
01qF	CTTTCACCCACCCAGCAGCCACAC	GGAGGGAGGCAGAGAAGGGCAGGCA	186

Tabelle 26: Fall 7, Deletion 1q

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 1 mittels Real-Time-PCR bei Fall 7. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von <0,78 (rot) entspricht der Deletion des subtelomeren Bereichs von 1q, die von 01qF bis 01q244.0 alle Detektoren einschließt. Die grün markierten MoM-Werte sind nicht eindeutig zu beurteilen.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
01qF	0,55	0,03
01q0.1	0,91	0,08
01q280	0,65	0,06
01q338	1,40	0,07
01q393	0,75	0,00
01q3	0,62	0,07
01q2	0,66	kein Wert
01q0.9	0,58	0,01
01q1.14	0,65	0,06
01q1.35	0,90	0,02
01q	0,43	0,04
01q1.59	0,75	0,04
01q2.17	1,26	0,03
01q2.2	0,69	0,01
01q244.0	0,73	0,05
01q244.0	0,66	kein Wert
01q244.0	0,83	0,04
01q243.0	0,98	0,05
01q243.0	1,73	0,04
01q241.6	0,99	0,04
01q241.6	0,81	0,07
01q240.1	0,87	0,05
01q240.1	0,68	0,04

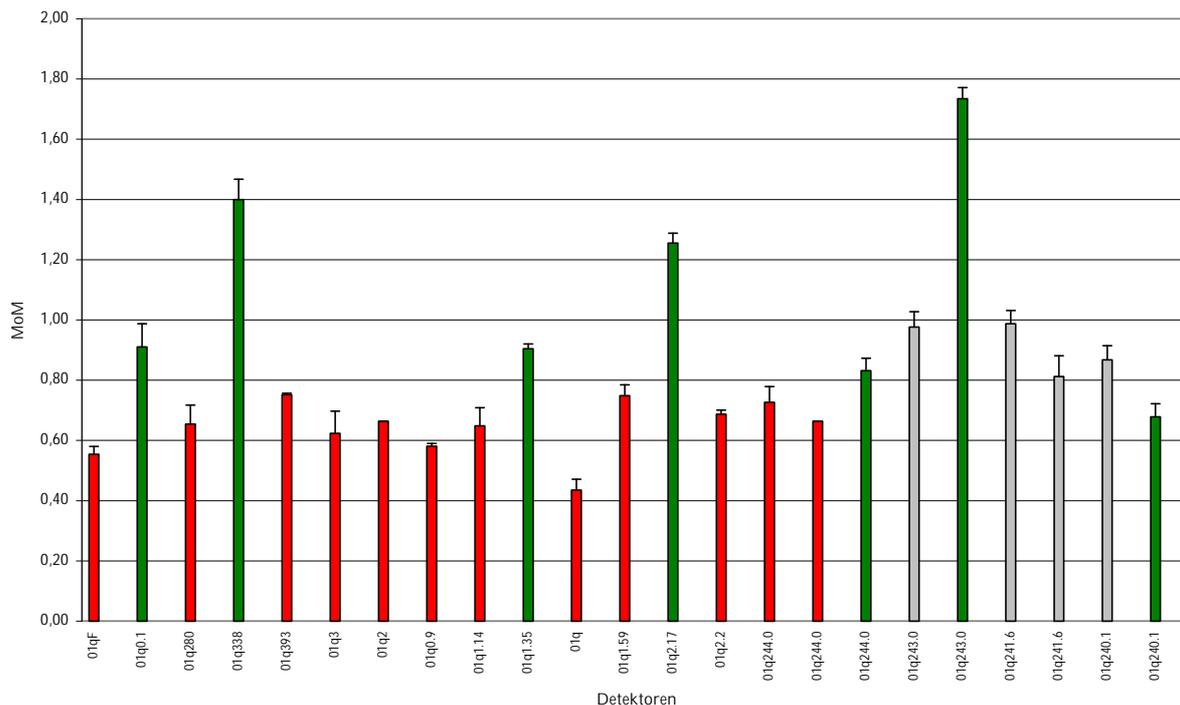


Abbildung 20: Fall 7, Deletion 1q

Subtelomeranalyse des langen (q-) Arms von Chromosom 1 mittels Real-Time-PCR bei Fall 7. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Verlust an DNA, entsprechend einer Deletion (<0,78 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 1q. Die Deletion reicht vom Detektor 01qF bis einschließlich zu 01q244.0 (mindestens 3,0-4,2 Mb). Grüne Säulen markieren nicht eindeutige Messwerte.

## Fall 10

Tabelle 27: Fall 10, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 20. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
20q			
20q2	GCAACAGCTTGGTGCCCGTGAACA	AACTCCAACAAGCAGCTCCAGGGCC	179
20q5993	ACAGACTCTGAAACCCTCCCTGT	CAGGATGAGGATGCAGATGAGGATG	158
20q6099	GAAGACAGGAGGTCCGAGGAGAAAG	CTTCTTTGGCACGAGGTTCTAGGTG	113
20qF2	ATACCCAGACCCCGCCCCACCAAC	TGGGCAGGAGGTGCAGCCCAGACA	190
20q	GGAAGGGCAAAGGCAAAGGGAAGGC	CACGGGGCAGAGGCTAAACTACA	188

Tabelle 28: Fall 10, Deletion 20q

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Deletion des langen (q-) Arms von Chromosom 20 mittels Real-Time-PCR bei Fall 10. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von <0,78 (rot) entspricht der Deletion des subtelomeren Bereichs von 20q, die die Detektoren 20q und 20qF2 einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
20q	0,51	0,00
20qF2	0,61	0,00
20q6099	1,11	0,08
20q5993	1,07	0,05
20q2	1,13	0,21

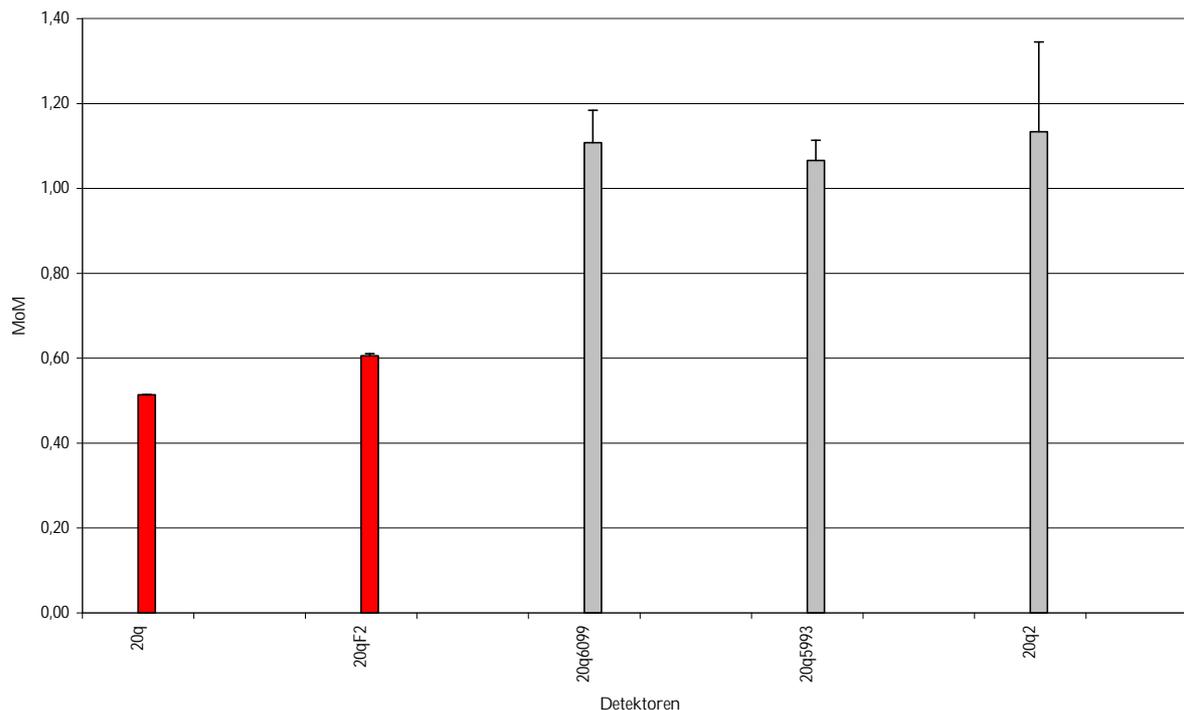


Abbildung 21: Fall 10, Deletion 20q

Subtelomeranalyse des langen (q-) Arms von Chromosom 20 mittels Real-Time-PCR bei Fall 10. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Verlust an DNA, entsprechend einer Deletion (<0,78 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 20q. Die Deletion reicht vom Detektor 20q bis einschließlich zu 20qF2 (0,2-1,4 Mb).

## Fall 11

Tabelle 29: Fall 11, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des langen (q-) Arms von Chromosom 10. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
10q			
10q 134.66	TGGCCTGTGTGGACCGCTGTGGGGA	GGAGCCCAGCCCGAAGGGGAACCGAA	147
10q 134.73	CCCTCTGTGCCTTTCCCTCCCCAGCC	GACTTCCAGCCCCTGTCCCAGAGCCC	134
10q 134.82	TCGTGCCCTCCAACCTGCCCATGAA	CCCCTCAGTGACCCTGCCAAAGGGAA	186
10q	TCTCCTTTGTGCCCGTGATGGTCCC	CTGCCACAACCAGTCGCCAAGCAA	183

Tabelle 30: Fall 11, Duplikation 10q

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des langen (q-) Arms von Chromosom 10 mittels Real-Time-PCR bei Fall 11. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von >1,24 (rot) entspricht der Duplikation des subtelomeren Bereichs von 10q, die die Detektoren 10q134.73 bis 10q einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
10q 134.66	0,96	0,04
10q 134.73	1,27	0,10
10q 134.82	1,43	0,21
10q	1,55	0,13

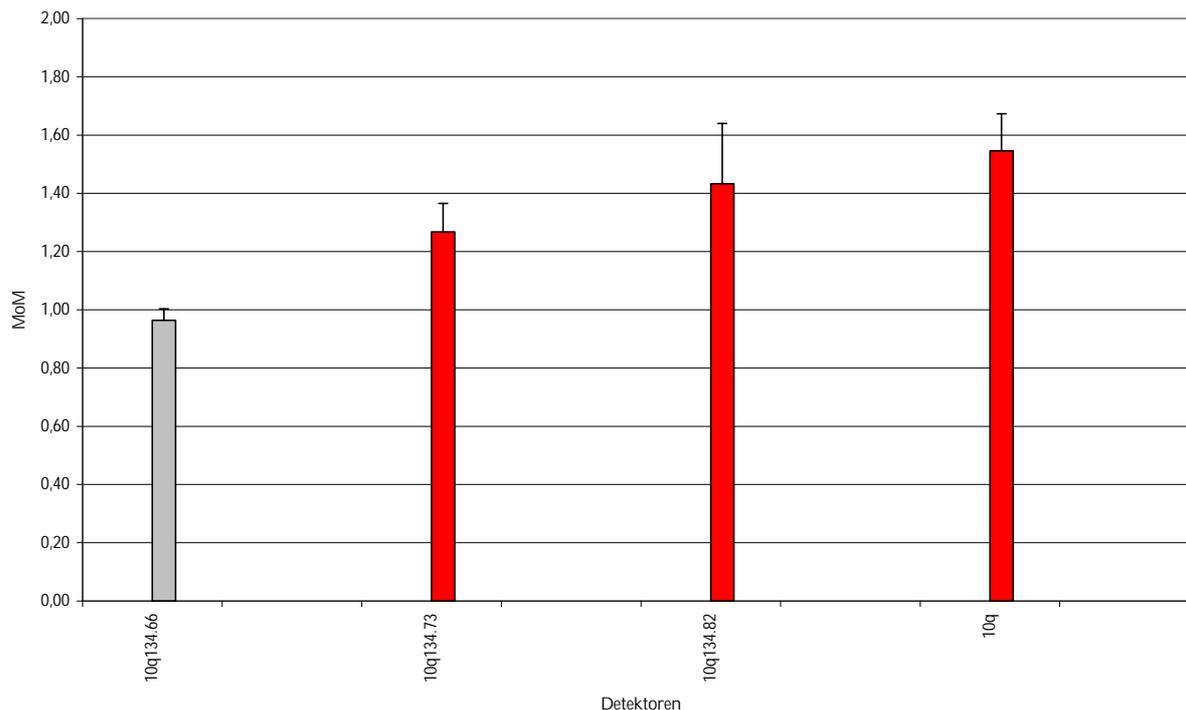


Abbildung 22: Fall 11, Duplikation 10q

Subtelomeranalyse des langen (q-) Arms von Chromosom 10 mittels Real-Time-PCR bei Fall 11. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Zugewinn an DNA, entsprechend einer Duplikation (>1,24 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 10q. Die Duplikation reicht vom Detektor 10q134.73 bis 10q (0,1-0,4 Mb).

## Fall 12

Tabelle 31: Fall 12, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 7. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
7p			
07pF	TGTGGTGGATGGGTGATGGGGCGA	AGGGTGGTCTGAGGCTGTGCTGGG	195
07p152	GAGCCAGGCCAACACACAGGCCA	CCGGAAGACCAGGAGGCACAGGGA	114
07p188	ACCGAAATTCACACTCAGGAGAGGAG	GAGGAGAAATAGCCGCTGGACTAGGT	129
07p253	GGCAATAGTGAGTGAGAGCTGGACAA	CGCTGTTTCAGAAGAGTGGCTGACTA	135
07p290	GGTGTGAAGGTGCAGAATTCCTCT	CTGGAGTACAGCTCGTACCGTTGAT	106
07p686	TCCAGTCAGGACTCGCTGTACCAATA	GAAAAGCCTTGCTGAGACCAGAGAAC	149
07p711	ATAAACCTTAGCGAGTGC GGCTGGA	GCCTTGAGGTTCCAGAGAAGCATCC	190
07p	GCCGCTGCATAACAAAGCACCCCAA	ACATGACACTGAGCCCACCTGCCTG	183

Tabelle 32: Fall 12, Duplikation 7p

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 7 mittels Real-Time-PCR bei Fall 12. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von >1,24 (rot) entspricht der Duplikation des subtelomeren Bereichs von 7p, die die Detektoren 07pF und 07p152 einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
07pF	1,58	0,20
07p152	1,21	0,06
07p188	0,84	0,06
07p253	0,90	0,05
07p290	0,77	0,06
07p686	0,87	0,02
07p711	0,91	0,06
07p	0,96	0,01

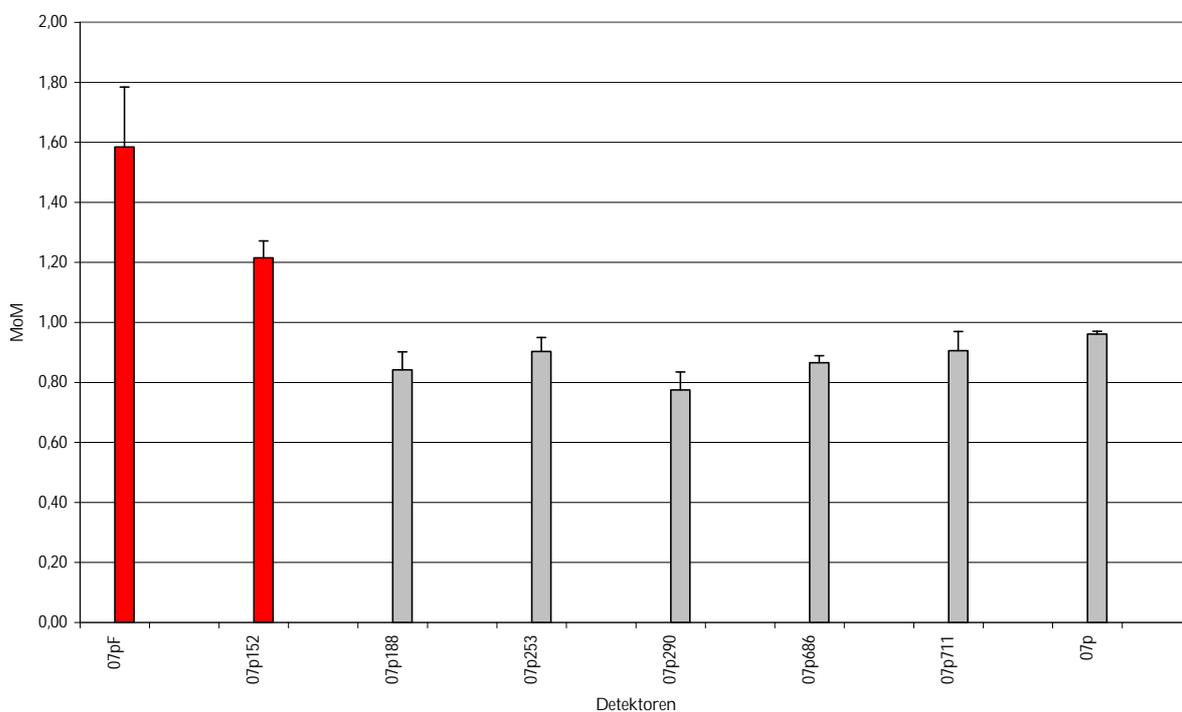


Abbildung 23: Fall 12, Duplikation 7p

Subtelomeranalyse des kurzen (p-) Arms von Chromosom 7 mittels Real-Time-PCR bei Fall 12. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Zugewinn an DNA, entsprechend einer Duplikation (>1,24 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 7p. Die Duplikation schließt die Detektoren 07pF und 07p152 ein (0,01-0,2 Mb).

## Fall 13

Tabelle 33: Fall 13, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 7. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
<b>7p</b>			
07pF	TGTGGTGGGATGGGTGATGGGGCGA	AGGGTGGTCTGAGGGCTGTGCTGGG	195
07p152	GAGCCAGGCCAACACACAGGCCA	CCGGGAAGACCAGGAGGCACAGGGA	114
07p	GCCGCTGCATAACAAAGCACCCCAA	ACATGACACTGAGCCCACCTGCCTG	183

Tabelle 34: Fall 13, Duplikation 7p

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 7 mittels Real-Time-PCR bei Fall 13. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von >1,24 (rot) entspricht der Duplikation des subtelomeren Bereichs von 7p, die den Detektor 07pF einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
07pF	1,25	0,10
07p152	1,13	0,03
07p	0,93	0,05

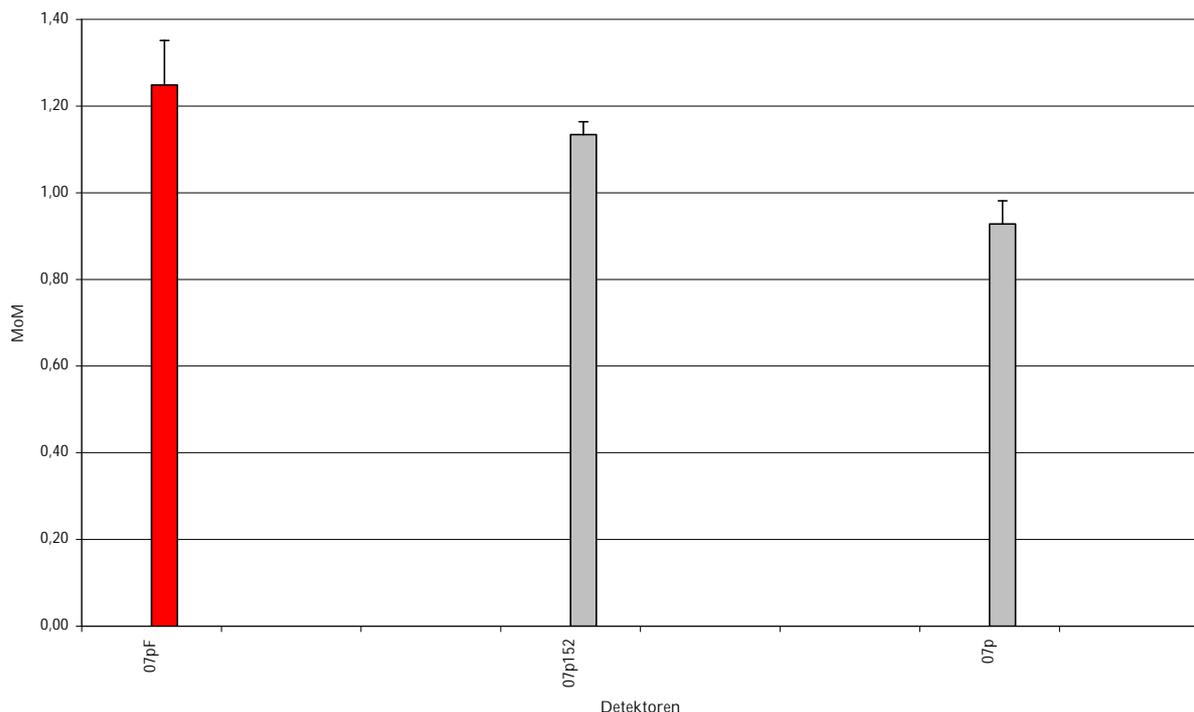


Abbildung 24: Fall 13, Duplikation 7p

Subtelomeranalyse des kurzen (p-) Arms von Chromosom 7 mittels Real-Time-PCR bei Fall 13. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Zugewinn an DNA, entsprechend einer Duplikation (>1,24 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 7p. Die Duplikation schließt den Detektor 07pF ein.

## Fall 15

Tabelle 35: Fall 15, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 7. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
<b>7p</b>			
07pF	TGTGGTGGGATGGGTGATGGGGCGA	AGGGTGGTCTGAGGGCTGTGCTGGG	195
07p152	GAGCCAGGCCAACACACAGGCCA	CCGGGAAGACCAGGAGGCACAGGGA	114
07p188	ACCGAAATTCACACTCAGGAGAGGAG	GAGGAGAAATAGCCGCTGGACTAGGT	129
07p253	GGCAATAGTGAGTGAGAGCTGGACAA	CGCTGTTTCAGAAGAGTGGCTGACTA	135
07p290	GGTGCTGAAGGTGCAGAATTCCTCT	CTGGAGTACAGCTCGTACCGGTTGAT	106
07p686	TCCAGTCAGGACTCGCTGTACCAATA	GAAAAGCCTTGCTGAGACCAGAGAAC	149
07p711	ATAAACCTTAGCGAGTGCGGCTGGA	GCCTTGAGGTTCCAGAGAAGCATCC	190
07p	GCCGCTGCATAACAAAGCACCCCAA	ACATGACACTGAGCCCACCTGCCTG	183

Tabelle 36: Fall 15, Duplikation 7p

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Duplikation des kurzen (p-) Arms von Chromosom 7 mittels Real-Time-PCR bei Fall 15. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von >1,24 (rot) entspricht der Duplikation des subtelomeren Bereichs von 7p, die den Detektor 07pF einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
07pF	1,37	0,10
07p152	0,84	0,04
07p152	1,10	0,05
07p188	0,98	0,02
07p253	0,93	0,04
07p290	0,92	0,02
07p686	0,84	0,08
07p711	1,07	0,09
07p	1,15	0,04

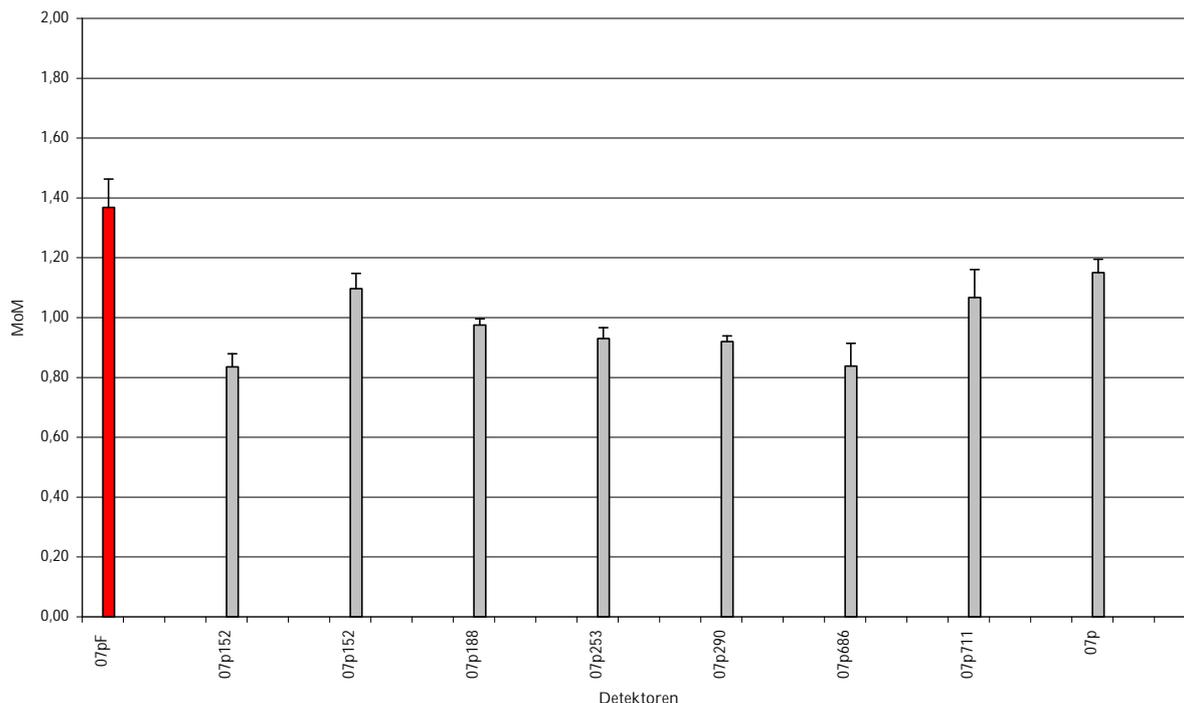


Abbildung 25: Fall 15, Duplikation 7p

Subtelomeranalyse des kurzen (p-) Arms von Chromosom 7 mittels Real-Time-PCR bei Fall 14. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Zugewinn an DNA, entsprechend einer Duplikation (>1,24 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 7p. Die Duplikation schließt den Detektor 07pF ein.

## Fall 16

Tabelle 37: Fall 16, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Deletion des kurzen (p-) Arms von Chromosom 5. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
5p			
05p0.026	ACCAAAAACCGCCCCAGCCCCCAA	GCAGTCTGACCAGGCCCTCTCGCA	101
05p0.06	CACCCGCTCACCTCCCTCACGCTCA	GCCGACGCCAGACCTCCTTACTCCCA	195
05p3	CCAACCTCGGAAAGTGACAGGCTG	AGGCTCTCGTGAGGTGGCTGGAATG	190
05p0.5	ACCCCAGCAAACGCCTACGGACCA	GGCCACCCGGCATCCTTTCATCTCCA	128
05pF	GCCCCCACACTCCACCACAGTCA	CGCCAGCACTCCACCTGCATCCA	176

Tabelle 38: Fall 16, Deletion 5p

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Deletion des kurzen (p-) Arms von Chromosom 5 mittels Real-Time-PCR bei Fall 16. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von <0,78 (rot) entspricht der Deletion des subtelomeren Bereichs von 5p, die mindestens den Detektor 05pF einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
05p0.026	1,03	0,03
05p0.06	0,89	0,14
05p3	0,65	0,05
05p0.5	0,91	0,06
05pF	0,72	0,04

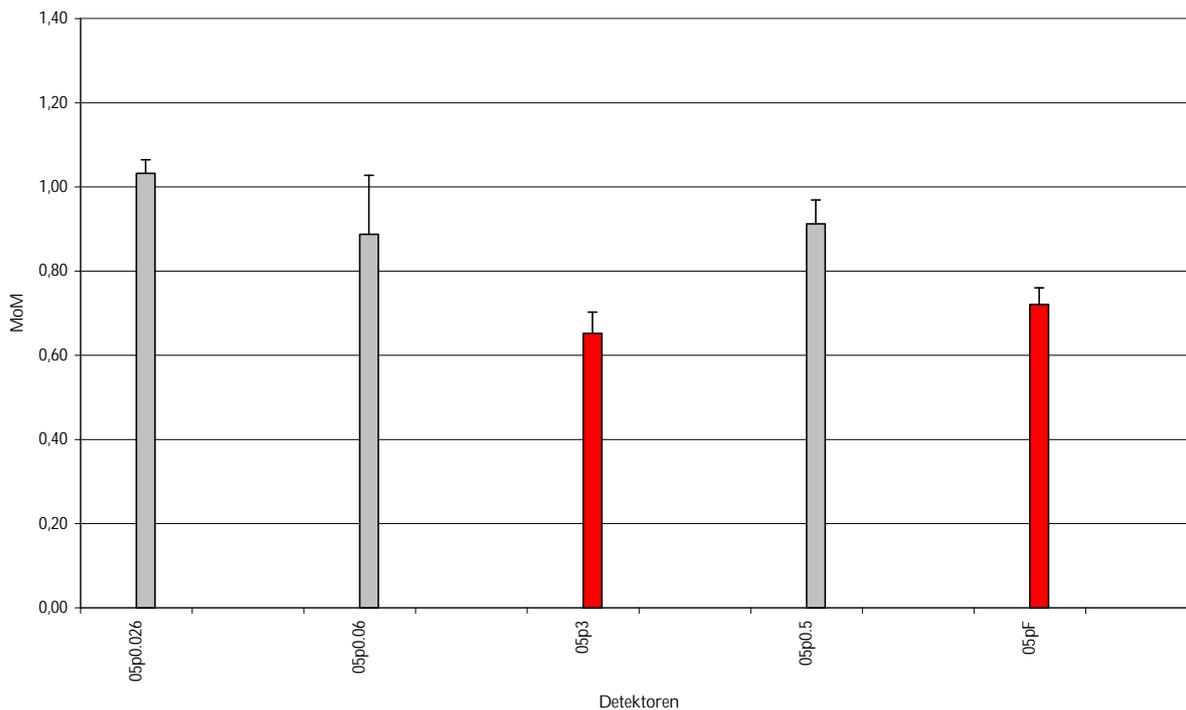


Abbildung 26: Fall 16, Deletion 5p

Subtelomeranalyse des kurzen (p-) Arms von Chromosom 5 mittels Real-Time-PCR bei Fall 16. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Verlust an DNA, entsprechend einer Deletion (<0,78 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 5p. Die Deletion schließt mindestens den Detektor 05pF ein.

## Fall 17

Tabelle 39: Fall 17, Detektoren

Detektoren für die quantitative Real-Time-PCR zur näheren Größen- und Bruchpunktbestimmung der Deletion des kurzen (p-) Arms von Chromosom 8. Angegeben sind die Bezeichnungen der Detektoren mit der Größe der Region, die sie auf dem Chromosom abdecken (in bp), und den Primer-Sequenzen.

Detektor (Bezeichnung)	Primer-Sequenz 5'→3'		abgedeckte Region (in bp)
	Vorwärts	Rückwärts	
<b>8p</b>			
08p180	GATGGTGTGAGTAAAACCCAGAGGA	GAAGCCCTGGGGAATCTTAATTGGAG	196
08p313	TCGGCATAAGACCTGAGGAATAACCA	GCTGCCGTTCCACTTAACTCTGTCTC	179
08p	AGGTGACTTTCCAGGACGCTGCTGC	TGACTGACTGCCCTCTGTGCTCCCA	180
08p324	GTGCACGTCATATGGTGAGAGCAAGT	GAGAAGAGAGTTGGGGTGTGAGGATG	169
08p408	TGCAGGGCTCATAGTGAGTGTCTGT	CCTTGCCCTCTGACTTTCAGTGATG	142
08p300	TCCGCTGCCACATGCCTGTGCTCC	GCCCCTGTCTGCCACTTCCCTCCA	186
08p1000	CTCTCCCTCCAACCTCTGATGCCCTGCC	TCTCTGCCCCACTCCCTTCCCAATCC	170

Tabelle 40: Fall 17, Deletion 8p

Subtelomeranalyse und Bruchpunktbestimmung der Deletion des kurzen (p-) Arms von Chromosom 8 mittels Real-Time-PCR bei Fall 17. Aufgelistet sind die in regelmäßigen Abständen zum Telomer gelegten Detektoren mit den in der Real-Time-PCR ermittelten MoM-Mittelwerten und der Standardabweichung. Ein MoM von 0,78-1,24 (schwarz) entspricht dem normalen DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms. Ein MoM von <0,78 (rot) entspricht der Deletion des subtelomeren Bereichs von 8p, die die Detektoren 08p313 und 08p einschließt.

Detektoren	MoM	Standardabweichung
08p180	0,93	0,15
08p313	0,52	0,15
08p	0,52	0,05
08p	0,42	0,04
08p324	0,94	0,00
08p408	0,94	0,04
08p300	1,06	0,04
08p1000	0,91	0,15

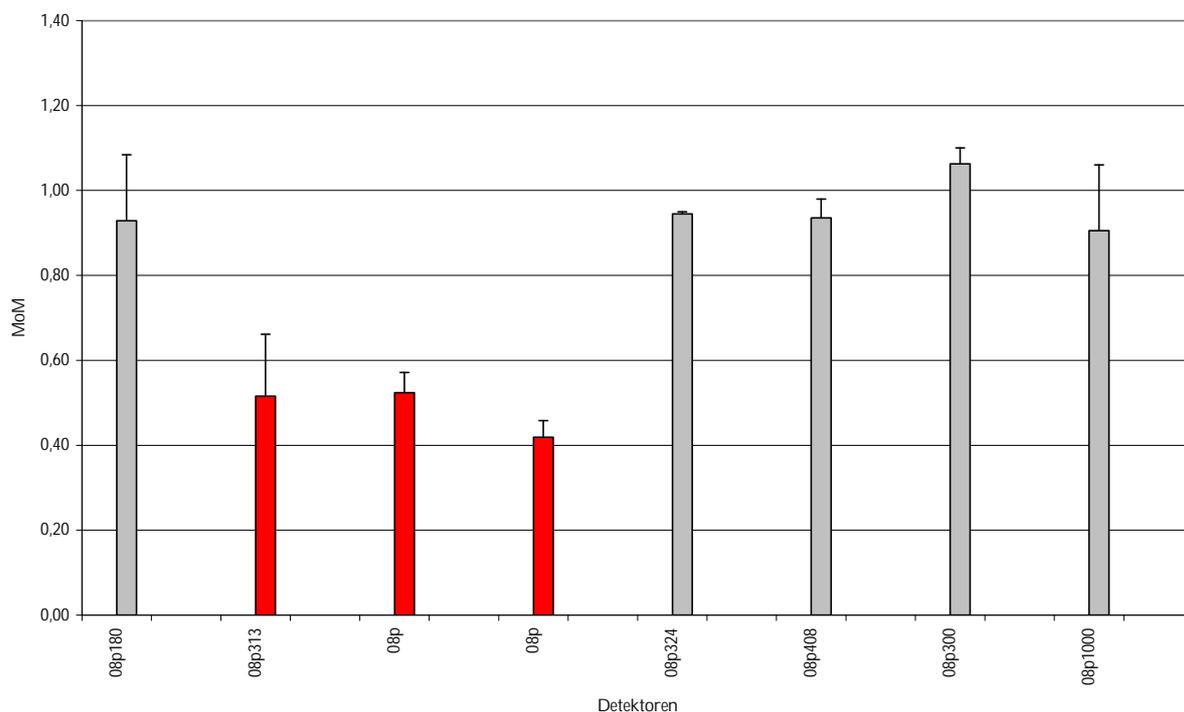


Abbildung 27: Fall 17, Deletion 8p

Subtelomeranalyse des kurzen (p-) Arms von Chromosom 8 mittels Real-Time-PCR bei Fall 17. In definierten Abständen vom Telomer des Chromosoms wurde der DNA-Gehalt gemessen. Der normale DNA-Gehalt eines diploiden Chromosoms wird mit 0,78-1,24 MoM angegeben. Graue Säulen repräsentieren den normalen DNA-Gehalt des diploiden Chromosoms. Rote Säulen markieren den Verlust an DNA, entsprechend einer Deletion (<0,78 MoM) des subtelomeren Bereichs von Chromosom 8p. Die Monosomie schließt die Detektoren 08p313 und 08p ein.

## Literaturverzeichnis

- Adeyinka A, Adams SA, Lorentz CP, Van Dyke DL, Jalal SM (2005): Subtelomere deletions and translocations are frequently familial. *Am J Med Genet Part A* 135A, 28-35
- Auber B, Bruemmer V, Zoll B, Burfeind P, Boehm D, Liehr T, Brockmann K, Wilichowski E, Argyriou L, Bartels I (2009): Identification of subtelomeric genomic imbalances and breakpoint mapping with quantitative PCR in 296 individuals with congenital defects and/or mental retardation. *Mol Cytogenet* 2, 2-10
- Baker E, Hinton L, Callen DF, Aitree M, Dobbie A, Eyre HJ, Sutherland GR, Thompson E, Thompson P, Woollatt E et al. (2002): Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet* 107, 285-293
- Balikova I, Menten B, de Ravel T, Le Caignec C, Thienpont B, Urbina M, Doco-Fenzy M, de Rademaeker M, Mortier G, Kooy F et al. (2007): Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals. *Hum Mutat* 28, 958-967
- Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG (2003): Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions. *Hum Mol Genet* 12, 2153-2165
- Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG (2007): The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet Part A* 143A, 1850-1857
- Baris HN, Tan WH, Kimonis VE, Irons MB (2007): Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization in a clinical setting. *Am J Med Genet Part A* 143A, 2523-2533
- Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Theisen A, Kashork CD, Shaffer LG (2005): Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more?. *Am J Med Genet Part A* 134A, 259-267
- Biesecker LG (2002): The end of the beginning of chromosome ends. *Am J Med Genet* 107, 263-266
- Boehm D, Herold S, Kuechler A, Liehr T, Laccone F (2004): Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. *Hum Mutat* 23, 368-378
- Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Cherif B, Bienvenu T (2006): Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eu J Hum Genet* 14, 701-713
- Chute I, Le Y, Ashley T, Dobson MJ (1997): The telomere-associated DNA from human chromosome 20p contains a pseudotelomere structure and shares sequences with the subtelomeric regions of 4q and 18p. *Genomics* 46, 51-60
- de Vries BBA, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW et al. (2001): Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 38, 145-150
- de Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C (2003): Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 40, 385-398
- de Vries BBA, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LELM, Janssen IM, van Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EHLPG, de Leeuw N et al. (2005): Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 77, 606-616
- Department of Genetics and Genomic Biology (2008): Database of Genomic Variants, Build 36. URL: <http://projects.tcag.ca/variation>. Stand: 17.07.2010
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006): Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7, 85-97
- Flint J, Wilkie AOM (1996): The genetics of mental retardation. *Br Med Bull* 52, 453-464

- Flint J, Bates GP, Clark K, Willingham D, Roe BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ (1997): Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet* 6, 1305-1314
- Graubner B: ICD-10-GM 2010, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 2010
- Hunter AGW (2000): Outcome of the routine assessment of patients with mental retardation in a genetics clinic. *Am J Med Genet* 90, 60-68
- Inlow JK, Restifo LL (2004): Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics* 166, 835-881
- Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Lorentz CP, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, Meyer RG, Ensenauer R, Anderson MH, Michels VV (2003): Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med* 5, 28-34
- Joly G, Lapierre JM, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois MC, Prieur M, Raoul O, Colleaux L, Munnich A et al. (2001): Comparative genomic hybridisation in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet* 60, 212-219
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821
- Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J (1999): Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354, 1676-1681
- Knight SJ, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM et al. (2000): An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 67, 320-332
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MHA, Merckx GFM, Knoers NVAM, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CMA, de Kovel CG, Brunner HG et al. (2004): Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 41, 892-899
- Ledbetter DH, Martin CL (2007): Cryptic telomere imbalance: a 15-year update. *Am J Med Genet Part C: Semin Med Genet* 145C, 327-334
- Lenhard W, Breitenbach E, Ebert H, Schindelbauer-Deutscher HJ, Henn W (2005): Psychological benefit of diagnostic certainty for mothers of children with disabilities: Lessons from Down Syndrome. *Am J Med Genet Part A* 133A, 170-175
- Moeschler JB, Shevell M, Committee on Genetics (2006): Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 117, 2304-2316
- National Center for Biotechnology Information (2009): Blast Human Sequences. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606>. Stand: 15.07.2008
- National Center for Biotechnology Information (2009): Human Genome Resources. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human>. Stand: 15.07.2008
- National Center for Biotechnology Information (2009): Map Viewer. Build 37.1. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9606](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606). Stand: 17.07.2010
- National Center for Biotechnology Information: Online Mendelian Inheritance in Man. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Stand: 30.08.2010
- Ning Y, Roschke A, Smith ACM, Macha M, Precht K, Riethman H, Ledbetter DH, Flint J, Horsley SW, Regan R et al. (1996): A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nat Genet* 14, 86-89

- Pickering DL, Eudy JD, Olney AH, Dave BJ, Golden D, Stevens J, Sanger WG (2008): Array-based comparative genomic hybridization analysis of 1176 consecutive clinical genetics investigations. *Genet Med* 10, 262-266
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschemdorf F et al. (2006): Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet Part A* 140A, 2063-2074
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL (2006): Subtelomere FISH analysis of 11688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43, 478-489
- Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A (2001): Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 109, 286-294
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF (2005): Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat* 25, 513-524
- Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, Storm K, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, van den Ende J, Biervliet M, Eyskens F et al. (2006): Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. *Clin Genet* 69, 58-64
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H et al. (2006): Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 43, 180-186
- Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G (1992): The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4913-4917
- Sauter SM, Boehm D, Bartels I, Burfeind P, Laccone FA, Neesen J, Wilken B, Liehr T, Zoll B (2007): Partial trisomy of distal 19q detected by quantitative real-time PCR and FISH in a girl with mild facial dysmorphism, hypotonia and developmental delay. *Am J Med Genet Part A* 143A, 1091-1099
- Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M (2005): Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 42, 699-705
- Schroeder S, Gerry M, Gertz G, Velazquez F (2002): Final Project Report: Usage of the Term "Mental Retardation": Language, Image and Public Education. URL: <http://www.ssa.gov/disability/MentalRetardationReport.pdf>. Stand: 30.08.2010
- Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA (2006): Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr* 149, 98-102
- Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L et al. (2004): Microarray based comparative genomic hybridization (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 41, 241-248
- Stewart DR, Kleefstra T (2007): The chromosome 9q subtelomere deletion syndrome. *Am J Med Genet Part C: Semin Med Genet* 145C, 383-392
- Strachan T, Read AP: *Molekulare Humangenetik*. 3. Auflage; Elsevier, München 2005
- University of California Santa Cruz: UCSC Genome Browser. URL: [http://genome.ucsc.edu/trash/hgtIdeo/hgtIdeo\\_genome\\_49c0\\_a6dda0.png](http://genome.ucsc.edu/trash/hgtIdeo/hgtIdeo_genome_49c0_a6dda0.png), Stand: 5.08.2010

- van Karnebeek CDM, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DFMC, Redeker EJ, Hennekam RCM, Hoovers JMN (2002): Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet* 39, 546-553
- van Karnebeek CDM, Jansweijer MC, Leenders AG, Offringa M, Hennekam RC (2005): Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *Eu J Hum Genet* 13, 6-25
- Visser LELM, de Vries BBA, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, On Choy C, Straatman H, van der Vliet W, Huys EHLPG, van Rijk A et al. (2003): Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 73, 1261-1270
- Vorsanova SG, Kolotii AD, Sharonin VO, Soloviev YB, Yurov YB (1998): FISH analysis of microaberrations at telomeric and subtelomeric regions in chromosomes of children with mental retardation. *Am J Hum Genet Suppl* 65, A154
- Yu S, Baker E, Hinton L, Eyre HJ, Waters W, Higgins S, Sutherland GR, Haan E (2005): Frequency of truly cryptic subtelomere abnormalities – a study of 534 patients and literature review. *Clin Genet* 68, 436-441
- Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, White LD, Liu W, Beaudet AL, Bejjani BA et al. (2003): Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Hum Mol Genet* 12, 2145-2152
- Zahn S: Etablierung und Vergleich von Multi-Colour-FISH-Techniken und Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH) zur Detektion kryptischer Aberrationen der subtelomerischen Chromosomenregionen. Math.-Nat. Diss. Bonn 2004

## Danksagung

Meinen besonderen Dank richte ich an Frau Prof. rer. nat. I. Bartels für die Überlassung des Themas, die stets engagierte und freundliche Betreuung sowie die hilfreiche Unterstützung während der gesamten Zeit. Herrn Dr. med. B. Auber danke ich herzlich für die intensive Betreuung und die kompetente fachliche Unterstützung. Und Frau S. Herold danke ich für die geduldige Einführung in die Technik der Real-Time-PCR.

## Curriculum Vitae

Ich wurde am 2. Juli 1983 als Tochter von Christa Rita Hildegard Röser-Brümmer und Benno Vinzenz Brümmer in Filderstadt geboren. Aufgewachsen bin ich in Biringen, Baden-Württemberg, wo ich auch die Grundschule von 1990 bis 1994 besuchte. Bis zur Allgemeinen Hochschulreife 2003 war ich Schülerin des Gymnasiums Möckmühl. Im April 2004 habe ich dann das Studium der Humanmedizin an der Georg-August Universität Göttingen aufgenommen. Begleitend zu meiner Studienzeit habe ich als Tutorin im Modul Histologie der Abteilung Humanmedizin und im Modul Ärztliche Basisfähigkeiten der Abteilung Allgemeinmedizin mehrere Semester gearbeitet. In der Akutpsychiatrie des Asklepios Fachklinikums Rosdorf durfte ich als studentische Hilfskraft im Pflegedienst weitere Erfahrungen sammeln. Im Praktischen Jahr von März 2009 bis Januar 2010 habe ich den chirurgischen Teil im Waidspital Zürich absolviert, das Tertiäre Innere Medizin im Evangelischen Krankenhaus Weende und am Jewish General Hospital Montreal und das neurologische Tertiäre am Universitätsklinikum Göttingen. Seit dem Sommersemester 2007 beschäftigte ich mich mit meiner Dissertation zum Thema „Subtelomere Chromosomenveränderungen mittels quantitativer Real-Time PCR bei Patienten mit mentaler Retardierung und normalem zygotenesischem Chromosomensatz“ unter Frau Prof. rer. nat. I. Bartels in der Abteilung Humangenetik. Teile der Dissertation wurden bereits 2009 unter dem Titel „Identification of subtelomeric genomic imbalances and breakpoint mapping with quantitative PCR in 296 individuals with congenital defects and/or mental retardation“ in Molecular Cytogenetics von Auber et al. veröffentlicht.

Im Mai 2010 habe ich das Humanmedizinstudium erfolgreich abgeschlossen und seit 1. Oktober 2010 bin ich Assistenzärztin der Neurologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Standort Großhadern.