

Detektion chromosomaler Kopienzahlveränderungen
bei Patienten mit Intelligenzminderung
zur Identifizierung und Charakterisierung von
Kandidatengeneten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt von

Alexander Michael Zink

aus Bonn

Bonn Oktober, 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. M. Nöthen
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Höfeld

Tag der Promotion: 06.03.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	4
2.1. Genetische Variabilität	4
2.2. Kopienzahlvarianten (CNVs)	4
2.3. Mechanismen der CNV-Entstehung	5
2.4. Methoden zur CNV-Detektion	6
2.5. CNVs und ihre Kausalität	7
2.6. Intelligenzminderung	9
2.7. Ursachen der Intelligenzminderung	11
2.8. CNVs und Intelligenzminderung	13
2.9. CNVs und variable Penetranz / Expressivität	14
2.10. Interpretation von CNV Daten	15
2.11. Ziel der Forschung	18
3. Material und Methoden	20
3.1. Geräte	20
3.2. Chemikalien	21
3.3. Kommerzielle Systeme (Kits)	22
3.4. Software und Datenbanken	22
3.5. Identifizierung von Kopienzahlveränderungen	23
Isolierung von DNA aus Blut	23
Photometrische Konzentrations- und Reinheitsmessung (Nanodrop)	23
Molekulare Karyotypisierung (Genomweite SNP-Arrays (Fa. Illumina))	24
Prozessieren der Bead Chips	26
In silico Analyse der Array Daten	27
QuantiSNP	28
3.6. Filterkriterien für die CNV-Analyse	29
3.7. Verifizierung der Kopienzahlveränderungen und Segregationsanalyse	33
Polymerase Kettenreaktion (PCR)	33
quantitative PCR (qPCR) mit SYBR Green I	34

Auswertung $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode	36
Primer Design	37
3.8. Folgeuntersuchungen	38
3.8.1. Expressionsanalysen aus Vollblut	38
Isolierung von RNA aus Lymphozyten	38
RT-PCR	39
Relative qPCR von cDNA	40
Auswertung der relativen qPCR	42
3.8.2. Sanger-Sequenzierung	43
Two-Step-PCR	44
Gelelektrophorese	45
Exonuklease (Exo) - Thermo sensitive Shrimp Alkaline-Phosphatase (TSAP)	46
Sequenzierreaktion (Cycle Sequencing)	47
Aufreinigung mit SEPHADEX (separation Pharmacia dextran)	48
Auswertung der Sequenzierreaktion	49
3.8.3. Genomweite Expressionsanalysen mit dem Illumina HumanHT-12 v4 BeadChip	49
Einführung HumanHT-12v4BeadChip	49
Prozessieren HumanHT-12 v4 BeadChip Illumina	51
Auswertung der HumanHT-12 v4 BeadChip Illumina Daten	51
3.9. Kohortenbeschreibung Genotypisierung	53
3.10. Kohortenbeschreibung Sanger-Sequenzierung	54
4. Ergebnisse	56
4.1. Auswertung der CNV-Analyse	56
4.1.1. Erste Analysegruppe	56
4.1.2. Zweite Analysegruppe	57
4.2. CNVs in kritischen Regionen bekannter Mikrodeletions-/ Mikroduplikationssyndrome	58
4.3. Klinische Übersicht der Patienten mit auffälligen CNV-Befunden	60
4.4. Seltene CNVs	68
4.4.1. <i>De novo</i> Mikrodeletion 2p14-p15	68
Patientenbeschreibung (15/08)	68
Molekulare Karyotypisierung	69
Vergleich Patient 15/08 – DECIPHER-Datenbank	69
4.4.2. <i>De novo</i> Mikrodeletion Xp11.3-p11.4	71
Patientenbeschreibung (72/00)	71
Molekulare Karyotypisierung	72

4.4.3. <i>De novo</i> Mikrodeletion 5q31.2	73
Patientenbeschreibung (29/09)	73
Molekulare Karyotypisierung	74
Sequenzierung <i>LRRTM2</i>	75
4.4.4. <i>De novo</i> Mikrodeletion 15q22.1-q22.2	76
Patientenbeschreibung (22/09)	76
Molekulare Karyotypisierung	77
Vergleich Patient (22/09)-DECIPHER-Datenbank	78
Sequenzierung <i>FOXB1</i>	78
4.4.5. <i>De novo</i> Mikrodeletion 3q26.33	79
Patientenbeschreibung (43/01)	79
Molekulare Karyotypisierung	79
Sequenzierung <i>SOX2</i>	80
4.4.6. <i>De novo</i> Mikrodeletion 9q33.3-q34.11	80
Patientenbeschreibung (73/08)	80
Molekulare Karyotypisierung	81
Vergleich Patient 73/08- DECIPHER/MRNET-Datenbank	81
4.4.7. <i>De novo</i> Mikrodeletion Xq27.3-q28	84
Patientenbeschreibung (5/07)	84
Molekulare Karyotypisierung	84
Vergleich Patientin 5/07-DECIPHER-Patienten	85
FMR1 Repeat-Analyse und Sequenzierung	87
X-Inaktivierungsanalysen	87
Genomische Überlappung der drei Deletionen	87
Expressionsstudien	88
Mutter-Tochter-Paare als Kontrollen für die Expressionsanalyse	88
FMR1-Expression	89
FMR2/AFF2-Expression	90
IDS-Expression	90
4.4.8. <i>De novo</i> Mikrodeletion 5q14.3 Deletion	91
Patientenbeschreibung (14/06)	91
Molekulare Karyotypisierung	92
Vergleich Patientin 14/06 - DECIPHER/MRNET-Datenbank	93
Genomweite Expressionsuntersuchungen	97
Verifizierung der genomweiten Expressionsanalysen	100

5.	Diskussion	106
5.1.	Ergebnisse der molekularen Karyotypisierung	106
	Erste Analysegruppe	107
	Zweite Analysegruppe	110
5.2.	<i>De novo</i> Mikrodeletion 2p14-p15	114
5.3.	<i>De novo</i> Mikrodeletion Xp11.3-p11.4	119
5.4.	<i>De novo</i> Mikrodeletion 5q31	121
5.5.	<i>De novo</i> Mikrodeletion 15q22.1-q22.2	125
5.6.	<i>De novo</i> Mikrodeletion 3q26.33	128
5.7.	<i>De novo</i> Mikrodeletion 9q33.3-q34.11	129
5.8.	<i>De novo</i> Mikrodeletion Xq27.3-q28	136
5.9.	<i>De novo</i> Mikrodeletion 5q14.3-q15	140
6.	Zusammenfassung	153
7.	Ausblick	157
8.	Literaturverzeichnis	160
9.	Eigene Publikationen	183
	Danksagung	185

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
∞	unendlich
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
AEG-Syndrom	Anophthalmie; Esophageal-atresia (Ösophagusatresien), Genital abnormalities (Fehlbildungen der Genitalien)
aRNA	antisenseRNA
ASD	Atrium septum Defekt
b	Base
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BAF	B-Allel-Frequenz
BDMR	Brachydaktylie-Mental Retardation-Syndrom
BERA	Brainstem Evoked Response Audiometry
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
cDNA	complementary DNA
CGH	Comparative Genomic Hybridisation
chr	Chromosom
cm	Zentimeter
CNV	Copy Number Variation
Ct	Cycle Threshold
d.h.	das heißt
DD	Entwicklungsverzögerung (developmental delay)
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
DGV	Database of Genomic Variants
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpt	Dioptrie
DPV	Detection p-Value
DTT	Dithiothreitol
EBM	Einheitlicher Bewertungsmaßstab
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalografie
et al.	et alia
etc.	et cetera
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FISH	Fluoreszenz-In situ Hybridisierung
FoSTeS	Fork Stalling and Template Switching

FXS	Fragiles X-Syndrom
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GS	Gaumenspalte
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HI	Haploinsuffizienzwert
HKG	Housekeeper-Gene
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
ID	Intelligenzminderung (Intellectual Disability)
IQ	Intelligenzquotient
J	Jahre
j	ja / vorhanden
k	tausend
k.A.	keine Angaben
kb	Kilobasenpaare
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kg	Kilogramm
KU	Kopfumfang
LCR	Low-copy-Repeat
LKGS	Lippen-Liefer-Gaumenspalte
LS	Lippenspalte
logR	log ₂ Ratio
m	männlich
Mb	Megabasenpaare
MFED	Münchener Funktionelle Entwicklungsdiagnostik
MGB	Minor Groove Binder
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
min	Minute
miRNA	mikroRNA
ml	Milliliter
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
mM	millimolar
Mo	Monate
MR	Mentale Retardierung (ID)
mRNA	messenger RNA
MRNET	German Mental Retardation Network
MRT	Magnetresonanztomographie
n	nein / nicht vorhanden
n.b.	nicht berichtet
n.v.	nicht verifiziert
NAHR	Nicht-allelische homologe Rekombination
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncRNA	non-coding RNA
ng	Nanogramm
NHEJ	Nicht-Homologe End-Verbindung
nm	Nanometer

NS-ID	Nicht-syndromale Intelligenzminderung
o.g.	oben genannt
OD	optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
P	Perzentile
p	kurzer Arm eines Chromosoms
path	pathologisch
PCR	Polymerasen-Ketten-Reaktion
PDA	Persistierender Ductus Arteriosus
PFO	Persistierendes Foramen Ovale
PLS	Potocki-Lupski-Syndrom
pmol	Pikomol
POF	primäre Ovarialinsuffizienz
q	Langer Arm eines Chromosoms
qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
RefSeq	NCBI Reference Sequence
RNA	Ribonukleinsäure
s.	Siehe
SCA	segmental chromosomal aneusomies
SD	Standardabweichung
sek	Sekunden
SGB	Sozialgesetzbuch
S-ID	Syndromale Intelligenzminderung
SLC	Solute Carrier
SMS	Smith-Magenis-Syndrom
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPZ	Sozialpädiatrisches Zentrum
SRO	Smallest Region of Overlap
SSW	Schwangerschaftswoche
t	Translokation
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAR-Syndrom	Thrombocytopenia-Absent Radius Syndrom
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSAP	Thermo sensitive Shrimp Alcaline-Phosphatase
U	Unit
u.a.	unter anderem
UPD	Uniparentale Disomie
UV	Ultraviolett
v.	Version
V.a.	Verdacht auf
VOUS	Variance of unkown significance
w	weiblich
WGA	Whole Genome Amplification
WHO	World Health Organisation
Z.n.	Zustand nach
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Die phänotypischen Unterschiede zwischen Individuen sind neben Umwelteinflüssen vor allem auf die genetische Variabilität zurückzuführen (Schafer & Hawkins, 1998). Das Spektrum bekannter genetischer Unterschiede zwischen Individuen ist sowohl in Bezug auf deren verschiedene Formen als auch auf ihre Anzahl sehr groß und reicht von numerischen Chromosomenaberrationen über strukturelle Chromosomenumbauten wie Translokationen oder CNVs (Copy Number Variations= Kopienzahlvarianten) bis hin zu SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms= Ein-Basen-Polymorphismen) (Feuk et al., 2006). CNVs sind DNA-Segmente, die bei verschiedenen Individuen einer Spezies in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen und zwischen einem Kilobasenpaar (kb) und mehreren Megabasenpaaren (Mb) groß sein können. Ein CNV kann in einer verringerten (heterozygote oder homozygote Deletion) oder einer vermehrten (Duplikation, Triplikation usw.) Kopienzahl vorliegen. Schätzungen ergaben, dass CNVs ca. 13% des menschlichen Genoms betreffen (Stankiewicz & Lupski, 2010). CNVs können sowohl in der Meiose als auch in der Mitose entstehen und führen demnach entweder zu einem durchgehenden Genotyp oder zu einem Mosaik. Zum jetzigen Zeitpunkt sind drei verschiedene Mechanismen der CNV-Entstehung bekannt: die Nicht-Allelische Homologe Rekombination (NAHR), die Nicht-Homologe End-Verbindung (NHEJ= Non Homologous End Joining) und FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching) (Gu et al., 2008). In Abhängigkeit von der Lokalisation eines CNVs und dem daraus resultierenden genetischen Inhalt kann eine Pathogenität in Bezug auf bestimmte Phänotypen vorliegen. CNVs können mit verschiedenen Methoden, die sich in ihrer Auflösung und ihrem Detektionsspektrum unterscheiden, detektiert werden. Unter diesen Methoden ist die sogenannte molekulare Karyotypisierung durch verschiedene Array-Technologien am aussagekräftigsten, da durch sie genomweit CNVs mit hoher Auflösung detektiert werden können.

Als Intelligenzminderung (**I**ntellectual **D**isability = ID) wird ein Zustand verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten bezeichnet (ICD-10-WHO Version 2011). ID hat eine Prävalenz von 1%-3% und ist damit ein häufiges Krankheitsbild (Maulik et al., 2011). Der Schweregrad der ID wird in Abhängigkeit vom Intelligenzquotienten in verschiedene Kategorien unterteilt (Zhang et al., 2005). Als möglichen Ursachen für eine ID kommen sowohl exogene als auch genetische Faktoren in Frage. Zu den genetischen Ursachen gehören numerische Aberrationen der Chromosomen (ca. 11% der ID-Patienten), von denen die Trisomie 21 als Ursache des Down-Syndroms die häufigste und bekannteste ID-Ursache ist (Rauch et al., 2006). Des Weiteren weisen ca. 5% der ID-Patienten eine Mutation in einem der ca. 450 bisher bekannten mit ID assoziierten Gene auf (van Bokhoven, 2011). Nach Schätzungen, die auf der Anzahl der bekannten ID-Gene auf dem X-Chromosom basieren, wird insgesamt mit 1500-2000 ID-Genen im gesamten Genom gerechnet (Rauch et al., 2006; van Bokhoven, 2011).

Je nach untersuchtem Kollektiv weisen 5%-35% der ID-Patienten einen pathogenen CNV auf und können mit Hilfe der Array-Technologie diagnostiziert werden (Miller et al., 2010). Zu den klassischen Deletions-/Duplikationssyndromen gehören u.a. das Cri-du-chat-Syndrom (Mikrodeletion 5p15.2-p15.3), das DiGeorge-Syndrom (Mikrodeletion 22q11.2), das Williams-Beuren-Syndrom (Mikrodeletion 7q11.23) oder das Wolf-Hirschhorn-Syndrom (Mikrodeletion 4p16.3). Patienten mit diesen Syndromen weisen oft ein charakteristisches Erscheinungsbild auf und werden daher als "*phenotype-first*"-Syndrome bezeichnet. Patienten mit bestimmten Mikrodeletionen in 17p11.2 leiden am Smith-Magenis-Syndrom (SMS), das ebenfalls zu den "*phenotype-first*"-Syndromen zählt. Nach der Identifizierung dieser Mikrodeletionen als Ursache für SMS konnte durch Sequenzanalysen von Genen der deletierten Region *RAI1* als das ursächliche Gen identifiziert werden - ein gutes Beispiel, wie über eine Mikrodeletion ein ursächliches ID-Gen bestimmt werden kann. Von "*genotype-first*"-Syndromen spricht man dagegen bei Syndromen, die nicht anhand des – häufig eher unspezifischen- klinischen Erscheinungsbildes, sondern aufgrund der gemeinsamen genetischen Ursache durch molekulare Karyotypisierung identifiziert wurden. Dazu gehören u.a. das Mikrodeletionssyndrom 2q33.1 und das Mikrodeletionssyndrom 17q21.31 (de Ravel et al., 2009). Interessanterweise führen CNVs, die die gleiche genomische Region betreffen, nicht automatisch zu identischen Phänotypen. So können zum Beispiel Mikrodeletionen in der Chromosomensubbande 15q13.3 zu einem weiten Spektrum an zentralnervösen Phänotypen wie durchschnittlicher bis grenzwertiger IQ, ID, Autismus, Epilepsie, bipolarer Störung und Schizophrenie führen. Man spricht dann von einer variablen Expressivität des CNVs. Deletionen in 16p13.11 werden sowohl gehäuft in ID-Patienten als auch in deren phänotypisch unauffälligen Eltern identifiziert und gelten daher als Risikofaktoren mit unvollständiger Penetranz für eine ID. Die wahrscheinlichste Ursache für variable Expressivität und unvollständige Penetranz liegt wahrscheinlich im unterschiedlichen genetischen Hintergrund des jeweiligen Patienten (Hannes et al., 2009; Girirajan et al., 2010).

Eine der größten aktuellen Herausforderungen der klinischen Genetik liegt in der Interpretation der bei einem Patienten identifizierten CNVs. Ziel ist es, in Bezug auf den untersuchten Phänotyp, die ursächlichen CNVs von den benignen/neutralen CNVs zu unterscheiden. Hierzu werden zur Zeit evidenzbasierte Maßstäbe etabliert, anhand derer eine Kategorisierung der CNVs stattfindet (Riggs et al., 2011). Die Maßstäbe beziehen sich hauptsächlich auf die Frequenz, mit der CNVs in der Allgemeinbevölkerung vorkommen und auf Genotyp-Phänotyp-Korrelationen von Patienten mit vergleichbaren CNVs und vergleichbaren Phänotypen. Dazu werden CNV-Daten von einer großen Anzahl ID-Patienten und Kontrollpersonen ohne ID benötigt. Diese Daten finden sich z.T. in der Literatur, häufiger jedoch in internationalen Datenbanken. Für Patientendaten ist hier die Datenbank DECIPHER (**D**atabase of **C**hromosomal **I**mbalance and **P**henotype in **H**umans Using **E**nsembl **R**esources; <http://decipher.sanger.ac.uk/>) führend und für Kontrollpersonen die **D**atabase of **G**enomic **V**ariants (DGV) (<http://projects.tcag.ca/variation/>). Zu Beginn der CNV-Interpretation wurden *de novo*-CNVs, die nicht in der Allgemeinbevölkerung zu finden waren, automatisch als pathogen angesehen

(Buysse et al., 2009). Aufgrund der inzwischen bekannten Neumutationsrate von CNVs (2,5 *de novo*-CNVs/1000 Neugeborene), kann ein *de novo*-Ursprung aber nicht mehr als alleiniges und ausreichendes Kriterium für eine Ursächlichkeit, sondern nur als Hinweis darauf angesehen werden (Vermeesch et al., 2011).

Ziel der Forschung in der vorliegenden Arbeit ist die Detektion und Charakterisierung bisher noch nicht beschriebener für eine ID ursächlicher CNVs und die nachfolgende Identifizierung neuer ID-Gene in den betroffenen chromosomalen Regionen. Hierbei sind klinische und Grundlagenforschung oft eng verknüpft. Oftmals ist die erste Beschreibung eines CNVs bei einem oder wenigen Patienten der entscheidende Schritt zur Identifizierung von Genen, die durch andere Mechanismen (z.B. Punktmutationen) eine häufige Krankheitsursache darstellen oder interessante Hinweise auf ätiologische Mechanismen ("*pathways*") der Intelligenzminderung geben. Gleichzeitig wird für Patienten und deren Familien die diagnostische Situation verbessert und eine gezieltere Betreuung ermöglicht. Des Weiteren ermöglicht die immer genauere Kenntnis der betroffenen Gene und genetischen Mechanismen die Entwicklung neuer Therapieformen. So gibt es derzeit Studien zur Entwicklung neuer Therapieformen für bestimmte Symptome des fragilen X-Syndroms (FXS), des 15q13.3-Mikrodeletionssyndroms und der Neurofibromatose Typ 1 (Li et al., 2005; McBride et al., 2005; Cubells et al., 2011).

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Genetische Variabilität

Die Aufklärung der genetischen Ursachen der phänotypischen Unterschiede zwischen Individuen ist das Aufgabenfeld der Genetik und im Speziellen der Humangenetik (Schafer & Hawkins, 1998). Durch die Entwicklung zahlreicher Techniken ist es möglich, die verschiedensten Typen von genetischen Variationen zu erfassen und genotypische Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen zu beschreiben. Die Bandbreite bekannter interindividueller Unterschiede im Genom ist sowohl in Bezug auf ihre verschiedenen Formen als auch auf ihre Anzahl sehr groß. Sie reicht von numerischen Chromosomenaberrationen über großen strukturellen Umbauten wie Translokationen oder Inversionen über CNVs (Copy Number Variation = Kopienzahlvariante), die von einer Kilobase (kb) bis hin zu mehreren Megabasen (Mb) groß sein können, bis hin zu SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms = Ein-Basen-Polymorphismen), die nur einzelne Basen betreffen (Feuk et al., 2006). Die Herausforderung für die biomedizinische Forschung besteht dabei in der Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp, also u.a. ob und wie diese Variationen im Genom die Expression und Funktion der Gene beeinflussen (Henrichsen et al., 2009). All diese genetischen Variationen tragen neben weiteren Faktoren (z.B. Umweltfaktoren; epigenetische Faktoren) zur phänotypischen Variabilität im Menschen bei. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf vollständig penetrante Kopienzahlvarianten, die zur Ausbildung einer Entwicklungsverzögerung (DD= Developmental delay) / Intelligenzminderung (ID= Intellectual Disability) führen. Daher treten die Kopienzahlvarianten in den nächsten Kapiteln stark in den Vordergrund.

2.2. Kopienzahlvarianten (CNVs)

Als Kopienzahlvariante (CNV = Copy Number Variation) bezeichnet man ein DNA-Segment, das zwischen 1 kb und mehreren Mb groß sein kann und bei verschiedenen Individuen einer Spezies in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegt. Ein CNV kann mit einer verringerten (heterozygote oder homozygote Deletion) oder einer vermehrten Kopienzahl (Duplikation, Triplikation usw.) vorliegen (Stankiewicz & Lupski, 2010). CNVs führen im Falle der Autosomen zu einer Abweichung vom i. d. R. disomen Normalzustand. Schätzungen ergaben, dass CNVs ca. 13% des menschlichen Genoms betreffen (Stankiewicz & Lupski, 2010). In der Datenbank für genomische Varianten (Database of Genomic Variants= DGV) sind 66741 CNVs aus 42 Studien an Kontrollpersonen, aufgeführt (Stand Nov. 2010). Mit steigender Auflösung der Detektionstechniken und der zunehmenden Anzahl der Studien wächst die Zahl der gefundenen CNVs weiterhin beständig. CNVs können sowohl von den

Eltern vererbt werden, als auch spontan, also *de novo*, entstehen. Ihr Einfluss auf den Phänotyp hängt vermutlich von ihrer Größe und dem Geninhalt ab (Kaminsky et al., 2011), wobei letztendlich nicht die Gesamtzahl der betroffenen Gene bzw. regulatorischen Elemente entscheidend ist, sondern die Anzahl und Art der kopienzahl-sensitiven Gene. Bei geschätzten 1000 CNVs pro Person (Conrad et al., 2010), die heterogen über das ganze Genom verteilt sind, ähnelt die Suche nach dem einen pathogenen CNV der Suche nach der Nadel im Heuhaufen (Veltman, 2007). Gerade die Seltenheit der so genannten "privaten" Mutationen, die nur wenige Patienten betreffen, erschwert die Interpretation der Daten.

2.3. Mechanismen der CNV-Entstehung

Zur Zeit sind drei verschiedene Mechanismen der CNV-Entstehung bekannt: die Nicht-alleleische homologe Rekombination (NAHR), die Nicht-Homologe End-Verbindung (NHEJ= Non Homologous End Joining) und FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching) (Gu et al., 2008). Bei einer NAHR können sich "low copy repeats" (LCRs) mit einer mindestens 97%igen Sequenzidentität und einem maximalen Abstand von 10 Mb während der Meiose bzw. Mitose aneinander lagern und zu einem ungleichen "crossing over" führen (Stankiewicz & Lupski, 2002; Gu et al., 2008). Die NAHR ist meist für das Auftreten von rekurrenten CNVs, also von CNVs mit identischen Bruchpunkten verantwortlich (Abb. 1 a). NHEJ und FoSTes sind für das Auftreten von nicht-rekurrenten CNVs verantwortlich (Abb. 1b).

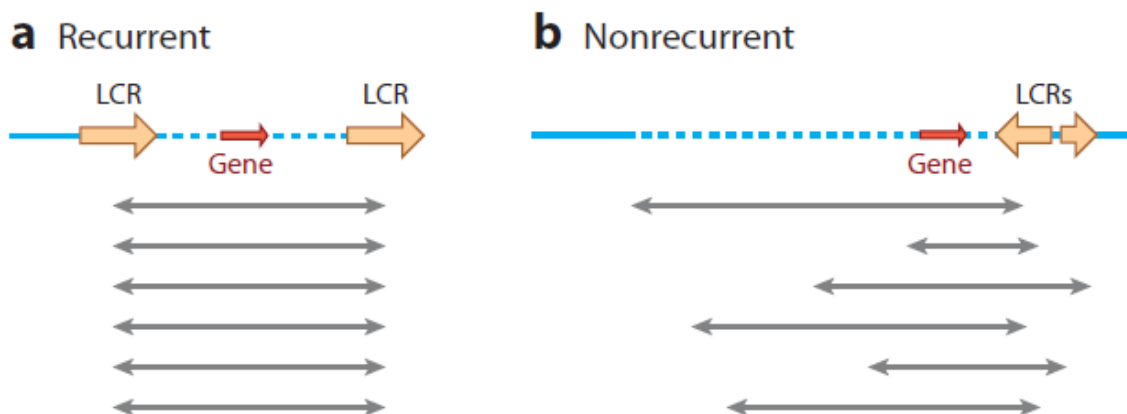


Abb. 1. Unterschied zwischen (a) rekurrenten und (b) nicht-rekurrenten CNVs. Rekurrente CNVs entstehen meist durch NAHR zwischen LCRs (orange Pfeile) und haben gleiche Bruchpunkte. Nicht-rekurrente CNVs entstehen meistens durch NHEJ oder FoSTes und haben unterschiedliche Bruchpunkte. Blaue Linie: chromosomale DNA. Die blaue gestrichelte Linie zeigt einen von CNVs (graue Pfeile) betroffenen Bereich an. Der rote Pfeil zeigt ein Gen an. Entnommen aus Stankiewicz P, Lupski JR. *Structural variation in the human genome and its role in disease*. Annu Rev Med. 2010;61:437-55.

Die NHEJ ist ein Reparaturmechanismus, der Doppelstrangbrüche in der DNA wieder ligiert. Da Doppelstrangbrüche in der DNA zufällig auftreten können, gibt es beim NHEJ im Gegensatz zur NAHR

keine festen Bruchbruchpunkte (Gu et al., 2008). FoSTeS ist ein replikationsbasierter Mechanismus der CNV-Entstehung (Lee et al., 2007). In diesem Modell der CNV-Entstehung reißt die Replikationsgabel ab, der Folgestrang löst sich vom Original-"*Template*" und bindet an eine andere Replikationsgabel in der direkten Umgebung. Voraussetzung sind Mikrohomologien von nur wenigen Basenpaaren zwischen beiden DNA-Strängen (Stankiewicz & Lupski, 2010). Alle Mechanismen der CNV-Entstehung können sowohl während der Meiose als auch während der Mitose auftreten. Ein Auftreten während der Meiose führt zu einem durchgängigen Genotyp. Die Entstehung von CNVs in somatischen Zellen führt zu einem Mosaik.

2.4. Methoden zur CNV-Detektion

Es gibt verschiedene Methoden, den menschlichen Chromosomensatz auf strukturelle Veränderungen zu untersuchen. Die Methoden unterscheiden sich stark in ihrer Auflösung und in ihrem Detektionsspektrum. So ist z.B. für die Detektion einer Trisomie 21 eine konventionelle Karyotypisierung ausreichend. Die konventionelle Karyotypisierung erfasst alle Chromosomen des menschlichen Genoms. Je nach Art der Karyotypisierung (G-, R-, Q- und T-Bänderung) erhält jedes Chromosom eine charakteristische Bänderung (Craig & Bickmore, 1993). Die konventionelle Karyotypisierung erfasst sowohl balancierte als auch unbalancierte strukturelle Aberrationen in Abhängigkeit von ihrer Größe und Lokalisation. Die Auflösung der konventionellen Karyotypisierung liegt bei ca. 3-10 Mb. Die molekulare Karyotypisierung, wie die DNA-Array-Untersuchungen auch genannt werden, wiederum erfasst nur unbalancierte strukturelle Aberrationen, diese aber mit einer höheren Auflösung. Zur molekularen Karyotypisierung gehören die Array-CGH (**C**omparative **G**enomic **H**ybridisation) und die SNP-Array-Untersuchungen. Bei der Array-CGH werden die zu untersuchende DNA und eine Kontroll-DNA unterschiedlich fluoreszierend angefärbt und anschließend an die auf einem Objektträger oder „Chip“ gebundene Ziel-DNA in Form von BACs (**B**acterial **A**rtificial **C**hromosomes) oder Oligonukleotiden hybridisiert. Während der Hybridisierung "konkurrieren" die zu untersuchende und die Kontroll-DNA um die Bindung an die Ziel-DNA. Binden gleiche Mengen von Kontroll- und zu untersuchender DNA an die Ziel-DNA, bekommt man als Ergebnis eine gleichmäßige Mischung der unterschiedlichen Färbungen, was auf eine gleiche DNA-Menge in der Kontroll- und in der zu untersuchenden DNA schließen lässt. Weist jedoch die zu untersuchende DNA für bestimmte DNA-Abschnitte mehr oder weniger Kopien als die Kontroll-DNA auf, bekommt man eine abweichende Farbmischung als Ergebnis. Es kann in Abhängigkeit von der Größe, der Anzahl und der genomischen Verteilung der im Array enthaltenen Abschnitte der Ziel-DNA eine Auflösung von bis zu 5 kb erreicht werden (Pinkel et al., 1998; Ren et al., 2005).

Eine weitere Methode der molekularen Karyotypisierung ist die SNP-Array-Technologie (siehe Kapitel 3.5). Die Auflösungsgrenzen der SNP-Arrays bewegen sich im Bereich der Array-CGH mit

Oligonukleotiden. Ein Vorteil der SNP-Arrays ist, dass neben der Erfassung von unbalancierten chromosomalen Aberrationen auch Informationen über den Genotypen generiert werden und daher neben CNVs auch uniparentale Disomien (UPD), Isodisomien und homozygote Regionen, die eventuell rezessive Mutationen enthalten, detektiert werden können.

Weitere Methoden zur Detektion von CNVs sind die qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction= quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion), die MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) und die FISH (Fluorescent In Situ Hybridisation). Diese Methoden dienen aber nicht der genomweiten Suche, sondern der gezielten Suche nach bestimmten CNVs, der Verifizierung von CNVs oder der Segregationsanalyse.

2.5. CNVs und ihre Kausalität

Die Terminologie der CNVs ist insofern unscharf, als der Begriff Variante im Ausdruck Kopienzahlvariante unter Umständen einen möglichen Einfluss auf den Phänotypen ausschließen könnte. Im Fall der CNVs beinhaltet der Begriff Variante keinerlei klinische Wertung. Die Benutzung des Begriffs Variante hat historische Gründe. Zunächst wurde versucht, z.B. über Begriffe wie Kopienzahlpolymorphismus (*copy number polymorphism = CNP*) für benigne / neutrale Veränderungen Termini mit klinischer Wertung zu etablieren. Dies erwies sich als problematisch, weil 1) definitionsgemäß die Allelfrequenz bei einem Polymorphismus größer als 1% sein muss, was bei vielen neutralen CNVs nicht der Fall ist und 2) weil derselbe CNV bezogen auf unterschiedliche Phänotypen ätiologisch relevant oder neutral sein kann. Führt das Vorliegen eines Deletions-CNVs z.B. zu einer verminderten Expression eines pharmakogenomisch relevanten Leberenzym, so wird der CNV in Bezug auf das Leberenzym als ursächlich bezeichnet werden. Bei der Erforschung der Intelligenzminderung (ID) würde der gleiche CNV jedoch als benigne eingestuft. Daher wird die klinische Wertung bezüglich eines bestimmten Phänotyps (in der vorliegenden Arbeit ausschließlich bezogen auf ID und damit assoziierte Merkmale wie Dysmorphiezeichen und Fehlbildungen) durch den Zusatz "pathogen" oder "benigne" durchgeführt (Kearney et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wird im Zusammenhang mit pathogenen CNVs auch von Mikrodeletionen bzw. Mikroduplikationen gesprochen.

Ihren Einfluss auf den Phänotyp eines Individuums können CNVs auf verschiedene Arten ausüben. Direkt oder indirekt können CNVs zu einer Veränderung der Expression oder der Funktion von Genen führen. Ist ein Gen komplett von einem CNV betroffen, verändert sich die Kopienzahl des Gens und im Falle von kopienzahl- bzw. dosissensitiven Genen gleichzeitig die Expression (Abb. 2. A) (Lupski et al., 1992; Froyen et al., 2007; Mittal et al., 2011). Ist ein Gen nur teilweise von einem CNV betroffen, führt dies zu einem Abbruch der ursprünglichen Gensequenz und abhängig vom Bruchpunkt ebenfalls

zu einem Funktionsverlust (Abb. 2. B) (Lupski & Stankiewicz, 2005). Durch CNVs können neben der veränderten Expression und der verminderten Funktion auch neue Fusionsproteine entstehen (Abb. 2. C) (Conrad et al., 2010). Dies weist auf eine eventuelle evolutionäre Funktion von CNVs hin. CNVs können aber auch indirekt über ihre Position und nicht über ihren Geninhalt Einfluss auf die Expression von Genen und somit auf den Phänotyp nehmen (Abb. 2. D) (Kleinjan & van Heyningen, 2005). Sind genomische regulatorische Elemente wie Promotoren oder Enhancer, die über eine große genomische Entfernung (~1Mb) Einfluss auf die Genexpression haben können, von einem CNV betroffen, kann dies ebenfalls einen Einfluss auf den Phänotyp eines Individuums haben (Klopocki et al., 2008; Stankiewicz & Lupski, 2010). CNVs können aber auch, im Falle einer Deletion, durch die Demaskierung einer rezessiven Mutation des verbleibenden Allels einen Einfluss auf den Phänotyp ausüben (Abb. 2. E) (Flipsen-ten Berg et al., 2007). Hat ein CNV Einfluss auf Expression und Funktion eines dosissensitiven Gens, so liegt das resultierende Genprodukt nicht mehr in der physiologisch benötigten Menge vor, was zu der Ausbildung eines Phänotyps führen kann. Wird der Phänotyp des Patienten durch die Veränderung nur eines Gens bedingt, handelt es sich um eine monogene Erkrankung, während das ätiologische Zusammenspiel von mehreren Genen innerhalb eines CNVs zu einem "*contiguous gene syndrome*" führt. Die zunehmende Beschreibung von CNVs mit unvollständiger Penetranz und von CNVs, die als Risikofaktoren eingestuft werden, deutet darauf hin, dass CNVs darüber hinaus auch eine Rolle bei komplexeren, z.B. multifaktoriellen oder oligogenen Mechanismen der Krankheitsentstehung spielen.

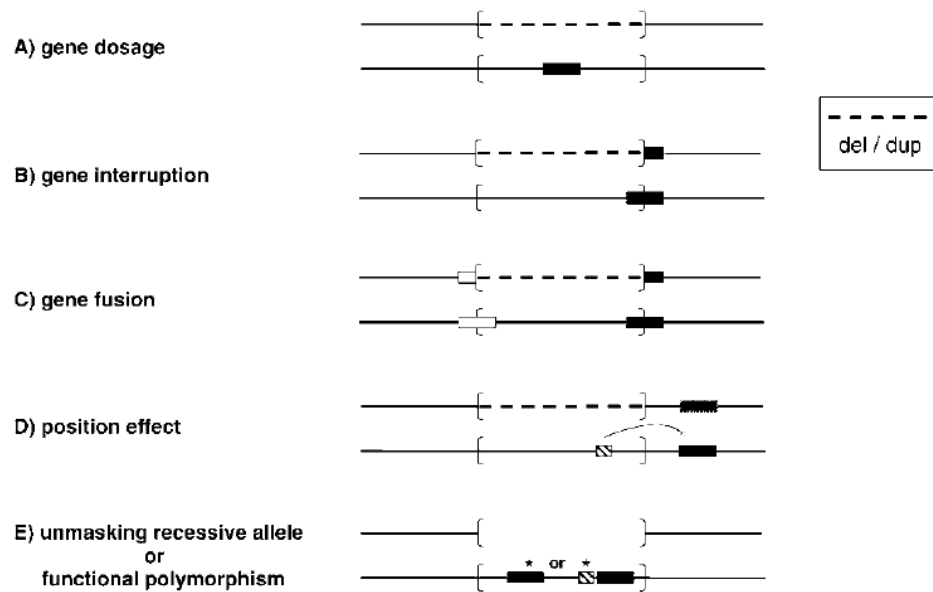


Abb. 2. Übersicht über die verschiedenen Möglichkeiten, durch die ein CNV die Expression eines Gens verändern kann. Die gestrichelte Linie repräsentiert den CNV; das schwarze Kästchen das betroffene Gen. Schraffierte Kästchen stellen regulatorische Elemente dar. Die Sternchen markieren Mutationen bzw. Polymorphismen. A) Dosis-Effekt durch die Del/Dup eines Allels. B) Disruption des Gens durch den CNV. C) Entstehung eines Fusionsgens. D) Positionseffekt E) Demaskierung eines rezessiven Allels oder eines funktionellen Polymorphismus. Entnommen aus James R. Lupski und Pawel Stankiewicz *Genomic Disorders: Molecular Mechanisms for Rearrangements and Conveyed Phenotypes*. PLoS Genet. 2005 Dec;1(6):e49.

Bisher wurden Zusammenhänge zwischen CNVs und den verschiedensten Phänotypen gezeigt. Allein eine Literatursuche in der Daten-Bank Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) zum Thema CNVs und Krebs liefert 756 Artikel. Breckpot et al. beschreiben Zusammenhänge zwischen CNVs und angeborenen Herzfehlern (Breckpot et al., 2011). Kudo et al. konnten einen Zusammenhang zwischen einer Deletion in 4p16.3 und Typ-2-Diabetes zeigen (Kudo et al., 2011). Eine 20 kb große Deletion in 5q33.1 konnte mit Morbus Crohn assoziiert werden (Prescott et al., 2010). Pelak et al. zeigten, dass sich CNVs in der sehr polymorphen Region 19q13.4 auf den Verlauf einer HIV-Infektion auswirken (Pelak et al., 2011). Des Weiteren beschreiben zahlreiche Veröffentlichungen Assoziationen von CNVs mit neurologischen oder psychiatrischen Phänotypen wie Schizophrenie (Sebat et al., 2009) oder Intelligenzminderung. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Zusammenhänge zwischen CNVs und Intelligenzminderung.

2.6. Intelligenzminderung

Die WHO definiert eine Intelligenzminderung (**Intellectual Disability = ID**) als einen Zustand von verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten. Besonders beeinträchtigt sind Fertigkeiten, die sich in der Entwicklungsperiode manifestieren und die zum Intelligenzniveau beitragen, wie Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten. Eine Intelligenzminderung kann allein oder zusammen mit jeder anderen psychischen oder körperlichen Störung auftreten (ICD-10-

WHO Version 2011). ID hat eine Prävalenz von ca. 1%-3% (Roeleveld et al., 1997; Kaufman et al., 2010; Ropers, 2010; Maulik et al., 2011). Die Inzidenz im männlichen Geschlecht ist ungefähr 30% höher als im weiblichen (Kaufman et al., 2010). In Abhängigkeit vom Intelligenzquotienten (IQ) wird der Schweregrad der ID in vier verschiedene Kategorien unterteilt (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10) Version for 2010):

- schwerste Intelligenzminderung: IQ < 20
- schwere Intelligenzminderung: IQ 21- 34
- mittelgradige Intelligenzminderung. IQ 35- 49
- leichte Intelligenzminderung: IQ 50- 69

Die Einteilung der ID basierend auf dem IQ setzt die Möglichkeit einer IQ-Messung voraus. Gerade bei sehr jungen Patienten besteht diese Möglichkeit nicht. Die neurologische Entwicklung eines kleinen Kindes wird daher am Zeitpunkt des Erreichens verschiedener Entwicklungsmeilensteine (z.B. zieht sich zum Stand hoch: typischerweise mit ca. 9 Monaten) gemessen. Liegt ein Kind beim Erreichen eines oder mehrerer Meilensteine außerhalb des Normbereiches, so spricht man von einer Entwicklungsverzögerung (Speer & Gahr, 2005). Die Erfassung des Verzögerungsgrades und des Alters, in dem die Verzögerung diagnostiziert wird, ermöglicht auch bei sehr jungen Patienten oder bei Patienten, bei denen wegen des großen Aufwandes oder der Schwere der Retardierung keine IQ-Testung durchgeführt wurde, eine Kategorisierung der ID (Zhang et al., 2005). Der Einfachheit halber verwenden viele Studien eine Einteilung der ID in eine milde (IQ 70-50; Zhang et al. Stufe 1-3) und eine schwere Form (IQ <50; Zhang et al. Stufe 4-5) (Ropers & Hamel, 2005). Im Nachfolgenden bezieht sich die Bezeichnung des Schweregrades der ID auf die Veröffentlichung von Zhang et al. (Abb. 3) (Zhang et al., 2005).

MR LEVEL	DESCRIPTION (IQ)	PHENOTYPE	
		Adult	Child
0	Normal	No MR	No MR
1	Borderline (<70)	Attends standard school for many years; requires minor/major support	Normal developmental milestones; minor retardation obvious during the first school years
2	Very mild (<65)	Attends standard school for a few years; requires major support; has simple reading, writing, and math ability	Normal developmental milestones during the first years of life; minor retardation obvious from age 2–3 years
3	Mild (<50)	Understands everything, including long sentences; has very simple reading, writing, and math ability	Developmental milestones delayed a few mo; retardation obvious from age 1–2 years
4	Moderate (<35)	Understands almost everything; makes use of small sentences and lots of signs	Developmental milestones delayed several mo; retardation obvious from age 1 year
5	Severe (<20)	Understands simple, daily sentences and single words; uses sentences of 2–3 words, and many signs; walks	Developmental milestones delayed several mo to 1 year; MR obvious before age 1 year
6	Very severe (<10)	Understands a few words; usually walks, unsteadily, if supported; has no language or only a few words	Developmental milestones delayed several years; MR obvious before age 6 mo
7	Profound	Shows minor or no response; may sit and stand unaided; walking is rare	Cannot sit unaided at age 5 years

Abb. 3. Klassifizierung der ID. Entnommen aus Zhang et al. (2005): High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. *American Journal of Human Genetics*, 76: 312-26

Während sich die Einteilung des Schweregrades nur auf den IQ eines Patienten bezieht, so wird bei der Unterscheidung zwischen syndromaler und nicht-syndromaler (isolierter) ID das gesamte klinische Bild eines Patienten in Betracht gezogen. Liegen bei Patienten neben der ID noch weitere klinische Diagnosen vor, wie zum Beispiel Fehlbildungen oder Dysmorphien, so spricht man von einer syndromalen ID (S-ID). Liegen bei einem Patienten keine weiteren klinischen Diagnosen vor, so spricht man von einer nicht-syndromalen oder isolierten ID (NS-ID) (Kaufman et al., 2010). Die Einordnung der ID als S-ID unterliegt klaren Kriterien, während eine Einordnung als NS-ID problematisch sein kann, da die ID weitere klinische Diagnosen wie z.B. neurologische Auffälligkeiten überlagern kann (Kaufman et al., 2010).

2.7. Ursachen der Intelligenzminderung

Die möglichen Ursachen für eine ID sind mannigfaltig, können aber in einer ersten groben Unterteilung in zwei Gruppen gegliedert werden. Die erste Gruppe umfasst die umweltbedingten/externen Faktoren, zu denen unter anderem zentralnervöse Schäden durch pränatale Infektionen des Embryos gezählt werden. Aber auch die vermehrte Einnahme von Alkohol durch die Mutter während der Schwangerschaft kann den Embryo schädigen. Ebenso kann es während der Geburt (perinatal) zu Komplikationen kommen, die zum Beispiel zu einem Sauerstoffmangel des Feten führen. Nach der Geburt (postnatal) können Infektionen, wie Masern oder Meningitis zu einer ID führen. Ungefähr 5-13 % der ID Fälle sind umweltbedingt bzw. durch Teratogene hervorgerufen (Curry et al., 1997).

Die zweite Gruppe umfasst die genetischen Veränderungen, die zu einer ID führen können. In einer repräsentativen und umfassenden Studie (n=670 Patienten) an einem deutschen humangenetischen

Zentrum im Jahr 2006 und damit zu Beginn einer diagnostischen Anwendung einer noch groben Array-Technologie zählten numerische Chromosomenaberrationen mit 11,3% zu den häufigsten Diagnosen (Abb. 4) (Rauch et al., 2006). Die bekannteste und häufigste (9,2%) numerische Aberration ist die Trisomie des Chromosoms 21, die dem Down-Syndrom zugrunde liegt. Konventionell sichtbare strukturelle Chromosomenaberrationen wurden in 4,7% der Patienten diagnostiziert und bekannte "phenotype first"-Mikrodeletionssyndrome in 5,3% der Patienten. Durch eine erste, noch sehr grobe genomweite molekulare Karyotypisierung sowie durch Subtelomer-Screening, eine zu dieser Zeit angewandte Methode zur Detektion submikroskopischer Aberrationen der Chromosomenenden, konnten 6,6% bzw. 1,3% der Patienten diagnostiziert werden. 4,8% der ID-Patienten wiesen eine Mutation in einem bekannten ID-Gen auf (monogen). Bisher sind Mutationen in ca. 450 Genen mit ID assoziiert. Nach Schätzungen, basierend auf der Anzahl an ID Genen auf dem X-Chromosom (90) wird mit insgesamt 1500-2000 ID-Genen gerechnet (van Bokhoven, 2011). Demnach ist zum jetzigen Zeitpunkt nur ein Bruchteil der ID-Gene identifiziert. Dies ist den Umständen geschuldet, dass die Methoden zur genomweiten Suche nach *de novo*-Mutationen oder CNVs erst seit kurzem zur Verfügung stehen und dementsprechend lange Zeit nur nach familiären genetisch bedingten ID-Formen gesucht werden konnte. Neben der schon erfolgreichen Suche nach X-chromosomalen ID-Formen konnten lange Zeit nur wenige autosomale Gene identifiziert werden. Wegen der ausgeprägten Heterogenität der ID und da nur wenige der dafür notwendigen großen Familien mit mehreren Betroffenen zur Verfügung stehen bzw. rekrutiert werden können, waren nur in wenigen Fällen systematische genomweite Analysen (Kopplungsanalysen bzw. "homozygosity mapping" im Falle der autosomal-rezessiven ID / ARID) möglich. Die erfolgreichen Identifizierungen autosomal dominanter ID-Gene erfolgte durch Kandidatengen-Sequenzierungen wie bei *SYNGAP1*, *STXBP1*, und *SHANK3* oder durch die extrem aufwändige Bruchpunktanalyse von sichtbaren Chromosomenaberrationen wie bei *CDH15* und *KIRREL3* (Kaufman et al., 2010). Erst mit Anwendung der Array-Technologie stieg die Anzahl der identifizierten ID-Gene oder Kandidatengene sprunghaft an. Je nach Untersuchungsmethodik und Probandenauswahl konnten in verschiedenen Studien in 5%-35% der untersuchten ID-Patienten mit Hilfe der Array-Technologie pathogene CNVs diagnostiziert werden (Miller et al., 2010). In ca. 60% der ID Fälle konnte zu Beginn der Anwendung der Array-Diagnostik noch keine erklärende Diagnose gestellt werden (Rauch et al., 2006). Die Aufklärungsrate wird sich mit Anwendung der Array-Technologie und dem Einzug des Next-Generation-Sequencing in die Diagnostik vergrößern.

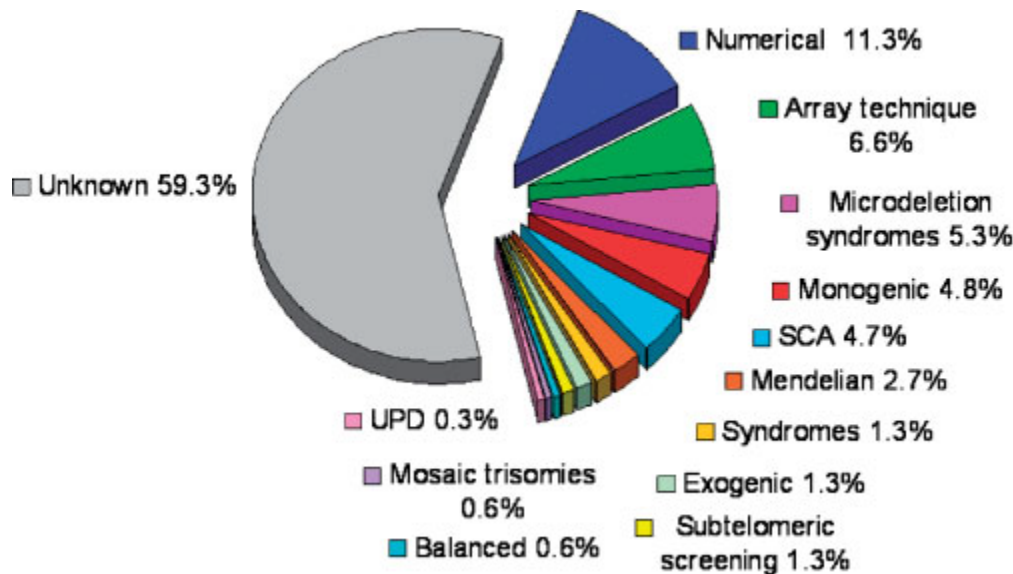


Abb. 4. Ermittelte ID-Ursachen in einer umfassenden Studie (n=670 Patienten) zu Beginn der Array-Ära. UPD: Uniparentale Disomie; SCA: segmental chromosomal aneusomies. Entnommen aus Rauch et al. *Diagnostic Yield of Various Genetic Approaches in Patients With Unexplained Developmental Delay or Mental Retardation* Am J Med Genet A. 2006 Oct 1; 140(19):2063-74

2.8. CNVs und Intelligenzminderung

Zahlreichen klinischen Syndromen, die mit einer ID einhergehen, konnten CNVs als Ursache zugeordnet werden. Zu den so genannten "klassischen" Syndromen gehören u.a. das Cri-du-chat-Syndrom (Mikrodeletion 5p15.2-p15.3), das DiGeorge-Syndrom (Mikrodeletion 22q11.2), das Williams-Beuren-Syndrom (Mikrodeletion 7q11.23), das Wolf-Hirschhorn-Syndrom (Mikrodeletion 4p16.3) oder das Smith-Magenis-Syndrom (Mikrodeletion 17p11.2). Diese Syndrome weisen oft ein wiedererkennbares Erscheinungsbild auf und werden daher als "*phenotype-first*"-Syndrome bezeichnet. Mit Zunahme der Anwendung der molekularen Karyotypisierung (Array-CGH; SNP-Array) und einer Verbesserung ihrer Auflösung konnten weitere Syndrome identifiziert werden, oft sogenannte "*genotype-first*"-Syndrome. Bei diesen wird zuerst die gemeinsame Ursache, hier i.d.R. ein CNV, erkannt; das Erscheinungsbild ist meist entweder sehr variabel oder unspezifisch. Zu diesen Mikrodeletions- und Mikroduplikationssyndromen gehören u.a. das Mikrodeletionssyndrom 2q33.1 (de Ravel et al., 2009), das Mikrodeletionssyndrom 17q21.31 (Koolen et al., 2006), Mikrodeletionen und Mikroduplikationen in 16p13.3 (Bartsch et al., 1999; Thienpont et al., 2010) sowie Mikroduplikationen in 17p11.2. 17p11.2 ist eine der bekanntesten und aufgrund seiner Genomarchitektur strukturell variabelsten Chromosomenregionen und daher ein gutes Beispiel sowohl für CNVs, die zu Mikrodeletions- und Mikroduplikationssyndromen führen, als auch für die Identifizierung von Kandidatengen über CNVs. Patienten mit Deletionen in 17p11.2 leiden am „*phenotype-first*“ Smith-Magenis-Syndrom (SMS), das erstmals 1984 von Patil und Bartley sowie 1986 von Smith et al. beschrieben wurde (Patil & Bartley, 1984; Smith et al., 1986). Die Patienten weisen

unter anderem eine ID, spezifische Verhaltensauffälligkeiten, skelettale Anomalien, eine verzögerte Sprachentwicklung sowie Schlafstörungen auf (Elsea & Girirajan, 2008). Lucas et al. analysierten 2001 die für das SMS verantwortliche Region und fanden 13 bekannte Gene sowie 14 ESTs (**Expressed Sequence Tags**) (Lucas et al., 2001). 2003 beschrieben Slager et al. Patienten mit klinischen Merkmalen des SMS, die jedoch keine Mikrodeletionen in 17p11.2 aufwiesen. In zwei dieser Patienten fanden sie eine Ein-Basen-Deletion im Gen *RAI1* (*retinoic acid induced 1*) und konnten so zeigen, dass *RAI1* für einen Großteil der phänotypischen Merkmale des SMS verantwortlich ist (Slager et al., 2003). Insgesamt haben 70%-80% der Patienten eine rekurrente, ca. 4 Mb große Deletion in 17p11.2 (Stankiewicz & Lupski, 2010), welche das Gen *RAI1* umfasst. Die restlichen Patienten besitzen größere oder kleinere Deletionen bzw. Mutationen in *RAI1* (Slager et al., 2003). Während Deletionen in 17p11.2 also zum Smith-Magenis-Syndrom führen, führen Duplikationen in 17p11.2 zum Potocki-Lupski Syndrom (PLS), das u.a. mit einer Hypotonie, Gedeihstörungen, DD / ID, sowie Merkmalen aus dem autistischen Spektrum assoziiert ist (Potocki et al., 2007). Das klinische Erscheinungsbild ist jedoch unspezifischer, so dass das Duplikationssyndrom über 20 Jahre nach dem Deletionssyndrom beschrieben wurde. Es ist wahrscheinlich, dass auch hier *RAI1* für den Phänotyp mitverantwortlich ist. Patienten mit kleineren Duplikationen ohne *RAI1* legen aber die Vermutung nahe, dass weitere Gene in die Entwicklung des Phänotyps involviert sind und es sich damit um ein "*contiguous gene syndrome*" handelt (Potocki et al., 2007).

2.9. CNVs und variable Penetranz / Expressivität

In vielen Genomregionen bedingt das Vorhandensein eines rekurrenten CNVs bei nicht verwandten Patienten einen ähnlichen bzw. vergleichbaren Phänotyp. Einige CNVs mit einer unvollständigen Penetranz bzw. variablen Expressivität zeigen aber, dass dies nicht immer der Fall ist. So weisen zum Beispiel Personen mit einer 1,6 Mb großen Mikrodeletion in 15q13.3 ein weitreichendes Spektrum an zentralnervösen Phänotypen (durchschnittlicher bis grenzwertiger IQ, ID, Autismus, Epilepsie, bipolare Störungen und Schizophrenie) auf (Ben-Shachar et al., 2009). Reziproke rekurrente Deletionen und Duplikationen in 16p13.11 sind Beispiele für CNVs mit einer unvollständigen Penetranz. Deletionen und Duplikationen in 16p13.11 können sowohl *de novo* auftreten als auch von gesunden Eltern vererbt werden. Fall-Kontroll-Studien zeigen, dass die Deletion signifikant häufiger in Patienten vorkommt und scheinen daher zumindest das Risiko für die Entwicklung einer ID zu erhöhen, während es sich bei der reziproken Duplikation um eine benigne Variante handeln könnte (Hannes et al., 2009). Wie kann es zu einer unvollständigen Penetranz kommen? Die naheliegendste Erklärung für unvollständige Penetranz bzw. variable Expressivität ist der genetische Hintergrund der Patienten. Im Fall der 15q13.3-Deletionen waren z.B. mehr Männer von einem schwereren Phänotyp betroffen, was einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des Geschlechts an der Ausprägung eines CNVs sein könnte (Ben-Shachar et al., 2009). Girirajan et al. beschreiben anhand von Patienten mit einer ebenfalls unvollständig penetranten

16p12.1-Mikrodeletion ein "2nd Hit"-Modell. In diesem Modell hängt der Schweregrad des Phänotyps von weiteren Mutationen, z.B. CNVs, im Genom der Patienten ab. Die 16p12.1-Deletion ist somit ein Risikofaktor für eine ID, aber nicht allein für deren Ausprägung ausreichend (Girirajan et al., 2010). Das TAR-Syndrom (**T**hrombocytopenia-**A**bsent **R**adius) zeigt, wie eine Kombination aus CNV und SNP zur Ausbildung der Krankheit führen kann. Deletionen in 1q21.1 wurden sowohl in Patienten mit TAR-Syndrom als auch in deren gesunden Verwandten gefunden (Klopocki et al., 2007) und sind somit für die Ausprägung des Syndroms notwendig, aber nicht ausreichend. Albers et al. konnten zeigen, dass die Kombination aus der Deletion in 1q21.1 und einem SNP in der 5'-UTR (*untranslated Region*) des nicht-deletierten Allels des Gens *RBM8A* (*RNA binding motif protein 8A*), das in der Deletionsregion 1q21.1 lokalisiert ist, zur Ausprägung des TAR-Syndroms führt (Albers et al., 2012). Weitere Möglichkeiten für eine unterschiedliche Ausprägung sind unterschiedliche Expression der entscheidenden Gene durch SNPs, Methylierung oder demaskierte rezessive Mutationen (Hannes et al., 2009).

2.10. Interpretation von CNV Daten

Die Interpretation von CNV-Daten, also die Differenzierung zwischen für einen Phänotyp kausalen und benignen CNVs, ist heute eine zentrale Aufgabe der klinischen Genetik (Altshuler et al., 2010). Anhand des *de novo*-Status, der Größe eines CNVs und seines Geninhaltes sowie der Frequenz, mit der der CNV in der allgemeinen Population vorkommt, kann eine erste Bewertung erfolgen (Morrow, 2010; Kaminsky et al., 2011). Das Ziel der Interpretation ist es, einen CNV möglichst als pathogen oder benigne und nötigenfalls als CNV unklarer klinischer Signifikanz zu kategorisieren. Auf diesem Weg durchläuft der CNV eine Entscheidungskette (Abb. 5), die verschiedene Kriterien abfragt und so eine Bewertung des CNV ermöglicht.

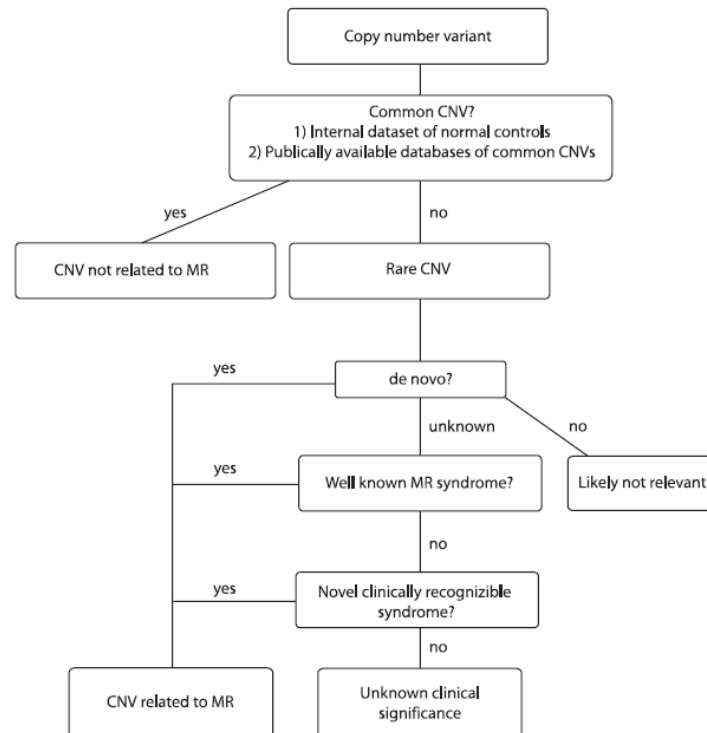


Abb. 5. Beispiel für eine Entscheidungskette für die Interpretation von CNVs. 1. Ausschluss häufiger CNVs. 2. Segregationsanalyse. 3. Genotyp-Phänotyp-Korrelation zur Bestimmung der klinischen Relevanz. MR=ID Entnommen aus Koolen et al. *Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications* Human Mutation.2009 Mar; 30(3):283-92

Dabei ist zu beachten, dass es keine generellen Regeln für die Interpretation von CNVs gibt, sondern jeder CNV gesondert bewertet werden muss (Buysse et al., 2009). Allerdings werden zurzeit evidenzbasierte Maßstäbe entwickelt, anhand derer eine Beurteilung der Pathogenität eines CNV erfolgen soll. Diese Maßstäbe teilen CNVs in fünf Kategorien ein: (1) Kein Hinweis auf Dosis-Sensitivität der Region; (2) Kein Hinweis auf Pathogenität; (3) Geringer Hinweis auf Pathogenität; (4) Beginnende Hinweise auf Pathogenität; (5) Ausreichende Hinweise auf Pathogenität. CNVs der Kategorie 5 können als gesichert pathogen beurteilt werden. Dazu müssen sie folgende Maßstäbe erfüllen: 1) Es müssen mindestens drei Mutationen / CNVs in dieser Region bei Patienten mit einem ähnlichen Phänotyp vorliegen. Zusätzlich muss noch eine der folgenden Bedingungen erfüllt sein: 2) Die Mutationen müssen in mindestens zwei unabhängigen Veröffentlichungen beschrieben werden; 3) Mutationen wurden in nur einer Veröffentlichung beschrieben, aber es liegen sekundäre unterstützende Daten vor; 4) Die Rolle der Mutation in der Allgemeinbevölkerung muss geklärt sein. Letzteres heißt, dass die Mutation entweder nicht in der Allgemeinbevölkerung beobachtet wurde, oder eine variable Expressivität des Phänotyp gut dokumentiert ist (Riggs et al., 2011). CNVs der Kategorie 4 können nicht als gesichert, aber mit einer hohen Wahrscheinlichkeit als pathogen angesehen werden. Für die Einteilung in Kategorie 4 muss eine der folgende Bedingungen erfüllt sein: 1) Es müssen mindestens zwei unabhängige Mutationen in nicht verwandten Patienten mit vergleichbarem Phänotyp beschrieben

werden; 2) Es liegen mehr als zwei unabhängige Mutationen vor, von denen aber ein Teil von gesunden Eltern vererbt wurde oder die Mutation ist im Vergleich zu Kontrollpersonen in Patienten nicht signifikant angereichert; 3) Die Mutation wurde ohne eine genauere Beschreibung des Phänotyp als klinisch signifikant beschrieben. CNVs der Kategorie 4 können als wahrscheinlich pathogen angesehen werden. CNVs der Kategorien 1-3 sind mit hoher Wahrscheinlichkeit als benigne einzustufen (Riggs et al., 2011). Diese Kriterien sind auf der einen Seite sehr hilfreich, stellen auf der anderen Seite aber ein Problem dar, da man oft eine große Anzahl von CNV-Daten sowohl von Patienten als auch von Kontrollpersonen benötigt (Kaminsky et al., 2011). Hier sind neben Publikationen weiterhin Datenbanken wie DECIPHER (**D**atabase of **C**hromosomal **I**mbalance and **P**henotype in **H**umans Using **E**nsembl **R**esources; <http://decipher.sanger.ac.uk/>) oder DGV (**D**atabase of **G**enomic **V**ariants; <http://projects.tcag.ca/variation/>) unentbehrlich. Sie beinhalten die CNV-Daten von Patienten (DECIPHER) oder Kontrollpersonen (DGV). Anhand dieser Datenbanken ist oft eine korrekte Genotyp-Phänotyp Korrelation möglich. Die Genotyp-Phänotyp Korrelation wiederum ist entscheidend für eine korrekte Interpretation eines CNVs.

Bei der Arbeit mit Datenbanken ist die Datenqualität und die Pflege der Daten entscheidend. So sollten z.B. nur die Studien in DGV zur Beurteilung herangezogen werden, deren Detektionstechniken mit einer ähnlich hohen Auflösung arbeiten wie die eigene, da es sonst zu Größenüberschätzungen der CNVs kommen kann. Ebenso sollten die verwendeten Kollektive über eine bestimmte Anzahl an Personen verfügen und der entsprechende CNV sollte mit einer bestimmten Frequenz und mehr als einmal in der Studie vorkommen. So lässt sich die Wahrscheinlichkeit verringern, dass falsch positive CNVs, CNVs von Personen mit einer ID oder CNVs, die mit einer variablen Penetranz bzw. Expressivität zu einer ID führen können, als benigne eingestuft werden (Gijsbers et al., 2011). Neben den Datenbanken wie DGV sind daher lokale Kontrollkollektive nützlich. Wurden diese mit der gleichen Technik genotypisiert wie der Patient, erlauben sie neben der Erkennung lokaler Varianten auch das Herausfiltern von technischen Artefakten und weisen eine vergleichbare Datenqualität auf.

Die evidenzbasierten Maßstäbe verdeutlichen zudem, dass der *de novo*-Status eines CNVs für eine Einstufung als "pathogen" nicht ausreicht. Es wurde lange Zeit zwar davon ausgegangen, dass ein *de novo*-CNV mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit pathogen ist (Buisse et al., 2009; Koolen et al., 2009), diese Annahme stimmt aber nur bedingt. Wie im Abschnitt CNVs und variable Penetranz/Expressivität beschrieben (Kapitel 2.9), können sich vererbte CNVs mit einer unvollständigen Penetranz im Elter und im Patienten unterschiedlich ausprägen. Ebenso können vererbte CNVs rezessive Mutationen demaskieren. Ein automatisches Aussortieren vererbter CNVs als „nicht pathogen“ ist daher unter Umständen fehlerhaft. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der *de novo*-CNVs, die keine Fehlentwicklungen bedingen, die Anzahl derjenigen *de novo*-CNVs, die ätiologisch relevante Gene betreffen, aufgrund der Neumutationsrate von 2,5 *de novo* CNVs/1000 Neugeborene übersteigt (Vermeesch et al., 2011). Ein gesichertes Urteil kann in Bezug auf eine ID daher nur für CNVs gefällt

werden, die entweder häufig in der Allgemeinbevölkerung vorkommen und daher benigne sind, oder für die eine gesicherte Genotyp-Phänotyp-Korrelation vorliegt und die daher als pathogen eingestuft werden. Für sämtliche CNVs, die in keine der beiden Kategorien fallen, kann eine Pathogenität vermutet, aber nicht bewiesen werden. Sie haben daher eine bisher unbekannte klinische Relevanz (VOUS=Variant of unknown significance) (Riggs et al., 2011), sind aber ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Forschung, weil anhand dieser CNVs neue Kandidatengene gefunden werden können.

2.11. Ziel der Forschung

Ziel der Forschung und im Speziellen dieser Arbeit war die Detektion neuer kausaler CNVs und die darauf aufbauende Identifizierung neuer ID-Kandidatengene. Dazu wurden 312 ID-Patienten mit SNP-Arrays der Firma Illumina genomweit auf CNVs untersucht. Da die erste Beschreibung eines kausalen CNVs oftmals der entscheidende Schritt zur Identifizierung von Genen ist, die auch durch andere ätiologische Mechanismen (z.B. Punktmutationen) eine häufige Krankheitsursache darstellen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Gene, die innerhalb der detektierten CNVs lagen und deren Funktion sowie Expression einen Einfluss auf die Entwicklung einer ID wahrscheinlich machen, in größeren Kollektiven von 192-330 weiteren ID-Patienten sequenziert. Die Entdeckung neuer kausaler CNVs und die daraus folgende Identifizierung neuer ID-Kandidatengene vereinfacht die zukünftige Interpretation genetischer Daten von Patienten und führt zu einem besseren Verständnis der biologischen Grundlagen des menschlichen Denkens bzw. der Pathophysiologie der Intelligenzminderung. Für die Patienten und ihre Familien steht zurzeit die Verbesserung der diagnostischen Situation und daraus resultierend eine gezieltere Betreuung im Vordergrund (Kaufman et al., 2010). Das weite Spektrum an Genen, deren veränderte Expression und Funktion eine ID-Entwicklung bedingen können, zeigt, dass die ID das Ergebnis einer Vielzahl von verschiedenartigen fehlerhaften Prozessen sein kann. Für ein endgültiges Verständnis der Entwicklung der ID und des menschlichen Denkens fehlen noch viele Informationen (Raymond & Tarpey, 2006). Daher war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit mit Hilfe von Expressionsanalysen zum einen den Einfluss von CNVs auf die Expression der betroffenen Gene, aber auch den Einfluss auf Gene außerhalb der CNVs zu analysieren und so Einblicke in Netzwerke von Genen und Proteinen zu gewinnen und daraus mögliche Entstehungsmechanismen zu erklären. Das Erkennen neuer Entstehungsmechanismen kann langfristig zu neuen Therapieformen für Krankheiten des zentralen Nervensystems führen (Kaufman et al., 2010). Schon jetzt werden die ersten Therapieformen entwickelt: So konnten McBride et al. in Drosophila-Modellen des fragilen X-Syndroms (FXS) das fehlerhafte Balzverhalten und die synaptische Plastizität durch die Zugabe von metabotropen Glutamat-Rezeptor- (mGluR) Antagonisten oder Lithium wiederherstellen (McBride et al., 2005). Seit 2011 läuft eine humane Phase II-Studie der Firma Novartis zur Therapie zentraler Verhaltensprobleme bei Patienten mit fragilem X-Syndrom (FXS) (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01253629>) durch die Inhibierung des oben genannten Rezeptors.

Ermöglicht wurden diese Studien durch die Identifizierung des für das FXS verantwortlichen Gens *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*) und seiner Rolle in der glutamatergen Neurotransmission. Die Identifizierung des Gens *CHRNA7* (*cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7*) in Patienten mit Deletionen in 15q13.3 führte zur Therapie des aggressives Verhaltens der Patienten durch die Gabe eines Acetylcholin-Esterase-Inhibitors (Cubells et al., 2011). Li et al. konnten durch die Gabe von Lavastatin, einem Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase), die Lern- und Aufmerksamkeitsdefizite bei einem Mausmodell für Neurofibromatose Typ 1 günstig beeinflussen (Li et al., 2005). Auch die weit fortgeschrittene pathophysiologische Forschung an Mausmodellen des Down-Syndroms hat erfolgsversprechende Wege zu therapeutischen Intervention eröffnet (Bartesaghi et al., 2011).

3. Material und Methoden

3.1. Geräte

Autoklav

-Varioklav® 135 S Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH

Automatischer Sequenzierer

- 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Inc.
- GeneticAnalyzer 3500, Applied Bios Biosystems, Inc.

Elektrophoresekammern

- Model B1, OWL Separation Systems Inc.

Gel-Dokumentations-System

- INTAS-UV-Systems, INTAS Science Imaging Instruments GmbH

Genotypisierungssysteme

- BeadStation 500GX System, Illumina® Inc.
- Infinium Plus Whole-Genome Genotyping Starter-Manual
Option Package, Illumina® Inc.

Nukleinsäure-Messgeräte

- NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab
Biotechnologie GmbH

Mikrowelle

-MS1987U; LG Electronics

Pipettierhilfen

- Eppendorf Research Plus 2,5 µl; 10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl;
1000 µl, Eppendorf AG
- Eppendorf Research Plus 8-Kanal 2,5 µl-10 µl; 10 µl-100 µl,
Eppendorf AG

Schüttel-, Misch- und Heizgeräte

- Thermomixer comfort, Eppendorf AG
- Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc.

Spannungsgeräte

- Electrophoresis Power Supply EPS200, Pharmacia Biotech

Thermocycler

- PTC-200, MJ Research
- ABI Prism®7900HT Fast real-Time PCR System (TaqMan), Applied Biosystems Inc.

Thermomixer

- Thermomixer comfort, Eppendorf AG

Waagen

- CPA 6235, Sartorius GmbH
- KB, Kern und Sohn GmbH

Zentrifugen

- Heraeus Megafuge 1.0, Thermo Scientific Inc.
- Galaxy Mini, Merck KGaA
- Centrifuge 5430, Eppendorf AG

3.2. Chemikalien

- Agarose D1 Low EEO, Chromatrin
- DMSO- Dimethyl sulfoxid, Sigma Aldrich
- EDTA- Ethylendiamintetraessigsäure reinst, Merck KGaA
- Essigsäure (Eisessig) 100% Merck, KGaA
- Sephadex™, G50 super fine, GE Healthcare
- Tris $\geq 99,9$ % Carl Roth GmbH+Co Kg
- Wasser PCR reagent, Sigma Aldrich

3.3. Kommerzielle Systeme (Kits)

- Expand High Fidelity PCR Systems dNTP Pack, Roche
- GC-Rich PCR Systems, dNTPack, Roche
- Infinium II Whole-Genome Genotyping Kit, Illumina Inc.
- Power SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems
- PAXgene™ Blood RNA-Systems, Qiagen n.v.
- Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, Applied Biosystems
- TaqMan® Endogenous Control Assay Human Cyc “4326316E” (Cyclophilin), Applied Biosystems
- TaqMan® Endogenous Control Assay Human β 2M “4326319E” (β -2-Mikroglobulin), Applied Biosystems
- TaqMan® Gene Expression Assay “Hs00924547_m1” (*FMR1*), Applied Biosystems
- TaqMan® Gene Expression Assay “Hs00541336_m1” (*FMR1NB*), Applied Biosystems
- TaqMan® Gene Expression Assay “Hs00171400_m1” (*AFF2/FMR2*), Applied Biosystems
- TaqMan® Gene Expression Assay “Hs00240821_m1” (*IDS*), Applied Biosystems
- TaqMan® Gene Expression Assay “Hs00231149_m1” (*MEF2C*), Applied Biosystems
- TaqMan® Gene Expression Assay “Hs00972557_m1” (*TRABD*), Applied Biosystems
- TaqMan® Gene Expression Assay “Hs00371307_m1” (*COX7B*), Applied Biosystems

3.4. Software und Datenbanken

- 3500 Data Collection Software 1.0, Applied Biosystems
- BioEdit, Ibis Biosciences
- Cartagenia Bench, Cartagenia n.v.
- Database of Genomic Variants (DGV), <http://projects.tcag.ca/variation/>
- DECIPHER, <http://decipher.sanger.ac.uk/>
- Ensembl Genome Browser, Wellcome trust SANGER Institute, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index
- GeneCard, Weizmann Institute of Science, <http://www.genecards.org/>
- GenomeStudio, Illumina Inc.
- GERP (**G**enomic **E**volutionary **R**ate **P**rofilng) (<http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html>)

- NanoDrop® ND-100 v3.3.0, PeqLab
- National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>
- PLIGU (Patienten und Laborinformationssystem für genetische Untersuchungen)
- Primer 3, <http://frodo.wi.mit.edu/>
- QuantiSNP©, University of Oxford
- SDS 2.2.2, Applied Biosystems
- Sequencing Analysis v5.4, Applied Biosystems
- UCSC Genome Browser, Center for Biomolecular Science and Engineering, University of California Santa Cruz, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index

3.5. Identifizierung von Kopienzahlveränderungen

Isolierung von DNA aus Blut

Die DNA der ID-Patienten des Bonner Kollektivs wurde aus kernhaltigen Leukozyten aus peripherem frischem Vollblut isoliert. Das Blut wurde in Monovetten abgenommen, die mit dem Antikoagulans EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) beschichtet waren. Zur DNA-Isolierung wurde die Aussalzmethode nach Miller et al. angewendet (Miller et al., 1988). Die Isolierung der DNA wurde im Rahmen diagnostischer Vorarbeiten in der Abteilung molekulargenetische Diagnostik des Instituts für Humangenetik der Universität Bonn durchgeführt.

Photometrische Konzentrations- und Reinheitsmessung (Nanodrop)

Qualität und Quantität von Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) wurden durch eine photometrische Messung (NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer)) ermittelt. Insgesamt werden 1,5 µl der zu messenden Lösung je Messung mit dem Nanodrop verwendet. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Weitere Moleküle wie Proteine, Salze oder Ethanol, die nach der Isolation der DNA/RNA in der Lösung enthalten sein können, haben ein Absorptionsmaximum von 280 nm. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes lässt sich aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm die Konzentration der Nukleinsäure bestimmen. Das OD-Verhältnis von 260 nm und 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäurelösung. Eine reine DNA-Lösung zeigt ein Verhältnis von 1,8 und eine reine RNA Lösung ein Verhältnis von 2. Eine Kontamination mit anderen Molekülen führt zu einem niedrigeren Verhältnis. Die entsprechenden Berechnungen werden mit der Software NanoDrop 1000 v.3.7.0 durchgeführt.

Molekulare Karotypisierung (Genomweite SNP-Arrays (Fa. Illumina))

Einführung in die Bead Array Technologie

Für die genomweite Suche nach Kopienzahlveränderungen im Genom der Patienten wurde die SNP-Array-Technologie der Firma Illumina verwendet. Mit Hilfe der SNP-Arrays werden in Abhängigkeit des verwendeten Arrays bis zu 1 Million SNPs je Genom genotypisiert. Daher wurden die SNP-Arrays oder (SNP-, „Chips“ ursprünglich für Assoziationsstudien benutzt. Neben dem Genotyp der SNPs liefert der SNP-Array aber auch Intensitätsdaten der Fluoreszenzsignale für jeden analysierten SNP (im Folgenden SNP-Marker). Aus der Kombination von Genotyp und Intensität wird später die Kopienzahl eines SNPs bestimmt (Kapitel QuantiSNP, S. 28).

Das Prozessieren startet mit einer gleichmäßigen Vervielfältigung der gesamten genomischen DNA (*whole genome amplification* =WGA) eines Patienten um das 1000-2000fache. Bei ursprünglich 200 ng (4 µl einer DNA-Lösung von 50ng/µl) ist das Resultat der WGA eine Gesamtmenge von ca. einem Milligramm DNA (Gunderson et al., 2006). Die amplifizierte DNA wird nach einem enzymatischen Verdau an Oligonukleotide hybridisiert, die wiederum an Kieselsäurekugeln mit 3µm Durchmesser, die sogenannten Beads, gekoppelt sind. An jedem Bead liegen ca. $0,63 \times 10^6$ identische Oligonukleotide kovalent gebunden vor. Die Oligonukleotide sind meist 80 Basen lang, wobei die ersten 50 5'-Basen zur Dekodierung dienen und die verbleibenden 30 Basen komplementär zur genomischen Zielsequenz sind (Gunderson et al., 2006). Das 3'-Ende der komplementären Sequenz des Oligonukleotids endet eine Position vor dem zu analysierenden SNP. Je nach Genotyp des SNPs wird das Oligonukleotid durch eine Ein-Basen-Verlängerung (Single-Base-Extension) (Abb. 6) unter Verwendung markierter Nukleotide um die komplementäre Base verlängert. Die markierten Nukleotide werden in einem nächsten Schritt immunohistochemisch angefärbt, wobei die Nukleotide A (Adenin) und T (Thymin) mit dem roten Flurochrom Cy5 und die Nukleotide G (Guanin) und C (Cytosin) mit dem grünen Flurochrom (Cy3) gefärbt werden (Steemers & Gunderson, 2007). Anhand der Fluoreszenzmarkierung kann so der Genotyp des SNPs erkannt werden. Die Verwendung von zwei Farben schränkt die mögliche Auswahl an SNPs ein, da nur vier von sechs SNP Gruppen verwendet werden können (A/G, T/C, A/C, und T/G) (Gunderson et al., 2006). Da laut Angaben des Herstellers nur 17% der genomweiten SNPs die verbleibenden Genotypen A/T bzw. G/C haben, fällt diese Einschränkung nicht ins Gewicht (Steemers & Gunderson, 2007). Die Genotypen der SNPs werden nach der TOP/BOT Methode benannt. Besitzt der SNP den Genotypen A/C oder A/G (TOP), wird das A als A-Allel bezeichnet und das C bzw. G als B-Allel. Dementsprechend werden bei SNPs, die den Genotypen T/C oder T/G haben (BOT), das T ebenfalls als A-Allel und G bzw. C als B-Allel bezeichnet (http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_topbot.pdf).

Die Beads mit den Oligonukleotiden sind zufällig über dem gesamten SNP-Array verteilt und werden durch den Bead-Array-Reader dekodiert. Der Dekodierungsprozess (Gunderson et al., 2004) benutzt die ersten 50 Basen des Oligonukleotids zur Erkennung des Beads.

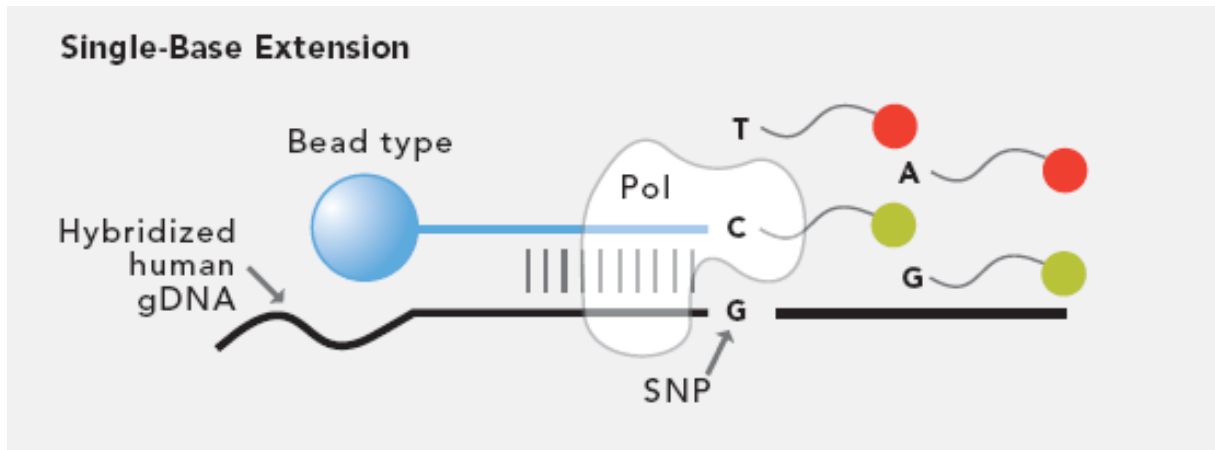


Abb. 6. Schema der Ein-Basen-Verlängerung (Single Base Extension). Die genomische DNA (gDNA) liegt an ein Oligonukleotid hybridisiert vor. Die Polymerase (Pol) verlängert das Oligonukleotid um eine Base. Die eingebaute Base (hier C) ist komplementär zum vorliegenden SNP (hier G) und wird entsprechend fluoreszierend markiert (hier grün). (<http://med.stanford.edu/advance/phase2/genotyping.html>)

Im Laufe der hier vorliegenden Arbeit wurden bedingt durch die stetige Weiterentwicklung verschiedene SNP-Arrays der Firma Illumina verwendet. Die SNP-Arrays unterscheiden sich hauptsächlich in der Anzahl der Marker und der daraus resultierenden technischen Auflösung. Je mehr Marker über das ganze Genom verteilt sind, desto geringer wird der durchschnittliche genomische Abstand zwischen zwei Markern. Da die Aussagekraft eines einzelnen Markers in Bezug auf seine Kopienzahl nur sehr gering ist, wurden nur CNVs mit 5 konsekutiven Markern ausgewertet. Die technische Auflösung ist das Produkt aus der Anzahl der ausgewerteten konsekutiven Marker und deren durchschnittlichem genomischen Abstand (Tab. 1). Der mittlere genomische Abstand zweier Marker auf dem HumanHap 550 SNP-Array betrug 5,3 kb. Daraus resultiert eine durchschnittliche technische Auflösung von 26,5 kb (5x 5,3 kb). Für den HumanOmni1-Quad SNP-Array betrug der durchschnittliche genomische Abstand 2,4 kb. Daraus ergibt sich eine technische Auflösung von 12 kb (5x 2,4 kb).

	HH550 (HumanHap 550)	H610Q (Human610- Quad)	H660W (Human660W- Quad)	HumanOmni1M- Quad
Anzahl Marker pro Patient	561.466	620.901	657.336	1.140.419
Patienten pro Array	1	4	4	4
Anzahl der Marker mit <10 kb Abstand zu einem RefSeq Gen	252.793	309.978	332.756	618.959
Nicht-Synonyme SNPs	7.107	7.577	10.051	32.11
Mittlerer Abstand zwischen zwei Markern (in kb)	5,3	4,7	4,4	2,4
Median des Abstandes zwischen zwei Markern (in kb)	2,9	2,7	2,3	1,2
Durchschnittliche technische Auflösung (5 konsekutive Marker) (in kb)	26,5	23,5	22	12

Tab. 1. Technische Details der verschiedenen während der Arbeit verwendeten SNP-Arrays. Die Kombination aus HumanHap 550 + HumanCNV-12 ergab die gleiche technische Auflösung wie der H610Q SNP-Array.

Prozessieren der Bead Chips

Das Prozessieren wurde entsprechend dem von der Firma Illumina bereitgestellten Protokoll durchgeführt.

In silico Analyse der Array Daten

Der Scan des SNP-Arrays liefert die Rohdaten, auf deren Basis die weitere Auswertung stattfindet. Die Software Genome Studio (Illumina) berechnet aus diesen Rohdaten mehrere Werte, die sowohl Aussagen über jeden Marker als auch über die Gesamtqualität des Arrays machen. Die sogenannte *Call Rate* gibt z.B. prozentual die Anzahl der Marker wieder, die während des Scanvorgangs erkannt wurden. Für eine gute CNV-Auswertung darf die *Call Rate* nicht unter 97% liegen.

Für die weitere CNV-Analyse sind zwei markerspezifische Werte von besonderer Bedeutung. Die B-Allel-Frequenz (BAF) trifft eine Aussage über den Genotypen eines jeden SNP-Markers. Abhängig von dem beim Patienten vorliegenden SNP-Genotyp wird während der Single-Base-Extension an jedes Bead-Oligonukleotid entweder ein rot (Cy5) oder ein grün (Cy3) fluoreszenzmarkiertes Nukleotid eingebaut. Fluoresziert ein Bead bzw. die daran gekoppelten, nun unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide hauptsächlich grün, so liegt ein homozygoter Genotyp B/B und eine BAF um 1 vor. Wird eine hauptsächlich grüne Fluoreszenz detektiert, so liegt ebenfalls ein homozygoter Genotyp (A/A) vor, aber eine BAF von ungefähr 0. Liegt der SNP-Marker heterozygot vor, so erkennt der Scanner eine Mischfarbe, der Genotyp ist heterozygot (A/B) und der Marker hat eine BAF von 0,5.

Die BAF kann eine erste Auskunft über eine mögliche Kopienzahlveränderung geben. Liegt eine heterozygote Deletion vor (Abb. 7), so ist nur noch ein Allel vorhanden und die BAF des Markers (1 oder 0) entspricht einer Homozygotie. Bei einer Duplikation (3 Kopien) (Abb. 8) gibt es mehrere mögliche Kombinationen. Die beiden möglichen homozygoten Zustände (BBB bzw. AAA) führen weiterhin zu einer BAF von 0 oder 1. Die anderen beiden Möglichkeiten entsprechen den Genotypen BBA und AAB, die zu einer BAF von 0,66 bzw. 0,33 führen. Einige Marker auf den SNP-Arrays bilden bezüglich der BAF eine Ausnahme. Diese sogenannten "*intensity only*"-Marker geben keine Information über die BAF bzw. die Aussage über die BAF darf nicht beachtet werden. "*Intensity only*"-Marker sind Oligonukleotide, die keinen SNP betreffen. Daher wird ihre BAF immer als homozygot angezeigt. Über die B-Allel Frequenz alleine kann keine klare Aussage über eine möglicherweise vorhandene Kopienzahlveränderung getroffen werden, da zum Beispiel ein homozygoter DNA-Abschnitt anhand der BAF nicht von einer Deletion unterschieden werden kann.

Daher bedarf es bei der Auswertung eines zweiten Wertes, das sogenannten logR Ratio, das eine Auskunft über die Intensität, mit der ein Marker fluoresziert, gibt. Das logR Ratio eines Markers entsteht durch die Verrechnung der Intensitätswerte des analysierten Arrays mit der erwarteten Intensität, die aus den Intensitäten einer zuvor analysierten Kontrollgruppe errechnet wurde: $\log_2 R \text{ ratio} = [\log_2(R_{\text{subject}}/R_{\text{expected}})]$. Entspricht die Intensität eines Markers der zu erwarteten Intensität, so ergibt sich $\log_2 x = 0$. Liegt also bei Patient und Kontrollgruppe die gleiche Kopienzahl vor, schwankt der Wert des Markers um 0. Ist die Intensität beim Patienten im Vergleich zu der erwarteten Intensität geringer,

so liegt der Wert unter 0. Ist die Intensität größer, liegt der Wert über 0. Ein weiteres Qualitätsmerkmal eines Arrays ist die Standardabweichung des logR Ratio aller Marker. Sie sollte nicht über 0,3 liegen.

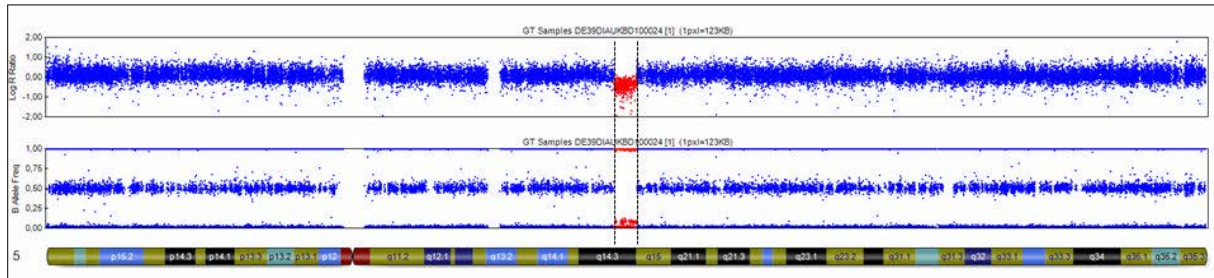


Abb. 7. Beispiel für die Darstellung einer Deletion in der Genome Studio-Software. Im oberen Teil ist das logR Ratio dargestellt, im unteren Teil die BAF (B-Allel-Frequenz). Jeder blaue und rote Punkt repräsentiert einen Marker. Hier dargestellt sind alle Marker des Chromosoms 5 eines Patienten. Die roten Marker (begrenzt durch die gestrichelte Linie) befinden sich innerhalb einer Deletion. Das logR Ratio der roten Marker ist im Vergleich zu den restlichen Markern deutlich herabgesetzt. Die BAF zeigt, dass innerhalb der Deletion nur homozygote Marker vorliegen.

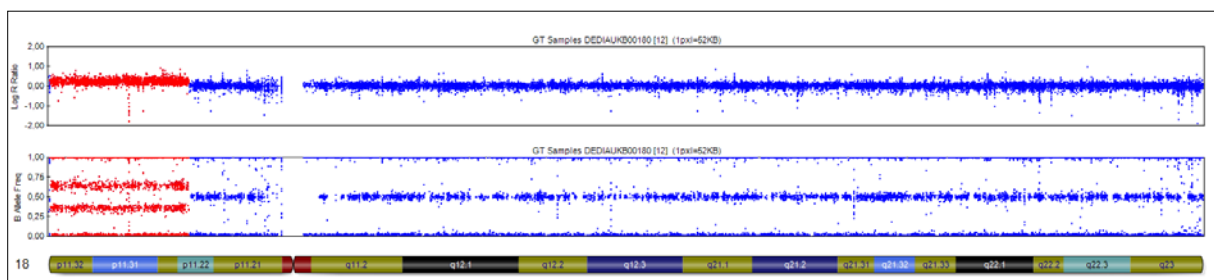


Abb. 8. Beispiel für die Darstellung einer Duplikation in der Genome Studio-Software (oberer Teil: das logR Ratio, unterer Teil: BAF (B-Allel-Frequenz)). Jeder blaue und rote Punkt markiert einen Marker. Dargestellt sind alle Marker des Chromosoms 18 eines Patienten. Die roten Marker befinden sich innerhalb einer Duplikation. Die logR Ratio der roten Marker ist im Vergleich zu den restlichen Markern deutlich heraufgesetzt. Die BAF innerhalb der Duplikation zeigt die vier verschiedenen möglichen Genotypen BBB, BBA, BAA und AAA.

QuantiSNP

QuantiSNP ist ein an der Universität Oxford und am Wellcome Trust Centre for Human Genetics entwickelter Algorithmus, der mit einem Hidden-Markov-Modell anhand der B-Allel-Frequenz und der logR Ratio eine systematische Suche nach CNVs ermöglicht (Colella et al., 2007). QuantiSNP errechnet für jeden erkannten CNV ein Wahrscheinlichkeitsmaß, den logBayes-Faktor. Je höher der logBayes-Faktor ist, desto wahrscheinlicher ist die putative Kopienzahlveränderung echt, d.h. kein technisches Artefakt. Je geringer der logBayes-Faktor ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein falsch positiver CNV ermittelt wurde. Der logBayes-Faktor wird durch die Anzahl der SNPs in einem putativen CNV, die gesamte Abweichung aller SNPs in einem putativen CNV des logR Ratio von 0 und von den erwarteten B-Allel Frequenzen beeinflusst. Die Entwickler des Programmes schlagen einen logBayes-

Faktor von 30 als Schwellenwert vor. Das bedeutet, dass mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit alle CNVs über einem logBayes von 30 ein wirkliches CNV Ereignis sind. In dieser Arbeit wurde ein niedrigerer Schwellenwert von sieben festgelegt, um die Falsch-Negativ-Rate weiter zu verringern. Dies erhöht die Anzahl der zu verifizierenden CNVs und der falsch positiven Treffer.

3.6. Filterkriterien für die CNV-Analyse

Ziel der CNV-Analyse in dieser Arbeit ist die Identifizierung potentiell pathogener CNVs, die aufgrund der Kopienzahlveränderung selbst mit sehr hoher oder vollständiger Penetranz zur Ausprägung einer ID führen. Zu anderen Mechanismen, die z. B. auf der Kombination verschiedener CNVs oder mit anderen genetischen oder nicht-genetischen Faktoren / reduzierter Penetranz oder der Demaskierung rezessiver Allele durch Deletionen beruhen, kann keine Aussage getroffen werden. Da aus Kosten- und Effizienzgründen nicht alle identifizierten CNVs durch qPCR verifiziert werden können, bedarf es mehrerer Filterschritte (Abb. 9), die das Aussortieren solcher CNVs zum Ziel hat, die nach heutigem Wissensstand bezüglich ID höchstwahrscheinlich benigne oder neutral sind.

Die ersten vier Filterschritte sind technischer Natur und nicht auf die eigentliche ätiologische Relevanz bezogen. Sie sollen sowohl CNVs, die höchstwahrscheinlich falsch positiv sind, als auch CNVs, deren Verifizierung per qPCR nicht möglich ist, aussortieren. Die Filterschritte 5-7 dienen einer ersten Beurteilung der CNVs bezüglich ihrer ätiologischen Relevanz. Die verschiedenen Filterschritte wurden zunächst manuell durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurde dazu die halbautomatische Software CartageniaBench (Cartagenia n.v.) verwendet.

1. Längenfilter

Der erste Filterschritt betrifft die Länge der CNVs. In dieser Arbeit wurden in der ersten Analysegruppe für die SNP-Arrays der Versionen HH550, HH550+CNV12, H610Q und H660W alle CNVs ab einer Länge von 20kb in die weitere Auswertung mit aufgenommen. In der zweiten Analysegruppe wurden für den HumanOmni1M-Quad SNP-Array alle CNVs ab einer Länge von 80kb ausgewertet. CNVs decken das gesamte Größenspektrum von 1kb bis mehrere Megabasen ab (Buysse et al., 2009). 95% aller detektierten CNVs sind kleiner als 100kb und die durchschnittliche Größe eines benignen/neutralen CNVs ist 200kb (Miller et al., 2010). CNVs mit einer Länge von z.B. 10-50kb sind zwar aus wissenschaftlicher Sicht interessant, aber werden in der klinischen Diagnostik meistens aussortiert (Pinto et al., 2011). Da die meisten CNVs also unter 100kb groß, aber gleichzeitig auch höchstwahrscheinlich benigne sind, muss für die klinische Diagnostik daher eine Balance zwischen dem diagnostischen Nutzen und den Kosten der Verifizierung bestehen. Da die zweite Analysegruppe mehr

im Fokus der klinischen Diagnostik stand, wurden daher nur CNVs mit einer Größe >80kb untersucht. Dies liegt weit unter den Vorgaben der "S2-Leitlinie Humangenetische Diagnostik" (2011), die eine minimale Auflösung von 500kb vorschreibt und eine Auflösung von 200kb empfiehlt.

2. Anzahl der Marker

Die Aussagekraft eines einzelnen Markers ist sehr gering. Daher wurden basierend auf Erfahrungswerten in die weitere Auswertung nur CNVs aufgenommen, die mindestens 5 konsekutive Marker enthielten. So wurde sichergestellt, dass bei einem höheren Signal-Stör-Verhältnis (signal-to-noise ratio) eine möglichst große Anzahl an CNVs echte CNV-Ereignisse waren.

3. logBayes Faktor

Die CNV-Analyse-Software QuantiSNP errechnet basierend auf der logR Ratio, der B-Allel-Frequenz und der Anzahl der Marker ein Maß für die Wahrscheinlichkeit eines echt positiven CNV Ereignisses (QuantiSNP, S. 28). Die Grenze für diesen logBayes-Faktor lag in dieser Arbeit bei 7. Alle CNVs mit einem logBayes Faktor < 7 wurden als höchstwahrscheinlich falsch-positive putative CNVs nicht weiter ausgewertet.

4. Ausschluss von Segmentalen Duplikation und konstitutivem Heterochromatin

Segmentale Duplikationen verhindern den Entwurf von spezifischen Primerpaaren (PCR, S. 33), die nur einmal im Genom binden und damit in der qPCR eine sinnvolle Aussage zur Kopienzahl der analysierten Chromosomenregion ermöglichen. Daher können CNVs, die komplett von segmentalen Duplikationen überlagert werden, nicht durch qPCR verifiziert werden. Die kurzen sich wiederholenden DNA-Sequenzen im konstitutiven Heterochromatin verhindern ebenfalls eine einzelne Bindung von Primern. Daher können auch diese Regionen nicht durch eine qPCR verifiziert werden. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, dass in konstitutivem Heterochromatin keine transkribierten Gene vorliegen und dass Gene, die in segmentalen Duplikationen lokalisiert sind, nicht kopienzahlsensitiv sind.

5. Ausschluss von häufigen benignen CNVs anhand der Database of Genomic Variants / DGV-Filter

Wurde der entsprechende CNV in der Database of Genomic Variants (DGV) (<http://projects.tcag.ca/variation/>) in drei unabhängigen Studien mit einer Frequenz von mindestens 3% in Kontrollpopulationen gefunden, so wurde er von einer weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Dabei wurde möglichst darauf geachtet, dass in den Studien mit Detektionstechniken gearbeitet wurde, die der Auflösung der hier verwendeten SNP-Arrays entsprachen. So können Fehler durch eine Größenüberschätzung der CNVs in den DGV-Studien verhindert werden. Diese Größenüberschätzung ist besonders für CNVs bekannt, die durch Array-CGH mit BAC-Arrays erfasst wurden. So zeigten Perry et al., dass die Größe von über 75% der von ihnen nachuntersuchten CNVs durch BAC-aCGH um die Hälfte überschätzt wurden (Perry et al., 2008).

6. Eigene Kontrollkollektive

Neben der Database für Genomic Variants wurden in dieser Arbeit auch drei lokale Kontrollkollektive verwendet. Da die Kontrollkollektive mit den in dieser Arbeit verwendeten SNP-Arrays analysiert wurden, konnten so array-spezifische Artefakte aus der Analyse entfernt werden. Des Weiteren bestanden die Kontrollkollektive zum größten Teil aus deutschen Personen. So konnten auch lokale häufige Varianten, die eventuell nicht in DGV eingetragen sind, von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Das erste Kontrollkollektiv bestand aus 80 Patienten mit FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis), die auf einem H660W SNP-Array typisiert wurden. Das zweite bestand aus 131 Bildgebungskontrollpersonen, die keine Anzeichen einer ID aufwiesen und mit dem H610Q SNP-Array genotypisiert wurden. Das dritte bestand aus 531 Kontrollpersonen aus dem Heinz-Nixdorf-Recall-Kontrollkollektiv, die mit dem HumanOmni1M-Quad SNP-Array analysiert wurden. In allen Kollektiven wurde vorausgesetzt, dass keine oder extrem wenige ID-Patienten Teil des Kollektivs waren. Jeder CNV, der mit einer Frequenz von 0,5% in diesen Kontrollkollektiven vorkam, wurde als häufig und bezüglich der Fragestellung höchstwahrscheinlich neutral von einer weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

7. Geninhalt

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung hoch penetranter CNVs und potentieller Kandidatengene. Daher wurden nur CNVs in die Analyse einbezogen, die mindestens ein proteinkodierendes Gen ganz oder teilweise enthielten. Diese Einschränkung ist auch aus Effizienzgründen notwendig und entspricht der üblichen Vorgehensweise und den internationalen Leitlinien bei diagnostischen Fragestellungen (Kearney et al., 2011). Somit wird die Detektion von CNVs, die ausschließlich nicht-kodierende, regulatorische Sequenzen betreffen, aus Effizienzgründen teilweise vernachlässigt. Intronisch lokalisierte CNVs wurden durch die Filterkriterien jedoch nicht automatisch aussortiert. Ungefähr 14%

der bekannten ursächlichen Punktmutationen in der Human Genome Mutation Database (www.hgmd.org/) sind in der nicht-kodierenden Sequenz lokalisiert, davon 11% intronisch und 3% in regulatorischen, Promoter-, und UTR-Sequenzen etc. (Cooper et al., 2010). Andererseits wurden CNVs, welche keine kodierende Sequenz, sondern ausschließlich regulatorische Elemente betreffen, bisher praktisch nur in Fällen mit spezifischem klinischem Verdacht und bekannten ursächlichen Genen durch gezielte Untersuchung als z.T. häufige Krankheitsursache identifiziert, z.B. für die Gene *SOX9* (Pierre Robin-Sequenz / Cooks-Syndrom), *SHOX* (Kleinwuchs), *H19/IGF2* (Silver-Russell-Syndrom, Kleinwuchs) und *PMP22* (Charcot–Marie–Tooth) (Weterman et al., 2010; Gronskov et al., 2011; Klopocki & Mundlos, 2011). Weitere betroffene Gene sind u.a. *HOXD*, *IHH*, *SHH*, *BMP2*, *PLP1* und *DAX1* (Klopocki & Mundlos, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden auch CNVs, die intronische, ausschließlich nicht-kodierende Sequenz enthielten, als "genhaltig" definiert und somit nicht aus der Analyse ausgeschlossen.

8. Verifizierung der CNVs und klinische Interpretation

8.1 Quantitative PCR / qPCR

Die qPCR mit SYBR Green I (qPCR mit SYBR Green I, S. 34) ermöglicht gleichzeitig die Verifizierung der CNVs und eine Segregationsanalyse. Der zu untersuchenden chromosomale Abschnitt wurde dazu sowohl im Patienten als auch in den Eltern durch qPCR untersucht. Lag der Abschnitt beim Patienten im Vergleich zu den Eltern in veränderter Kopienzahl vor, war dies ein Hinweis auf eine *de novo*-Entstehung.

8.2 Literatur und Datenbankabgleich

Der *de novo*-Status alleine gibt noch keine Auskunft über die Pathogenität eines CNVs (Vermeesch et al., 2011). Ein Abgleich mit der Literatur und Datenbanken, die sowohl genetische als auch klinische Informationen über Patienten enthalten, ermöglicht eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation, die die Entscheidung über die Pathogenität eines CNVs erleichtern.

Dazu werden zurzeit evidenzbasierte Maßstäbe entwickelt, anhand derer eine Einteilung von CNVs in pathogen, VOUS (variants of unknown significance = Varianten unbekannter Signifikanz) und benigne/neutral erfolgen kann. Die evidenzbasierten Maßstäbe geben vor, wie viele weitere Patienten mit einem vergleichbaren Phänotypen und einem Genotypen vorliegen müssen, damit der CNV als pathogen eingestuft werden kann (Interpretation von CNV Daten, S. 15).

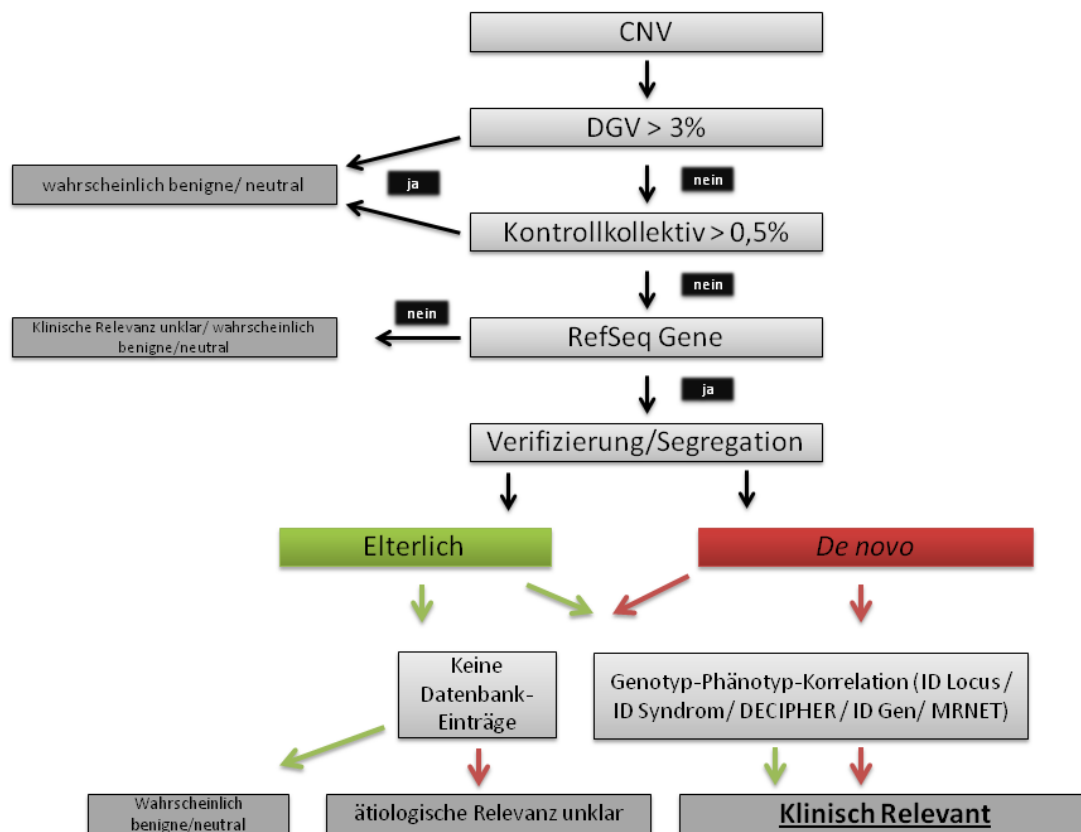


Abb. 9. In dieser Arbeit verwendete Entscheidungskette für die CNV-Analyse. Helle Kästchen beschreiben die Filterkriterien. Schwarze Kästchen (ja/nein) zeigen die Entscheidung. Dunkelgraue Kästchen zeigen die endgültige Einteilung. Grüne Pfeile beschreiben den Entscheidungsweg für seltene elterliche CNVs. Rote Pfeile beschreiben den Entscheidungsweg für *de novo* entstandene CNVs.

3.7. Verifizierung der Kopienzahlveränderungen und Segregationsanalyse

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die quantitative PCR (qPCR) mit SYBR Green I basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Die von Mullis und Faloona 1987 eingeführte Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR=Polymerase Chain Reaction) (Mullis & Faloona, 1987) (Abb. 10) ermöglicht die Amplifizierung von einzelnen bzw. wenigen DNA Abschnitten.

Hierzu benötigt man eine DNA-Sequenz als Ausgangsmatrize (Template), sowie ein Oligonukleotid (Primer), das komplementär zum 5'-Ende als auch ein Oligonukleotid, das komplementär zum 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz ist. Eine thermosensitive DNA-Polymerase verlängert die an die DNA gebundenen Primer und bildet so einen komplementären Strang. Durch Wiederholungszyklen, die auch eine Denaturierung und Renaturierung beinhalten (s.u.), wird die Vervielfältigung der Zielsequenz

erreicht. Die PCR ist die Grundlage der quantitativen PCR (qPCR) sowie für weitere in dieser Arbeit benutzte Techniken wie zum Beispiel der Expressionsanalysen und der Sanger-Sequenzierung (Expressionsanalyse, S. 38; Sanger-Sequenzierung, S. 43).

Vom Ablauf her ist die PCR in mehrere Schritte unterteilt:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C
2. Renaturierung bei 45°C-65°C. Dabei lagern sich die Primer an die DNA an. Die Renaturierungstemperatur hängt von der Beschaffenheit und damit der Schmelztemperatur der Primer ab.
3. Elongation. Je nach verwendetem Enzym unterscheidet sich die Temperatur.
4. Wiederholung der Schritte 1-3 25x-30x.

Geht man von einem einzelnen DNA-Abschnitt als Ausgangsmaterial aus, liegen nach 25-30 Wiederholungen über 4 Milliarden DNA-Abschnitte vor.

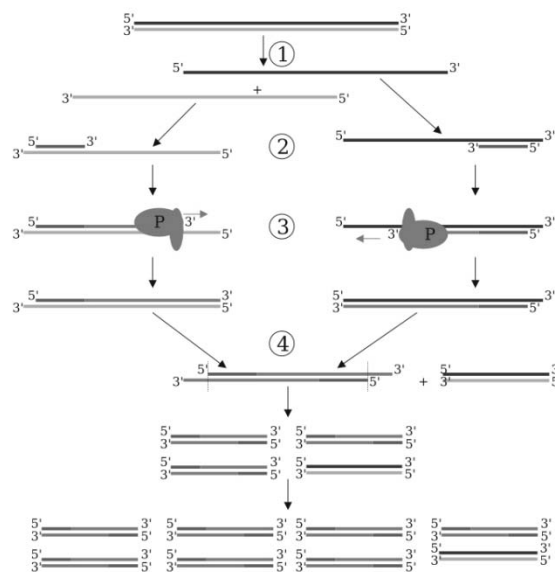


Abb. 10. Schematische Darstellung einer Polymerasen-Ketten-Reaktion. 1) Denaturierung. 2) Renaturierung. 3) Elongation durch die DNA-Polymerase 4) Wiederholung der Schritte 1-3. http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/186/Pcr_wiki_copy.jpg

quantitative PCR (qPCR) mit SYBR Green I

Zur Verifizierung der putativen CNVs und zur Überprüfung ihrer Segregation (maternal, paternal oder *de novo*) wurde eine qPCR mit SYBR Green I sowohl bei den Patienten als auch bei den Eltern durchgeführt. Der prinzipielle Ablauf gleicht der normalen PCR (s.o.). Um das Ziel einer Quantifizierung zu erreichen, wird die Methode jedoch teilweise abgewandelt. Ein wichtiger Unterschied ist die Zugabe von SYBR Green I zum Reaktionsgemisch, um die Menge der vorhandenen DNA messen zu können. SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Durch die Interaktion zwischen SYBR Green und der DNA erhöht sich die Fluoreszenz. Da sich mit jedem Zyklus die Anzahl der doppelsträngigen DNA-Moleküle erhöht, erhöht sich im gleichen Maße die detektierbare Fluoreszenz (Applied Biosystems, Application Note: Real-Time PCR: Understanding C_T). Zu bedenken ist jedoch, dass SYBR Green unspezifisch in jede doppelsträngige DNA interkaliert. Finden sich in der PCR also unspezifische DNA-Nebenprodukte, wie zum Beispiel Primer-Dimere, führt dies zu einer Verfälschung der Ergebnisse. Daher ist es wichtig, die Primer so zu entwerfen, dass sie nur in der Zielregion binden und keine Primer-Dimere bilden können. Zur Überprüfung der Spezifität der Ergebnisse wird am Ende jeder PCR eine Schmelzkurve errechnet (Abb. 11). Dazu wird die Temperatur erhöht, bis die DNA an einem spezifischen Schmelzpunkt schmilzt und SYBR Green I freigesetzt wird. Die dadurch entstehenden Fluoreszenzunterschiede werden gemessen. In Abhängigkeit von der Größe des DNA-Abschnittes und seines GC-Gehalts unterscheiden sich die Schmelztemperaturen verschiedener DNA-Abschnitte. Anhand der Schmelzkurven kann analysiert werden, wie lang das amplifizierte DNA-Produkt ist und wie viele verschiedene DNA-Produkte in der Reaktion entstanden sind. Befinden sich unspezifische Nebenprodukte in der Reaktion, so erkennt man dies am Vorliegen von zusätzlichen Fluoreszenzspitzen in der Schmelzkurve.

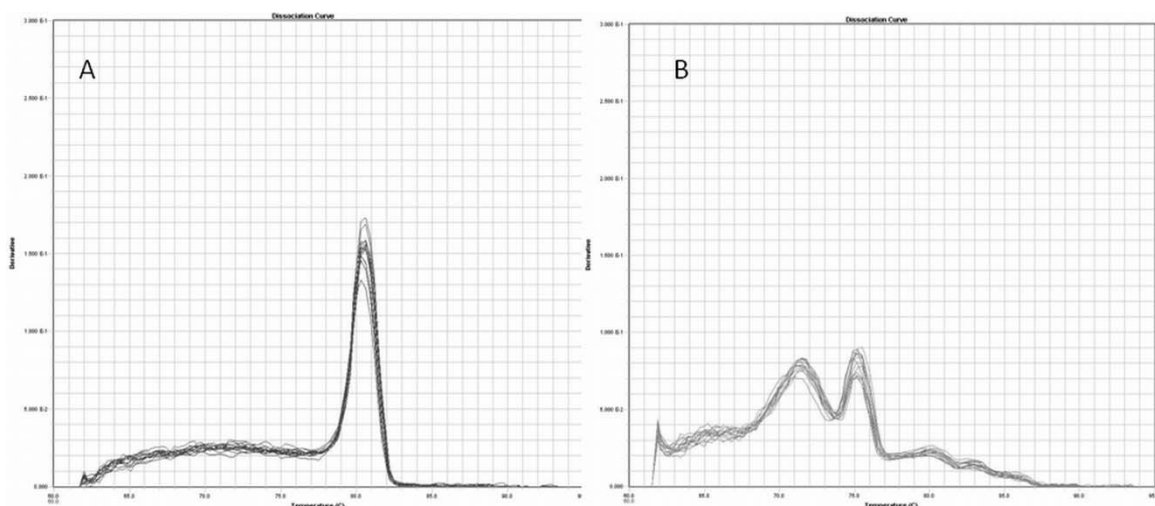


Abb. 11. Beispiel für die Schmelzkurve von PCR-Produkten. A) Spezifisches Produkt. Die Schmelzkurve hat nur einen Spitze bei ca. 80,5°C. B) Unspezifische PCR-Produkte. Die Schmelzkurve hat mehrere Spitzen /"Peaks". Die hier resultierenden C_T -Werte können für eine Analyse nicht verwendet werden

Durchgeführt und analysiert wurden die Reaktionen in einem ABI Prism®7900HT Fast Real-Time PCR System (TaqMan). Dieses misst die vorhandene Fluoreszenz nach jedem Zyklus und bildet den C_T -Wert (Cycle Threshold). Der Cycle Threshold ist der Zyklus bzw. Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenzzunahme

die exponentielle Phase erreicht und sich von der Hintergrundfluoreszenz absetzt. Der Ct-Wert wird anhand von einem Schwellenwert, der für alle Proben gleich ist, automatisch ermittelt (Abb. 12).

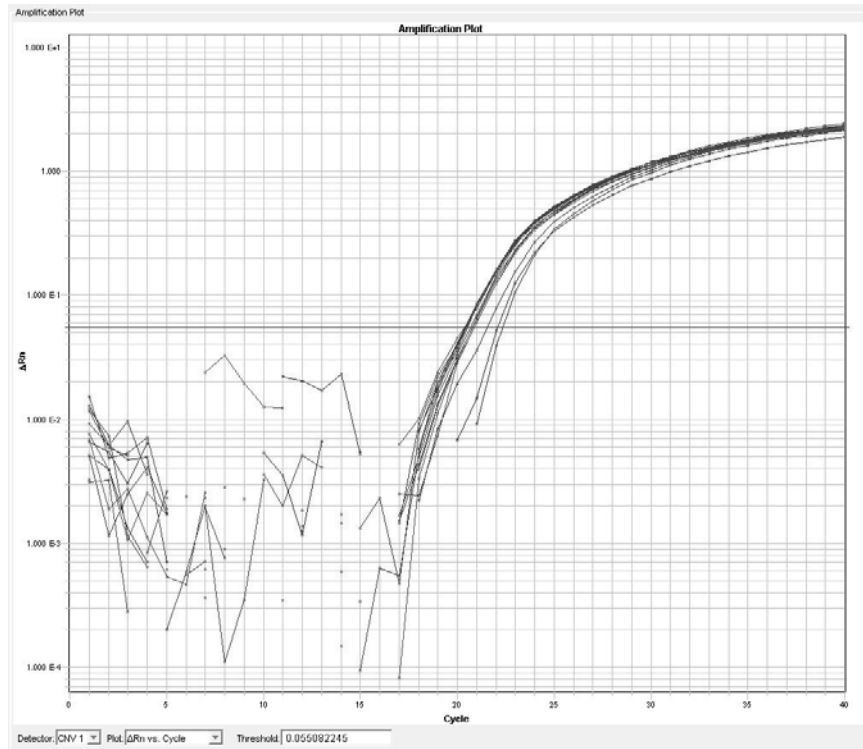


Abb. 12. Ermittlung des Ct-Wertes. Ergebnis der gleichen Reaktion in 5 verschiedenen Personen in Triplikaten. X-Achse: Zyklus. Y-Achse: ΔRn normalisierte Fluoreszenz. Der Punkt, an dem die Fluoreszenz (blaue Linien) der verschiedenen Reaktionen den Schwellenwert (rote Linie) kreuzt, ergibt den Ct-Wert für die jeweilige Reaktion. Gemessene Werte unterhalb der Schwelle sind Hintergrundfluoreszenz oder von Hintergrundfluoreszenz nicht unterscheidbar.

Auswertung $\Delta\Delta Ct$ -Methode

Ausgewertet wurden die Daten mit Hilfe der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Bei jeder Art von qPCR ist genaues Arbeiten essentiell, da schon geringe Konzentrationsunterschiede zwischen Patienten-DNA und der DNA von Kontrollpersonen zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können. Trotz genauem Arbeiten sind jedoch Pipettierfehler und Konzentrationsunterschiede nicht ganz zu vermeiden. Daher werden zur Kalibrierung der Ergebnisse endogene Kontrollen (HKGs=House Keeper Genes) benutzt. Diese internen Kontrollen sollten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in zwei Kopien im Genom vorliegen. In der $\Delta\Delta Ct$ Methode wird daher der Ct-Wert der internen Kontrolle vom Ct Wert der Zielsequenz subtrahiert. ($\Delta Ct = Ct_Z - Ct_{HKG}$). Dies dient der Normalisierung der Ergebnisse. Während dieser Arbeit wurden *BNCL1* (*basonuclin 1*), *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) und *RPP38* (*ribonuclease P/MRP 38kDa subunit*) als interne Kontrollen benutzt. Jeder Messwert wurde gegen alle drei internen Kontrollen normalisiert.

Der ΔCt -Wert ist für eine Aussage über die Kopienzahl eines DNA Abschnittes ohne Bezug zu einem Vergleichswert noch nicht ausreichend. Daher wird der ΔCt -Wert des Patienten (ΔCt_P) mit dem ΔCt -Wert mindestens einer phänotypisch unauffälligen Person (Referenz, ΔCt_R) verrechnet ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_P - \Delta\text{Ct}_R$).

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ergibt die Anzahl an DNA-Zielabschnitten in der qPCR nach Normalisierung mit einer endogenen Kontrolle und im Verhältnis zu einer Referenz.

Die Multiplikation $2 * 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ergibt die relative Kopienzahl des gesuchten DNA-Abschnittes im Genom des Patienten im Verhältnis zu einer phänotypisch unauffälligen Person. Es ist überaus wichtig, dass die so ermittelte Kopienzahl relativ und nicht absolut ist. Haben sowohl Patient als auch Referenz drei Kopien eines DNA-Abschnittes, ergibt sich mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode die relative Kopienzahl 2. Um möglicherweise daraus resultierende Fehler zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit mit insgesamt 4 Kontrollpersonen verglichen.

Durchführung:

Reaktionsansatz 10 μl :

- 5 μl SYBR Green Master Mix
- 2 μl DNA 10 ng/ μl
- 0,8 μl Primer Mix (50 pmol / μl je Primer)
- 2,2 μl H₂O

qPCR Protokoll :

1. 50°C 2 min.
2. 95°C 10 min.
3. 95°C 15 sek.
4. 60°C 1 min.
5. Schritte 3 und 4: 40 Wiederholungen

Primer Design

Alle in der Arbeit verwendeten Primer (qPCR und Sequenzieren) wurden mit der Software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Rozen & Skaletsky, 2000) entworfen. Dabei wurden folgende Spezifikationen verwendet (Tab. 2).

	Minimum	Optimum	Maximum
PCR Produktgröße (bp)	120		150
Länge der Primer (b)	18	20	27
Schmelztemperatur (°C)	57	60	61
GC-Gehalt (%)	20	40	60

Tab. 2. Übersicht der Primer 3-Spezifikationen zur Ermittlung von geeigneten Primer-Paaren.

Alle weiteren Spezifikationen des Programms wurden nicht verändert. Alle Primer wurden mithilfe des UCSC Genome Browsers auf eventuelle Sequenzgleichheiten mit DNA Abschnitten außerhalb der Zielregion verglichen und bekannte SNPs in der Primersequenz hin untersucht.

3.8. Folgeuntersuchungen

3.8.1. Expressionsanalysen aus Vollblut

Isolierung von RNA aus Lymphozyten

Wie stark oder wie schwach ein Gen in einem Gewebe exprimiert ist, wird über die darin vorhandene Menge an mRNA ermittelt. Bei Expressionsanalysen ist zu beachten, dass die Ergebnisse nur für das entsprechende Gewebe, aus dem die RNA gewonnen wurde, aussagekräftig sind. Dazu wurde den Patienten und den Kontrollpersonen peripheres Blut abgenommen und aus den daraus isolierten Lymphozyten RNA gewonnen. Die Gewinnung der RNA aus Blut wurde mit Hilfe des PAXgene™ Blood RNA-Systems durchgeführt. Die zu dem System gehörenden PAXgene™ Blood RNA-Tubes, die jeweils bis zu 2,5ml Blut aufnehmen können, enthalten eine Lösung, die auf einer patentierten RNA-Stabilisierungs-Technologie basiert. Laut Hersteller verhindert die Lösung den Abbau der RNA durch RNAsen und damit eine Veränderung der mRNA-Mengen nach der Blutentnahme. Die RNA wurde anschließend mit Hilfe des PAXgene™ Blood RNA-Systems isoliert. Das System basiert auf der Verwendung der Silica-Technologie. In Gegenwart hoher chaotroper Salzkonzentrationen binden hierbei Nukleinsäuren an eine Silica-Membran. Vor der Eluierung der RNA finden mehrere Waschschritte statt, bei denen unerwünschte Substanzen und Zellkomponenten entfernt werden. Das PAXgene™ Blood RNA-System verwendet eine spezielle Silica-Gel-Membran, die ein spezifisches Binden von RNA an die Membran ermöglicht. DNA, die in späteren Experimenten stören würde, wird

dagegen nahezu vollständig eluiert. Die restliche DNA wird in einem anschließenden DNase-I-Verdau hydrolysiert. Die im Reaktionsansatz verbliebenen Enzyme werden anschließend durch Hitze inaktiviert. Das gesamte Protokoll wurde gemäß den Angaben des Herstellers in der Life and Brain GmbH (Plattform Genomics) von Nadine Kluck und Stefanie Heilmann durchgeführt.

RT-PCR

Für die quantitative PCR, mit der die Mengen der gesuchten mRNA bestimmt werden, muss ein DNA-Template vorliegen. Hierzu wird die RNA mit einer reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben. Als Primer werden für die RT-PCR Oligo(dT) Primer verwendet. Diese binden an den 3' Poly(A) Abschnitt, der Beginn der meisten eukaryotischen mRNAs.

Durchführung:

- Jede Lösung kurz vortexen und abzentrifugieren.
- Folgendes in einem 1,5ml Reaktionsgefäß kombinieren:
 - bis zu 5µg RNA
 - 1µl 50µM Oligo(dT)₂₀ Primer
 - 1µl 10mM dNTP Mix
 - mit DEPEC-H₂O auf 10µl Gesamtvolumen auffüllen
- Bei 65°C für 5 min. inkubieren und dann 1 min. auf Eis stehen lassen.
- Herstellung des cDNA-Synthese-Mix durch die Zugabe folgender Komponenten in der angegebenen Reihenfolge
 - 2µl 10x RT Puffer
 - 4µl 25 mM MgCl₂
 - 2µl 0.1 M DTT
 - 1µl RNase OUTTM (40U/µl)
 - 1µl SuperScriptTM III RT (200 U/µl)
- 10µl cDNA-Synthese-Mix zu jedem RNA-Primer-Gemisch hinzugeben, kurz mischen, kurz abzentrifugieren und bei 50°C für 50 min. inkubieren.
- Reaktion bei 85°C für 5 min. beenden.
- Kurz abzentrifugieren und nach Zugabe von 1 µl RNaseH die Reaktion für 20 min. bei 37°C inkubieren
- Reaktion auf Eis stellen oder bei -20°C lagern.

Relative qPCR von cDNA

Im Gegensatz zur quantitativen PCR zur Bestimmung der Kopienzahl mittels SYBR Green wurde bei der Bestimmung der Expression mit vorgefertigten TaqMan-Sonden gearbeitet (Tab. 3). Diese Detektionsmethode ist spezifischer, da diese spezifisch bindenden Sonden sich nicht wie SYBR Green auch in Nebenprodukte einlagern können. Die TaqMan-Sonden sind so hergestellt, dass sie Exon-Exon Grenzen überlagern. Die flankierenden Primer binden damit zwangsläufig in unterschiedlichen Exons. So wird verhindert, dass die Sonden an genomische DNA binden.

Die genspezifischen TaqMan-Sonden besitzen an ihrem 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (meist VIC oder FAM) und an ihr 3'-Ende ist ein sogenannter Quencher (MGB=Minor Groove Binder) gekoppelt. Für die Detektion ist das Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Prinzip (Abb. 13) entscheidend. Der Reporter wird durch das Licht des TaqMan angeregt und emittiert daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge. So lange aber Reporter und Quencher benachbart sind, absorbiert der Quencher das Licht des Reporters. Im Verlauf der PCR verlängert die DNA-Polymerase die Primer. Sobald sie an die hybridisierte Sonde gelangt, zerstückelt sie diese durch ihre 5'-3' Exonuklease-Eigenschaft (Hydrolyse der Sonde). Dabei löst sich der Reporter von der Sonde und ist somit nicht mehr in unmittelbarer Nähe des Quenchers, der dadurch das emittierte Licht nicht mehr absorbieren kann. So gelangen nach jedem PCR-Zyklus mehr freie Reporter-Moleküle in die Reaktionsflüssigkeit und nach jedem Zyklus wird stärkere Fluoreszenz gemessen. Um eine Bindung der Sonde während der Renaturierung zu gewährleisten, ist die Schmelztemperatur der Sonde um 10°C höher als die der Primer. Ein weiterer Unterschied und Vorteil gegenüber der SYBR Green-Methode ist die Möglichkeit, Duplex-Reaktionen durchzuführen.

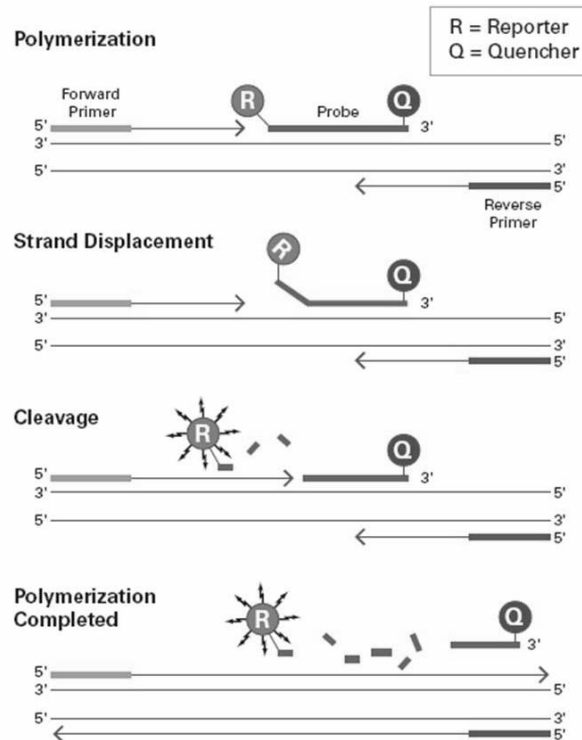


Abb. 13. Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer / FRET-Prinzips. Entnommen aus Applied Biosystems TaqMan Universal PCR Master Mix Protokoll

Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Reportern ist es in einer Duplex-Reaktionen möglich, die Expression zweier verschiedener Gene simultan in einer Reaktion zu analysieren. So kann man neben dem Zielgen zur Normalisierung gleichzeitig eine endogene Kontrolle analysieren. Für eine optimale Normalisierung sollten als interne Kontrollen solche Gene ausgewählt werden, die sowohl in den Referenzpersonen als auch in den Patienten möglichst gleich exprimiert werden. In den Experimenten wurden *β -2-Mikroglobulin* und *Cyclophilin* als endogene Kontrollen verwendet. Jede Reaktion wurde als Triplikat durchgeführt. Die Standardabweichung innerhalb eines Triplikates durfte dabei nicht über 0,2 liegen, um statistisch valide Ct Werte zu gewährleisten.

Durchführung der TaqMan-qPCR:

Reaktionsansatz

- 0,5 μ l TaqMan® Gene Expression Assay
- 0,5 μ l Endogene Kontrolle
- 5 μ l TaqMan® Gene Expression Master Mix
- 2 μ l cDNA
- 2 μ l H₂O

qPCR Protokoll:

1. 50°C 2 min
 2. 95°C 10 min
 3. 95°C 15 sek
 4. 60°C 1 min
- Schritte 3.-4.: 40 Wiederholungen

Verwendete TaqMan® Gene Expression Assay

Projekt	Gen	Assay
Xq27.3-q28	<i>FMR1</i>	Hs00924547_m1
Xq27.3-q28	<i>FMR1NB</i>	Hs00541336_m1
Xq27.3-q28	<i>AFF2/FMR2</i>	Hs00171400_m1
Xq27.3-q28	<i>IDS</i>	Hs00240821_m1
5q14.3	<i>MEF2C</i>	Hs00231149_m1
5q14.3	<i>TRABD</i>	Hs00972557_m1
5q14.3	<i>COX7B</i>	Hs00371307_m1

Tab. 3. Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten *TaqMan® Gene Expression Assay*

Die Durchführbarkeit von Expressionsstudien hängt von einer ausreichenden Expression der Gene im untersuchten Gewebe ab. Daher wurde vor Beginn der Expressionsstudien die Expression der Gene im Blut einer Kontrollperson untersucht. Idealerweise sollten die gemessenen Ct Werte in der qPCR unter 32 liegen, da sie sonst nicht gut von der Hintergrundstrahlung zu unterscheiden sind. Dazu wurden in die RT-PCR unterschiedliche Mengen (250 ng und 1000 ng) RNA eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass die Expression von *FMR1NB* im Blut zu schwach war. Wurden 250ng RNA in die RT-PCR eingesetzt, konnte durch Taqman-qPCR kein Ct-Wert ermittelt werden. Wurden 1000ng RNA in die RT-PCR eingesetzt, lag der Ct Wert bei 35,9. Daher wurde die Expression von *FMR1NB* im Folgenden nicht weiter untersucht. Für die restlichen Gene wurden in den weiteren Versuchen jeweils 801,6 ng RNA eingesetzt. Die Menge ergab sich aus den vorhandenen Mengen RNA und der zu erwartenden Anzahl der Experimente.

Auswertung der relativen qPCR

Die Expression der verschiedenen Zielgene wurde mit den endogenen Referenzgenen *Cyclophilin* und β -2-Mikroglobulin normalisiert. Dazu wurden die Mittelwerte über alle Ct-Werte beider endogener Kontrollen gebildet. Der Ct-Wert der entsprechenden endogenen Kontrolle eines Reaktionsansatzes wurde durch diesen Mittelwert geteilt, um einen Angleichfaktor zu erhalten. Die Angleichfaktoren von

Cyclophilin und β -2-Mikroglobulin jedes Reaktionsansatzes wurden abermals zu einem Mittelwert verrechnet. Zur Normalisierung der Expressionswerte eines Zielgens wurde der Ct-Wert des untersuchten Gens durch den gemittelten Angleichfaktor aus *Cyclophilin* und β -2-Mikroglobulin geteilt. Aus dem so normalisierten Ct-Wert des untersuchten Gens wurde durch die Verrechnung $1/2^{Ct}$ die ursprüngliche Transkriptmenge errechnet. Durch die Multiplikation mit dem arbiträren Faktor 100.000.000 wurde eine sinnvolle Dimension erreicht. Die Ergebnisse der Patienten wurden mit den Ergebnissen von gesunden Kontrollpersonen verglichen. Für das Projekt Xq27.3-q28 wurden fünf weibliche gesunde Kontrollpersonen verwendet und für das 5q14.3-Projekt fünf weibliche und fünf männliche Kontrollen. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen Wilcoxon-Test errechnet. Ein Wilcoxon-Test für abhängige Gruppen ist ein nichtparametrischer Test zur Überprüfung, ob die zentrale Tendenz von zwei verbundenen Stichproben signifikant unterschiedlich ist. Die abhängige Variable muss dabei nicht normalverteilt sein, sollte aber mindestens ordinalskaliert sein. Beim Wilcoxon-Test (Wilcoxon, 1945) handelt es sich um einen Rangtest. Die Berechnung der Teststatistik basiert auf der Bildung einer Rangreihe aus Paardifferenzen. Die Paardifferenzen ergeben sich daraus, dass es sich um verbundene Stichproben handelt und so jedem Wert aus der ersten Messung der entsprechende Wert aus der zweiten Messung zugeordnet werden kann. (<http://www.methodenberatung.uzh.ch/datenanalyse/unterschiede/zentral/wilcoxon.html>). p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Jedes Experiment wurde zweimal wiederholt.

3.8.2. Sanger-Sequenzierung

Die Suche nach Mutationen in Kandidatengenen in Patientenkollektiven bzw. die Untersuchung des verbleibenden Allels eines Kandidatengens bei Patienten, die eine Mikrodeletion tragen, wurde durch Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Der Prozess der Sequenzierung besteht aus mehreren Schritten. Als erstes wird der gewünschte genomische DNA-Abschnitt amplifiziert (Two-Step-PCR, S. 44). Diese Reaktion wird anschließend aufgereinigt, wobei die genomische DNA und die Primer komplett verdaut werden (Exo-SAP-Verdau, S. 46). Die aufgereinigte amplifizierte DNA wird anschließend als Template für die eigentliche Sequenzierreaktion genutzt (Cycle Sequencing, S. 47). Das Cycle Sequencing Produkt wird ebenfalls erneut aufgereinigt (Sephadex-Aufreinigung, S. 48), so dass am Ende nur noch die Cycle Sequencing-Produkte vorliegen.

Two-Step-PCR

Die Two-Step-PCR ist eine Abwandlung der herkömmlichen PCR (PCR, S. 33). Sie besteht aus zwei verschiedenen Zyklen mit jeweils unterschiedlichen Renaturierungstemperaturen.

Die erste Renaturierung findet bei einer relativ hohen Temperatur statt, so dass die Primer sich sehr spezifisch anlagern. Die zweite Renaturierung findet bei einer relativ niedrigen Temperatur statt, so dass die Primer sich auch unspezifischer anlagern können. In der zweiten PCR ist jedoch die Primerkonzentration höher, wodurch die Anzahl der Produkte erhöht wird. Da aber nach dem ersten PCR-Schritt in der Reaktionslösung der gewünschte DNA Abschnitt bei weitem überwiegt, können die zusätzlich resultierenden unspezifischen Produkte vernachlässigt werden. Durch diese Kombination wird erreicht, dass Produkt in ausreichender Menge und mit ausreichender Spezifität hergestellt wird.

Material:

- ReadyMix (enthält Polymerase, Puffer, dNTPS) (SIGMA)
- Primer (vorwärts und rückwärts)
- H₂O (PCR Reagent, SIGMA)

Durchführung:

Ansatz:

- 3 µl DNA (20ng/µl)
- 1 µl Primer 10pmol/µl (vorwärts)
- 1 µl Primer 10pmol/µl (rückwärts)
- 12,5 µl Ready Mix (Sigma-Aldrich)
- 7,5 µl H₂O (PCR Reagent, SIGMA)
- Gesamtvolumen 25µl

PCR-Programm:

1. 94° 4.00 min
2. 95° 0.45 min
3. 60° 0.45 min
4. 72° 1.00 min
5. 2.-4. 14x
6. 95° 0.45 min
7. 55° 0.45 min

8. 72° 1.00 min
9. Schritte 6.-8. 20x wiederholen
10. 72° 7.00 min
- 10° ∞

Gelelektrophorese

Inwiefern während der TwoStep-PCR der gewünschte Genomabschnitt amplifiziert wurde, lässt sich anhand einer Gelelektrophorese überprüfen. Das Rückgrat von DNA und RNA enthält unter anderem Phosphatreste, die eine negative Gesamtladung der Nukleinsäuren bedingen. Zur Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen verschiedener Größen wird über ein Agarosegel, auf das die DNA bzw. RNA aufgetragen wird, ein elektrisches Feld gegeben, so dass die DNA- bzw. RNA-Moleküle zur Anode wandern. Durch den Siebeffekt der Agarose findet eine Auftrennung der Moleküle nach der Größe statt. Die DNA bzw. RNA kann z.B. durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid durch Fluoreszenz unter UV-Licht nachgewiesen werden.

Material:

- Agarose
- 50x TAE (5l)
 - 1210 g TRIS
 - 93,06 g EDTA
 - 285,5 ml Essigsäure
 - add 5l H₂O
- Ethidiumbromidlösung
 - 5 ml 1%ige Ethidiumbromidlösung
 - 600 ml TAE
- DNA Marker Fermentas GeneRuler™ 1 kb DNA ladder
- Horizontale Gelelektrophorese Kammer

Durchführung:

Eine 1% Agarose Lösung mit 1x TAE wurde aufgekocht. Zum Polymerisieren wurde die Lösung in eine Form mit passendem Kamm gegeben. Das gehärtete Gel wurde dann in eine mit 1x TAE Puffer gefüllte Kammer gegeben und Proben und ein Längenmarker aufgetragen, indem sie in die nach Entfernen des Kamms entstandenen Löcher an einem Ende des Gels pipettiert wurden. Zum Auftrennen wurde eine

Spannung von ca. 100 V angelegt. Nach ca. 20 Min. wurde das Gel für 15 Min. in eine (10mg/ml) Ethidiumbromidlösung gelegt und danach unter UV-Licht fotografiert.

Exonuklease (Exo) - Thermo sensitive Shrimp Alcaline-Phosphatase (TSAP)

Dieser Schritt ist zur Entfernung von genomischer DNA und Primern und somit zur Vermeidung von Hintergrundsignalen in der eigentlichen Sequenzierreaktion absolut notwendig. Zur Aufreinigung der Two-Step PCR Reaktion wurde ein Exo-TSAP Verdau durchgeführt. Das Enzym TSAP (Thermo sensitive Shrimp Alcaline Phosphatase) dephosphoryliert die DNA und das Enzym Exonuklease spaltet von einer Nukleinsäure in jedem Reaktionsschritt ein Nukleinsäuremonomer ab. Die Reaktionen finden unspezifisch statt. Es werden also die genomische DNA, die Primer und das gewünschte Produkt verdaut. Da aber das gewünschte DNA-Produkt in sehr großer Menge vorliegt und die Enzymmengen und die Dauer des Verdau entsprechend dimensioniert sind, verbleibt nach dem Verdau idealerweise nur das Endprodukt der Two-Step-PCR.

Material

- Exonuklease I 20U/μl (New England Biolabs)
- TSAP 1U/μl (Promega)
- H₂O
- Two-Step-PCR Produkt

Ansatz:

- 0,075 μl Exonuklease I
- 0,06 μl TSAP
- 1,865 μl H₂O
- 8 μl Twp-Step-PCR-Produkt

Durchführung:

- 37°C 30 min (Enzyme arbeiten bei 37°C)
- 72°C 20 min (Inaktivierung der Enzyme)

Sequenzierreaktion (Cycle Sequencing)

Die von Sanger veröffentlichte Dideoxy-Methode zur Sequenzierung (Sanger et al., 1977) beruht auf einer Kettenabbruchsynthese der DNA. In der Reaktion liegen neben dem zu sequenzierenden DNA-Fragment eine Polymerase, ein spezifischer Primer und die vier Nucleotide vor, wobei ein Teil aller vier Nucleotide Dideoxynucleosidtriphosphate (ddNTPs) sind. Baut die Polymerase während der Reaktion ein ddNTP ein, führt dies wegen der fehlenden 3'-Hydroxygruppe zum Abbruch der Reaktion und es liegt ein DNA-Fragment einer bestimmter Länge mit einem ddNTP am Ende vor. Zusätzlich sind die ddNTPs markiert. In modernen Sanger-Sequenziermethoden wird zur Markierung für jedes ddNTP ein spezifischer Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Im Gegensatz zur PCR wird die Reaktion nur mit einem Primer als Ausgangspunkt für die Polymerase durchgeführt. Dies hat zur Folge, dass nur in eine "Richtung" sequenziert werden kann.

Ursprünglich wurde für jede Base bzw. jedes ddNTP eine eigene Reaktion durchgeführt und anschließend die Reaktionen in vier getrennten Spuren eines Gels der Länge nach aufgetrennt. So konnte man die Sequenz an Hand der Fragmentlängen und mit dem Wissen, welches ddNTP als letztes eingebaut wurde, ablesen. Heute wird die Sequenzierreaktion in einem Sequenziergerät, der die verschiedenen Fragmente kapillarelektrophoretisch der Länge nach auftrennt und die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe erkennt, ausgewertet. Durch die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe ist nur noch eine Sequenzierreaktion nötig.

Material:

- BigDye Cycle Sequencing Kit v1.1 (Applied Biosystems)
- aufgereinigtes PCR Produkt
- 5x Sequenzierpuffer (Applied Biosystems)
- Primer vorwärts oder rückwärts
- H₂O

Ansatz:

- 0,5 µl BigDye Cycle Sequencing v1.1
- 1,1 µl aufgereinigtes PCR Produkt
- 2 µl 5x Sequenzierpuffer
- 0,25 µl Primer (10pmol/µl)
- 6,15 µl H₂O

Durchführung:

1. 94° 5.00 min
2. 95° 0.10 min
3. 55° 0.10 min
4. 60° 4.00 min
5. Schritte 2.-3. 24x wiederholen
6. 60° 10.00 min
7. 15° 30.00 min

Aufreinigung mit SEPHADEX (separation Pharmacia dextran)

Dextrane sind hochmolekulare, verzweigte, neutrale Biopolysaccharide, die wasserlöslich sind und aufgrund ihres Siebeffekts z.B. in der hydrophilen und lipophilen Gelchromatographie eingesetzt werden. Die Firma Pharmacia vertreibt Dextrane unter dem Markennamen Sephadex (Akronym von **separation Pharmacia dextran**). Zur Aufreinigung der Sequenzierreaktion wird das Sephadex in Pulverform in Multiscreen-Platten (Millipore) vorgelegt. Durch die Zugabe von 300 µl reinem H₂O quillt das Sephadex und es entsteht eine Gelfiltrationssäule. Die Sequenzierreaktion wird auf die Gelsäule gegeben. Durch die Zentrifugalkraft, die beim anschließenden Zentrifugieren entsteht, wandert die Lösung durch die Poren des verzweigten Makromoleküls. Hierbei bleiben nur niedrigmolekulare Verunreinigungen wie Salze und Enzyme in den Poren hängen, während größere Moleküle wie DNA durch den Filter gelangen. Die Multiscreen Platten sind unten durchlässig, so dass die DNA und das Wasser aufgefangen werden können.

Durchführung:

Die mit SEPHADEX und H₂O gefüllten Platten wurden 5 min bei 2400 rpm zentrifugiert, um das überschüssige Wasser zu entfernen. Anschließend wurde die mit 10 µl H₂O verdünnte Sequenzierreaktion (Gesamtvolumen 20 µl) genau in die Mitte der Säulen pipettiert und abermals 5 min bei 2400 rpm zentrifugiert.

Vor der Analyse im Sequenziergerät werden 1,5 µl des so aufgereinigten Sequenzierproduktes in 10 µl HIDI (highly deionized)-Formamide geben.

Auswertung der Sequenzierreaktion

In dieser Arbeit wurden zur Auswertung der Sequenzierreaktion die Sequenziergeräte 3500xl Genetic Analyzer und 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) verwendet. Im Sequenziergerät werden die Proben in Kapillaren elektrophoretisch aufgetrennt und beim Durchlaufen einer Laserschranke detektiert. Durch die unterschiedlichen Floreszenzen und die genaue Auftrennung kann jeder Position eine Base zugeordnet werden.

3.8.3. Genomweite Expressionsanalysen mit dem Illumina HumanHT-12 v4 BeadChip

Einführung HumanHT-12v4BeadChip

Ziel der Expressionsanalyse ist die Quantifizierung der genomweiten RNA-Transkripte im jeweiligen Untersuchungsgewebe, welches in dieser Arbeit aus Vollblut bestand. Der HumanHT- 12 v4 BeadChip ermöglicht die Detektion und Quantifizierung von insgesamt 47.231 Transkripten. Die Detektion basiert auf der Umschreibung der RNA nach dem modifizierten Eberwine-Protokoll (Eberwine et al., 1992) (Abb. 14).

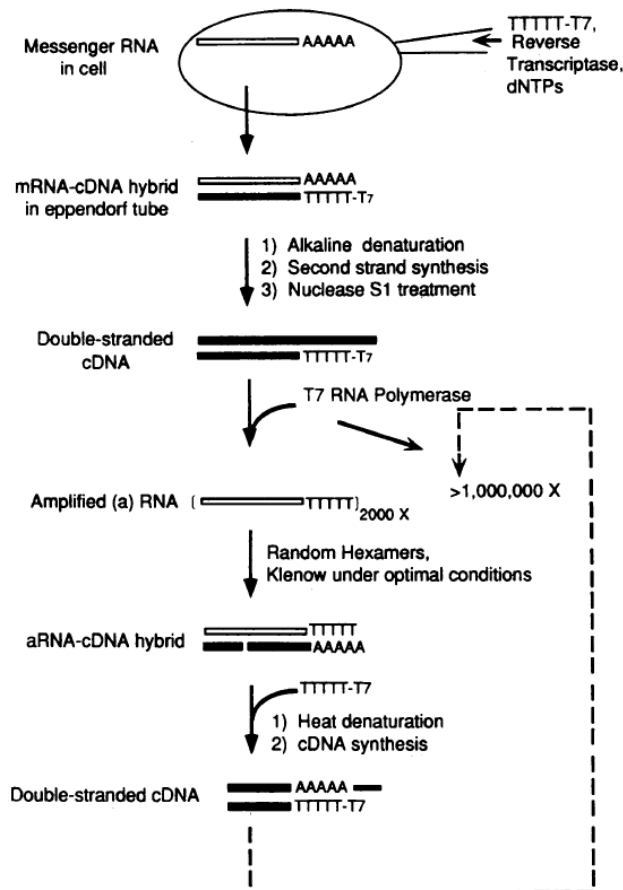


Abb. 14. Schematische Darstellung des Eberwine-Protokolls. Entnommen aus Eberwine et al. (1992) *Analysis of gene expression in single live neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 89: 3010-3014

Die mRNA wird hierbei in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wiederum wird mit Hilfe einer T7 RNA-Polymerase in eine amplifizierte (a)RNA umgewandelt. Die Amplifizierung der mRNA ergibt so ungefähr die 2000fache Menge an RNA (Eberwine et al., 1992). Durch die erneute Umwandlung der aRNA in eine cDNA und die Wiederholung der aRNA Synthese kann die Vervielfältigung der RNA stöchiometrisch auf das 1.000.000fache gesteigert werden (Eberwine et al., 1992). Während Eberwine et al. die aRNA radioaktiv markierten, wird sie zur Analyse mit dem HumanHT-12 v4 BeadChip der Firma Illumina durch die Verwendung von Biotin-16-UTP markiert (Kuhn et al., 2004). Nach der Hybridisierung der aRNA auf den BeadChip findet nach mehreren Waschschritten und dem Absättigen noch freier Bindungsstellen auf dem Bead-Chip durch eine 1%ige Casein-PBS-Lösung zur Vermeidung von Hintergrundsignalen die Färbung der mit Biotin markierten aRNA durch eine Streptavidin-Cy3 Lösung (1 µg/ml) statt (Kuhn et al., 2004).

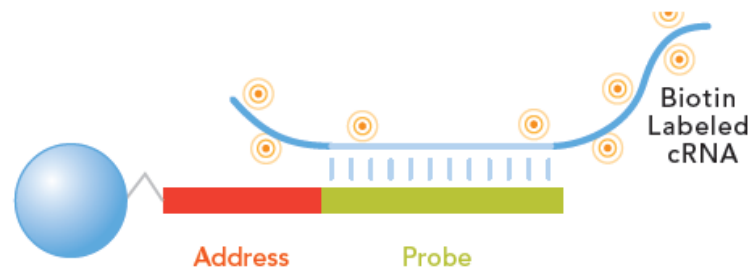


Abb. 15. Schematische Darstellung des an einen Bead gekoppelten Oligonukleotids. Der rote Abschnitt (Address) besteht aus einer 25bp langen Sequenz, die das Oligonukleotid spezifiziert. Der grüne Abschnitt (Probe) besteht aus der zum untersuchenden Transkript komplementären 50bp langen Sequenz. Die mit Biotin (grüne Kreise) markierte cRNA (blau) hybridisiert an das Oligonukleotid.

Streptavidin kann mit jeder seiner vier Untereinheiten hochaffin an Biotin binden. Die so mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierte RNA wird anschließend an chimäre Oligonukleotide, die an Beads (Kieselsäurekugeln) gekoppelt sind, hybridisiert (Abb. 15). Die chimären Oligonukleotide bestehen aus einer spezifischen Sequenz (25bp) zur Identifizierung der Oligonukleotide und einer zum untersuchten Transkript komplementären Sequenz (50bp) (Kuhn et al., 2004). Die prozessierten BeadChips werden anschließend mit dem Illumina Bead Array Scanner ausgelesen.

Prozessieren HumanHT-12 v4 BeadChip Illumina

Das Prozessieren des HumanHT-12 v4 BeadChip Illumina wurde gemäß den Herstellerangaben des durchgeführt.

Auswertung der HumanHT-12 v4 BeadChip Illumina Daten

Die Auswertung und die statistische Analyse, der aus der genomweiten Expressionsanalyse gewonnenen Daten, wurde von Dr. Jens Wendland (Laboratory of Clinical Science, NIMH Intramural Research Program, Bethesda, MD) durchgeführt. Zur Analyse der Pathophysiologie des Mikrodeletionssyndroms 5q14.3 wurden zwei unterschiedliche Analysemethoden verwendet. Die erste Analyse für die Auswertung der Expressionsergebnisse ist bereits beschrieben und publiziert worden (Becker et al., 2012). Zusätzlich wurde noch eine zweite Analysemethode ("*detection score*") den Gegebenheiten der Patientenzusammenstellung angepasst und neu entwickelt. Vor der eigentlichen Analyse wurden mehrere Filterschritte angewendet. In der Anwendung der Filterkriterien besteht der eigentliche Unterschied zwischen beiden Analysemethoden. Bei der ersten Analysemethode wurden zunächst von den 47.231 Transkripten nur die Transkripte mit einem Illumina "*detection score*" (Detektionswert) von

>0.99 in allen Hybridisierungen, d.h. in Kontrollen und Patienten, in die weitere Auswertung mit aufgenommen. Ein Detektionswert von >0.99 entspricht einer robusten Expression im untersuchten Gewebe, im Rahmen dieser Arbeit Vollblut der Probanden. Bei der zweiten Analyse wurde zwischen Patienten und Kontrollen unterschieden. Es wurden nur solche Sonden in die Auswertung einbezogen, die entweder nur in den Kontrollen und nicht in den Patienten oder umgekehrt nur in den Patienten und nicht in den Kontrollen einen Detektionswert von >0.99 aufwiesen. So wurden nur Sonden erfasst, die entweder

1. in keiner der Kontrollhybridisierungen und innerhalb mindestens einer Patientengruppe in über 80% der Hybridisierungen deutlich detektierbar (DPV $<0,01$) waren

oder

2. in sämtlichen Hybridisierungen von Kontrollpersonen mit einem DPV $<0,01$ sicher detektierbar waren und in mindestens einer der sieben Patientengruppen deutlich seltener sicher detektierbar waren.

Während in der ersten Analyse diejenigen Sonden, die aufgrund der Deletion eine herabgesetzte oder verstärkte Expression und daher in den Patienten oder den Kontrollen einen Detektionswert von <0.99 aufwiesen, aus der Analyse gefallen wären, waren solche Sonden das Ziel der zweiten Analyse. Die nächsten Filterschritte waren für beide Analysemethoden gleich. Als erstes wurden mit Hilfe des Programms ReMOAT (version March 2009, <http://www.compbio.group.cam.ac.uk/Resources/Annotation/index.html>) diejenigen Sonden herausgefiltert, die SNPs enthielten. Des Weiteren wurden nur Sonden ausgewertet, die exon-spezifisch waren. So wurden ungenaue Signale, die durch nicht ausreichende Hybridisierungen an unterschiedliche Isoformen eines Gens bedingt sein können, vermieden. Mit Hilfe der Software nuID (<https://prod.bioinformatics.northwestern.edu/nuID/>) wurden die Sonden aus der Analyse entfernt, die mehrmals im Genom binden. So kamen nur die Proben in die weitere Auswertung, die spezifisch einem Gen aus der Entrez GeneID Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) zugeordnet werden konnten. Des Weiteren wurden nur Sonden in die Analyse aufgenommen, deren korrespondierende Transkripte als "*reviewed*" oder "*validated*" annotiert waren (RefSeq-Datenbank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). In dem Fall, dass mehrere Sonden das gleiche Transkript repräsentieren, wurde zufällig eine der Sonden für die weitere Analyse ausgewählt. Im letzten Filterschritt wurden die Sonden identifiziert, die einen definierten Transkriptions-Start- und Endpunkt hatten (UCSC version hg18 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>)). Die Filterschritte hatten zur Folge, dass von den ursprünglich 47.231 Transkripten nur 3953 in die Analyse gingen. Die 3954 Proben wurden anschließend nach der "*inverse quantile*" Normalisierung normalisiert (Veyrieras et al., 2008).

3.9. Kohortenbeschreibung Genotypisierung

Das Bonner ID-Kollektiv umfasste im November 2011 552 Patienten mit einer ID ungeklärter Herkunft, die das komplette Spektrum an Schweregraden gemäß der Einteilung von Zhang et al. (Zhang et al., 2005) aufwies. Die Rekrutierung begann im Jahre 2000 durch Frau Dr. med. Kristin Bosse im Rahmen eines DFG-geförderten Projekts und wurde seit 2008 durch Frau Dr. med. Eva Wohlleber im Rahmen des BMBF-geförderten Konsortiums "German Mental Retardation Network MRNET" (www.german-mrnet.de/) weitergeführt. Aus den 552 ID-Patienten wurden 312 Patienten ausgewählt und mit verschiedenen SNP-Arrays der Firma Illumina genotypisiert (Tab. 4). Aufgrund der Weiterentwicklung der SNP-Arrays durch die Firma Illumina und der Einstellung der Produktion älterer SNP-Array-Versionen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene SNP-Arrays verwendet. In einer ersten wissenschaftlichen und aus Projektmitteln finanzierten Analysegruppe wurden 151 Patienten auf den SNP-Arrays Sentrix HumanHap 550-Duo v3Beadchip (HH550), 550k+HumanCNV-12 (CNV12), Sentrix Human610-Quad (H610Q) und Human660W-Quad v1 (H660W) genotypisiert. Die Kombination aus Sentrix HumanHap 550-Duo v3 BeadChip und HumanCNV-12 ergab die gleiche technische Auflösung wie der Sentrix Human610-Quad SNP-Array.

Die Auswahl der Patienten erfolgte anhand verschiedener Kriterien: 1) Von jedem Patienten mussten vollständige und ausführliche klinische Informationen vorliegen. 2) Patienten mit syndromalem Erscheinungsbild, d.h. mit weiteren Auffälligkeiten wie Dysmorphiezeichen und Fehlbildungen, wurden bevorzugt. 3) Es musste ausreichend DNA für die Genotypisierung und die Verifizierung durch qPCR vorhanden sein. Alle 151 Patienten dieser ersten Analysegruppe wurden vor der Untersuchung mittels SNP-Array Genotypisierung konventionell zytogenetisch untersucht und wiesen bei einer Bandenauflösung von 400-550 Banden/Genom einen unauffälligen Karyotyp auf. Bei ungefähr 90% dieser Patienten war zusätzlich durch FISH oder MLPA das Vorliegen von kryptischen subtelomerischen Chromosomenaberrationen ausgeschlossen worden und bei ungefähr einem Drittel der Patienten wurden bei einer spezifischen Verdachtsdiagnose (z.B. fragiles X-Syndrom, Smith-Magenis-Syndrom, DiGeorge-Syndrom etc.) die entsprechenden molekulargenetischen und molekularzytogenetischen Voruntersuchungen durchgeführt. Blieben die Voruntersuchungen ohne pathologischen Befund und gaben die Eltern ihr Einverständnis, wurden die Patienten in das Projekt aufgenommen. Sämtliche Voruntersuchungen wurden in den jeweiligen Diagnostikabteilungen des Instituts für Humangenetik der Universität Bonn bzw. in Kooperation mit anderen Instituten durchgeführt.

Nach der Etablierung der SNP-Array-Auswertung und -Interpretation sowie der qPCR-Verifizierung wurde die Methode als diagnostische Leistung am Institut für Humangenetik der Universität Bonn angeboten. Im Rahmen der Diagnostik wurden 161 weitere Patienten mit unterschriebener Projekt-Einverständniserklärung mit dem HumanOmni1M-Quad der Firma Illumina analysiert. Die Kriterien für eine Untersuchung mittels Bead Array im Rahmen der Diagnostik richteten sich nach den Vorgaben

des Bewertungsausschusses des Einheitlichen Bewertungsmaßstabes (Beschluss des Bewertungsausschusses nach § 87 Abs. 1 Satz 1 SGB V zu Änderungen des Einheitlichen Bewertungsmaßstabes (EBM) in seiner 235. Sitzung am 24. September 2010) (Deutsches Ärzteblatt; Jg. 107; Heft 43; 29 Oktober 20120). Demnach musste mindestens eines der folgenden Kriterien zur Veranlassung der Array-Diagnostik erfüllt sein:

- Es liegt eine isolierte Intelligenzminderung, die mindestens einem Intelligenzquotienten IQ <70 entspricht, dokumentiert im Rahmen einer neuropädiatrischen und/ oder entwicklungsneurologischen Vordiagnostik klinisch und/ oder mit standardisierten Testverfahren bei einem Menschen älter als 3 Jahre vor.
- Es liegt eine Intelligenzminderung in Kombination mit dysmorphologischen Merkmalen mit Beteiligung von zwei oder mehr Systemen vor.
- Es liegt eine tiefgreifende Entwicklungsstörung des Autismus-Formenkreises oder eine Fehlbildung und schwere Funktionsstörung des Gehirns, die nicht einer bekannten Ursache zuzuordnen ist, vor.
- Es liegen multiple angeborene Fehlbildungen vor.
- Es liegen multiple dysmorphologische Merkmale, die zytogenetisch nicht erfassbare chromosomale Aberrationen als Ursache implizieren, vor.

Im Gegensatz zur ersten Analysegruppe wurde bei diesen Patienten nicht in allen Fällen eine konventionelle Chromosomenanalyse durchgeführt und es Patienten mit einem syndromalen Erscheinungsbild wurden nicht bevorzugt. Ebenso war das Vorhandensein von DNA beider Eltern keine Bedingung. Eventuell durchgeführte Voruntersuchungen mussten wie in der ersten Analysegruppe ohne pathologischen Befund sein, damit die Patienten durch die SNP-Array-Diagnostik untersucht wurden.

Array	HH550 (HumanHap 550)	HH550 (HumanHap 550) +CNV12	H610Q (Human610- Quad)	H660W (Human660W- Quad)	HumanOmni1M- Quad	gesamt
Anzahl Patienten	5	26	72	48	161	312

Tab. 4. Anzahl der Patienten, die mit den unterschiedlichen SNP-Arrays der Firma Illumina genotypisiert wurden.

3.10. Kohortenbeschreibung Sanger-Sequenzierung

Zur Identifizierung von pathogenen Mutationen in ID-Kandidatengenen wurden die jeweiligen Gene in ID-Patienten sequenziert. *SOX2*, *GARNL3*, *RALGPS1* und *ANGPTL2* wurden/werden sowohl in den jeweiligen Deletionspatienten als auch in 191 (126 männlich; 65 weiblich) ID-Patienten des Bonner Kollektivs sequenziert. 105 der Patienten wiesen mit einem IQ > 50 eine milde ID/DD und 82 eine

moderate bis schwere ID/DD auf. Vier Patienten waren zu jung, um den Grad der ID bestimmen zu können. Für alle Patienten lagen detaillierte klinische Informationen, eine unauffällige Chromosomenanalyse und der Ausschluss klinisch erkennbarer Syndrome mit bekannter Ätiologie vor. Das fragile X-Syndrom wurde für einen Großteil der Patienten ausgeschlossen. Bei 138 Patienten fand eine molekulare Karyotypisierung auf verschiedenen Arrays (Affymetrix250K-, Affymetrix 6.0, Illumina HumanHap 550, Human610-Quad, Human660W-Quad, HumanOmni1M-Quad, Agilent 2x400K, Agilent 244A) statt. Bei keinem der Patienten wurde ein offensichtlich pathogener CNV detektiert.

Die ID-Kandidatengene *LLRTM2* und *FOXBI* wurden neben den oben beschriebenen Patienten zusätzlich noch in 139 ID-Patienten aus dem Institut für Humangenetik der Universität Heidelberg sequenziert. 72 der Patienten wiesen eine milde und 44 eine moderate bis schwere ID/DD auf. 23 Patienten waren zu jung, um den Schweregrad der ID/DD zu beurteilen. Für 109 Patienten lagen detaillierte klinische Informationen vor. Bei allen Patienten wurde auf verschiedenen Arrays eine molekulare Karyotypisierung durchgeführt und es wurden keine offensichtlich pathogenen CNVs detektiert.

4. Ergebnisse

4.1. Auswertung der CNV-Analyse

4.1.1. Erste Analysegruppe

In der ersten Analysegruppe wurde die DNA von 151 ID-Patienten mit verschiedenen SNP-Arrays der Firma Illumina analysiert (

Tab. 5). Nach Selektion anhand der in Material und Methoden (Filterkriterien für die CNV-Analyse, S.29) dargestellten Filterkriterien, (CNV-Größe ≥ 20 kb, Geninhalt, Häufigkeit in Kontrollkollektiven, segmentale Duplikationen) wurden 232 mögliche CNVs, die durch den "*calling*"-Algorithmus QuantiSNP errechnet worden waren, durch qPCR verifiziert und ihre Segregation untersucht. Daraus ergaben sich durchschnittlich 1,54 putative CNVs je Patient. 69 (29,7%) der putativen CNVs konnten nicht bestätigt werden, d.h. die genomische Region lag bei Patient/in und Kontrollpersonen in der gleichen Kopienzahl vor. Bei 13 (5,6%) CNVs konnte aufgrund einer hohen Variabilität der Kopienzahl innerhalb der Kontrollen und den Eltern die Kopienzahl nicht zuverlässig ermittelt werden. Da für diese putativen CNVs jedoch dieselbe Kopienzahl in mindestens einer der vier Kontrollpersonen oder in einem Elternteil vorlag, wurden sie als Regionen mit hoher Kopienzahlvariabilität eingeordnet und dementsprechend mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen, dass die veränderte Kopienzahl nicht ursächlich für den Phänotyp war. Insgesamt 130 der CNVs wurden durch die qPCR bestätigt (56%) und durch entsprechende Elternuntersuchungen nachgewiesen, dass sie parentaler Herkunft waren. Davon zeigten 57 (24,6%) CNVs eine maternale und 65 (28%) CNVs eine paternale Herkunft. Bei 8 (8,6%) CNVs konnte die Herkunft nicht bestimmt werden, da sowohl Mutter als auch Vater ebenfalls Träger des CNVs waren. Die qPCR zeigte bei 20 (8,6%)CNVs eine *de novo*-Entstehung. Bei keinem Patienten wurden dabei mehr als ein *de novo*-CNV gefunden, woraus sich eine *de novo*-Rate von 13,2% ergab.

Die bestätigten CNVs variierten in Ihrer genomischen Größe zwischen 20 kb und 17,5 Mb. Interessanterweise war der größte detektierte CNV eine 17,5 Mb große von der phänotypisch unauffälligen Mutter vererbte Duplikation. Die bestätigten *de novo*-CNVs waren zwischen 65 kb und 12 Mb groß.

Analysegruppe	Anzahl Patienten	Patienten mit <i>de novo</i> -CNVs (%)	Patienten mit pathologischen CNVs (ID)* (%)	Patienten mit CNVs mit unbekannter klinischer Signifikanz (VOUS)
1	151	19 (12,6%)	13 (8,6%)	6 (3,9%)
2	161	16 (9,9%)	20 (12,4%)	5 (3,1%)
Gesamt	312	35 (11,2%)	33 (10,5%)	11 (3,5%)

Tab. 5. Übersicht der Anzahl der analysierten Patienten in den beiden Gruppen und die Ergebnisse

4.1.2. Zweite Analysegruppe

Weitere 161 Patienten wurden im Rahmen der Diagnostik mit einem HumanOmni1-Quad-Chip SNP-Array analysiert (Tab. 5). Die zur Verifizierung und Segregationsanalyse notwendige qPCR wurde für diese Patienten von Jennifer A. Lee, PhD durchgeführt. Die wissenschaftliche Dateninterpretation wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) fordern für die Array-Diagnostik eine durchschnittliche effektive Auflösung von deutlich unter 500 kb, wobei eine Auflösung von unter 200 kb anzustreben ist. Aufgrund der sehr hohen durchschnittlichen technischen Auflösung des HumanOmni1M-Quad von 12 kb war es möglich, Befunde mit einer diagnostischen Auflösung von 100 kb zu erstellen. Mit abnehmender Detektionsgröße, erhöht sich die Anzahl der durch eine qPCR zu verifizierenden CNVs fast exponentiell (Tab. 6). Gleichzeitig ist ein Großteil der kleineren CNVs (<100 kb) in der Allgemeinpopulation häufig zu detektieren und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit neutral (Buysse et al., 2009) (Tab. 6). Daher wurden in dieser Analysegruppe kleinere CNVs (<100 kb) aus Kosten- und Effizienzgründen nicht in die diagnostische Auswertung einbezogen. Zur Vermeidung eventueller Größenunterschätzungen wurde ein Sicherheitspuffer von 20kb eingeführt und in die diagnostische Auswertung wurden nur CNVs > 80 kb aufgenommen.

Nach Anwendung der Filterkriterien (Filterkriterien für die CNV-Analyse, S.29) verblieben insgesamt 119 putative CNVs, die mit qPCR verifiziert wurden (0,74 je Patient). Davon waren 75 elterlicher Herkunft (48 / 40,3% maternal, 27 / 22,7% paternal) und 17 (14,3%) wurden nicht bestätigt. Für sieben (5,9%) CNVs konnte nur eine maternale Herkunft ausgeschlossen werden, da keine DNA des Vaters des Patienten vorlag. Zwei dieser CNVs konnten aufgrund ihrer genomischen Position als pathogen eingestuft werden. Die übrigen vier CNVs wurden aufgrund ihrer unklaren Herkunft als seltene Variante unklarer klinischer Signifikanz eingestuft. Für 20 CNVs (16,8%) wurde ein *de novo*-Ursprung nachgewiesen. Bei drei Patienten konnten jeweils zwei *de novo*-CNVs nachgewiesen werden, so dass insgesamt 17 Patienten *de novo*-CNVs (10,6%) aufwiesen.

Analysegruppe	1	2
# Patienten	151	161
# bestätigte CNVs	149	103
CNVs 20kb-80kb	66 (44,3%)	n.a.
CNVs 80kb-200kb	30 (20,1%)	46 (44,6%)
CNVs 200kb-500kb	31 (20,8%)	26 (25,2%)
CNVs >500kb	22 (14,8%)	31 (30,1%)
<i>de novo</i> -CNVs 20-80kb	1 (0,7%)	-
<i>de novo</i> -CNVs 80kb-200kb	1 (0,7%)	2 (1,9%)
<i>De novo</i> -CNVs 200kb-500kb	4 (2,7%)	-
<i>de novo</i> -CNVs >500kb	13 (8,7%)	18 (17,4%)

Tab. 6. Größenverteilung der bestätigten CNVs innerhalb der beiden Analysegruppen. %: Der Anteil in Bezug auf die Anzahl der bestätigten CNVs in den Analysegruppen. n.a.: nicht analysiert

4.2. CNVs in kritischen Regionen bekannter Mikrodeletions-/ Mikroduplikationssyndrome

Bei 24 der insgesamt 312 analysierten Patienten mit einer ID ungeklärter Ursache konnten CNVs in den kritischen Regionen bekannter Mikrodeletions- bzw. Mikroduplikationssyndrome nachgewiesen werden oder CNVs, die bekannte ID-Gene und Kandidatengene betrafen (Tab. 7). Acht der bekannten Regionen bzw. Gene wurden in der ersten Analysegruppe nachgewiesen (5,3% der Patienten) und 17 in der zweiten (10,6% der Patienten). Zu den detektierten Deletionssyndromen gehörten das 1p32-p31-Deletionssyndrom (OMIM #613735), das 2q33.1-Deletionssyndrom (OMIM # 612313), das Wolf-Hirschhorn-Syndrom (Chromosomenbande 4p16.3) (OMIM #194190), zwei Fälle von Williams-Beuren-Syndrom (Mikrodeletion 7q11.23) (OMIM #194050), das 8q21.11-Deletionssyndrom (OMIM #614230), das 16p11.2-Deletionssyndrom (593-Kb) (OMIM #611913), das 17q21.31-Deletionssyndrom (OMIM #610443), das 18p-Deletionssyndrom (OMIM #146390), das 18q-Deletionssyndrom (OMIM #601808), das 22q11.2-Mikrodeletions- / DiGeorge-Syndrom (OMIM #188400), das 22q13-Mikrodeletions- / Phelan-McDermid-Syndrom (OMIM #606232). Das 16p13-Deletionssyndrom (OMIM #610543) konnte bei zwei Patienten nachgewiesen werden. Einer dieser Patienten wies zwei atypische *de novo*-Deletionen in der Region 16p13 auf.

Als bekannte Mikroduplikationssyndrome wurden das 15q11-q13-Duplikationssyndrom (OMIM # 608636) und das Xp11.23-p11.22 Mikroduplikationssyndrom (OMIM # 300801) bei je einem Patienten nachgewiesen.

Von CNVs betroffene bekannte ursächliche (Kandidaten-)Gene für ID waren *EHMT1* (Deletion) (OMIM * 607001), *CASK* (Deletion) (OMIM * 300172), *FMR1* / *FMR2* (Deletion) (OMIM *309550/

*300806) und *NRXN1* (Deletion) (OMIM * 600565). Drei Brüder wiesen eine maternal vererbte Deletion des Gens *CHRNA7* (OMIM * 118511) auf.

Zehn CNVs lagen im mikroskopisch sichtbaren Bereich (> 5 Mb). Dazu gehörte eine unbalancierte Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 4 und 13 (der(13)t(4;13)(q33;q33)). Eine nachfolgende konventionelle Chromosomenanalyse bestätigte die unbalancierte Translokation und zeigte beim Vater des Patienten eine balancierte Translokation t(4;13)(q33;q33). Eine Patientin zeigte bei normaler Kopienzahl eine Homozygotie des gesamten Chromosoms 15 (uniparentale Isodisomie 15/UPD 15). Durch nachfolgende diagnostische Untersuchungen wurde ein paternale UPD 15 nachgewiesen, wodurch ein Angelman-Syndrom diagnostiziert werden konnte.

Analysegruppe	Anzahl Patienten	Patienten mit <i>de novo</i> -CNVs (%)	Patienten mit pathologischen Befunden* (%)	CNVs mit unbekannter klinischer Signifikanz (VOUS)
1	151	20 (13,2%)	13 (8,6%)	7 (4,6%)
2	161	17 (10,6%)	20 (12,4%)	11 (6,8%)
Gesamt	312	36 (11,5%)	33 (10,5%)	18 (5,8%)

Tab. 7. Übersicht der Anzahl der analysierten Patienten in den beiden Analysegruppen und die Ergebnisse. * Einschließlich UPD 15; %:Anteil an untersuchten Patienten.

4.3. Klinische Übersicht der Patienten mit auffälligen CNV-Befunden

Patienten-Nr.	11/10	71/10	15/08	48/08	38/02	55/10
SNP-Array	HumanOmni1M-Quad	HumanOmni1M-Quad	H610Q	H610Q	H610Q	HumanOmni1M-Quad
Genomische Position (NCBI36)	1p31.2-p32.2 (57.091.194-69.070.397)	2p16.3 (50.994.846-51.155.160)	2p14-p15 (63.756.740-65.983.507)	2q33.1-q33.2 (199.274.259-205.509.082)	2q37.3 (238.269.389-241.225.299)	3p26.2 (3.985.819-4.927.779)
Deletion/Duplikation	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion	Duplikation	Deletion
Länge [Mb]	11,98	0,16	2,23	6,23	2,96	0,94
Herkunft	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>
Anzahl Gene	53	1	13	46	34	3
Syndrom/Kandidatengen	1p32-p31-Deletions-syndrom	NRXN1		2q33.1-Deletions-syndrom		
klinische Relevanz	path.	path.	path.	path.	VOUS	VOUS
Geschlecht	m	m	m	w	m	m
Alter (Jahre)	7 ⁷ / ₁₂	11 ¹⁰ / ₁₂	5 ¹¹ / ₁₂	4	7	2 ¹¹ / ₁₂
ID Schweregrad (Zhang et al.)	k.A.	3-4	2	4	k.A.	3
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Geburt	KU > P97	n	n	k.A.	Länge < P3	n
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Beratung	n	n	n	n	Größe < P3	n
Organfehlbildungen	Aortenfehlbildungen, Kryptorchismus, verbreiterte Seitenventrikel, partielle Balkenaplasie, Hydrozephalus internus	n	n	n	n	n
Dysmorphien	++	+	+	++	+	n
Epilepsie	n	n	n	k.A.	n	k.A.
Muskelhypotonie	j	k.A.	n	j	n	j
Verhaltensauffälligkeiten	n	Aggressivität, autistische Züge	k.A.	k.A.	n	Aggressivität, Schlafstörungen
Weiteres	Infektanfälligkeit, Fütterungsschwierigkeiten	n	Fütterungsschwierigkeiten als Säugling	Fütterungsschwierigkeiten als Säugling	Hyperopie	n

Tab. 8. Klinische und genomische Übersicht der Patienten mit Auffälligkeiten in der SNP-Array Untersuchung. path: pathologisch; VOUS: Variante mit unbekannter klinischer Relevanz; m: männlich; w: weiblich; k.A.: keine Angaben; KU: Kopfumfang; n: nicht vorhanden; ++ deutliche Dysmorphiezeichen; +: leichte Dysmorphiezeichen; j: vorhanden;

Patienten-Nr.	43/01	70/11	44/10	62/11		14/06
SNP-Array	H660W	HumanOmni1M-Quad	HumanOmni1M-Quad	HumanOmni1M-Quad		HH550+CNV12
Genomische Position (NCBI36)	3q26.33 (182.708.440-182.943.281)	4p16.3 (53.834-2.267.384)	4q32.1 (156.598.018-16.0815.862)	4q32.3q35.2 (17.0187.970-19.1176.659)	13q33.1q34 (102.660.937-114.125.259)	5q14.3 (88.693.066-92.022.455)
Deletion/Duplikation	Deletion	Deletion	Deletion	Duplikation	Deletion	Deletion
Länge [Mb]	0,23	2,21	4,22	21	11,5	3,33
Herkunft	<i>de novo</i>	nicht maternal	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>		<i>de novo</i>
Anzahl Gene	1	45	17	73	46	6
Syndrom/Kandidatengen		Wolf-Hirschhorn-Syndrom		Unbalancierte Translokation 4q/13q		
klinische Relevanz	VOUS	path.	VOUS	path.		path.
Geschlecht	w	m	m	m		w
Alter (Jahre)	2 ⁵ / ₁₂	26 ⁸ / ₁₂	14 ¹¹ / ₁₂	1 ⁵ / ₁₂		6 ³ / ₄
ID Schweregrad (Zhang et al.)	3	4	3	4		5
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Geburt	n	k.A.	n	KU<P3		n
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Beratung	n	Größe < P3, Gewicht < P3, KU < P3	Größe < P3, Gewicht < P3, KU < P3	KU < P3		n
Organfehlbildungen	Speiseröhrenstenose	n	n	Analatresie, Hirnanlagestörung, Hypospadie, Kraniosynostose, LKGS,		geringe Ventrikel-erweiterung, geringe unspez. Leukenzephalopathie, kortikale Atrophie
Dysmorphien	+	++	+	+++		+
Epilepsie	n	j	k.A.	n		j
Muskelhypotonie	j	j	k.A.	j		j
Verhaltensauffälligkeiten	n	Autismus	Autistische Züge	k.A.		Stereotypie
Weiteres	Tics	Gelenks-überbeweglichkeit, Klumpfüße	Pubertas tarda, verzögertes Knochenalter	n		Bruxismus, Strabismus, Weitsichtigkeit

Tab. 9. Klinische und genomische Übersicht der Patienten mit Auffälligkeiten in der SNP-Array Untersuchung. path: pathologisch; VOUS: Variante mit unbekannter klinischer Relevanz; m: männlich; w: weiblich; k.A.: keine Angaben; KU: Kopfumfang; n: nicht vorhanden; +++: schwere Dysmorphiezeichen; ++ deutliche Dysmorphiezeichen; +: leichte Dysmorphiezeichen; j: vorhanden

Patienten-Nr.	12/11	29/09	37/10	21/06	42/02	69/11
SNP-Array	HumanOmni1M-Quad	H660W	HumanOmni1M-Quad	HH550+CNV12	HH550+CNV12	HumanOmni1M-Quad
Genomische Position (NCBI36)	5q31.1-q31.2 (131.464.385-137.565.623)	5q31.2 (137.750.721-138.687.057)	6q22.31 (123.552.656-124.371.012)	7p22.1 (5.342.068-5.407.863)	7p15.3 (24.250.806-24.511.261)	7q11.23 (72.357.322-73.776.539)
Deletion/Duplikation	Deletion	Deletion	Duplikation	Deletion	Duplikation	Deletion
Länge [Mb]	6,10	0,94	0,82	0,07	0,26	1,42
Herkunft	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>
Anzahl Gene	64	9	2	1	1	26
Syndrom/Kandidatengen						Williams-Beuren-Syndrom
klinische Relevanz	path.	path.	VOUS	VOUS	n.r.	path.
Geschlecht	m	m	m	w	w	m
Alter (Jahre)	17	5 1/2	6 3/12	26 2/12	5 3/12	39 8/12
ID Schweregrad (Zhang et al.)	3-4	2-3	1-2	3-4	3-4	3
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Geburt	Länge < P3, Gewicht < P3	n	n	n	n	Länge < P3, Gewicht < P3
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Beratung	Größe < P3, Gewicht < P3, KU < P3	KU < P3	n	Größe < P3	n	n
Organfehlbildungen	n	Hypoplasie der Tonsilla cerebelli	n	Z.n. PDA	n	Hodenatrophie, Kryptorchismus
Dysmorphien	+++	+	+	+++	n	++
Epilepsie	j	n	n	n	n	n
Muskelhypotonie	j	n	n	n	j	k.A.
Verhaltensauffälligkeiten	n	Schlafstörungen	Aggressivität, Hyperaktivität	Angststörung	n	k.A.
Weiteres	Fehlsichtigkeit, Hypothyreose, Sichelfüße	dissoziierte Skelettentwicklung	n	Entwicklungsrückschritte im Erwachsenenalter, Keilwirbel	Strabismus, Weitsichtigkeit	Gynäkomastie, hypergonadotroper grenzwertiger Normogonadismus, Schwerhörigkeit

Tab. 10. Klinische und genomische Übersicht der Patienten mit Auffälligkeiten in der SNP-Array Untersuchung. path: pathologisch; VOUS: Variante mit unbekannter klinischer Relevanz; n.r.: nicht relevant; m: männlich; w: weiblich; k.A.: keine Angaben; n: nicht vorhanden; +++: schwere Dysmorphiezeichen; ++ deutliche Dysmorphiezeichen; +: leichte Dysmorphiezeichen; j: vorhanden; Z.n.: Zustand nach; PDA: persistierender Ductus Arteriosus

Patienten-Nr.	08/11	48/09	43/11		22/00	51/10
SNP-Array	HumanOmni1M-Quad	H660W	HumanOmni1M-Quad		H610Q	HumanOmni1M-Quad
Genomische Position (NCBI36)	7q11.23 (73.705.539-75.823.488)	8p23.2 (2.640.862-2.849.233)	8q21.11-q21.3 (77.719.805-92.949.852)	12q21.1 (70.824.696-72.053.941)	9q21.12-q21.32 (72.945.254-85.154.555)	9q33.3-q34.11 (128.503.434-13.0264.010)
Deletion/Duplikation	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion
Länge [Mb]	2.12	0.21	15.23	1.23	12.21	1.76
Herkunft	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>
Anzahl Gene	40	1	55	1	39	40
Syndrom/Kandidatengen	atypisches Williams-Beuren-Syndrom		8q21.11-Deletions-syndrom			
klinische Relevanz	path.	VOUS	path.	VOUS	path.	path.
Geschlecht	m	m	w		w	w
Alter (Jahre)	1 ⁵ / ₁₂	3 ¹ / ₂	14 ¹ / ₁₂		4 ¹¹ / ₁₂	1 ⁸ / ₁₂
ID Schweregrad (Zhang et al.)	3-4	3	3		3	3
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Geburt	n	n	n		n	KU < P3
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Beratung	n	Größe < P3	Größe < P3		Größe < P3	n
Organfehlbildungen	Kryptorchismus	Kryptorchismus	LKGS		Lippen-Kiefer-Gaumen-Nasen-Vomer-Spalte, Mitralinsuffizienz, Z.n. VSD	n
Dysmorphien	++	++	++		++	++
Epilepsie	n	n	k.A.		n	n
Muskelhypotonie	j	n	j		j	j
Verhaltensauffälligkeiten	Schlafstörungen	n	n		n	n
Weiteres	n	Fütterungsschwierigkeiten als Säugling	Strabismus		n	n

Tab. 11. Klinische und genomische Übersicht der Patienten mit Auffälligkeiten in der SNP-Array Untersuchung. path: pathologisch; VOUS: Variante mit unbekannter klinischer Relevanz; m: männlich; w: weiblich; k.A.: keine Angaben; KU: Kopfumfang; n: nicht vorhanden; +++: schwere Dysmorphiezeichen; ++ deutliche Dysmorphiezeichen; +: vorhanden; Z.n.: Zustand nach; LKGS: Lippen-Kiefer-Gaumenspalte; VSD: Ventrikel septum Defekt

ID	73/08	71/08	70/08	2/11	77/10	68/10
SNP-Array	H610Q	HumanOmni1M-Quad	H660W	HumanOmni1M-Quad	HumanOmni1M-Quad	HumanOmni1M-Quad
Genomische Position (NCBI36)	9q34.3 (139.581.920-139.725.155)	15q11.2q26.3 (18.300.000-100.338.915)	15q11.2-q13.1 (20.069.422-26.541.850)	15q11.2 (20.384.417-20.638.370)	15q11.2-q13.1 (21.259.944-26.111.509)	15q13.3 (29.806.023-30.322.604)
Deletion/Duplikation	Deletion	UPD	Duplikation	Duplikation	Duplikation	Deletion
Länge [Mb]	0.14	82,03	6.47	0.25	4.85	0.52
Herkunft	<i>de novo</i>		<i>de novo</i>	paternal	<i>de novo</i>	maternal
Anzahl Gene	5	655	28	4	14	1
Syndrom/Kandidatengen	<i>EHMT1</i>	UPD 15	Prader-Willi-/Angelman-Syndrom-Region	Prader-Willi-/Angelman-Syndrom-Region	Prader-Willi-/Angelman-Syndrom-Region	<i>CHRNA7</i>
klinische Relevanz	path.	path.	path.	VOUS	path.	path.
Geschlecht	w	w	m	w	w	m
Alter (Jahre)	9 ⁵ / ₁₂	3 ⁶ / ₁₂	10 ² / ₁₂	2 ³ / ₁₂	12	9 ⁹ / ₁₂
ID Schweregrad (Zhang et al.)	4	4	2	5	3	2-3
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Geburt	n	n	n	n	n	n
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Beratung	n	Gewicht > P 97	Größe < P3	n	KU > P97	n
Organfehlbildungen	kleiner ASD II	n	Kryptorchismus	n	n	n
Dysmorphien	+	n	++	+	n	+
Epilepsie	j	n	n	j	n	n
Muskelhypotonie	j	k.A.	k.A.	j	j	k.A.
Verhaltensauffälligkeiten	k.A.	n	k.A.	Schlafstörungen	n	Autistische Züge, Schlafstörungen
Weiteres	Fütterungsschwierigkeiten als Säugling	n	n	Kontrakturen, Pendelnystagmus, Schluckstörung, Strabismus, Z.n. Torticollis	Zahn-anomalien	n

Tab. 12. Klinische und genomische Übersicht der Patienten mit Auffälligkeiten in der SNP-Array Untersuchung. path: pathologisch; VOUS: Variante mit unbekannter klinischer Relevanz; m: männlich; w: weiblich; k.A.: keine Angaben; KU: Kopfumfang; n: nicht vorhanden; ++ deutliche Dysmorphiezeichen; +: leichte Dysmorphiezeichen; j: vorhanden; Z.n.: Zustand nach; ASD: Atriumseptum-Defekt

Patienten-Nr.	70/10	69/10	22/09	52/11	40/11
SNP-Array	HumanOmni1M-Quad	HumanOmni1M-Quad	H610Q	HumanOmni1M-Quad	HumanOmni1M-Quad
Genomische Position (NCBI36)	15q13.3 (30.060.958-30.322.604)	15q13.3 (30.072.565-30.303.141)	15q22.1-q22.2 (56.164.760-61.493.779)	16p11.2 (29.585.324-30.099.860)	16p13.3 (217.459-1.391.673)
Deletion/Duplikation	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion
Länge [Mb]	0.26	0.23	5.33	0.51	1.17
Herkunft	maternal	maternal	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>
Anzahl Gene	1	1	31	28	53
Syndrom/Kandidatengen	<i>CHRNA7</i>	<i>CHRNA7</i>		16p11.2-Mikrodeletionssyndrom	16p13-Deletionssyndrom
klinische Relevanz	path.	path.	path.	path.	path.
Geschlecht	m	m	m	w	m
Alter (Jahre)	3 ⁹ / ₁₂	7 ² / ₁₂	14 ¹ / ₂	17 ² / ₁₂	5 ¹¹ / ₁₂
ID Schweregrad (Zhang et al.)	2	2	3	3	1
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Geburt	n	n	n	n	Gewicht < P3, Länge < P3
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Beratung	n	n (relative Mikrozephalie)	Größe < P3 (dysproportioniert)	Gewicht > P 97	n
Organfehlbildungen	n	n	n	n	Kryptorchismus
Dysmorphien	n	n	+	n	++
Epilepsie	n	n	n	n	n (path EEG)
Muskelhypotonie	k.A.	k.A.	j	k.A.	j
Verhaltensauffälligkeiten	n	n	Distanzlosigkeit, mangelndes Sättigungsgefühl	kein Sättigungsgefühl	Schlafstörungen
Weiteres	n	n	Strabismus, Weitsichtigkeit	n	Infektanfälligkeit

Tab. 13. Klinische und genomische Übersicht der Patienten mit Auffälligkeiten in der SNP-Array Untersuchung. path: pathologisch; VOUS: Variante mit unbekannter klinischer Relevanz; m: männlich; w: weiblich; k.A.: keine Angaben; n: nicht vorhanden; ++ deutliche Dysmorphiezeichen; +: leichte Dysmorphiezeichen; j: vorhanden; EEG: Elektroenzephalografie

Patienten-Nr.	4/10		6/03	50/11	12/10	59/01
SNP-Array	HumanOmni1M-Quad		H610Q	HumanOmni1M-Quad	HumanOmni1M-Quad	HH550
Genomische Position (NCBI36)	16p13.11-p13.12 (14.993.705-15.074.392)	16p13.11 (15.400.547-16.199.484)	17q21.31 (41.041.708-41.496.568)	18p11.21-p11.32 (120.538-12.537.561)	18q21.32-q23 (57.002.577-74.988.860)	22q11.21 (17.257.787-19.792.353)
Deletion/Duplikation	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion
Länge [Mb]	0.08	0.80	0.45	12.42	17.99	2.53
Herkunft	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>
Anzahl Gene	3	9	7	57	53	59
Syndrom/Kandidatengen	16p13-Deletions-syndrom	16p13-Deletions-syndrom	17q21.31-Deletions-syndrom	18 p-Deletions-syndrom	18q-Deletions-syndrom	Di George-Syndrom
klinische Relevanz	path.		path.	path.	path.	path.
Geschlecht	w		w	m	m	m
Alter (Jahre)	6 1/2		3 1/2	11 1/12	5 2/12	2 7/12
ID Schweregrad (Zhang et al.)	1-2		k.A.	3-4	3-4	4
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Geburt	n		n	n	n	n
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Beratung	n		n	n	KU<P3	Größe < P3, KU < P3
Organfehlbildungen	gedeckte GS mit angedeuteter LS		PFO, V.a. Reifungsstörung des Innenohrs	n	Gehörgangstenose	multizystische Niere, PFO
Dysmorphien	n		+	n	+	+++
Epilepsie	n		n	k.A.	n	n
Muskelhypotonie	k.A.		n	k.A.	j	k.A.
Verhaltensauffälligkeiten	kein Sättigungsgefühl, geringe Frustrationstoleranz		k.A.	Schlafstörungen	k.A.	Aggressivität, Autismus
Weiteres	n		n	Astigmatismus, Hyperopie, Pubertas præcox, Strabismus	Klumpfuß, Strabismus, Trichterbrust, Uvula bifida	Schallempfindungsschwerhörigkeit

Tab. 14. Klinische und genomische Übersicht der Patienten mit Auffälligkeiten in der SNP-Array Untersuchung. path: pathologisch; VOUS: Variante mit unbekannter klinischer Relevanz; m: männlich; w: weiblich; k.A.: keine Angaben; KU: Kopfumfang; n: nicht vorhanden; +++: schwere Dysmorphiezeichen; ++ deutliche Dysmorphiezeichen; +: leichte Dysmorphiezeichen; j: vorhanden; GS: Gaumenspalte; LS: Lippenspalte; V.a.: Verdacht auf; PFO: persistierendes Foramen Ovale;

ID	41/11	29/08	72/00	81/11	19/09	5/07
SNP-Array	HumanOmni1M-Quad	H660W	H610Q	HumanOmni1M-Quad	H610Q	HH550+CNV12
Genomische Position (NCBI36)	22q13.33 (48.714.735-49.545.224)	Xp11.22-p11.23 (47.826.019-52.569.273)	Xp11.3-p11.4 (41.378.849-45.842.600)	Xp22.31 (6.464.813-8.091.442)	Xp22.31 (6.468.166-8.095.053)	Xq27.3-q28 (144.934.242-148.461.832)
Deletion/Duplikation	Deletion	Duplikation	Deletion	Duplikation	Deletion	Deletion
Länge [Mb]	0.83	4.74	4.46	1.63	1.63	3.53
Herkunft	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	paternal	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>
Anzahl Gene	33	84	13	4	4	7
Syndrom/Kandidatengen	22q13-Deletionssyndrom	Xp11.23-p11.22-Duplikationssyndrom	CASK			FMR1/FMR2
klinische Relevanz	path.	path.	path.	VOUS	VOUS	path.
Geschlecht	m	w	w	w	w	w
Alter (Jahre)	5 ⁷ / ₁₂	13 ⁸ / ₁₂	¹ / ₂	5 ⁷ / ₁₂	9 ¹ / ₁₂	6 ¹⁰ / ₁₂
ID Schweregrad (Zhang et al.)	3-4	1	3	3-4	4	3
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Geburt	KU < P3	n	KU < P3	n	Länge < P3, Gewicht < P3, KU < P3	Gewicht > P97
Auffälligkeiten der Wachstumsparameter bei Beratung	n	n	Größe < P3, KU < P3	Größe > P97, Gewicht > P97	Größe < P3	Gewicht > P97
Organfehlbildungen	n	n	n	n	n	n
Dysmorphien	+	n	n	+	++	+
Epilepsie	n	n	n	n	n	n
Muskelhypotonie	j	n	k.A.		j	j
Verhaltensauffälligkeiten	Autoaggression	ADHS, Aggressivität	n	k.A.	n	Antriebslosigkeit
Weiteres	Strabismus	n	Pontocerebelläre Hypoplasie	ataktischer Gang	Nystagmus, Skelettauffälligkeiten	Kyphose, Pubertas præcox

Tab. 15. Klinische und genomische Übersicht der Patienten mit Auffälligkeiten in der SNP-Array Untersuchung. path: pathologisch; VOUS: Variante mit unbekannter klinischer Relevanz; m: männlich; w: weiblich; k.A.: keine Angaben; KU: Kopfumfang; n: nicht vorhanden; +++: schwere Dysmorphiezeichen; ++ deutliche Dysmorphiezeichen; +: leichte Dysmorphiezeichen; j: vorhanden; ADHS: Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung

4.4. Seltene CNVs

4.4.1. De novo Mikrodeletion 2p14-p15

Patientenbeschreibung (15/08)

Patient 15/08 war der 8 ¹/₄ Jahre alte Sohn nicht verwandter deutscher Eltern. Die Familiengeschichte war bis auf eine balancierte Robertson'sche Translokation (13;14) der gesunden Mutter unauffällig. Nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf wurde er in der 41. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 3450 g (Perzentile (P) 25-50), einer Länge von 51 cm (P 25) und einem Kopfumfang von 34 cm (P 10) ohne offensichtliche Fehlbildungen oder Auffälligkeiten geboren. Während der ersten Lebensmonate traten Fütterungsprobleme auf und der Patient schrie auffällig viel. Im weiteren Verlauf wurde eine Entwicklungsverzögerung offensichtlich. So zeigte der Patient bis zum Alter von 15 Monaten keine soziale Interaktion. Nach Beginn einer physiotherapeutischen Behandlung mit 12 Monaten konnte er mit 14 Monaten ohne Unterstützung sitzen und mit 15 Monaten frei laufen. Die Sprachentwicklung war mit ersten Worten im Alter von 3 Jahren deutlich verzögert. Mit 5 Jahren sprach er in Zwei- und Drei-Wort Sätzen. Nach Einschätzung der Eltern war seine sprachliche Auffassungsgabe besser als seine aktive Sprache. Nach zwei generalisierten Krampfanfällen im Alter von ca. 2 ¹/₂ Jahren wurde er antiepileptisch therapiert. Nach der Beendigung der antiepileptischen Therapie trat noch ein weiterer Krampfanfall auf. Ein zerebrales MRT im Alter von 2 ⁹/₁₂ Jahren ergab einen unauffälligen Befund. Als weitere Auffälligkeiten zeigte der Patient eine milde Weitsichtigkeit und enge Gehörgänge.

Im Rahmen seiner ersten Vorstellung in der humangenetischen Sprechstunde im Alter von 5 ¹¹/₁₂ Jahren fielen eine milde Entwicklungsverzögerung vor allem der Sprache, eine leichte Weitsichtigkeit, eine milde Trichterbrust, weiche fetale Fingerpads, eine atypische Vierfingerfurche beidseits sowie eine leichte Syndaktylie der zweiten und dritten Zehen des rechten Fußes und eine relative Mikrozephalie auf. Seine fazialen Dysmorphien waren mild und erinnerten mit einem langen Gesicht, einer vollen Nasenspitze und einer dünnen Oberlippe teilweise an die Merkmale des 22q11.2-Deletions-Syndroms. Ein 22q11.2-Deletions-Syndrom wurde vor der Array-Analyse durch eine FISH-Untersuchung ausgeschlossen. Eine konventionelle Karyotypisierung ergab das Vorliegen einer balancierten maternalen Robertson'schen Translokation (13;14); eine maternale UPD 14 wurde ausgeschlossen. Im Alter von 8 ⁸/₁₂ Jahren zeigte eine BERA-Untersuchung (BERA= Brainstem Evoked Response Audiometry) einen sensorineuralen Hörverlust. Er sprach weiterhin in Zwei-Drei-Wort-Sätzen, benutzte eine elektronische Sprechhilfe und besuchte eine Förderschule.

Molekulare Karyotypisierung

Die molekulare Karyotypisierung mit einem Illumina Sentrix Human610-Quad Array ergab 40 potentielle CNVs. Nach Anwendung der Filterkriterien (Filterkriterien für die CNV-Analyse, S. 29) verblieben drei CNVs zur Verifizierung mittels qPCR, von denen zwei verifiziert werden konnten (Tab. 16). Die Segregationsanalysen durch qPCR zeigte für einen CNV (Deletion 2p14-p15) (Abb. 16) eine normale Kopienzahl bei den Eltern, was auf eine *de novo*-Entstehung schließen lässt. Für den zweiten bestätigten CNV (Deletion 2p6.2) wurde eine maternale Herkunft nachgewiesen.

Chromosom / Bande	Anfang	Ende	Länge (Mb)	Kopienzahl	Enthaltene Marker	logBayes-Faktor	Herkunft
2 p14-p15	63.756.740	65.983.507	2,23	1	504	2095,04	<i>de novo</i>
2 p16.2	54.212.021	54.271.149	0,06	1	18	92,25	maternal
9 q22.33	98.946.366	99.015.827	0,07	3	11	11,34	n.v.

Tab. 16. Eigenschaften und Ergebnis der qPCR der drei nach Anwendung der Filterkriterien verbleibenden CNVs. n.v. nicht verifiziert

Die heterozygote *de novo*-Deletion umfasste 504 Marker. Als proximalster SNP-Marker der Deletion wurde rs171902 an Position Chr2:63.756.740 bestimmt und als distalster SNP-Marker der Deletion rs11674730 an Position Chr2:65.983.507 (NCBI 36). Daraus ergibt sich als genomische Position der Deletion von chr2:63.756.740-65.983.507. Die Deletion enthielt elf proteinkodierende Gene (RefSeq): *UGP2*, *VPS54*, *PEL1I*, *HSPC159*, *AFTPH*, *SERTAD2*, *SLC1A4*, *CEP68*, *RAB1A*, *ACTR2*, und *SPRED2*.

Vergleich Patient 15/08 – DECIPHER-Datenbank

Die Suche nach weiteren Patienten mit überlappenden Deletionen in der MRNET-Datenbank war erfolglos. In der DECIPHER-Datenbank war eine weitere Patientin (Tab. 17) mit einer überlappenden Deletion in 2p14-p15 verzeichnet. Ihre 2.84-Mb große heterozygote *de novo*-Deletion in Chromosom 2p14-p15 (Chr2:62,540,632-65,377,490) wurde mittels Array-CGH im Institut für klinische Genetik im Rigshospitalet (Kopenhagen, Dänemark) mit einem Agilent Human Genome Microarray Kit 244A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) detektiert (Abb. 16). Die Deletion enthielt 15 Gene (RefSeq): *TMEM17*, *EHBPI*, *OTX1*, *LOC51057*, *MDH1*, *UGP2*, *VPS54*, *PEL1I*, *HSPC159*, *AFTPH*, *SERTAD2*, *SLC1A4*, *CEP68*, *RAB1A* und *ACTR2*.

	Patient 15 / 08 Patient 1	Patient 2	Krabichler et al., 2012
Alter	5 ¹¹ / ₁₂ Jahre	11 Jahre	1 ¹⁰ / ₁₂ Jahre
Array	Illumina 610k	Agilent 244 A	Illumina HumanCytoSNP-12
Lokalisation der Deletion	2: 63.756.740-65.983.507	2: 62.540.632-65.377.490	n.r.
Größe (Mb) der Deletion	2,23	2,84	2,9
Anzahl der enthaltenen Gene	11	15	12
Herkunft der Deletion	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>
Psychomotorische Entwicklung	Verzögert Soziale Interaktion: 15 Mo.; Freies Sitzen: 14 Mo.; Erste Worte: 3 J.	Verzögert Freies Gehen: 18 Mo., erste Worte: 3 J.	Verzögert Fehlende Sprachentwicklung
Schweregrad der ID (nach Zhang et al., 2005)	2	2	?
Wachstumsparameter	5 ¹¹ / ₁₂ J.: Größe P 75- P 90, Gewicht P 25- P 50, Kopfumfang P 3	11 J.: Größe P 50; Gewicht P 50; Kopfumfang: P 25- P 50	Niedriger Normalbereich
Dysmorphiezeichen	Hohe Stirn / langes Gesicht, schmales Oberlippenrot, leichte Trichterbrust, leichte Syndaktylie II/III des rechten Fußes, bilaterale atypische Vierfingerfurche	-	Hohe Stirn. Schütterer Augenbrauen, kurze Lidspalten, Hypertelorismus, schmales Oberlippenrot, tiefsitzende Ohren
Krampfanfälle	Generalisierte Krampfanfälle	n.b.	n.b.
Augen/Ohren	Hypermetropie, verengter Gehörgang, sensorineuraler Hörverlust,	-	beidseitige Taubheit mit einer Dysplasie semizirkulären Kanäle
Weiteres	Robertson'sche Translokation 13/14 (maternal), UPD 14 ausgeschlossen.	Hypernasale Sprache	Muskuläre Hypotonie

Tab. 17. Vergleich der drei Patienten mit heterozygoten *de novo*-Deletionen in 2p14-p15. n.b.: nicht berichtet; Mo: Monate; J.: Jahre; P: Perzentile; UPD: Uniparentale Disomie; ?: aufgrund fehlender klinischer Informationen nicht zu beurteilen

4.4.2. De novo Mikrodeletion Xp11.3-p11.4

Patientenbeschreibung (72/00)

Patientin 72/00 wurde als zweites Kind deutscher, nicht verwandter Eltern geboren, ihr älterer Bruder ist gesund. Die Schwangerschaft verlief unauffällig und bis auf einen Nikotinabusus von zehn Zigaretten am Tag lagen keine Risikofaktoren vor. Die Patientin wurde in der 40. SSW mit einem Gewicht von 3490 g (P 50 - P 75), einer Länge von 50 cm (P 10 - P 25) und einem Kopfumfang von 32 cm (ca. 0,4 cm < P 3) geboren. Nach anfangs unauffälliger frühkindlicher Entwicklung fiel bei der U4-

Untersuchung eine generalisierte Muskelhypertonie mit asymmetrischer Körperhaltung auf, die durch Krankengymnastik therapiert wurde. Die weitere Entwicklung der Patientin war verzögert. Freies Laufen war mit 18 Monaten möglich, erste Worte sprach die Patientin ebenfalls zu diesem Zeitpunkt. Im Alter von 4 Jahren sprach die Patientin erste Zweiwortsätze. Ein Entwicklungstest (Griffiths-Entwicklungsskalen) im Alter von 6 Jahren und 5 Monaten ergab einen Entwicklungsstand entsprechend einer 2-2^{1/2} jährigen. Bei einer augenärztlichen Untersuchung wurden eine Hyperopie, ein Astigmatismus links und eine Anisometropie festgestellt. Eine MRT-Untersuchung des Schädels wurde im Alter von einem Jahr durchgeführt und ergab bei gezielter Nachbefundung nach der genetischen Diagnosestellung das Ergebnis einer pontocerebellären Hypoplasie. Bei der Untersuchung im Alter von 10 ⁵/₁₂ Jahren zeigte die Patientin eine ID entsprechend einem Schweregrad 3 nach Zhang et al. (Zhang et al., 2005). Größe, Gewicht und Kopfumfang lagen unter der dritten Perzentile. Als faciale Dysmorphien lagen ansteigende Lidachsen, ein Telekanthus, eine breite Nasenwurzel und -spitze, eine hypoplastische Maxilla und große Ohren vor. Weiterhin fielen eine Brachydaktylie der 5. Finger beidseits, verbreiterte Endglieder aller Finger und Knick-Senk-Füße auf. Die Untersuchung der X-Inaktivierung im Blut ergab eine starke Verschiebung (*skewing*) (97:3).

Molekulare Karyotypisierung

Die molekulare Karyotypisierung wurde mit einem Illumina Sentrix Human610-Quad Array durchgeführt und zeigte 62 potentielle CNVs. Nach Anwendung der Filterkriterien (Filterkriterien für die CNV-Analyse, S. 29) verblieben zwei heterozygote CNVs zur Verifizierung per qPCR (Tab. 18). Beide CNVs konnten durch qPCR verifiziert werden. Die Segregationsanalyse durch qPCR zeigte für einen CNV eine normale Kopienzahl bei den Eltern, was auf eine *de novo*-Entstehung schließen lässt. Der zweite bestätigte CNV war elterlicher Herkunft.

Chromosom Bande	Anfang	Ende	Länge (Mb)	Kopienzahl	Marker	logBayes Faktor	Herkunft
X p11.3-p11.4	41.378.849	45.842.600	4,46	1	466	721,23*	<i>de novo</i>
19 q13.42	60.084.567	60.254.214	0,17	3	53	82,97	elterlich

Tab. 18. CNVs nach Anwendung der Filterkriterien und das Ergebnis der qPCR bei Patientin 72/00. *: gemittelt: Der Algorithmus QuantiSNP errechnete mehrere einzelne CNVs, die nach visueller Kontrolle im Programm GenomeStudio als eine durchgängige Deletion diagnostiziert wurden. Aus den logBayes-Faktoren der einzelnen errechneten Deletionen wurde ein gewichteter Durchschnittswert ermittelt.

Die heterozygote *de novo*-Deletion enthielt 466 Marker. Der distalste SNP-Marker der Deletion war rs5918213 an Position ChrX: 41.378.849 (NCBI 36). Der proximalste SNP-Marker der Deletion war rs28628673 an Position ChrX: 45.842.600 (NCBI 36) (Abb. 17). Daraus ergab als genomische

Lokalisation der Deletion ChrX:41.378.849-45.842.600. Die Deletion enthielt 11 Gene (RefSeq): *CXorf36*, *UTX*, *DUSP21*, *FUNDC1*, *EFHC2*, *NDP*, *MAOB*, *MAOA*, *GPR82*, *GPR34* und *CASK*.

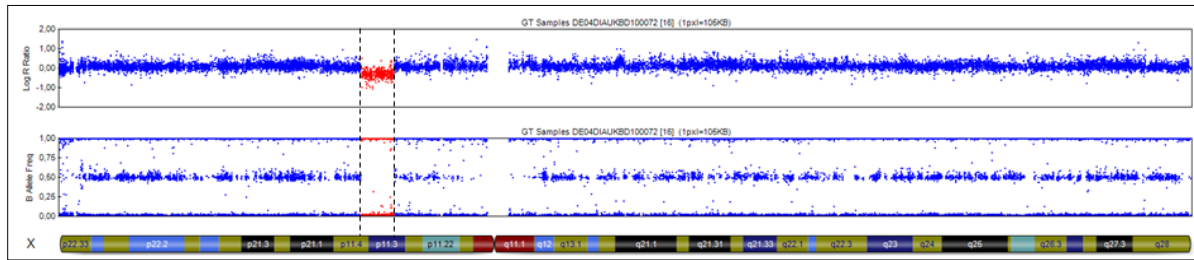


Abb. 17. Patientin 72/00: Ergebnis des SNP-Arrays für das X-Chromosom. Oben: LogR Ratio. Unten: B-Allel-Frequenz. Die Marker in der Deletion sind rot hervorgehoben. Die gestrichelten Linien zeigen die Grenzen der Deletion.

4.4.3. De novo Mikrodeletion 5q31.2

Patientenbeschreibung (29/09)

Der 7 ¹/₄ Jahre alte Patient 29/09 war das dritte Kind gesunder nicht verwandter deutscher Eltern. Die Familiengeschichte war bis auf ein Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom und Ticks beim ältesten Bruder und ein Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom bei einem Onkel mütterlicherseits unauffällig. Nach unauffälliger Schwangerschaft wurde der Patient in der 40. SSW mit einem Gewicht von 2880g (P 3), einer Größe von 49 cm (P 3-P 10) und einem Kopfumfang von 34 cm (P 3-P 10) geboren. Der Apgar-Wert lag bei 10/10 und es wurden keine Fehlbildungen diagnostiziert. In der Neonatalperiode bestanden Fütterungsschwierigkeiten und die Eltern berichteten sowohl von einer Muskelhypotonie als auch von im Vergleich zu seinen Geschwistern längeren Schlafperioden. Im Alter von vier Wochen wurde eine Mikrozephalie diagnostiziert.

Die Entwicklung des Patienten verlief besonders im sprachlichen Bereich verzögert. Im Alter von 12 Monaten konnte er ohne Unterstützung sitzen und mit 21 Monaten frei laufen. Seine ersten Worte sprach er mit 18 Monaten, im Alter von 7 Jahren kommunizierte er nur mit Ein-Wort-Sätzen. Eine Münchener Funktionelle Entwicklungsdiagnostik (MFED) zeigte im Alter von 3 Jahren eine Entwicklungsverzögerung um 1,5 Jahre. Zu dieser Zeit bestanden Schlafstörungen und der Patient zeigte ein autoaggressives und hyperaktives Verhalten. Ein kraniales MRT im Alter von 2 ³/₁₂ Jahren zeigte eine bilaterale Hypoplasie der Kleinhirntonsillen. Im Alter von 5 Jahren wurden eine milde Hyperopie und ein Astigmatismus diagnostiziert.

Bei der Vorstellung in der humangenetischen Beratung im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn im Alter von 7 ³/₁₂ Jahren wog er 23 kg (P 25-P 50) und war 116,5 cm groß (P 3). Mit einem Kopfumfang von 50 cm (<P 3) war er weiterhin mikrozephal. Er zeigte eine milde Entwicklungsverzögerung und leichte Dysmorphien wie tief sitzende Augen, eine dünne Oberlippe,

einen hohen Gaumen, eine milde Mikroretrognathie sowie prominente Eckzähne, die auch beim Vater vorlagen. Sein Mund stand meistens offen. Es wurden drei Café-au-lait-Flecken festgestellt und im Bereich der Zehen milde Auffälligkeiten bemerkt (leichte Syndaktylie der 2. und 3. Zehen, laterale Deviation der 2. und mediale Deviation der 3. Zehen, hypoplastische Nägel der fünften Zehen). Vor der molekularen Karyotypisierung blieben verschiedene genetische Analysen wie eine konventionelle Karyotypisierung, ein Subtelomer-Screening, eine Testung auf FXS und eine MLPA basierte Testung auf häufige Mikrodeletions-Syndrome (SALSA MLPA Kit P245 Microdeletion Syndromes-1, MRC-Holland, Amsterdam, Niederlande) ohne pathologischen Befund.

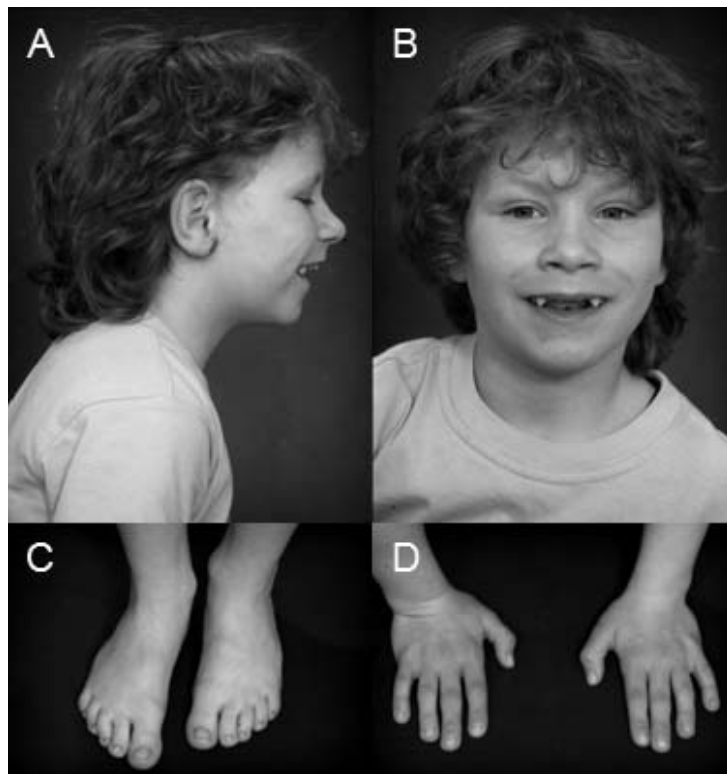


Abb. 18. Patient im Alter von 7 $\frac{1}{4}$ Jahren. A) Profilansicht: Milde Mikroretrognathie; tief liegende Augen; B) Vorderansicht: dünne Oberlippe, spitze Eckzähne C), D) Hände/Füße: milde Auffälligkeiten. Entnommen aus Kleffmann, Zink et al. (2012) *5q31 Microdeletions: Definition of a Critical Region and Analysis of LRRTM2, a Candidate Gene for Intellectual Disability*. Mol Syndromol, 3: 68-75

Molekulare Karyotypisierung

Die Molekulare Karyotypisierung wurde auf einem Illumina Human660W-Quad v1 Bead Chip durchgeführt und ergab 49 potentielle CNVs. Nach Anwendung der Filterkriterien blieb ein CNV zur Verifizierung durch qPCR übrig (Tab. 19). Durch qPCR an kindlicher und elterlicher DNA konnte der CNV verifiziert und eine *de novo*-Entstehung nachgewiesen werden.

Chromosom Bande	Anfang	Ende	Länge (Mb)	Kopienzahl	Marker	logBayes	Herkunft
5 q31.2	137.750.721	138.687.057	0,94	1	103	292,063	<i>de novo</i>

Tab. 19. Eigenschaften und Ergebnis der qPCR des nach Anwendung der Filterkriterien verbliebenen CNVs.

Die heterozygote *de novo*-Mikrodeletion enthielt 103 Marker und war 0,94 Mb groß. Der proximalste SNP-Marker der Deletion war rs3798149 an Position Chr5: 137750721 (NCBI 36). Der distalste SNP-Marker der Deletion war rs6866346 an Position Chr5: 138687057 (NCBI 36) (Abb. 19). Daraus ergibt sich eine genomische Position von Chr5: 137.750.721-138.687.057. Die heterozygote *de novo*-Deletion enthielt neun proteinkodierende Gene (RefSeq): *KDM3B*, *REEP2*, *EGR1*, *ETF1*, *HSPA9*, *CTNNA1*, *LRRTM2*, *SIL1* und *MATR3*.

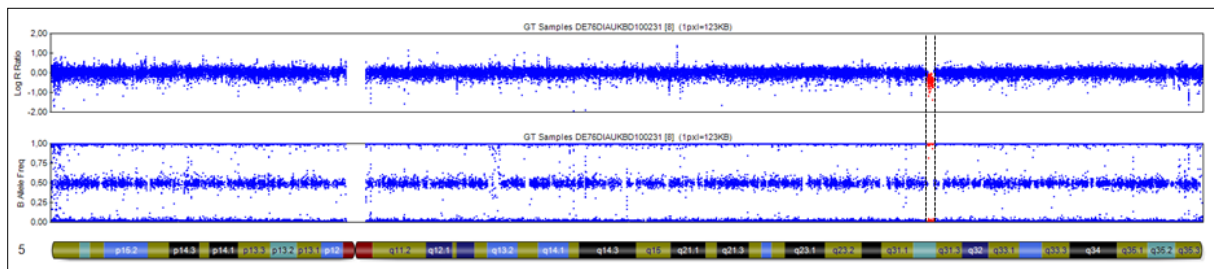


Abb. 19. Patient 29/09: Ergebnis des SNP-Arrays für Chr. 5. Oben: LogR Ratio. Unten: B-Allele-Frequenz. Die Marker in der Deletion sind rot hervorgehoben. Die gestrichelten Linien zeigen die Grenzen der Deletion.

Sequenzierung *LRRTM2*

Durch die Sequenzierung von *LRRTM2* konnte bei 20 von 330 nichtverwandten Patienten mit ID der SNP rs11744283 (*minor allele frequency* / MAF) 1,6%) und bei sechs Patienten ein bisher nicht beschriebener heterozygoter SNP in Intron 1 (c.4+74A>G; ENST00000274711; ENST00000518785; ENST00000521094) nachgewiesen werden.

Die Interpretation eines möglichen Einflusses des bisher nicht beschriebenen SNPs auf das Spleißen der *LRRTM2*-prä-mRNA wurde mit der Hilfe von zwei Vorhersage-Algorithmen durchgeführt (<http://www.mutationtaster.org/>; http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Beide Programme sagten keinen Einfluss des SNPs auf das Spleißen der prä-mRNA von *LRRTM2* voraus.

Für die Segregationsanalyse des SNPs in Intron 1 standen die DNAs der Eltern eines der sechs Patienten zur Verfügung. Die Sequenzierung der Eltern zeigte, dass auch die gesunde Mutter den SNP trug (Abb. 20).

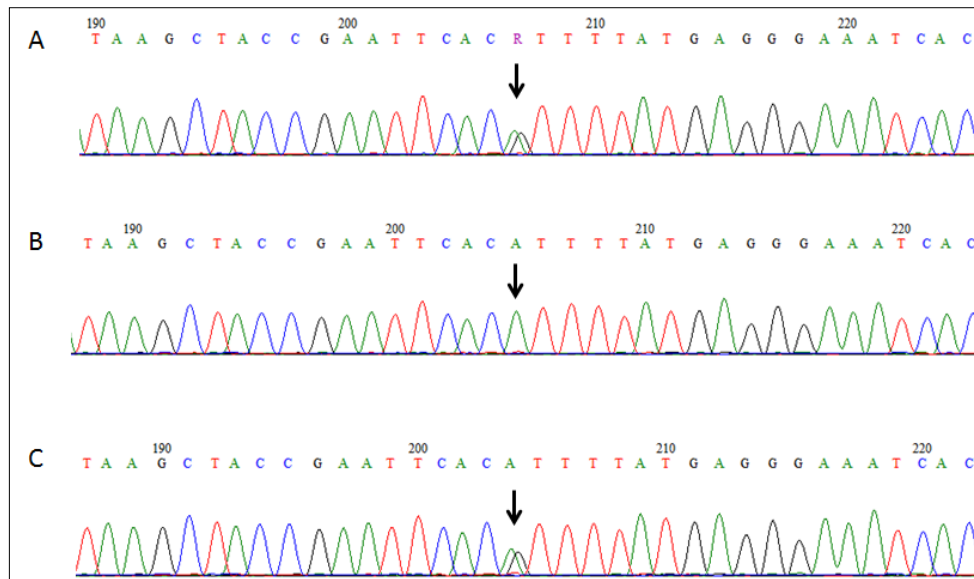


Abb. 20. Elektropherogramm. A) Patient mit heterozygotem SNP c.4+74A>G. B) Vater des Patienten mit WT-Allelen. C) Mutter des Patienten mit heterozygotem SNP c.4+74A>G. Pfeile markieren die Position des SNPs.

4.4.4. De novo Mikrodeletion 15q22.1-q22.2

Patientenbeschreibung (22/09)

Patient 22/09 war das dritte Kind deutscher nicht verwandter Eltern. Die beiden älteren Geschwister zeigten eine unauffällige Entwicklung. Die Schwangerschaft verlief unauffällig und die Geburt erfolgte spontan zum errechneten Termin. Die Geburtsmaße lagen im Normbereich. Die psychomotorische Entwicklung verlief anfangs unauffällig. Im weiteren Verlauf wurden die motorischen Meilensteine jedoch nur verzögert erreicht. Der Patient konnte mit 9 Monaten frei sitzen und mit 24 Monaten frei laufen. Die ersten Worte sprach der Patient mit einem Jahr, die weitere Sprachentwicklung verlief verzögert. Zwischen dem 2. und dem 4. Lebensjahr fand eine Frühförderung in einem Sozialpädiatrischen Zentrum (SPZ) statt. Danach besuchte er einen integrativen Kindergarten und eine Schule mit ganzheitlicher Förderung. Eine Entwicklungsdiagnostik mit 6 ⁸/₁₂ Jahren ergab einen IQ von 55-60. Ein Handröntgen mit 14 Jahren zeigte ein retardiertes Knochenalter (entsprechend dem 11. Lebensjahr). Sein Wachstum war perzentilenparallel (P 50). Der Patient zeigte ein sehr offenes und freundliches Verhalten und eine gute verbale Ausdrucksweise. In seinem Essverhalten musste er von seinen Eltern häufig gebremst werden. Zum Zeitpunkt der genetischen Beratung im Alter von 14 ¹/₂ Jahren im Institut für Humangenetik der Universität Bonn war der Patient 145,5 cm (7cm < P 3) groß und wog 53 kg (P 25-50). Sein Kopfumfang betrug 52 cm (P 3) und sein Body-Mass-Index (BMI) 25,2 (>P 97). Er wies milde faziale Dysmorphiezeichen wie dünne Augenbrauen, leicht ansteigende Lidachsen, ödematös erscheinende Oberlider mit schmalen Lidspalten, eine kugelige Nasenspitze, ein langes Philtrum, eine dünne Oberlippe und eine volle Unterlippe auf. Desweiteren wurde eine milde

Klinodaktylie des 5. Fingers beobachtet. Seine ID wurde nach Zhang et al. in Stufe 3 eingeteilt (Zhang et al., 2005).

Die sämtlich unauffälligen Voruntersuchungen umfassten ein kraniales MRT, einen Hörtest, Stoffwechseluntersuchungen, eine konventionelle Karyotypisierung, eine FXS-Diagnostik, eine Williams-Beuren-Diagnostik sowie ein Mikrodeletions- und Subtelomer-Screening.

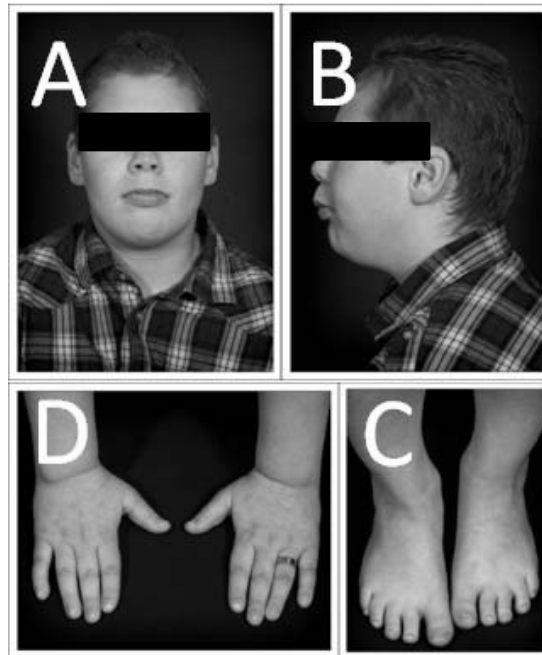


Abb. 21. Patient 22/09 mit heterozygoter *de novo*-Deletion in 15q22.1-q22.2. A) Frontalansicht und B) Profilansicht links: dünne Augenbrauen; leicht ansteigende Lidachsen; ödematös erscheinende Oberlider mit schmalen Lidspalten; kugelige Nasenspitze; langes Philtrum, dünne Oberlippe; evertierte, volle Unterlippe C) Hände milde Klinodaktylie des 5. Fingers re. D) Füße.

Molekulare Karyotypisierung

Die molekulare Karyotypisierung wurde mit einem Illumina H610Q SNP-Array durchgeführt und ergab 35 potentielle CNVs. Nach Anwendung der Filterkriterien verblieben zwei CNVs zur Verifizierung durch qPCR (Tab. 20).

Chromosom Bande	Anfang	Ende	Länge (Mb)	Kopienzahl	Marker	logBayes- Faktor	Herkunft
15 q22.1-q22.2	56.164.760	61.493.779	5,3	1	1485	5351,92	<i>de novo</i>
3 q13.31	116.113.331	116.150.586	0,04	1	8	9,43	n.v.

Tab. 20. Patient 22/09: CNVs nach Anwendung der Filterkriterien und das Ergebnis der qPCR. n.v.: nicht verifiziert

Die heterozygote *de novo*-Deletion 15q22.1-q22.2 enthielt 1485 Marker und war 5,3 Mb groß. Der proximalste SNP-Marker der Deletion war rs8029919 an Position Chr15: 56.164.760 (NCBI 36). Der distalste SNP-Marker der Deletion war rs290537 an Position Chr15: 61.493.779 (NCBI 36) (Abb. 22). Daraus ergibt sich als genomische Position der Deletion Chr15:56.164.760-61.493.779. Die heterozygote *de novo*-Deletion enthielt 28 proteinkodierende Gene (RefSeq): *CAI2*, *APH1B*, *RAB8B*, *RPS27L*, *LACTB*, *TPM1*, *TLN2*, *FAM148B*, *FAM148A*, *VPS13C*, *RORA*, *NARG2*, *ANXA2*, *FOXB1*, *BNIP2*, *GTF2A2*, *GCNT3*, *FAM81A*, *LDHAL6B*, *MYO1E*, *CCNB2*, *RNF111*, *SLTM*, *FAM63B*, *HSP90AB4P*, *ADAM10*, *LIPC* und *AQP9*.

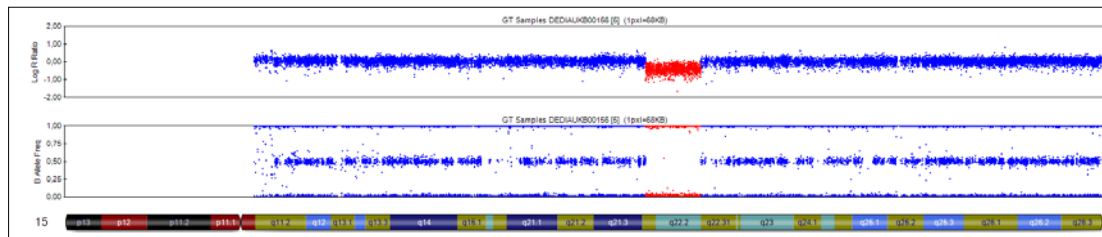


Abb. 22. Ergebnis des SNP-Arrays für Chromosom 15 bei Patient 22/09. Oben: logR Ratio. Unten: B-Allel-Frequenz. Die Marker in der Deletion sind rot markiert.

Vergleich Patient (22/09)-DECIPHER-Datenbank

Die Suche nach weiteren Patienten mit Deletionen, die die heterozygote Deletion in 15q22.1-q22.2 ganz oder teilweise überlappen, in der MRNET-Datenbank war ohne Erfolg. In der Datenbank DECIPHER wurden Einträge zu sieben weiteren Patienten mit überlappenden Deletionen in 15q22.1-q22.2 gefunden. In vier der DECIPHER-Patienten hatten die Deletionen einen *de novo*-Ursprung. Einer der Patienten hatte die Deletion von einem gesunden Elternteil (DECIPHER 250670) geerbt. Bei zwei Patienten war die Herkunft unbekannt, so dass sie für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation nicht sicher verwendbar waren. Drei der vier Patienten mit gesicherten *de novo*-Deletionen waren ID-Patienten (DECIPHER 965, 250885 und 255754). Ein Patient (DECIPHER 250973) zeigte keinerlei Anzeichen für eine ID, sondern war aufgrund einer Nierenfehlbildung, die ebenso bei der Mutter diagnostiziert wurde, auf CNVs untersucht worden.

Sequenzierung *FOXB1*

Die Sequenzierung von *FOXB1* in 330 weiteren ID-Patienten (Kohortenbeschreibung Sanger-Sequenzierung, S.54) erbrachte bisher keine weiteren pathogenen Mutationen.

4.4.5. De novo Mikrodeletion 3q26.33

Patientenbeschreibung (43/01)

Die 2 ⁵/₁₂ Jahre alte Patientin 43/01 war das erste Kind deutscher nicht verwandter Eltern. Bis auf leichte Blutungen in der 12. SSW verlief die Schwangerschaft komplikationslos und die Patientin wurde zum errechneten Termin per Kaiserschnitt nach Geburtsstillstand geboren. Sie war 2940 g schwer (P 10), 51 cm lang (P 50-75) und ihr Kopfumfang betrug 32 cm (P 75-90). Die Neonatalperiode verlief bis auf eine Muskelhypotonie und sich andeutende Ernährungsprobleme unauffällig. Im ersten Lebensjahr wurde eine Speiseröhrenverengung als Ursache der Ernährungsprobleme festgestellt und therapiert. Mit 7 Monaten konnte die Patientin frei sitzen und mit 14 Monaten krabbeln. Freies Laufen war ca. ab dem 4. Lebensjahr möglich, zu diesem Zeitpunkt konnte die Patientin auch Zwei- und Dreiwortsätze eingeschränkt einsetzen. Im Alter von 1 ³/₄ Jahren wurde die Diagnose einer kindlichen Epilepsie gestellt. Im Alter von 7 ¹/₃ Jahren zeigte die Patientin im Bezug auf ihr Sprachverständnis ein Entwicklungsalter von 3 Jahren. Es bestanden keine internistischen Auffälligkeiten. Zum Zeitpunkt der genetischen Beratung mit 2 ⁵/₁₂ Jahren zeigte die Patientin leichte faziale Dysmorphien wie eine breite Nasenwurzel, einen zeltförmigen Mund, eine Mittelgesichtshypoplasie und eine Prognathie. Sie stand auf den Fußinnenkanten. Der Schweregrad der ID nach Zhang et al. wurde als Stufe 3 klassifiziert (Zhang et al., 2005).

Molekulare Karyotypisierung

Die Molekulare Karyotypisierung wurde mit einem Illumina Human660W-Quad v1 Bead Chip durchgeführt und ergab 43 potentielle CNVs. Nach Anwendung der Filterkriterien verblieben drei CNVs zur Verifizierung per qPCR (Tab. 21). Von diesen konnten zwei bestätigt werden.

Chromosom Bande	Anfang	Ende	Länge (Mb)	Kopienzahl	Marker	logBayes	Herkunft
3q26.33	182.708.440	182.943.281	0,2	1	27	81,7056	<i>de novo</i>
13q32.1	96.902.903	96.928.731	0,02	1	20	26,3475	n.v.
Xp22.3	1.689.672	1.711.981	0,02	4	18	19,1928	paternal

Tab. 21. Patientin 43/01: CNVs nach Anwendung der Filterkriterien und das Ergebnis der qPCR. n.v.: nicht verifiziert

Die heterozygote *de novo*-Deletion enthielt 27 Marker und war 234,8 kb groß. Der proximalste SNP-Marker der Deletion war rs766100 an Position Chr3: 182.708.440 (NCBI 36). Der distalste SNP-Marker

der Deletion war rs7610679 an Position Chr3: 182.943.281 (NCBI 36) (Abb. 23). Daraus ergibt sich für die Deletion eine genomische Position von Chr3:182.708.440-182.943.281. Die heterozygote *de novo*-Deletion enthielt nur ein proteinkodierendes RefSeq-Gen: *SOX2* (*sex-determining region Y-box 2*).

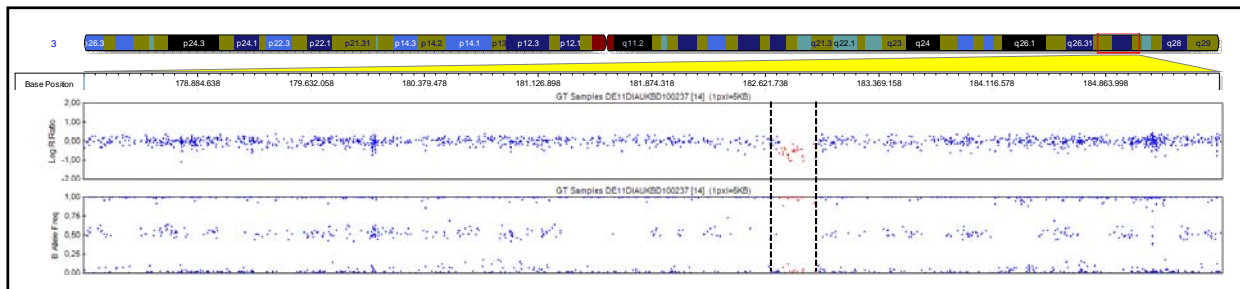


Abb. 23. Patientin 43/01: Ergebnis des SNP-Arrays für einen distalen Abschnitt von Chromosom 3q. Oben: LogR Ratio. Unten: B-Allel-Frequenz. Die Marker in der Deletion sind rot hervorgehoben. Die gestrichelte Linie markiert die Grenzen der Deletion

Sequenzierung *SOX2*

Die Sequenzierung von *SOX2* in der Indexpatientin und 191 weiteren ID-Patienten (Kohortenbeschreibung Sanger-Sequenzierung, S.54) erbrachte keine pathogenen Mutationen.

4.4.6. *De novo* Mikrodeletion 9q33.3-q34.11

Patientenbeschreibung (73/08)

Die knapp ein Jahr alte Patientin 73/08, im Folgenden Patientin 1 genannt, war das erste Kind nicht verwandter türkischer Eltern. Die Schwangerschaft verlief zunächst unauffällig. Im 6. und 8. Schwangerschaftsmonat traten vorzeitige Wehen auf. Die Geburt erfolgte in der 42. SSW unter Einsatz einer Saugglocke. Die Patientin war zum Zeitpunkt der Geburt 3135 g (P 10) schwer, 49 cm (knapp <P 10) lang und hatte einen Kopfumfang von 32 cm (0,7 cm < P 3). Bei der U3 fielen ein Strabismus divergens links und eine leichte Fußfehlhaltung beidseits auf. Bei der U5 fand noch keine Drehung um die Längsachse statt. Die Patientin präsentierte sich mit einer zentralen Tonus- und Koordinationsstörung mit schulterbetonter Asymmetrie. Die Muskulatur war dabei rumpf- und schultergürtelbetont hypoton. Die körperliche Untersuchung zum Zeitpunkt der genetischen Untersuchung im Alter von einem Jahr ergab ein adipöses Erscheinungsbild, eine rechts okzipital abgeflachten Schädelasymmetrie, einen Hypertelorismus, einen Epikanthus, eine kleine Nase, angewachsene Ohrläppchen, einen kurzen Hals, konisch zulaufende Finger, ein großes Gesäß, kräftige Beine und eine Spitzfußhaltung beider Füße. Die ID-Einteilung gestaltete sich auf Grund des geringen Alters der Patientin als schwierig. Ein ID-Grad nach Zhang et al. von mindestens 4 wurde angenommen.

Molekulare Karyotypisierung

Die molekulare Karyotypisierung wurde im Rahmen der SNP-Array-Diagnostik mit einem HumanOmni1-Quad-SNP-Array durchgeführt und ergab vier potentielle CNVs. Nach Anwendung der Filterkriterien verblieb eine Region zur Verifizierung (Tab. 22). Die Verifizierung durch qPCR bestätigte das Vorliegen einer Mikrodeletion von Teilen der Chromosomenbanden 9q33.3-q34.11, und wies dessen *de novo*-Entstehung nach.

Chromosom Bande	Anfang	Ende	Länge (Mb)	Kopienzahl	Marker	logBayes- Faktor	Herkunft
9 q33.3-q34.11	128.503.434	130.264.010	1,76	1	698	419,7*	<i>de novo</i>

Tab. 22. Patientin 73/08: CNV nach Anwendung der Filterkriterien und das Ergebnis der qPCR. *: gemittelt: Der Algorithmus QuantiSNP errechnete mehrere einzelne CNVs, die nach visueller Kontrolle im Programm GenomeStudio als eine durchgängige Deletion diagnostiziert wurden. Aus den logBayes-Faktoren der einzelnen errechneten Deletionen wurde ein gewichteter Durchschnittswert ermittelt.

Die heterozygote *de novo*-Deletion enthielt 698 Marker und war 1,76 Mb groß. Der proximalste in der Deletion enthaltene SNP-Marker war rs3906146 an Position Chr9: 128.503.434 (NCBI 36). Der distalste SNP-Marker der Deletion war rs7032246 an Position Chr9: 130.264.010 (NCBI 36) (Abb. 24). Daraus ergibt sich eine genomische Position der Deletion von Chr9: 128.503.434-130.264.010. Die *de novo* entstandene Deletion enthielt 40 proteinkodierende RefSeq-Gene.

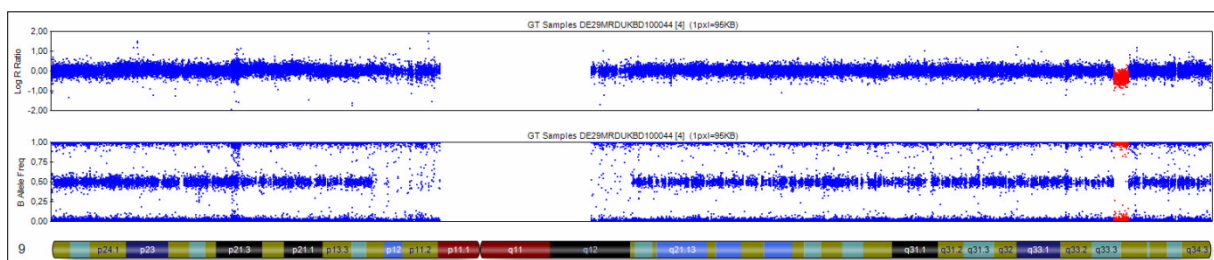


Abb. 24. Patientin 51/10: Ergebnis des SNP-Arrays für Chromosom 9. Oben: LogR Ratio. Unten: B-Allel-Frequenz. Die Marker in der Deletion sind rot hervorgehoben.

Vergleich Patient 73/08- DECIPHER/MRNET-Datenbank

Mit Hilfe der DECIPHER- und der MRNET-Datenbanken konnten fünf weitere ID-Patienten (P2-P6) mit nicht-rekurrenten überlappenden Deletionen in 9q33.3-q34.11 rekrutiert werden. Vier der Patienten trugen heterozygote *de novo*-Deletionen (Tab. 23). Die Deletion von Patientin P4 war von ihrer Mutter ererbt, bei der ebenfalls u.a. eine milde ID diagnostiziert wurde. Die postnatalen Wachstumsparameter der Mutter lagen im Normbereich und sie zeigte keine fazialen Dysmorphiezeichen. Weitere Details

zum klinischen Erscheinungsbild der Mutter konnten von den Kooperationspartnern nicht zur Verfügung gestellt werden.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Tohyama et al. 2008 Pat. 2	Saitu et al. 2012 Pat. 2	Mignot et al. 2011	Zusammen
Bande	9q33.3-q34.11	9q33.3-q34.11	9q33.3-q34.11	9q33.3	9q33.3-q34.11	9q33.3-q34.11	9q33.3-q34.11	9q33.3-q34.11	9q33.3-q34.11	
Position (NCBI 36)	128,5 -130,3 Mb	128,7 -129,9 Mb	127,5 -130,3 Mb	128,7 -129,2 Mb	127,0 -132,0 Mb	129,0 -130,2 Mb	ca. 128,1 -130,2 Mb*	ca. 129,0 -131,9 Mb*	ca. 128,4-129,5 Mb*	
Größe (Mb)	1,76	1,3	2,8	0,43	4,13	1,23	2,11	2,8	3,3	
Anzahl Gene RefSeq	40	26	44	3	76	36	41	70	?	
Herkunft der Deletion	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	maternal	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	
Array	Illumina 1M	Affymetri x 6.0 SNP	Affymetri Cyto 2.7M	Agilent 44K	Agilent 44K	Nimblegen CGH 3x720K	BAC array CGH customized	Affymetri aCGH customized	Agilent 44 A	
Alter (Jahre)	3	5	1 ⁵ / ₁₂	5 ³ / ₄	3 ¹ / ₃	11 ⁷ / ₁₂	1 ¹¹ / ₁₂	k.A.	10	
Geschlecht	w	m	w	w	w	w	w	m	w	
ID	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9/9 (100%)
SEV	++	++	+	++	++	++	++	k.A.	++	8/8 (100%)
MEV	++	++	(?) ^{##}	+	++	++	++	k.A.	++	7/8 (88%)
Körpermaße Geburt	KU < P3	Länge < P3, Gewicht < P3, KU < P3	Gewicht < P3	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	Länge < P3, Gewicht < P3	unauffällig	
Körpermaße Beratung	KU < P3	Länge < P3, KU < P3	Länge < P3, KU < P3	Länge < P3, KU < P3	unauffällig	BMI > P97	KU < P3	k.A.	KU < P3	
Mikrozephalie	+	+	+	+	-	-	+	-	+	6/9 (67%)
Brachyzeephalie	+	-	-	+	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	
Dysmorphien (bei mindestens 2 Patienten)	Rundes Gesicht, hoher vorderer Haaransatz, abfallende Lidachsen, kurze Nase, konische Finger	Abfallende Lidachsen, dünne Oberlippe	Kurze konische Finger	Hoher vorderer Haaransatz, kurze Nase	-	Rundes Gesicht, kurze Nase, dünne Oberlippe	k.A.	k.A.	k.A.	
Hypotonie	+	+	+	+	+	+	+	k.A.	k.A.	7/7 (100%)
Krampf-anfälle	- (pathologisches EEG)	- (pathologisches EEG)	-	+	+	-	+	+	+	6/9 (67%)
MRT-Auffälligkeiten	Leicht verzögerte Myelinisierung	Verzögerte Myelinisierung	-	Temporo-occipitale Pachygyrie	-	-	Dünnes Corpus callosum, Diffuse Hypomyelinisierung, korticale Atrophie	Schmales Corpus callosum, relativ kleines Cerebellum	Globale Atrophie der zerebellären Hemisphäre	
Auffälligkeiten der Augen	Strabismus	Strabismus, Hypermetropie	-	Strabismus	Frühgeborenen-Retinopathie, Mikrophthalmie bds., Strabismus	Strabismus	k.A.	k.A.	k.A.	Strabismus: 5/6 (83%)

Tab. 23. Klinische Beschreibung der Patienten mit Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11. w: weiblich; m: männlich; KU: Kopfumfang; +: vorhanden; ++: schwerer Phänotyp; -: nicht vorhanden; k.A.: keine Angaben, (?): Aufgrund des Alters kann keine Angabe über eine motorische Entwicklungsverzögerung getätigt werden. *: Die Positionsangaben wurden aufgrund der Genangaben in der jeweiligen Veröffentlichung geschätzt; SEV: Sprachentwicklungsverzögerung; MEV: motorische Entwicklungsverzögerung; WA: Wachstumsauffälligkeiten; Zusammen: Zur Berechnung der Prozentzahlen wurden nur die Patienten herangezogen, bei denen für die jeweiligen klinischen Merkmale Aussagen gemacht werden konnten.

4.4.7. De novo Mikrodeletion Xq27.3-q28

Patientenbeschreibung (5/07)

Die 16^{10/12} Jahre alte Patientin, im Folgenden Patientin 1 genannt, war das dritte Kind deutscher nicht verwandter Eltern. Ihre beiden Brüder waren gesund und die weitere Familiengeschichte war unauffällig. Nach unauffälliger Schwangerschaft wurde die Patientin zum Termin geboren. Bei der Geburt kam es zu einer Nabelschnurumschlingung. Die Geburtsmaße lagen im grenzwertig oberen Normbereich (Gewicht 4.620 g (P 97), Größe 56 cm (P 97), Kopfumfang 36 cm (P 90)). Bereits in den ersten Lebensmonaten vermuteten die Eltern eine verzögerte Entwicklung, ein Kinderarzt bestätigte dies im Alter von 3 Monaten. Die Meilensteine wurden verzögert erreicht, erste Worte sprach die Patientin mit 18 Monaten und mit 3 Jahren begann sie, ganze Sätze zu benutzen. Frei laufen konnte sie mit 25 Monaten. Ihre Ergebnisse eines Entwicklungstests (Denver Developmental Scale) entsprachen im Alter von 5 Jahren einem Entwicklungsalter von 3-3^{1/2} Jahren. Eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie vor allem der Gesichtsmuskeln bedingte eine Hypersalivation. Bei bestehenden Verhaltensauffälligkeiten (Passivität, anhaltendes Daumenlutschen) begann sie mit 8^{1/4} Jahren eine Psychotherapie. Der Pubertätsverlauf war unauffällig und ihre erste Regelblutung bekam die Patientin mit 14^{1/2} Jahren.

Bei der Vorstellung in der humangenetischen Beratung im Institut für Humangenetik der Universität Bonn im Alter von 16^{10/12} Jahren wog sie bei einer Größe von 1,68 m (P 50-P 75) 113 kg (>P 97). Ihr Kopfumfang betrug 57,5 cm (>P 97). Sie hatte eine milde ID (Stufe 3 nach Zhang et al. (Zhang et al., 2005)) und eine muskuläre Hypotonie. Ihre Eltern berichteten von einer schweren Hyperphagie sowie mangelndem Sättigungsgefühl. Ihre soziale Interaktion war adäquat. Sie zeigte nur milde Dysmorphien wie ein langes Gesicht, einen leichten Hypertelorismus, eine kugelige Nasenspitze und ein prominentes Kinn. Im Bereich der Hände fielen konisch geformte Finger und eine Überbeweglichkeit der Finger- und Handgelenke auf. Des Weiteren erschienen ihre beiden fünften Finger ebenso wie die vierten und fünften Zehen verkürzt. Voruntersuchungen beinhalteten eine Echokardiographie, eine konventionelle Karyotypisierung (400-500 Banden), eine Untersuchung auf Mukopolysaccharidosen, sowie molekulargenetische Untersuchungen auf ein Prader-Willi-Syndrom und eine maternale UPD 14. Sämtliche Voruntersuchungen ergaben unauffällige Resultate.

Molekulare Karyotypisierung

Die molekulare Karyotypisierung wurde mit einem Illumina Sentrix HumanHap 550-Duo v3 BeadChip in Kombination mit einem HumanCNV-12 durchgeführt und ergab 12 potentielle CNVs. Nach Anwendung der Filterkriterien verblieben drei CNVs zur Verifizierung. Durch die qPCR wurde nur

einer der CNVs verifiziert und bei den Eltern nicht nachgewiesen, was auf eine *de novo*-Entstehung schließen lässt (Tab. 24).

Chromosom Bande	Anfang	Ende	Länge (Mb)	Kopienzahl	Marker	logBayes	Herkunft
14q33.32	103.623.797	103.840.194	0,2	4	42	35,5109	n.v.
14q33.32	104.197.399	104279612	0,08	4	14	11,1	n.v.
Xq27.3-q28	144.934.242	148.461.832	3,5	1	450	418.082	<i>de novo</i>

Tab. 24. Patientin 05/07: CNVs nach Anwendung der Filterkriterien und das Ergebnis der qPCR. n.v.: nicht verifiziert

Die heterozygote *de novo*-Deletion enthielt 450 Array-Marker. Der proximalste SNP-Marker der Deletion war rs5965673 an Position ChrX: 144.934.242 (NCBI 36) und der distalste SNP-Marker rs17252760 an Position ChrX: 148.461.832 (NCBI 36) (Abb. 25). Daraus ergibt sich für die Deletion die genomische Position ChrX: 144.934.242-148.461.832. Die Deletion enthielt 5 Gene (RefSeq): *FMR1*, *FMR1NB*, *AFF2/FMR2*, *IDS*, und *CXorf40A*.

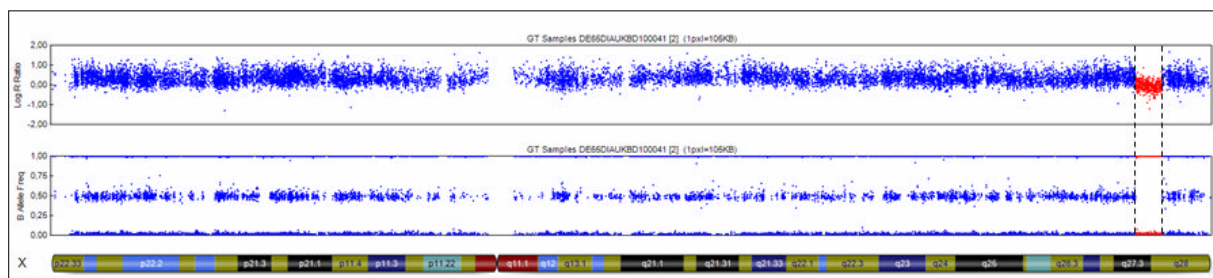


Abb. 25. Ergebnis des SNP-Arrays für Chromosom X bei Patientin 1 (5/07). Oben: LogR Ratio. Unten: B-Allel-Frequenz. Die Marker in der Deletion sind rot hervorgehoben.

Vergleich Patientin 5/07-DECIPHER-Patienten

Während eine Suche nach weiteren Patientinnen mit Deletionen in Xq27.3-q28 in der MRNET-Datenbank ergebnislos blieb, konnten in der DECIPHER Datenbank zwei weitere Patientinnen (Patientin 2 und Patientin 3) identifiziert und rekrutiert werden (Tab. 25).

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Alter	16 ¹⁰ / ₁₂ Jahre	3 ¹ / ₂ Jahre	9 Jahre
Array	Illumina 550K	Agilent 44K	CytoChip BAC array v2.0.1
Lokalisation der Deletion (NCBI36)	X:144,934,242-148,461,832	X:144,718,596-148,935,920	X:139,307,660-148,548,633
Größe (Mb)	3,53	4,22	9,24
Anzahl der proteinkodierenden RefSeq Gene	5	14	29
Herkunft der Deletion	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>
X-Inaktivierung (AR-Lokus; Blut)	Zufällig (62:38)	Zufällig (57:43)	Zufällig (48:52)
Schwangerschaft/Geburt	Nabelschnurumschlingung	Vaginale Blutungen, Nabelschnurvorfall, Kaiserschnitt	Unauffällig
Psychomotorische Entwicklung	Verzögert Diagnose der Entwicklungsverzögerung mit 3 Mo., erste Worte mit 18 Mo., freies Laufen mit 25 Mo.	Verzögert Entwicklung bis zum 9. Mo. unauffällig, nach Windpocken (9 Mo.) vorübergehende Verlangsamung der Entwicklung, freies Laufen mit 31 Mo., 40 einzelne Worte mit 3 ¹ / ₂ J.	Verzögert Diagnose der Entwicklungsverzögerung mit 2 J., Sprachverzögerung, milde motorische Entwicklungsverzögerung
Schweregrad der ID (Zhang et al.)	3	3	2-3
Wachstumsparameter	Gewicht > P 97, Größe P 50 - P 75, Kopfumfang > P 97	Gewicht P 90-P 97, Größe P 50 - P 75, Kopfumfang > P 97	6 J.: Gewicht P 50 - P 75, Größe P 25 9 J.: Gewicht P 50 - P 70, Größe P 50, Kopfumfang P 97
Muskeltonus	Hypotonie	Hypotonie	normal
Dysmorphiezeichen	Langes Gesicht, milder Hypertelorismus, prominentes Kinn, kugelige Nasenspitze	Hohe Stirn, volle Wangen	Hohe Stirn
Hände/Füße	Leichte Überbeweglichkeit der Finger- und Handgelenke, verkürzt erscheinende 4. und 5. Zehen	Überbeweglichkeit der Fingergelenke	n.b.
Verhalten	Verhaltensauffälligkeiten, Passivität	n.b.	n.b.
Pubertät	normal	Vorpubertäres Alter	Vorpubertäres Alter
Weiteres	Herabgesetztes Sättigungsgefühl	Herabgesetztes Sättigungsgefühl 1. Lebensjahr: exzessives Schreien, taktile Überempfindlichkeit, chronische Schluck-/Fütterungsprobleme, schwere Obstipation	n.b.

Tab. 25. Klinischer Vergleich der 3 Patientinnen mit *de novo*-Deletionen in Xq27.3-q28. n.b.: nicht berichtet; Mo.: Monate, J.: Jahre, P.: Perzentile.

FMR1 Repeat-Analyse und Sequenzierung

Bei allen drei Patientinnen wurden die CGG-Repeatlängen im *FMR1*-Gen bestimmt. Zusätzlich wurden Sequenzanalysen des *FMR1*-Gens durchgeführt. Die Sequenzierung aller drei Patientinnen und die Bestimmung der Anzahl der CGG-Repeats der Patienten 1 und 2 fanden in der molekulargenetischen Diagnostikabteilung des Instituts für Humangenetik der Universität Bonn statt. Bei Patientin 3 wurden die CGG-Repeats im Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen, Dänemark untersucht. Die Anzahl der CGG-Repeats aller drei Patientinnen lag im Normalbereich. Die Sequenzierung des *FMR1*-Gens des verbleibenden Allels zeigte bei allen drei Patientinnen keine Mutation.

X-Inaktivierungsanalysen

X-Inaktivierungsanalysen wurden von Frau Dr. Cornelia Kraus (Institut für Humangenetik, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg) durchgeführt und zeigten für alle Patientinnen eine zufällige Verteilung (Patientin 1: 62:38; Patientin 2: 57:43; Patientin 3: 48:52).

Genomische Überlappung der drei Deletionen

Die molekulare Karyotypisierung aller Patientinnen zeigte jeweils eine in ihrer Ausdehnung unterschiedliche heterozygote Deletion in Xq27.3-Xq28. Alle drei Deletionen traten *de novo* auf. Die kleinste gemeinsam deletierte Region (SRO= Smallest **R**egion of **O**verlap) entsprach der Deletion von Patientin 1. Sie war 3,53 Mb groß und enthielt 5 Gene, *FMR1*, *FMR1NB*, *FMR2*, *IDS* und *CXorf40A* (Abb. 26).

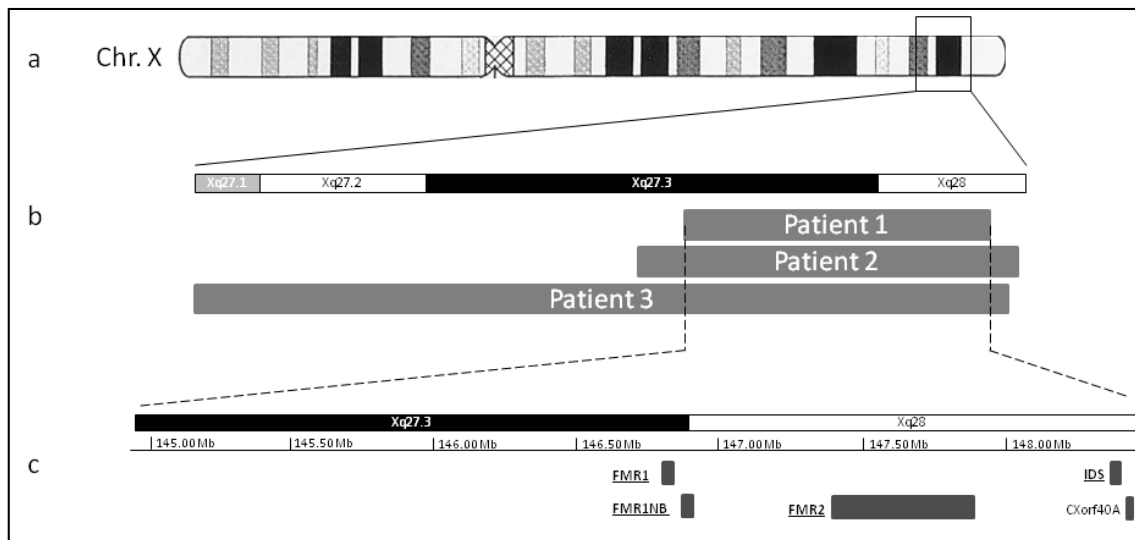


Abb. 26. Schematische Darstellung der Xq27.3-q28 Deletionen a) Diagramm des X-Chromosoms, b) Ausschnitt der Subbanden Xq27.1-q28. Graue Balken zeigen die Lokalisation der Deletionen in den Patientinnen c) Vergrößerung der SRO. Dunkelgraue Balken zeigen die Lokalisation der Gene. Für die unterstrichenen Gene wurde die Expression untersucht.

Expressionsstudien

Zur Untersuchung der Ätiologie des Phänotyps der drei Patientinnen wurde die Expression der Gene *FMR1*, *FMR2/AFF2* und *IDS* in RNA aus Vollblut der drei Patientinnen, ihrer Mütter und fünf gesunden, nicht verwandten weiblichen Kontrollpersonen (22-24 Jahre alt) untersucht (Tab. 26). Aufgrund der zu schwachen Expression in Blut konnte *FMR1NB* nicht untersucht werden.

Zur Untersuchung potentieller intrafamiliärer Effekte wurde die *FMR1*-Expression zusätzlich bei drei Mutter-Tochter-Paaren aus einem Kollektiv mit Patienten mit einer primären Ovarialinsuffizienz (POF) (POF1-POF3, POF1M-POF3M) als Kontrollen analysiert (Tab. 26).

Mutter-Tochter-Paare als Kontrollen für die Expressionsanalyse

Die Ergebnisse von Expressionsanalysen müssen immer in Relation zu den Ergebnissen von geeigneten Kontrollen gesetzt werden. In diesem Fall wären geeignete Kontrollen für die *FMR1*-Expressionsanalysen Mutter-Tochter-Paare im gleichen Alter wie die untersuchten Patientinnen und deren Mütter. Aus ethischen Gründen wurden in dieser Arbeit jedoch keine minderjährigen Kontrollpersonen rekrutiert, da die Möglichkeit bestand, dass die *FMR1*-Expressionsanalysen Hinweise auf das Vorhandensein einer Prä-Mutation bei asymptotischen Kindern geben könnten. Daher wurden als Kontrollen Mutter-Tochter-Paare verwendet, die aufgrund der Diagnose POF (POF: *premature ovarian failure*: Ovarialinsuffizienz) bereits am Institut für molekulare Genetik und Fertilitätstörungen, der Frauenklinik der Universität Heidelberg rekrutiert worden waren. Die Mutter-Tochter-Paare bestanden aus den von einer POF betroffenen Töchtern POF1 (32 Jahre alt), POF2 (36 Jahre), POF3 (22 Jahre) und ihren jeweiligen Müttern POF1M (62 Jahre), POF2M (64 Jahre) und

POF3M (39 Jahre). Bei der Mutter POF2M lag ebenfalls eine POF vor. Kontroll-Tochter POF3 war Trägerin einer mikroskopisch sichtbaren X-chromosomalen Deletion, die durch FISH mit einer subtelomerisch lokalisierten Sonde bestätigt wurde (46,X,del(X)(q27).ish del(X)(q27)(DXYS130+,DXYS224-)). Die Kontroll-Tochter POF3 zeigte eine zu 100% verschobene X-Inaktivierung und wies keine Anzeichen einer ID oder von Fehlbildungen auf. Eine qPCR bestätigte die Deletion von FMR1 bei Kontroll-Tochter POF3 und schloss eine FMR1-Deletion bei den weiteren fünf POF-Kontrollen aus. Kontroll-Tochter POF1 und ihre Mutter POF1M waren Trägerinnen einer FMR1-Prä-Mutation (POF1: 31/79 CGG-Repeats; POF1M: 29/72 CGG-Repeats). Bei den restlichen POF-Kontrollpersonen lagen die CGG-Repeatlängen im Normbereich.

Person	Alter (Jahre)	ID/POF	CNVs FMR1 betreffend	X-Inaktivierung
P1	16 1/2	ID	X:144,934,242-148,461,832	zufällig
P1M	45	-	-	n.b
P2	3 1/2	ID	X:144,718,596-148,935,920	zufällig
P2M	32	-	-	n.b
P3	9	ID	X:139,307,660-148,548,633	zufällig
P3M	38	-	-	n.b
POF1	32	POF	-	n.b
POF1M	63	-	-	n.b
POF2	36	POF	-	n.b
POF2M	64	POF	-	n.b
POF3	22	POF	46,X,del(X)(q27).ish del (X)(DXYS130+,DXYS224-)	100% verschoben
POF3M	39	-	-	n.b

Tab. 26. Übersicht der Personen, bei denen Expressionsstudien durchgeführt wurden. n.b. nicht berichtet

FMR1-Expression

Im Vergleich zu den fünf gesunden weiblichen Kontrollpersonen war die *FMR1*-Expression der drei Mikrodeletions-Patientinnen reduziert. Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nur für P1 ($p=1,027 \cdot 10^{-6}$) und P3 ($p=1,027 \cdot 10^{-6}$) erreicht. Die Expression der Mütter der Patientinnen P1 und P3 war ebenfalls im Vergleich zu den Kontrollpersonen signifikant reduziert ($p=0,001023$ und $p=0,000651$) (Abb. 27 c).

Ein Vergleich der *FMR1*-Expression von Patientinnen und ihren jeweiligen Müttern zeigte eine signifikante Verringerung der Expression in den Patientinnen (P1 $p^1=0,001023$, P2 $p^2=0,002165$, P3 $p^3=0,002165$) gegenüber ihren jeweiligen Müttern. Die POF-Kontroll-Töchter zeigten keine signifikante Veränderung der Expression im Vergleich zu den fünf gesunden weiblichen Kontrollpersonen und im Unterscheid zu den Mikrodeletionspatientinnen verglichen mit ihren jeweiligen Müttern eine eher leicht erhöhte *FMR1*-Expression. Die *FMR1*-Expression der Patientin POF2 war im Vergleich zu ihrer Mutter POF2M signifikant höher (Tab. 27).

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	POF1	POF2	POF3
FMR1-Expression gegenüber 5 weiblichen Kontrollpersonen	-92%*	-45%	-80%*	-26%	+30%	-32%
FMR1-Expression gegenüber der jeweiligen Mutter	-73%*	-50%*	-33%*	+41%	+139%*	+14%

Tab. 27. Verhältnis der FMR1-Expression der drei Deletionspatientinnen und der POF Kontrollpersonen gegenüber fünf weiblichen Kontrollpersonen und den jeweiligen Müttern. *: signifikant veränderte Expression

FMR2/AFF2-Expression

Die *FMR2/AFF2*-Expression zeigte innerhalb der fünf gesunden weiblichen Kontrollpersonen eine große Streubreite (Standardabweichung $SD=0,92$). Diese hohe Variabilität war auch in den Patientinnen und ihren Müttern sichtbar. Nur Patientin 3 zeigte eine gegenüber den fünf weiblichen Kontrollen signifikant reduzierte *FMR2/AFF2*-Expression ($p^2=0,02$) (Abb. 27 b).

IDS-Expression

Die Expression des Gens *IDS* war in allen drei Patientinnen im Vergleich zu den fünf gesunden weiblichen Kontrollpersonen verringert. Die Patientinnen P1 und P3 zeigten eine signifikant verringerte Expression ($p^1=1,5*10^{-3}$, $p^3=1,03*10^{-6}$), bei Patientin P2 war die Reduktion nicht signifikant (Abb. 27 a).

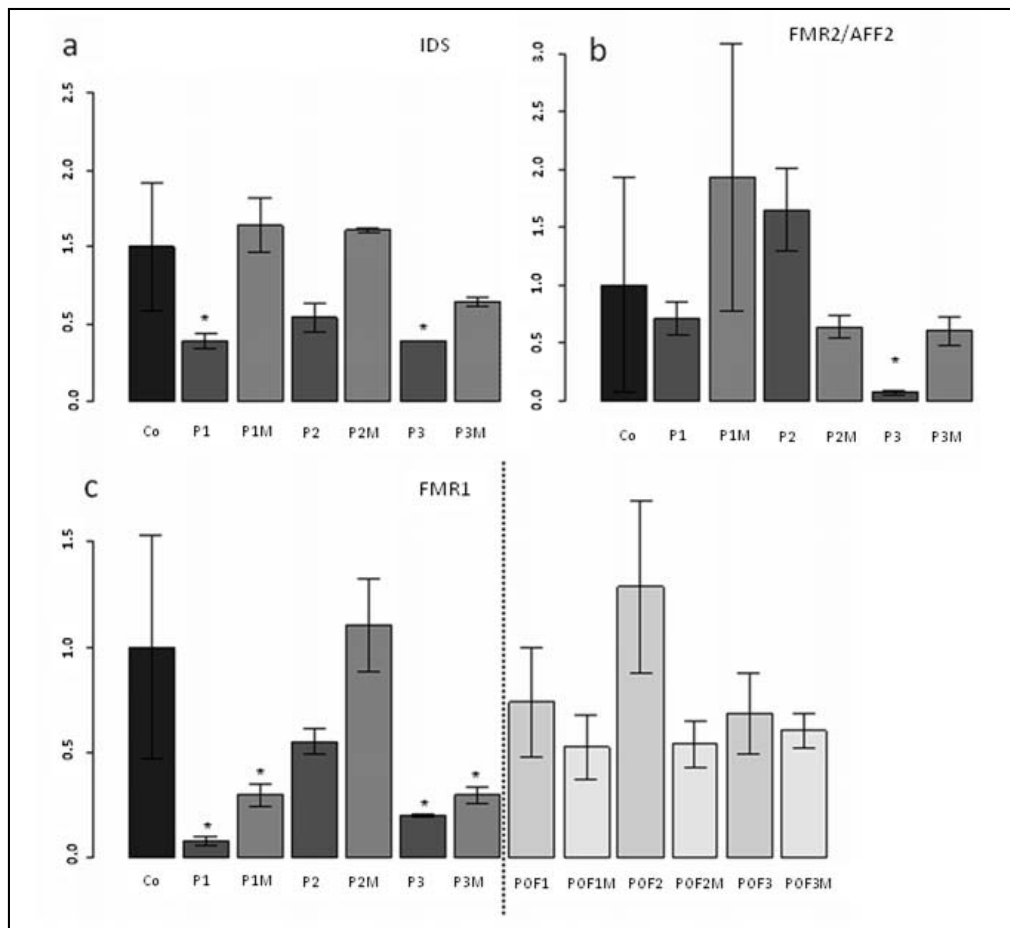


Abb. 27. Ergebnis der Expressionsuntersuchungen. a) *IDS*-Expression der drei Deletions-Patientinnen und ihrer jeweiligen Mütter im Vergleich zu fünf gesunden weiblichen Kontrollpersonen (Co). b) *FMR2/AFF2* Expression der drei Patientinnen und der jeweiligen Mütter im Vergleich zu fünf weiblichen Kontrollpersonen. c) *FMR1*-Expression der drei Patientinnen, ihrer jeweiligen Mütter und der POF-Kontroll-Mutter-Tochter-Paare im Vergleich zu fünf weiblichen Kontrollpersonen. Die gestrichelte Linie trennt die POF-Kontroll-Mutter-Tochter-Paare (rechts) von den Deletions-Patientinnen und ihren Müttern (links). Fehlerbalken der Deletions-Patientinnen, der Mütter der Patientinnen und der POF-Kontroll-Mutter-Tochter-Paare: Standardabweichung über zwei Experimente. Fehlerbalken der Kontrollpersonen: Schwankung innerhalb der Kontrollpersonen, gemittelt über zwei Experimente. *: im Vergleich zu den fünf gesunden weiblichen Kontrollpersonen (Co) signifikant ($p < 0,05$) reduzierte Expression.

4.4.8. De novo Mikrodeletion 5q14.3 Deletion

Patientenbeschreibung (14/06)

Patientin 14/06 war das dritte Kind deutscher, nicht verwandter Eltern. Ihre beiden Geschwister entwickelten sich altersentsprechend. Nach einer komplikationslosen Schwangerschaft wurde sie zum errechneten Termin mit einem Gewicht von 3510 g (P 50) einer Länge von 51 cm (P 25 - P 50) und einem Kopfumfang von 35 cm (P 50) ohne Fehlbildungen geboren. Im Alter von 4 Monaten wurden eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung und eine schwere muskuläre Hypotonie diagnostiziert. Die Entwicklungsmeilensteine wurden verzögert erreicht. So konnte die Patientin erst mit 2,5 Jahren ohne Unterstützung sitzen und im Alter von 7 Jahren noch nicht freies laufen. Mit 3

Jahren begann sie einzelne Wörter zu "brabbeln" (Mamama, Papapa). Ihr Sprachverständnis wurde im Vergleich zu ihrem Ausdrucksvermögen als besser beurteilt. Im Alter von 5 Monaten wurden eine Weitsichtigkeit (+5,5 dpt mit 5 Jahren) und ein Strabismus convergens diagnostiziert. Kraniale MRTs im Alter von 6 Monaten und 2 1/4 Jahren zeigten eine moderate Atrophie der supra- und infratentoriellen Region, ein leicht erweitertes Ventrikelsystem und eine unspezifische Leukoencephalopathie. Im Alter von 4 Jahren und 9 Monaten traten die ersten atypischen Absencen auf. Später wurden komplexpartiale Krampfanfälle beobachtet und im Alter von 5 1/4 Jahren trat ein "grand mal" Anfall auf. Zum Zeitpunkt der genetischen Beratung im Alter von 5 1/4 Jahren lagen eine schwere ID (Stufe 5 nach Zhang et al., 2005) und eine deutlich globale Entwicklungsverzögerung vor. Ihre sozialen Interaktionen waren limitiert. Zum Zeitpunkt der zweiten genetischen Beratung im Alter von 6 11/12 Jahren war sie 115 cm (P 10) groß, 21 kg (P 25) schwer und ihr Kopfumfang betrug 49,5 cm (P 10 - P 25). Eine Hypotonie der Speiseröhrenmuskulatur führte zu Fütterungsproblemen. Ihr Mund stand häufig offen und sie zeigte eine Hypersalivation. Eine Hypotonie der Speiseröhrenmuskulatur führte zu Problemen beim Füttern. Ein EEG zeigte keine epileptiformen Muster, obwohl weiterhin kleinere Anfälle auftraten. Sie hatte nur milde Dysmorphien wie leicht nach außen ansteigende Lidachsen, einfach modellierte Ohren, einen leicht verengten Supraorbitalbogen, und leicht seitwärts ansteigende Lidachsen. Sie zeigte stereotype Handbewegungen und Bruxismus. Eine konventionelle Karyotypisierung (400-500 Banden) sowie molekulargenetische Untersuchungen auf das Angelman- und das Rett-Syndrom blieben unauffällig.

Molekulare Karyotypisierung

Die molekulare Karyotypisierung wurde mit einem Sentrix HumanHap 550-Duo v3Beadchip, ergänzt durch einen HumanCNV-12 (Abb. 28 b), durchgeführt. Die Berechnung durch QuantiSNP ergab 44 potentielle CNVs. Nach Anwendung der Filterkriterien verblieb ein CNV zur Verifizierung durch qPCR. qPCR-Analysen der Patientin und ihrer Eltern bestätigte den CNV und zeigten eine *de novo*-Entstehung (Tab. 28).

Chromosom Bande	Anfang	Ende	Länge (Mb)	Kopienzahl	Marker	logBayes- Faktor	Herkunft
5q14.3	88.693.066	92.022.455	3,3	1	522	290,47*	de novo

Tab. 28. CNV nach Anwendung der Filterkriterien und das Ergebnis der qPCR. *: gemittelt: Der Algorithmus QuantiSNP errechnete mehrere einzelne CNVs, die nach visueller Kontrolle im Programm GenomeStudio als eine durchgängige Deletion diagnostiziert wurden. Aus den logBayes-Faktoren der einzelnen errechneten Deletionen wurde ein gewichteter Durchschnittswert ermittelt.

Die *de novo* entstandene heterozygote Deletion in 5q14.3 enthielt 6 proteinkodierende RefSeq Gene: *ARRDC3*, *GPR98*, *LYSMD3*, *POLR3G*, *MBLAC2* und *CETN3*.

Vergleich Patientin 14/06 - DECIPHER/MRNET-Datenbank

Eine erste Suche nach weiteren ID-Patienten mit *de novo* entstandenen Deletionen in 5q14.3 war sowohl in der MRNET Datenbank (Patientin Erlangen) als auch in der DECIPHER Datenbank (Patientin Cambridge) mit zunächst je einer weiteren Patientin erfolgreich.

Patientin Erlangen

Die molekulare Karyotypisierung wurde im Institut für Humangenetik der Universität Nürnberg-Erlangen auf einem Affymetrix GeneChip Human Mapping 100k SNP-Array durchgeführt und zeigte eine heterozygote 5,69 Mb große Deletion in 5q14.3-q15 (arr 5q14.3-q15(87975410- 93668872)x1) (Abb. 28 a).

Patientin Cambridge

Die molekulare Karyotypisierung der Patientin wurde im Department of Medical Genetics, Addenbrooke's Hospital NHS Trust, Cambridge mit einem 1 Mb Sanger BAC Array durchgeführt und ergab, ermittelt aus den Endpunkte des proximalsten und distalsten deletierten BACs, eine heterozygote Deletion von mindestens 3,93 Mb in 5q14.3 (arr5q14.3(86.206.067-90.139.366)x1) (Abb. 28 c).

FISH-Untersuchungen der deletierten Region in Lymphozyten-Metaphasen beider Patientinnen und ihrer Eltern bestätigte die Deletionen und den *de novo*-Ursprung.

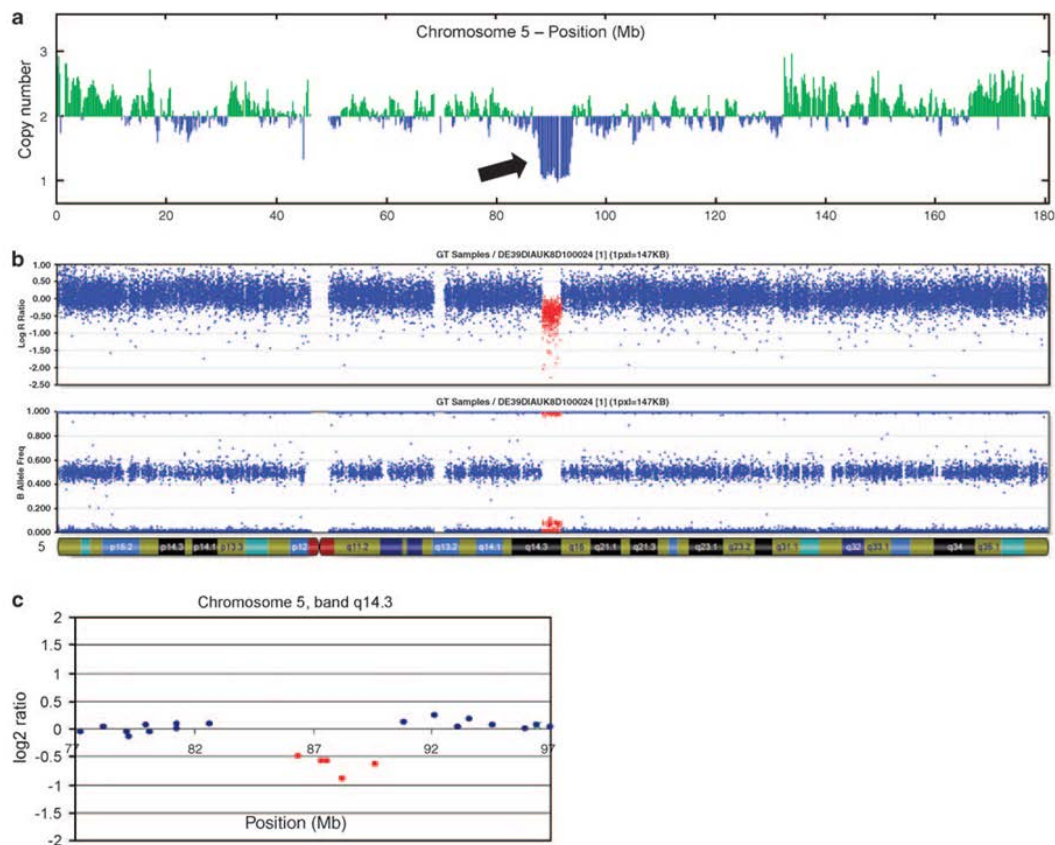


Abb. 28. Übersicht der Deletionen in 5q14.3 der Patienten aus Bonn, Erlangen und Cambridge. a) Ergebnis der molekularen Karyotypisierung der Erlanger Patientin mit einem Affymetrix GeneChip Human Mapping 100k SNP array. Der Pfeil markiert die Deletion. b) Ergebnis der molekularen Karyotypisierung der Bonner Patientin mit einem Sentrix HumanHap 550-Duo v3Beadchip. Die rot markierten SNPs, zeigen die Deletion an. c) Ergebnis der molekularen Karyotypisierung der Patientin aus Cambridge mit einem 1 Mb Sanger BAC Array. Die roten Marker sind deletiert. Entnommen aus Engels et al., *A novel microdeletion syndrome involving 5q14.3-q15: clinical and molecular cytogenetic characterization of three patients*. Eur J Hum Genet 17: 1592-1599 (2009)

	Patientin Bonn	Patientin Erlangen	Patientin Cambridge
Alter	6 ¾ Jahre	6 Jahre	8 Jahre
Array	Illumina 550k	Affymetrix 100k SNP	Sanger BAC 1Mb
Lokalisation der Deletion (NCBI36)	5:88.448.144-92.022.455	5: 87.975.410-93.668.872	5:86.206.067-90.139.366
Größe (Mb)	3,57	5,69	3,93
Anzahl der Gene	6	9	9
Herkunft der Deletion	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>
Schwangerschaft/ Geburt	Unauffällig	Unauffällig	Erhöhte Nackentransparenz
Psychomotorische Entwicklung	Stark verzögert	Stark verzögert Mit 6 Jahren entsprechend einem Neugeborenen	Stark verzögert Mit 7 Jahre entsprechend einem 6 Mo alten Kind
Schweregrad der ID (Zhang et al.)	5	5	5
(Fieber-)Krämpfe	Ja	Ja	Ja
Wachstumsparameter	Gewicht P25, Größe P10, Kopfumfang P10-P25	Größe P10 – P75, Kopfumfang P90-P97	Gewicht P2-P9, Größe P9, Kopfumfang P2-P9
Muskeltonus	Hypotonie mit Fütterungsproblemen	Hypotonie mit Fütterungsproblemen	Hypotonie mit Fütterungsproblemen
Faziale Dysmorphiezeichen	Mild	Keine	Mild
Weiteres	Hyperopie, Strabismus convergens	Optikus-Atrophie, Myokard-Hypertrophie, Café-au-lait-Flecken	Brachyzephalie
Kraniales MRT	Atrophie der Supra- und infratentoriellen Region, leicht erweitertes Ventrikularsystem, unspezifische Leukenzephalopathie	Aplasie des Kleinhirnwurms und des posterioren Corpus callosum, multiple Plexuszysten	prominente Arachnoidalräume

Tab. 29. Klinischer Vergleich der drei Patientinnen mit Mikrodeletionen in 5q14.3. Fett gedruckt: gemeinsame klinische Merkmale

Rekrutierung weiterer Patienten

Nach der Beschreibung eines Mikrodeletionssyndroms in 5q14.3 anhand der Patienten 1-3 (Engels et al., 2009), konnten weitere Patienten mit de novo-CNVs in 5q14.3 und 5q15 rekrutiert werden (Tab. 30). Insgesamt handelte es sich um 13 Patienten (P1-P13) mit Deletionen in 5q14.3 und einen Patient (P14) mit einer Deletion in 5q15 (Abb. 29). Die Nummerierung der Patienten erfolgt ab jetzt anhand der genomischen Position ihrer Deletionen bzw. anhand der proximalen Bruchpunkte der Deletion, so dass

die Bonner Patientin aus Engels et al. (2009) von jetzt an die Nummer P9 hat, die Erlanger Patientin P8 und die Patientin aus Cambridge P3.

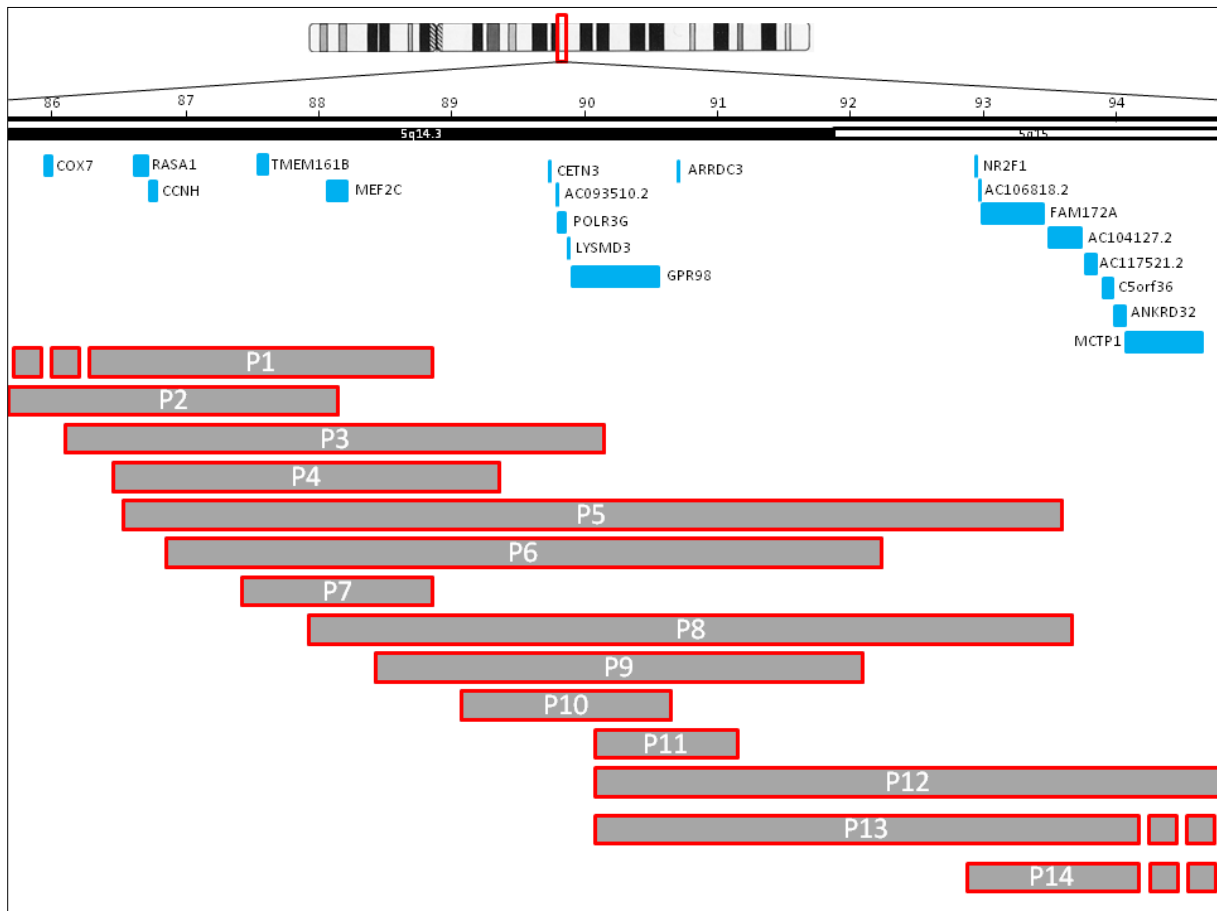


Abb. 29. Genomische Übersicht der Patienten mit Mikrodeletionen in 5q14.3-q15. Die Balken zeigen die Lokalisation der Deletionen

Patient	ID	Hypotonie	Krampfanfälle	MRT Auffälligkeiten
P1	schwer	+	+	n.b.
P2	schwer	+	-	+
P3	schwer	+	+	+
P4	schwer	+	+	+
P5	schwer	+	-	+
P6	schwer	+	+	- (zu jung)
P7	schwer	+	+	+
P8	schwer	+	+	+
P9	schwer	+	+	+
P10	schwer	+	n.b.	-
P11	schwer	+	+	-
P12	Mild	+	-	+
P13	schwer	+	-	+
P14	Mild	(+) mild	+	- (zu jung)

Tab. 30 Klinische Übersicht der für das 5q14.3 Mikrodeletionssyndrom typischen Merkmale der untersuchten Patienten. +: vorhanden. -: nicht vorhanden. (zu jung): Eine sichere Aussage über die MRT-Untersuchungen, war aufgrund des zu jungen Alters nicht möglich. n.b.: nicht berichtet

Genomweite Expressionsuntersuchungen

Durch Zusammenarbeit der Bonner und der Erlanger Arbeitsgruppe wurden zwei Kandidatengene aus der Mikrodeletionsregion durch Sequenzierung größerer Patientenkohorten analysiert: 1) *LYSMD3* aufgrund der Expression im ZNS und 2) *MEF2C* aufgrund der zentralnervösen Expression und der bekannten Rolle in der Neurogenese. Die Mutationssuche im letztgenannten Gen wurde in Erlangen bereits vor der Kontaktaufnahme durch die Bonner Arbeitsgruppe initiiert und weitergeführt, obwohl das Gen *MEF2C* nicht in der gemeinsam deletierten Region lag. Lediglich in *MEF2C* wurden weitere Mutationen identifiziert und in Folgenden die weiteren Analysen ausschließlich auf *MEF2C* beschränkt. Parallel zur Identifizierung von *MEF2C* als hauptverantwortliches Gen durch die Erlanger und Bonner Arbeitsgruppen publizierte Le Meur et al. (2009) weitere Patienten mit vergleichbarer Klinik und Mikrodeletionen der Region, die z.T. ausschließlich *MEF2C* umfassten.

Um die Ätiologie des Phänotyps weiter zu entschlüsseln, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des HT12 Gene Expression Chip (Illumina, San Diego, USA) genomweite Expressionsstudien

von 9 Patienten mit nicht-rekurrenten Deletionen in 5q14.3 und ausreichender RNA-Menge durchgeführt (Abb. 30). Deren Daten wurden mit acht Kontrollpersonen verglichen. Die RNA jeder Person wurde zweimal hybridisiert, so dass insgesamt 34 Hybridisierungen durchgeführt wurden. Für die statistische Analyse war es notwendig, dass die Patienten in Gruppen von je 4-5 Personen eingeteilt wurden. Die Einteilung dieser Patientengruppen erfolgte nach der genomischen Position ihrer Deletionen mit dem Ziel, dass die Patienten in jeder Gruppe einen gemeinsamen deletierten Genomabschnitt in 5q14.3-q15 besaßen. Die meisten Patienten sind durch die Größe und Ausdehnung ihrer Deletionen in mehr als einer dieser Gruppen vertreten. Insgesamt wurden sieben verschiedene Gruppen anhand von sieben Deletionsintervallen gebildet und später jede dieser Gruppen getrennt mit den Kontrollpersonen verglichen.

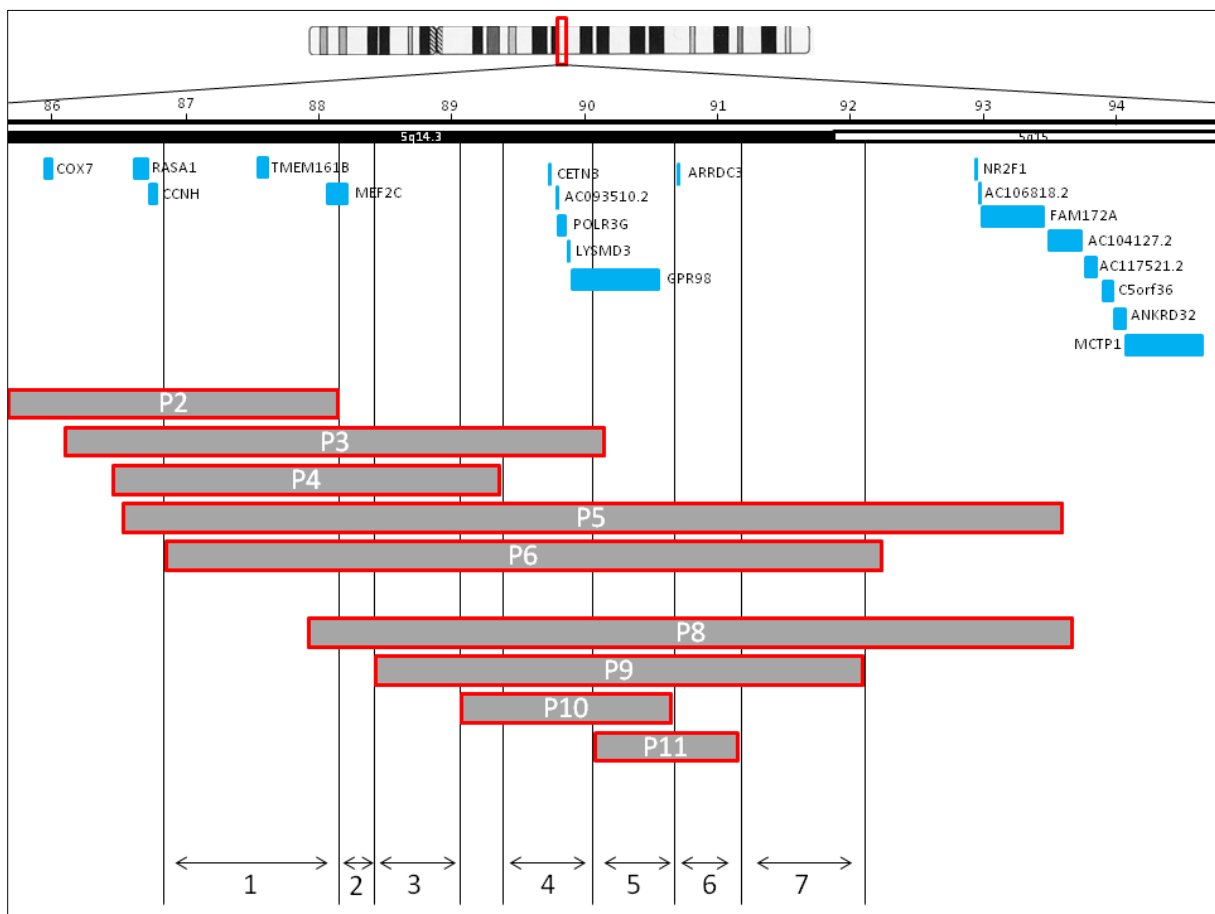


Abb. 30. Genomische Übersicht der in der genomweiten Expressionsanalyse untersuchten Patienten mit Mikrodeletionen in 5q14.3-q15 inklusive der Gruppeneinteilung. Die Balken zeigen die Lokalisation der Deletionen. Es wurden nur Patienten in die jeweiligen Gruppen aufgenommen, deren Deletion das gesamte genomische Intervall einer Gruppe überdeckte.

Bei der Auswertung der Expressionsdaten wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Der erste Ansatz wurde bereits häufig verwendet und publiziert (Becker et al., 2012). Hier wurden nur diejenigen Sonden in die statistische Auswertung mit einbezogen, die in allen 34 Hybridisierungen (Patienten und Kontrollpersonen) einen DPV (detection p-value) von $<0,01$ hatten, also deutlich von den

Hintergrundsignalen zu unterscheiden waren. Insgesamt waren dies 3953 Sonden. Die Sonde für *MEF2C* hatte in einigen Hybridisierungen einen DPV von $>0,01$ und konnte daher in diesem ersten Ansatz nicht in die weitere Auswertung mit aufgenommen werden.

Gruppe	Patienten	TRABD
1	P2; P3; P4; P5;P6	$p=1,133 \times 10^{-5}$
2	P3; P4; P5;P6; P8	$p=7,532 \times 10^{-6}$
3	P3; P4; P5; P6; P7; P9	$p=0,4203 \times 10^{-6}$
4	P4; P5; P6; P8; P9; P10	$p=2,842 \times 10^{-6}$
5	P5; P6; P8; P9; P10; P11	$p=4,435 \times 10^{-03}$
6	P5; P6; P8; P9; P11	$p=1,174 \times 10^{-02}$
7	P5; P6; P8; P19	$p=6,065 \times 10^{-05}$

Tab. 31. Übersicht der genomweiten Expressionsuntersuchungen für TRABD. Die nach Bonferroni-Korrektur statistisch signifikanten Ergebnisse sind fett gedruckt.

Bei 3953 Sonden lag die Signifikanzgrenze nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen bei $1,265 \times 10^{-05}$. Von diesen 3953 Sonden zeigte eine Sonde (TRABD) einen signifikanten Unterschied für die Intervalle 1-4 und das Intervall 7 gegenüber den Kontrollen (I1: $p=1,133 \times 10^{-5}$, I2: $p=7,532 \times 10^{-6}$, I3: $p=0,4203 \times 10^{-6}$, I4: $p=2,842 \times 10^{-6}$, I7: $p=6,065 \times 10^{-05}$) (Tab. 31). In den Intervallen 5 und 6 war der Expressionsunterschied nicht signifikant. Der Vergleich der ungefilterten Rohdaten zeigte eine 1,4fach reduzierte TRABD-Expression aller Patienten im Vergleich zu den Kontrollen.

Da der erste Ansatz nur diejenigen Sonden einbezog, die sowohl in allen Kontrollpersonen als auch in allen Patienten mit einem DPV $<0,01$ deutlich detektierbar waren, bestand die Möglichkeit, dass z. B. auch solche Sonden die Bedingungen dieser Qualitätskontrolle nicht erfüllten, die gerade aufgrund der Mikrodeletionen eine deutlich verringerte Expression aufwiesen. In diesem Fall würden durch die etablierte Auswertungsmethode gerade solche Sonden nicht analysiert, die aufgrund der untersuchten Mikrodeletionen ein deutlich verändertes Expressionsmuster aufwiesen und somit potentiell besonders interessant wären. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein zweiter Auswertungsansatz entwickelt und erprobt, der solche Sonden identifizieren sollte, die also entweder nur in den Kontrollen detektierbar waren (DPV $<0,01$) und in den Patienten nicht (DPV $>0,01$) oder in den Patienten detektierbar (DPV $<0,01$) und in den Kontrollen nicht (DPV $>0,01$) detektierbar waren. Mit Hilfe des zweiten Ansatzes („*detection score*-Methode“) wurden Sonden erfasst, die entweder

1. in keiner der Kontrollhybridisierungen und innerhalb mindestens einer Patientengruppe in über 80% der Hybridisierungen deutlich detektierbar (DPV $<0,01$) waren

oder

2. in sämtlichen Hybridisierungen von Kontrollpersonen mit einem DPV $<0,01$ sicher detektierbar waren und in mindestens einer der sieben Patientengruppen deutlich seltener sicher detektierbar waren.

Sonde	Kontrollen	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
PRIM1	0%	80%	90%	80%	80%	67%	60%	75%
TIMM44	0%	80%	80%	80%	80%	75%	70%	75%
ITGA3	0%	80%	80%	75%	67%	58%	60%	60%
CD38	0%	80%	70%	67%	67%	50%	40%	50%
COX7B	0%	70%	80%	75%	67%	50%	50%	60%
HSZFP36	0%	60%	80%	67%	67%	58%	50%	50%
LZTFL1	0%	60%	80%	75%	67%	58%	60%	60%
PTBP2	0%	60%	80%	75%	67%	50%	50%	60%
PTPRO	0%	60%	80%	67%	58%	42%	40%	50%
RECQL	0%	70%	80%	75%	75%	67%	60%	60%
UBA6	0%	70%	80%	75%	75%	58%	50%	60%
ZNF585A	0%	70%	80%	75%	58%	42%	50%	60%

Tab. 32. Übersicht der Ergebnisse des zweiten Ansatzes der genomweiten Expressionsanalyse. In Prozent werden die Anteile der Hybridisierungen der Sonden mit einem DPV $<0,01$ an allen Hybridisierungen angegeben. G1-G7: Patientengruppen 1-7. Die Gruppen, in denen die Sonden in über 80% der Hybridisierungen einen DPV $<0,01$ hatten, sind fett markiert.

Insgesamt entsprachen 12 Sonden der ersten Bedingung und waren in allen Kontrollpersonen nicht sichtbar und in mindestens einer Patientengruppe in über 80% der Hybridisierungen sicher detektierbar (Tab. 32). Die Sonde für *MEF2C* entsprach auch im zweiten Ansatz nicht den geforderten Kriterien und wurde daher nicht in die Analyse mit einbezogen.

PRIM1 und *TIMM44* zeigten in den meisten Patientengruppen (4/7) einen solchen Unterschied zwischen Patienten und Kontrollpersonen. Beide Gene erreichten in keiner der Kontrollhybridisierungen einen DPV von $<0,01$. In den Gruppen 1-4 dagegen hatte beide Gene in mindestens 80% der Patienten einen DPV von $<0,01$. Die Sonde für *COX7B* erreichte in keiner der Kontrollen einen DPV von $<0,01$. In Intervall 2 erreichte die Sonde für *COX7B* in 80% der Patienten einen signifikanten DPV von $<0,01$.

Verifizierung der genomweiten Expressionsanalysen

Die Verifizierung der oben genannten Ergebnisse der genomweiten Expressionsanalysen wurde mittels quantitativer PCR an RNA aus Vollblut durchgeführt. Insgesamt konnten drei Gene untersucht werden. *TRABD* war das einzige Gen, das im ersten Ansatz der genomweiten Expressionsuntersuchungen einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten zeigte. Im zweiten Ansatz zeigten 12 Gene einen Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten. Ein Vergleich der ungefilterten Rohdaten zeigte den deutlichsten relativen Expressionsunterschied zwischen Patienten und Kontrollen für *COX7B*. *COX7B* zeigte eine bis zu 1,86fach stärkere Expression, während die anderen unterschiedlich exprimierten Gene höchstens 1,29fach stärker exprimiert waren. Daher wurde *COX7B* in die Verifizierung mit eingeschlossen. Zusätzlich wurde die Expression von *MEF2C*, dem entscheidenden

Gen bei zumindest einem Teil der 5q14.3-Mikrodeletionssyndrom-Patienten, untersucht. Letzteres diente zum einen als Positivkontrolle, da die Expression in einigen Patienten (P2, P3, P7, P8, P9) schon im Rahmen der Zusammenarbeit von Zweier et al. untersucht worden war und zum anderen sollte mit den Daten eine mögliche Korrelation der Expression von *TRABD*, *COX7B* und eben *MEF2C* gezeigt werden. Aus organisatorischen Gründen entsprachen die zur Verifizierung durch qPCR eingesetzten Patienten-RNAs nicht vollständig den ursprünglichen Patienten aus den genomweiten Expressionsanalysen: Von Patient P6 stand nicht mehr ausreichend RNA zur Verfügung, während die Patienten P1, P7, P12 und P14 erst während oder nach den genomweiten Expressionsanalysen rekrutiert wurden (Tab. 33). Die Einteilung in die Gruppen 1-7 der Verifizierungsexperimente erfolgte wie bei den genomweiten Expressionsanalysen nach der Position der Deletionen (Abb. 31).

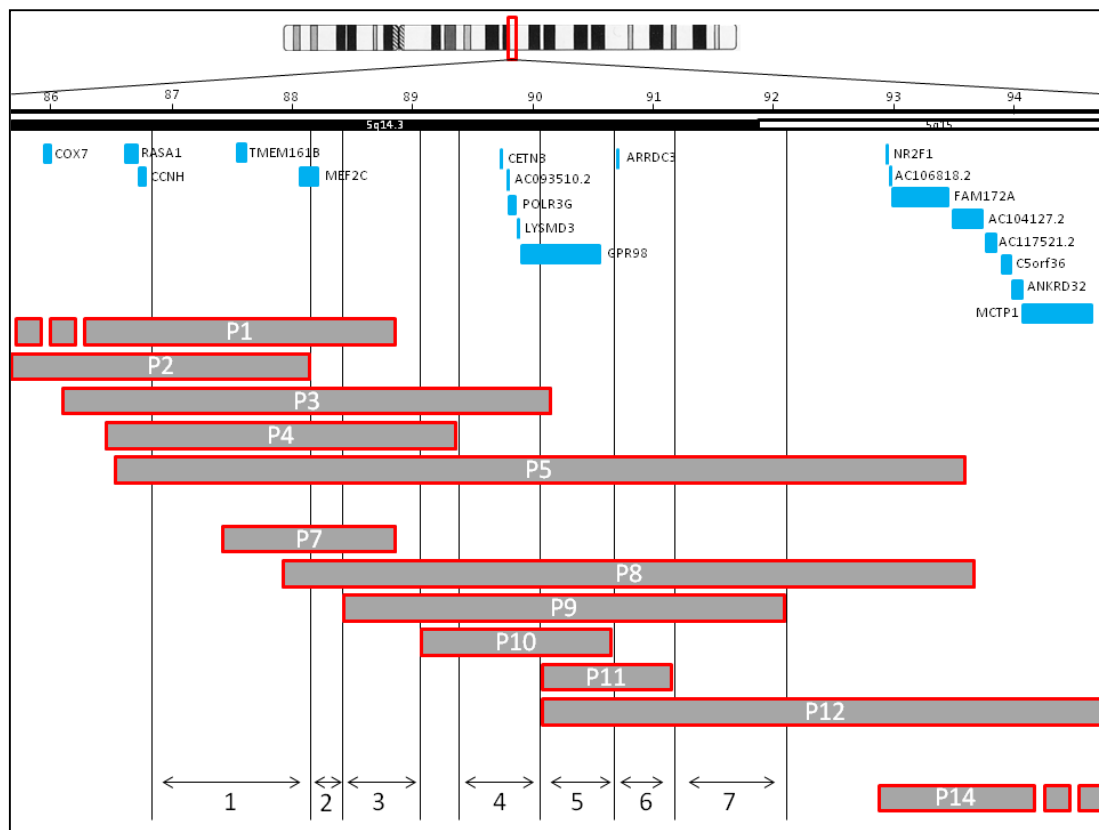


Abb. 31. Genomische Übersicht der in der qPCR untersuchten Patienten mit Mikrodeletionen in 5q14.3-q15 inklusive der Gruppeneinteilung. Die Balken zeigen die Lokalisation der Deletionen. Es wurden nur Patienten in die jeweiligen Gruppen aufgenommen, deren Deletion das ganze genomische Intervall einer Gruppe überdeckte. Patient P14 wurde in keiner der Gruppen untersucht.

Gruppe	Bei genomweiten Expressionsanalysen eingesetzte Patienten	Zusätzlich zur qPCR-Verifizierung eingesetzte Patienten
1	P2; P3; P4; P5;(P6)	P1
2	P3; P4; P5; (P6); P8	P1; P7
3	P3; P4; P5; (P6); P8; P9	
4	P3; P5; (P6); P8; P9; P10	
5	P5; (P6); P8; P9; P10; P11	P12
6	P5; (P6); P8; P9; P11	P12
7	P5; (P6); P8; P9	P12

Tab. 33. Übersicht der Patienten, die in den genomweiten Expressionsanalysen untersucht wurden und der Patienten, die zusätzlich in der qPCR-Verifizierung eingesetzt wurden. (P6): Für Patient P6 reichte die RNA nicht zur qPCR-Verifizierung aus. Die Patienten P1, P7 und P12 wurden nach der genomweiten Untersuchung rekrutiert.

Die Patienten P1, P7, P12 und P13 wurden erst nach den genomweiten Expressionsanalysen rekrutiert und ihre RNAs dementsprechend nur in den Verifizierungsexperimenten untersucht. Patient P6 wurde nur genomweit durch den HT12-Array untersucht und nicht durch qPCR, da keine RNA mehr zur Verfügung stand.

Die Gruppen 1-5 (G1-G5) und G7 zeigten in der qPCR einen signifikanten Expressionsunterschied für *TRABD* im Vergleich zu 10 gesunden Kontrollen (5 männliche / 5 weibliche) (G1: $p=0,002214$, G2: $p=1,8 \times 10^{-7}$, G3: $p=0,000147$, G4: $p=0,000105$, G5: $p=0,01436$, G7: $p=0,0003316$). Die Gruppe 6 zeigte keinen signifikanten Expressionsunterschied im Vergleich zu den Kontrollen (G6: $p=0,08614$).

Für *COX7B* konnte ein signifikanter Expressionsunterschied für die Gruppen 2 und 3 (G2: $p=0,007637$, G3: $p=0,02901$) gezeigt werden. Für die restlichen Gruppen wurde keine Signifikanz erreicht.

Alle Gruppen zeigten eine signifikant veränderte Expression für *MEF2C* (G1: $p=0,00000175$, G2: $p=3,579 \times 10^{-11}$, G3: $p=3,792 \times 10^{-11}$, G4: $p=1,19 \times 10^{-9}$, G5: $p=9,06 \times 10^{-6}$, G6: $p=4,88 \times 10^{-5}$, G7: $p=2,59 \times 10^{-9}$) (Tab. 34).

Der gemeinsame Vergleich aller Patienten, d.h. ohne die Einteilung in Gruppen, und den Kontrollen zeigte für die Expression von *MEF2C* einen nominalen Expressionsunterschied ($p=0,023$). Für die Expression von *TRABD* ($p=0,203$) und *COX7B* ($p=0,277$) konnte dies nicht gezeigt werden.

Gruppe	MEF2C	TRABD	COX7B
1	0.00000175	0,002214	0,2568
2	3,579x10⁻¹¹	1,8*10⁻⁷	0,007637
3	3,792x10⁻¹¹	0,000147	0,02901
4	1,19x10⁻⁹	0,0,000105	0,2789
5	9,06x10⁻⁶	0,01436	0,1235
6	4,88x10⁻⁵	0,08614	0,5986
7	2,59x10⁻⁹	0,0003316	0,1261

Tab. 34. Übersicht der qPCR Ergebnisse für *MEF2C*, *TRABD* und *COX7B*. Signifikante Expressionsunterschiede der Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen sind fett markiert.

Betrachtet man die Patienten einzeln und nicht in Intervallen, so zeigten außer den Patienten P2 und P14 alle Patienten eine signifikant veränderte Expression von *MEF2C* (Abb. 33). Die Patienten P1, P4, P7, P8, P10, P11 und P12 zeigten dabei auch für *TRABD* eine signifikant veränderte Expression (Abb. 33). Patient P8 zeigte nur für *MEF2C* und *TRABD* eine signifikant veränderte Expression, während die Patienten P1, P4, P7, P10, P11 und P12 auch für *COX7B* eine veränderte Expression zeigten (Abb. 33). Die signifikanten Veränderungen zeigten oft das gleiche Muster mit verringerter Expression sowohl von *MEF2C* als auch von *TRABD*. Dagegen war die Expression von *COX7B* im Vergleich zu den acht Kontrollen erhöht. Patient P11 bildete hier eine Ausnahme (Abb. 33). Er zeigte eine signifikant erhöhte Expression von *MEF2C* und *TRABD* und gleichzeitig eine signifikant verringerte Expression von *COX7B*. Da *COX7B* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist wurden die Expressionsdaten für *COX7B* zusätzlich geschlechtsspezifisch ausgewertet, d.h. die männlichen Patienten wurden nur gegen die männlichen Kontrollen und die weiblichen Patienten nur gegen die weiblichen Kontrollen gerechnet. Durch diese geschlechtsspezifische Auswertung änderten sich die Ergebnisse nicht (Daten nicht gezeigt).

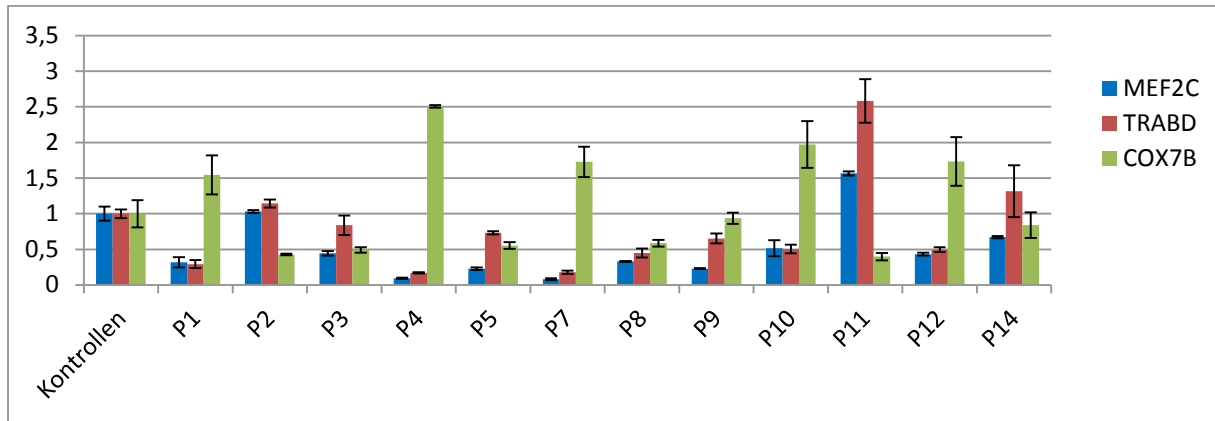


Abb. 32. Ergebnisse der qPCR für jeden einzelnen Patienten. Blaue Balken: *MEF2C*. Rote Balken: *TRABD*. Grüne Balken: *COX7B*. Fehlerbalken: Standardabweichung der Ergebnisse von zwei Experimenten.

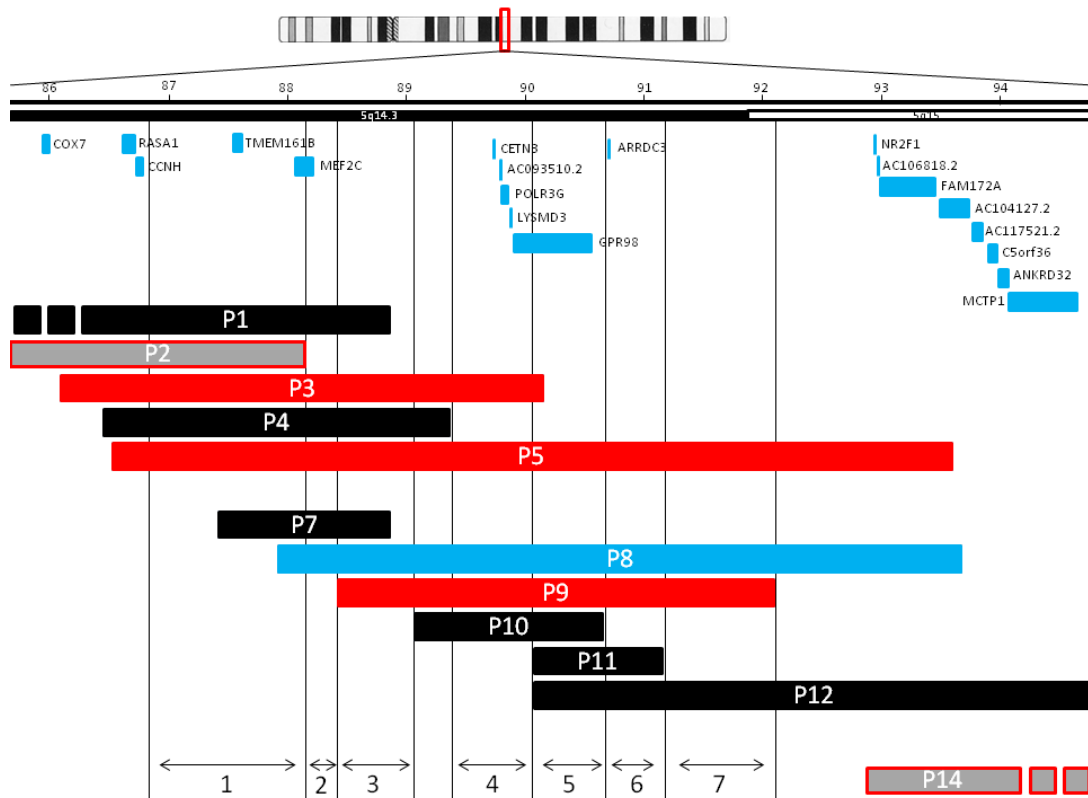


Abb. 33. Übersicht der Expressionsergebnisse der qPCR-Verifizierungsexperimente im Zusammenhang mit der Lage der Deletionen. Die Balken geben die Lokalisation der Deletionen der Patienten an. Die Farbkodierung der Balken gibt die Expressionsergebnisse wieder: Schwarz: signifikant veränderte Expression für *MEF2C*, *TRABD* und *COX7B*. Rot: signifikant veränderte Expression nur für *MEF2C* (*TRABD* und *COX7B*: keine signifikante Veränderung). Blau: signifikant veränderte Expression für *MEF2C* und *TRABD* (*COX7B*: keine signifikante Veränderung). Lila: signifikant veränderte Expression für *COX7B* (*TRABD* und *MEF2C*: keine signifikante Veränderung). Grau: keinerlei signifikante Veränderung. P12: P12 zeigt ein invertiertes Expressionsmuster, d.h. signifikant veränderte Expression für *MEF2C*, *TRABD* und *COX7B*, wobei im Unterschied zu P1, P5, P8, P11 und P13 die RNA-Level von *MEF2C* und *TRABD* erhöht und die von *COX7B* erniedrigt sind.

Die Beobachtungen aus den Expressionsexperimenten legten die Vermutung nahe, dass die Expression der Gene *MEF2C*, *TRABD* und *COX7B* korreliert ist. Die Berechnung des Korrelationsfaktors über alle

untersuchten Personen (Patienten und Kontrollen) zeigt eine Korrelation zwischen *MEF2C* und *TRABD* ($p=8,82 \cdot 10^{-7}$) und *MEF2C* und *COX7B* ($p=8,32 \cdot 10^{-3}$). Die Expressionen von *TRABD* und *COX7B* korrelieren ebenfalls ($p=4,45 \cdot 10^{-3}$).

5. Diskussion

5.1. Ergebnisse der molekularen Karyotypisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 312 Patienten mit einer ID ungeklärter Herkunft des Bonner Kollektivs mithilfe verschiedener SNP-Arrays der Firma Illumina analysiert. In der ersten Analysegruppe wurden 151 ID-Patienten untersucht, die als unauffällige diagnostische Voruntersuchungen sämtlich eine konventionelle Karyotypisierung und eventuell molekulargenetische Untersuchungen aufwiesen. Im Gegensatz zur ersten Analysegruppe war eine konventionelle Karyotypisierung im Rahmen der diagnostischen Abklärung in der zweiten Analysegruppe (161 Patienten) keine Voraussetzung. Bei 20 ID-Patienten der ersten Analysegruppe konnten *de novo*-CNVs detektiert werden. Dies entspricht einem Anteil von 13,2%. In der zweiten Analysegruppe wurden bei 17 ID-Patienten *de novo*-CNVs (entsprechend einer Detektionsrate von 10,6%) nachgewiesen. Ein Vergleich mit in der Literatur veröffentlichten Daten zeigte, dass beide Detektionsraten mit den bisher veröffentlichten Daten übereinstimmen. Miller et al. fassten die Ergebnisse von 33 verschiedenen Studien zusammen, die eine molekulare Karyotypisierung bei ID-Patienten durchführten. In Abhängigkeit von der verwendeten Array-Auflösung, der Patientenauswahl und den durchgeführten Voruntersuchungen schwanken die Detektionsraten meist zwischen 11% und 15% (Miller et al., 2010). Wird die Auswahl der Patienten auf schwer betroffene Patienten, die neben der ID noch weitere dysmorphologische Merkmale, angeborene Anomalien oder einen Minderwuchs aufweisen, beschränkt, kann die Detektionsrate auf bis zu 35% erhöht werden (Aradhya et al., 2007). Der Einfluss der Patientenauswahl spiegelt sich eventuell auch in den Detektionsraten der beiden Analysegruppen der vorliegenden Arbeit wieder. In der ersten Analysegruppe wurden stark bevorzugt Patienten mit einem syndromalem Erscheinungsbild, d.h. mit weiteren Auffälligkeiten wie Dysmorphiezeichen und Fehlbildungen untersucht, während in der zweiten Analysegruppe keine so ausgeprägte Vorauswahl auf syndromale Phänotypen getroffen wurde. So könnte die leicht erhöhte Detektionsrate innerhalb der ersten Analysegruppe (13,2%) im Vergleich zur zweiten Analysegruppe (10,6%) zu erklären sein. Neben den verwendeten SNP-Arrays und den verschiedenen Voruntersuchungen und Einschlusskriterien war die diagnostische Auflösung ein weiterer Unterschied zwischen den Analysegruppen. In der ersten Gruppe wurden alle Patienten auf CNVs bis zu einer Größe von 20 kb untersucht. In der zweiten Gruppe lag die untere genomische Grenze der Untersuchungen bei 80 kb. Innerhalb der ersten Analysegruppe waren 44% der bestätigten CNVs zwischen 20kb und 80kb groß. Unter diesen 44% war jedoch nur ein *de novo*-CNV. Auf die Gesamtzahl der untersuchten Patienten in der ersten Analysegruppe gerechnet entspricht dies einem Anteil von 0,6%. Auf die Routinediagnostik angewendet würde dies bedeuten, dass durch eine erhöhte Auflösung in zusätzlichen 0,6% der Patienten ein *de novo*-CNV identifiziert werden würde. Durch die hohe technische Auflösung der SNP-Arrays

und der dadurch großen Anzahl potentieller CNVs mit Größen unter 80 kb ständen den zusätzlichen 0,6% jedoch sehr hohe Kosten für die Verifizierung und Interpretation gegenüber. Die stetige Verbesserung der technischen Auflösung der SNP-Arrays vergrößert dieses Problem zunehmend.

Die Detektionsrate der SNP-Arrays darf aber nicht allein anhand der Patienten mit *de novo*-CNVs berechnet werden. So sprechen mehrere Gründe dafür, dass die *de novo*-Herkunft eines CNVs allein nicht beweisend für die Pathogenität desselbigen ist. Aufgrund der Neumutationsrate (2,5 *de novo*-CNVs/1000 Neugeborenen) kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der *de novo*-CNVs, die keine Fehlentwicklung bedingen, die Anzahl der pathogenen *de novo*-CNVs übersteigt (Vermeesch et al., 2011). Des Weiteren veröffentlichten Vermeesch et al. zwei Beispiele, in denen *de novo*-CNVs, die zunächst als pathogen eingestuft wurden, nicht die Ursache für die Entwicklung der Phänotypen waren. Gesichert ursächlich waren in diesen Fällen *de novo*-Mutationen in den für das Kabuki-Syndrom und das CHARGE-Syndrom verantwortlichen Genen *MLL2* und *CHD7* (Vermeesch et al., 2011). Daher dürfen in die Berechnung der Detektionsrate nur CNVs mit einer gesicherten bzw. hoch wahrscheinlichen Pathogenität eingehen. Zu den CNVs mit einer gesicherten/wahrscheinlichen Pathogenität können auch von Eltern vererbte CNVs gehören, die demnach auch in die Berechnung der Detektionsrate einfließen müssen. Für die Beurteilung von CNVs wird seit kurzem versucht, evidenzbasierte Maßstäbe zu entwickeln, anhand derer CNVs eine gesicherte oder wahrscheinliche Pathogenität zugeschrieben werden kann (Interpretation von CNV Daten, S. 15). (Riggs et al., 2011).

Erste Analysegruppe

Bei 13 der 20 ID-Patienten mit *de novo*-Deletionen der ersten Analysegruppe konnte anhand von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen gemäß den evidenzbasierten Maßstäben (Riggs et al., 2011) nachgewiesen werden, dass der detektierte CNV für die ID bzw. den Gesamtphänotyp des Patienten ursächlich ist. So wurden Deletionen der kritischen Regionen für bekannte Mikrodeletionssyndrome wie dem 2q33.1-Deletionssyndrom (OMIM #612313, Patient 48/08), dem 22q11.2- Deletionssyndrom / Di-George-Syndrom (OMIM #188400, Patient 59/01) und dem 17q21.31-Deletionssyndrom (OMIM #610443, Patient 6/03) identifiziert. Des Weiteren wurden ein 15q11-q13 Duplikation-Syndrom (OMIM # 608636, Patient 70/08) und eine Duplikation in der Region des Xp11.23-p11.22-Duplikationssyndroms (OMIM # 300801, 29/08) identifiziert. Drei CNVs betrafen mit *EHMT1* (OMIM *607001, Patient 73/08), *CASK* (OMIM *300172, Patientin 72/00) und *FMR1/FMR2* (OMIM *309550/*300806, Patientin 5/07) bekannte ID-Gene, die vollständig oder teilweise deletiert vorlagen. In allen diesen Fällen lagen sichere Genotyp-Phänotyp-Korrelationen vor. Die Identifizierung bekannter Mikrodeletionssyndrome trotz vorhergehender klinischer Untersuchung ist durch die klinische Heterogenität der Syndrome zu erklären. Eine 12,21 Mb große Deletion 9q21.12-q21.32, die in der konventionellen Karyotypisierung unentdeckt geblieben war, wurde aufgrund ihrer Größe und ihres

Geninhalts (61 RefSeq Gene) als pathogen eingestuft. Für vier Mikrodeletionen (2p14-p15 / Patient 15/08 (Wohlleber, Kirchoff, Zink et al., 2011); 5q31.2 / Patient 29/09 (Kleffmann, Zink et al., 2012); 5q14.3 / Patient 14/06 (Engels et al., 2009); 15q22.1-q22.2 / Patient 22/09) wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Genotyp-Phänotyp-Korrelationen eine wahrscheinliche bzw. höchstwahrscheinliche Pathogenität nachgewiesen. Für die Mikrodeletion in Xq27.3-q28, die mit *FMR1* und *FMR2* zwei bekannte ID-Gene enthielt wurde durch Expressionsanalysen die Pathophysiologie untersucht (Zink et al., 2012 (submitted)).

Die sechs im Folgenden diskutierten *de novo*-CNVs konnten weder in die Kategorie "pathogen" noch in die Kategorie "benigne / neutral" eingestuft werden und daher als CNVs mit unklarer klinischer Relevanz oder VOUS (**V**ariant **o**f **u**nknown **s**ignificance) bezeichnet.

Patient 38/02 trug eine 2,96 Mb große *de novo*-Duplikation in 2q37.3. Für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation fehlten direkt vergleichbare Fälle in der Literatur oder in der Datenbank DECIPHER. In DECIPHER sind fünf überlappende Duplikationen in 2q37.3 gelistet. Aufgrund der unterschiedlichen genomischen Größen dieser Duplikationen fällt eine genaue Genotyp-Phänotyp-Korrelation schwer. Innerhalb der Duplikation liegt das Gen *HDAC4* (OMIM * 605314). Mutationen und Deletionen des Genes werden mit dem Brachydaktylie-Mental Retardation-Syndrom (BDMR; OMIM# 600430) in Verbindung gebracht (Williams et al., 2010). Allerdings ist fraglich, ob Duplikationen von *HDAC4* zu einer ähnlichen Symptomatik wie Deletionen führen. Aufgrund der Größe der *de novo*-Duplikation, der Anzahl der betroffenen Gene (34 RefSeq-Gene) und der *de novo*-Entstehung ist eine Pathogenität wahrscheinlich, lässt sich aber noch nicht endgültig feststellen.

Die mögliche Pathogenität der *de novo*-Deletion in 3q26.33 (Patient 43/01) wird in Kapitel 5.6 (*De novo* Mikrodeletion 3q26.33, S.128) diskutiert.

Die bei Patientin 21/06 diagnostizierte ca. 70 kb große *de novo*-Deletion in 7p22.1 enthielt mit *TNRC18B* nur ein Gen. In der Datenbank DECIPHER sind zwei überlappende Deletionen eingetragen, die in ihrer Größe (2,35 Mb bzw. 3,64 Mb) und ihrem Geninhalt (24 bzw. 34 Gene) stark von der Deletion der Patientin 21/06 abweichen und daher für eine Genotyp-Phänotyp Korrelation kaum in Frage kommen. Über die Funktion und eine mögliche Verbindung mit neurologischen Phänotypen von *TNRC18B* ist in der Literatur nichts bekannt.

Patientin 48/09 trug eine 0,21 Mb große *de novo*-Deletion in 8p23.2. Die Deletion enthielt mit *CSMD1* (*CUB and Sushi multiple domains*) nur ein Gen. In DECIPHER sind 15 weitere Patienten mit überlappenden, aber deutlich größeren Deletionen aufgeführt, wodurch eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation erschwert wird. Die bei DECIPHER Patient 251426 vorliegende 7,68 Mb große Deletion, die die Deletion der Patientin 48/09 vollständig überdeckte, war von einem gesunden Elternteil vererbt. Dies spricht zumindest gegen eine vollständige Penetranz der hier detektierten Deletion. Genomweite Assoziationsstudien zeigten eine Assoziation zwischen *CSMD1* und Schizophrenie (Håvik et al., 2011).

Die mögliche Beteiligung von *CSMD1* an der Entwicklung eines psychiatrischen Phänotypen könnte als Hinweis darauf interpretiert werden, dass *CSMD1* auch an der Entwicklung eines psychomotorischen Phänotyp beteiligt sein könnte (Owen et al., 2011). So zeigen verschiedene GWAS (Genome-Wide-Association-Studies) und CNV-Analysen eine genetische Überlappung zwischen Phänotypen wie Autismus, ID, Epilepsie oder Schizophrenie (Doherty et al., 2012). Insgesamt kann die Deletion in 8p23.2 noch nicht endgültig in ihrer klinischen Relevanz bewertet werden.

Patientin 19/09 trägt eine 1,6 Mb große *de novo*-Deletion in Xp22.31, die mit *HDHDI*, *STS*, *VCX* und *PNPLA4* vier Gene enthält. Neben einer schweren ID wies die Patientin einen Kleinwuchs und einen Strabismus auf. Deletionen und Duplikationen dieser Region in Xp22.31 treten in verschiedener Größe aufgrund von flankierenden *low-copy-repeats* und daraus resultierenden NAHR häufig auf und werden in der Literatur intensiv diskutiert. Anhand von Deletionen und Mutationen konnten mit *STS* (Ichthyosis) und *KAL* (Kallmann-Syndrom) zwei krankheitsverursachende Gene in Xp22.31 identifiziert werden. In Abhängigkeit von der Deletionsgröße können Deletionen von *STS* und *KAL* zum jeweiligen Phänotyp führen (Lesca et al., 2005; Chocholska et al., 2006). Hemizygoter Xp22.31-Deletionen bei Männern und homozygoter Xp22.31-Deletionen bei Frauen führen durch die daraus entstehende Nullisomie zur vollen Ausprägung des jeweiligen Phänotyps (Van Esch et al., 2005; Nagtzaam et al., 2012). Zum Entstehungsmechanismus der ID bei Patienten mit Deletionen in Xp22.31 gibt es verschiedenen Theorien. Zum einen befindet sich in der Region das Gen *NLGN4*. Mutationen und Deletionen in *NLGN4* werden mit einem weiten Spektrum an neuropsychiatrischen Krankheiten, wie ID, ADHS und Autismus assoziiert (Laumonnier et al., 2004; Lawson-Yuen et al., 2008). Ein weiteres Kandidatengenes für die Entwicklung einer ID in Xp22.31 ist *VCX-A*, da in der Literatur ID-Patienten mit Deletionen in *VCX-A* beschrieben wurden. Lesca et al. zeigten allerdings, dass die Familie der *VCX*-Gene nur in Keimbahnzellen und nicht im Gehirn exprimiert wird (Lesca et al., 2005). Daher werden regulatorische "long-range"-Effekte der *VCX-A* Region auf das ca. 300 kb entfernte bekannte ID-Gen *NLGN4* vermutet (Jamain et al., 2003; Laumonnier et al., 2004). Mochel et al. berichteten von einem Patienten mit schwerer Ichthyosis und Kallmann-Syndrom, aber mit einer normalen neuropsychologischen Entwicklung. Der Patient erbt von seiner phänotypisch unauffälligen Mutter eine 3,7 Mb große Deletion in Xp22.31, die neben *STS* und *KAL*, auch *NLGN4* und alle *VCX* Gene inklusive *VCX-A* enthält. Dies spricht gegen eine alleinige hochpenetrante Ursächlichkeit von *NLGN4* und *VCX-A* in der Entwicklung einer ID (Mochel et al., 2008).

Wie oben erwähnt führen hemizygoter Deletionen der krankheitsverursachenden Gene (*STS*, *KAL*, *NLGN4*) bei Männern in Abhängigkeit von der Deletionsgröße und damit der in der Deletion enthaltenen bekannten krankheitsverursachenden Gene zu einer vollen Ausprägung des jeweiligen Phänotyps, während heterozygoter Mutationen bei Frauen zu einer variablen Ausprägung führen. Es wird vermutet, dass die Variabilität bei Trägerinnen heterozygoter Deletionen in Xp22.31 zum einen durch unterschiedliche X-Inaktivierungsmuster, zum anderen aber auch durch epigenetische Faktoren

beeinflusst wird (Chocholska et al., 2006; Lawson-Yuen et al., 2008). Die heterozygote Deletion der Patientin 19/09 enthält mit *STS* eines der bekannten krankheitsverursachenden Gene, dessen Deletion bei männlichen Patienten zu einer Ichthyosis führt. Die klinische Untersuchung der Patientin erbrachte keine Anzeichen einer Ichthyosis. Innerhalb der Deletion der Patientin 19/09 sind keine der oben beschriebenen Kandidatengene für ID enthalten. Daher ist die Ätiologie der ID von Patientin 19/09 unklar und es kann keine Aussage über die Pathogenität der *de novo*-Deletion in Xp22.31 getätigt werden. Eine Pathogenität kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, da in der Datenbank DECIPHER eine weitere Patientin (Patientin 257305) mit einer vergleichbaren *de novo*-Deletion und einer ID, aber anamnestisch ohne Ichthyosis eingetragen ist. Inwiefern weitere genetische Faktoren die Entwicklung der ID bei Patientin 19/09 bedingen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Es gibt aber Anzeichen, dass Deletionen in Xp22.31 im Sinne der "*second-hit*"-Theorie den Phänotyp der Patienten beeinflussen (Li et al., 2012). Aufgrund fehlender weiterer seltener CNVs in der Patientin ist es aber auch vorstellbar, dass Mutationen in ID-Genen oder CNVs unterhalb der in dieser Arbeit verwendeten Auflösung oder CNVs, die keine Gene, aber regulatorische Elemente enthalten und daher nicht Teil dieser Analyse waren, in Kombination mit der *de novo*-Deletion in Xp22.31 den Phänotyp bedingen.

Die *de novo*-Duplikation in 7p15.3 bei Patientin 42/02 betraf mit *NPY* nur ein Gen. Größere Duplikationen, die neben weiteren Genen unter anderem *NPY* betreffen, wurden mit ADHS (*Attention-deficit/hyperactivity disorder*= Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung) assoziiert (Lesch et al., 2011). Ein Zusammenhang zwischen einer *NPY*-Duplikation und einer ID wurde jedoch bisher nicht beschrieben. Bei keinem der neun publizierten Träger mit ADHS lag eine ID vor. Zusätzlich finden sich ebenfalls *NPY* betreffende Duplikationen parentaler Herkunft sowohl im Bonner Kollektiv als auch in DECIPHER (Patient 248461). Dies legt nahe, dass die hier detektierte Duplikation wahrscheinlich nicht ursächlich für den Phänotyp der Patientin ist.

Von 151 ID-Patienten der ersten Analysegruppe konnte für 13 Patienten die Ursache der ID aufgeklärt werden. Dies entspricht einer Detektionsrate von 8,6 %. Die klinische Signifikanz der sechs weiteren *de novo*-CNVs war unklar. Demnach beträgt der Anteil eindeutig pathogener CNVs an den *de novo*-CNVs 68 %.

Zweite Analysegruppe

Pathologische *de novo*-CNVs

In der zweiten Analysegruppe konnten bei 17 von 161 ID-Patienten (10,6%) *de novo*-CNVs identifiziert werden. Bei 13 der 17 Patienten handelte es sich um CNVs, die kritische Regionen für bekannte Mikrodeletions-/Mikroduplikationssyndrome bzw. bekannte ID-Gene betrafen. Dazu gehörten Deletionen in den kritischen Regionen für das 1p32-p31-Deletionssyndrom (OMIM # 613735, Patient 11/10), das Williams-Beuren-Syndrom (OMIM # 194050, Patienten 69/11 und 8/11), das 8q21-

Deletionssyndrom (OMIM # 614230, Patient 43/11), das 16p11.2-Mikrodeletionssyndrom (OMIM # 611913, Patient 52/11), das 16p13-Deletionssyndrom (OMIM # 610543, Patienten 40/11 und 4/10), das 18p- (OMIM # 146390, Patient 50/11) und das 18q-Deletionssyndrom (OMIM # 601808, Patient 12/10) und das 22q13-Deletionssyndrom / Phelan-McDermid-Syndrom (OMIM # 606232, Patient 41/11). Des Weiteren konnte eine *de novo* entstandene Duplikation in der kritischen Region für das 15q11-q13 Mikroduplikationssyndrom (OMIM #608636, Patient 77/10) identifiziert werden. Patient 71/10 trug eine Deletion in 2p16.3, die die Exons 1-3 bestimmter Transkripte des bekannten ID-Gens *Neurexin* (OMIM *600565) enthielt.

Patient 70/11 trug eine 2,21 Mb große Mikrodeletion der kritischen Region für das Wolf-Hirschhorn-Syndrom in 4p16.3 (OMIM # 194190). Für eine Segregationsanalyse stand nur die DNA der Mutter zur Verfügung, so dass nur eine maternale Herkunft der Deletion ausgeschlossen werden konnte. Trotz unvollständigem *de novo*-Nachweis ist die 2,21 Mb große Deletion in 4p16.3 aufgrund der Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei bekannter Pathogenität mit vollständiger Penetranz als ursächlich für die Entwicklung einer ID anzusehen. So wies Patient 70/11 mit einer ID, einer Wachstumsretardierung und Krampfanfällen die häufigsten Symptome des Wolf-Hirschhorn-Syndroms auf.

Neben CNVs in den kritischen Regionen für bekannte Mikrodeletions- und Mikroduplikationssyndrome wurden auch in der zweiten Analysegruppe seltene CNVs identifiziert, die im Folgenden genauer charakterisiert werden. Bei zwei Patienten konnten seltene *de novo*-CNVs nachgewiesen werden, die entweder aufgrund einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation mit weiteren Patienten oder aufgrund der Anzahl der betroffenen Gene als pathologisch angesehen wurden. Für die seltene 1,76 Mb große *de novo*-Deletion in 9q33.3-q34.11 der Patientin 51/10 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand weiterer DECIPHER- und MRNET-Patienten eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation aufgestellt werden, so dass von einer Pathogenität ausgegangen werden kann (*De novo* Mikrodeletion 9q33.3-q34.11, Kapitel 5.7, S. 129).

Bei Patient 12/11 wurde eine *de novo* entstandene 6,1 Mb große heterozygote Deletion in den Chromosomensubbanden 5q31.1-q31.2 detektiert. Die Deletion umfasste 64 bekannte Gene. In der DECIPHER-Datenbank waren zwei Patienten (254582 und 2224) mit überlappenden Deletionen in dieser Region eingetragen. Der DECIPHER-Patient 254582 wies wie Patient 12/11 eine psychomotorische Retardierung, Krampfanfälle und faziale Dysmorphien auf. Für DECIPHER-Patient 2224 werden zur psychomotorischen Entwicklung keine Angaben gemacht, bei ihm fielen aber wie bei Patient 12/11 eine Fußfehlstellung und ein kleines Kinn auf. Mosca et al. beschrieben eine weitere Patientin mit einer Entwicklungsverzögerung, einer Wachstumsretardierung bei normalem Kopfumfang, einer muskulären Hypotonie und milden faziale Dysmorphien, zu denen wie bei Patient 12/11 ein kleines Kinn gehörte (Mosca et al., 2007). Aufgrund der teilweisen Genotyp-Phänotyp-Korrelation und der Größe der Deletion konnte von einer Pathogenität ausgegangen werden.

In Patient 62/11 wurde eine unbalancierte Translokation der Chromosomen 4 und 13 identifiziert. Die Imbalancen umfassten insgesamt 135 RefSeq-Gene. Für eine abschließende Genotyp-Phänotyp-Korrelation fehlen genomisch vergleichbare Fälle. Aufgrund der sehr großen Anzahl an betroffenen Genen (Deletion: n= 46, Duplikation: n=73) ist eine Ursächlichkeit für den Phänotyp des Patienten wahrscheinlich.

Pathologischer Befund: UPD15

Für Patientin 71/08 konnte keine ursächlicher CNV identifiziert werden. Die Analyse der SNP-Array-Ergebnisse zeigte jedoch, dass nahezu sämtliche SNP-Marker des Chromosoms 15 in homozygoter Form vorlagen. Dieser Befund ist typisch für eine uniparentale Disomie (UPD) des Chromosoms 15. Bei uniparentalen Disomien stammen beide homologen Chromosomen von einem Elternteil, während das Homologe des anderen Elternteils fehlt. Werden dabei beide Homologe eines Elternteils vererbt, spricht man von einer uniparentalen Heterodisomie. In diesem Fall lägen SNP-Marker des Chromosoms heterozygot vor. Die bei Patientin 71/08 vorliegende Homozygotie der Marker spricht für die uniparentale Vererbung von zwei Kopien desselben elterlichen Chromosoms 15 und damit für eine uniparentale Isodisomie. Im Falle des Chromosoms 15 bzw. der kritischen Region in 15q11.2-q13 kann eine UPD in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft der Chromosomen zwei verschiedene Syndrome bedingen. Liegt eine paternale UPD 15 vor, so resultiert ein Angelman-Syndrom, während eine maternale UPD zur Ausprägung des Prader-Willi-Syndroms führt (Nicholls et al., 1989; Kishino et al., 1997). Verantwortlich für die Ausprägung der verschiedenen Syndrome ist ein Imprinting, d.h. eine elterliche Prägung bestimmter kritischer Regionen in 15q11.2 u. a. durch unterschiedliche Methylierungen in der Keimbahn. Im Fall von Patientin 71/08 wurde durch eine aufgrund des Array-Befundes veranlasste diagnostische methylierungsspezifische MLPA eine paternale UPD 15 nachgewiesen. Die identifizierte UPD 15 der Patientin 71/08 demonstriert einen wichtigen Vorteil von SNP-Arrays gegenüber reinen Oligonukleotid-Arrays. Durch die Bestimmung der SNP-Genotypen können zusätzlich zu den CNVs auch Homozygotien und uniparentale Isodisomien identifiziert werden.

Pathologische vererbte CNVs

Neben pathologischen *de novo*-CNVs wurde bei drei betroffenen Brüdern eine maternal vererbte Deletion in 15q13.3, die das Gen *CHRNA7* (OMIM *118511) enthielt, nachgewiesen. *CHRNA7* wird in der Literatur mehrfach als das Hauptkandidatengen für das 15q13.3-Mikrodeletionssyndrom diskutiert (Shinawi et al., 2009; Masurel-Paulet et al., 2010). Das 15q13.3-Mikrodeletionssyndrom wird unter anderem mit ID, Autismus und Schizophrenie assoziiert (Sharp et al., 2008; Ben-Shachar et al., 2009; Dibbens et al., 2009; Helbig et al., 2009; Stefansson et al., 2009; van Bon et al., 2009). Alle drei Brüder wiesen zumindest eine ID auf. Einer der Brüder zeigte zudem autistische Züge und eine Epilepsie. Die elterliche Herkunft solcher Deletionen und ihre variable Penetranz wurden mehrfach beschrieben (van

Bon et al., 2009). Somit kann aufgrund der vorliegenden Genotyp-Phänotyp-Korrelation von einer Ursächlichkeit der *CHRNA7*-Deletion ausgegangen werden.

***De novo* entstandene CNVs unklarer klinischer Signifikanz / VOUS**

Bei drei Patienten konnten *de novo*-CNVs nachgewiesen werden, deren klinische Signifikanz nicht eindeutig geklärt werden konnte. Patient 55/10 trug eine 0,94 Mb große *de novo*-Deletion in 3p26.2, die innerhalb der beim 3p-Syndrom häufiger deletierten Region liegt, aber außerhalb der dafür als kritisch beschriebenen Region (Shuib et al., 2009). Patienten mit dem 3p- Syndrom tragen in der Regel weitaus größere Deletionen (6-12 Mb) und der Phänotyp des Patienten stimmt bis auf seine ID nicht mit den wiedererkennbaren Merkmalen des 3p-Syndroms (niedriges Geburtsgewicht, Wachstumsretardierung, Telekanthus / Hypertelorismus, Ptosis und Mikrognathie) überein. Diese Tatsachen sprechen gegen eine hochpenetrante Ursächlichkeit der Deletion in 3p26.2.

Für die *de novo*-Deletion in 4q32.1, die bei Patient 44/10 nachgewiesen wurde, konnte mangels fehlender genomisch vergleichbarer Fälle mit vergleichbaren Phänotypen oder in Kontrollkollektiven keine klinische Signifikanz zugeordnet werden.

Die molekulare Karyotypisierung bei Patientin 43/11 ergab zwei *de novo* entstandene heterozygote Deletionen in 8q21.11-q21.3 und in 12q21.1. Ursächlich für den Phänotyp ist die 15,23 Mb große Deletion der kritischen Region des 8q21-Deletionssyndroms. Die klinische Signifikanz der zweiten 1,23 Mb großen *de novo*-Deletion in 12q21.1 ist aufgrund mangelnder vergleichbarer genomischer Fälle unklar.

Parentale CNVs unklarer klinischer Signifikanz / VOUS

Für zwei parental vererbte CNVs konnte eine klare klinische Signifikanz weder gesichert noch ausgeschlossen werden. Patientin 81/11 trug eine paternal vererbte, 1,63 Mb große Duplikation in Xp22.31. Die Duplikation entspricht von der Lokalisation her der in der ersten Analysegruppe detektierten Deletion der Patientin 19/09 und umfasst u.a. das *STS* Gen, das bei Deletion im männlichen Geschlecht Ichthyose verursacht (Lesca et al., 2005; Van Esch et al., 2005; Chocholska et al., 2006; Nagtzaam et al., 2012). Zu den reziproken Duplikationen in Xp22.31 konnte in der Literatur noch kein Konsens gefunden werden. Die Duplikation wird auch in Kontrollkollektiven und klinisch unauffälligen männlichen Verwandten beschrieben. Abhängig davon, ob in Patientenkollektiven gegenüber Kontrollkollektiven eine signifikant höhere Frequenz gefunden wird oder nicht, wird der Duplikation in einigen Studien eine Pathogenität mit unvollständiger Penetranz zugeschrieben, während andere sie als benigne Variante einstufen (Li et al., 2010; Faletra et al., 2012). Aufgrund der vorliegenden Daten kann die klinische Signifikanz der Duplikation momentan nicht endgültig beurteilt werden.

Bei Patientin 2/11 konnte eine 0,25 Mb große Duplikation paternalen Herkunft in 15q11.2 nachgewiesen werden. Der Vater war phänotypisch unauffällig. Der duplizierte Bereich lag zwischen den

Bruchpunktregionen BP1 und BP2 des langen Arms von Chromosom 15. Typische Prader-Willi/Angelman-Syndrom-Deletionen werden proximal durch die Bruchpunkte BP1 oder BP2 und distal von BP3 flankiert. Duplikationen zwischen den Bruchpunkten BP1 und BP2 können *de novo* entstehen oder von phänotypisch unauffälligen Eltern vererbt werden. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen sind reduzierte Penetranz, eine veränderte Gen-Expression in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes oder eine Wirkung als Suszeptibilität-Faktor (Burnside et al., 2011). Daher kann die klinische Signifikanz der Duplikation in 15q11.2 für Patientin 2/11 nicht abschließend beurteilt werden.

Insgesamt konnten in der zweiten Analysegruppe 17 Patienten mit *de novo*-CNVs identifiziert werden, was einer Detektionsrate von 10,6% entspricht. In 14 der 17 Patienten waren die nachgewiesenen *de novo*-CNVs ursächlich für die ID, was einem Anteil von 82,3% entspricht. Insgesamt konnten die Ursachen der ID bei 20 Patienten aufgeklärt werden. Dies entspricht einer Detektionsrate von 12,4%.

Zusammen wurden in beiden Analysegruppen 312 Patienten analysiert. Bei 36 (11,5% der Patienten) Patienten wurden *de novo*-CNVs detektiert. Für 33 (10,5%) Patienten konnte die wahrscheinliche Ursache der ID geklärt werden (Tab. 35).

Analysegruppe	Anzahl Patienten	Patienten mit <i>de novo</i> -CNVs (%)	Patienten mit pathologischen CNVs (ID)* (%)	Patienten mit CNVs unbekannter klinischer Signifikanz (VOUS)
1	151	20 (13,2%)	13 (8,6%)	7 (4,6%)
2	161	17 (10,6%)	20 (12,4%)	11 (6,8%)
Gesamt	312	36 (11,5%)	33 (10,5%)	18 (5,7%)

Tab. 35 Übersicht der Anzahl der analysierten Patienten in den beiden Analysegruppen und die Ergebnisse. * Einschließlich UPD 15; %: Anteil an untersuchten Patienten.

5.2. De novo Mikrodeletion 2p14-p15

Patient 15/08, im Folgenden analog zur Publikation von Wohlleber, Zink et al. (2011) Patient P1 genannt, war ein 8 1/4 Jahre alter Junge mit einer ID der Stufe 2 nach Zhang et al. (Zhang et al., 2005). Die molekulare Karyotypisierung mit einem Illumina Sentrix Human610-Quad-Array zeigte eine 2,23 Mb große heterozygote *de novo*-Mikrodeletion in den Chromosomenbanden 2p14-p15. Der Patient hatte zusätzlich von seiner Mutter eine balancierte Robertson'sche Translokation (13;14) geerbt. Da eine maternale UPD 14 ausgeschlossen wurde, konnte die Translokation als balancierter Umbau ohne klinische Relevanz klassifiziert werden. Die Suche in der DECIPHER-Datenbank ergab eine weitere Patientin (Patientin P2) mit einer *de novo* entstandenen 2,84 Mb großen heterozygoten Mikrodeletion

in 2p14-p15. In der Literatur wurden zum Zeitpunkt der Publikation (Wohlleber et al., 2011) keine vergleichbaren Mikrodeletionen in 2p14-p15 berichtet. Ein dritter Patient wurde 2012 in Posterform veröffentlicht (Krabichler et al. 2012). Die Bruchpunkte der überlappenden Mikrodeletionen waren nicht rekurrent und es gab keinen Hinweis auf segmentale Duplikationen oder LCRs (*low-copy-repeats*), die auf eine Nicht-Allellische Homologe Rekombination (NAHR) als Entstehungsmechanismus deuten würden. Daher ist eine Entstehung der Mikrodeletionen durch von segmentalen Duplikationen unabhängige Entstehungsmechanismen wie Nicht-Homologe-End-Verbindung (NHEJ= **N**on-**H**omologous **E**nd **J**oining) oder FoSTeS (**F**ork **S**talling and **T**emplate **S**witching) anzunehmen (Gu et al., 2008)

Die kleinste gemeinsame Region (SRO= **S**mallest **R**egion of **O**verlap) der drei Mikrodeletionen umfasste 1,6 Mb und 10 Gene: *UGP2*, *VPS54*, *PELI1*, *HSPC159*, *AFTPH*, *SERTAD2*, *SLC1A4*, *CEP68*, *RABA1A* und *ACTR2* (Abb. 34).

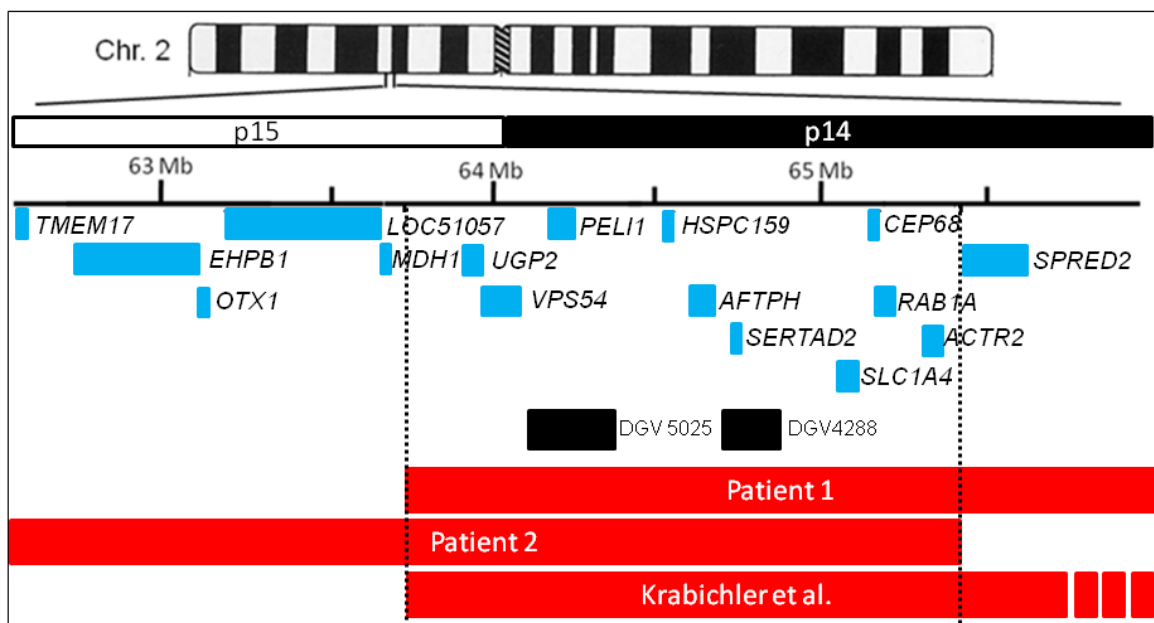


Abb. 34. Schematische Übersicht der Deletionen in 2p15-p14. Der roten Balken symbolisiert die de novo-Deletionen der drei Patienten. Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Grenzen der SRO. Blaue Balken: in der Region enthaltene Gene. Schwarzen Balken: Varianten aus DGV. Entnommen aus: Wohlleber, Kirchhoff, Zink et al. (2011) *Clinical and molecular characterization of two patients with overlapping de novo microdeletions in 2p14-p15 and mild mental retardation*. Eur J Med Genet, 54: 67-72.

Die klinischen Übereinstimmungen, wie die ID/DD, die vor allem die Sprachentwicklung betrifft, und die leichten, aber vergleichbaren fazialen Dysmorphiezeichen der drei Patienten, lassen im Sinne einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation den Schluss zu, dass diese durch die gemeinsame deletierte Region bedingt sind.

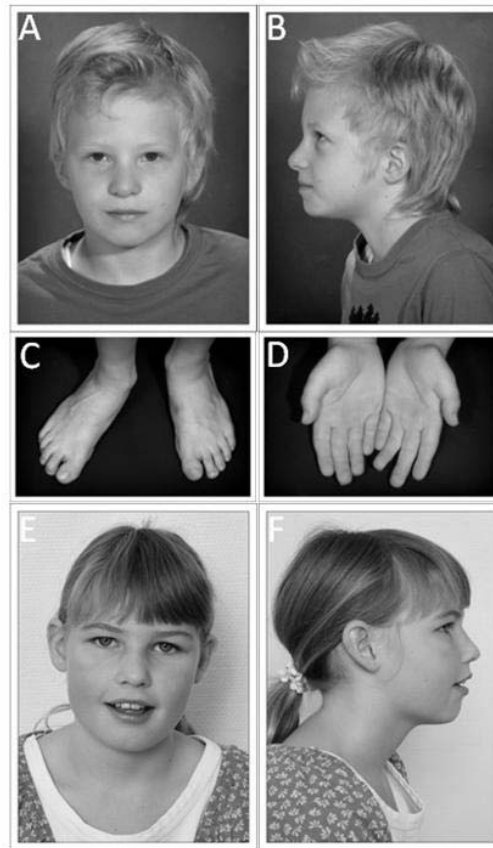


Abb. 35. A-D Patient 1 im Alter von 8 1/4 Jahren. E, F Patientin 2 im Alter von 12 Jahren. A, B, E, F Leichte Faziale Dismorphien: Langes Gesicht, breite Nasenspitze, dünne Oberlippe. C. Leichte Syndaktylie der zweiten und dritten Zehen des rechten Fußes. D. Beidseitige atypische Vier-Finger-Furche. Entnommen aus: Wohlleber, Kirchoff, Zink et al. (2011) *Clinical and molecular characterization of two patients with overlapping de novo microdeletions in 2p14-p15 and mild mental retardation*. Eur J Med Genet, 54: 67-72.

Eine direkte Beteiligung an der Ätiologie der ID wurde aber bisher bei keinem der Gene der SRO beschrieben. Für einige der Gene könnte aufgrund ihrer Funktion eine Beteiligung an der Ätiologie der ID der Patienten vermutete werden, obwohl sie eine ubiquitäre Expression zeigen. **UGP2** (*UDP-glucose pyrophosphorylase 2*) (HI: 1%) kodiert für ein Enzym, dass an der Interkonvertierung von Kohlenhydraten beteiligt ist. **VPS54** (*vacuolar protein sorting 54 homolog (Saccharomyces cerevisiae)*) (HI: 41%) ist an der Sortierung von Proteinen am Golgi-Apparat beteiligt; "loss of function"-Mutationen führen zu einer Depolarisation des Zytoskeletts (Fiedler et al., 2002). Eine publizierte *missense*-Mutation von **VPS54** in der Maus führt zu einer Fehlentwicklung der Motor-Neurone und zum Phänotypen der so genannten „Wobbler“-Maus (Meisler et al., 2008). Die Patienten 1 und 2 zeigen keine Anzeichen für eine Fehlentwicklung der Motor-Neurone. Zwei Gene, **PELII** (*pellino homolog 1 (Drosophila)*) (HI: 6%) und **SERTAD2** (*SERTA domain containing 2*) (HI: 7%) sind in CNVs der *Database of Genomic Variants DGV* lokalisiert (Varianten 4288 und 5025). Diese Varianten wurden in 4 bzw. 9 von 95 Kontrollpersonen in derselben Studie durch BAC-Array CGH-nachgewiesen (Wong et al., 2007). Eine Deletion dieser beiden Gene ist daher als Grund für eine ID eher unwahrscheinlich. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Deletion beider Gene zusammen zur Entwicklung

des Phänotyps der Patienten führt oder die Größe der Deletion überschätzt wurde, wie dies bei Verwendung der BAC-Array-CGH häufig der Fall ist (Perry et al., 2008). *PELII* ist Teil der Pellino-Protein-Familie, einer Gruppe von E3-Ubiquitin-Ligasen. Diese spielen als Mediatoren in "toll-like"-Rezeptor-Signalwegen, die zur Aktivierung von MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren führen, eine Rolle bei entzündlichen Prozessen und dem Immunsystem (Moynagh, 2009). *SERTAD2* kodiert für ein Protein mit einer SERTA-Domäne und einer PHD/Bromo-Bindungsdomäne. Die SERTA-Familie umfasst transkriptionelle Koregulatoren, die Signale von Transkriptionsfaktoren mit einer PHD- und/oder Bromodomäne integrieren (Hsu et al., 2001). *SERTAD2* fördert die Onkogenese in Nacktmäusen und wird in einigen Säugetiertumoren überexprimiert (Cheong et al., 2009). *HSPC159* oder *GRP* (*Galectin related Protein*) (HI: unbekannt) zeigt Sequenzähnlichkeiten mit den Galectinen, einer Familie von β -Galaktose bindenden Proteinen, die in einer Vielzahl von biologischen Prozessen mitwirken. Allerdings zeigten Proteinkristallographieuntersuchungen Unterschiede zwischen GRP und Galectinen, so dass für GRP eine andere, bisher unbekannte Funktion vermutet wird (Zhou et al., 2008). *AFTPH* (HI: 16%) kodiert für Aftiphilin, welches in der Ratte vorwiegend im Gehirn exprimiert wird, vor allem im Clathrin-trans-Golgi-Netzwerk in Neuronen des Hippokampus und in Synapsen. Es wird daher vermutet, dass Aftiphilin eine Komponente der Clathrin-Maschinerie in Neuronen ist (Burman et al., 2005). *SLCIA4* (HI: 70%) kodiert für das Transportprotein (SLC: solute carrier), das eine veränderte Expression in Patienten mit Schizophrenie, bipolarer Störung oder schweren Depressionen zeigt (Weis et al., 2007). Assoziationsuntersuchungen zeigten allerdings keine Assoziation zwischen *SLCIA4* und Schizophrenie (Skowronek et al., 2006). *CEP68* (HI: 92%) (*centrosomal protein 68 kDa*) wird für die Kohäsion des Zentrosoms benötigt (Graser et al., 2007). Eine spezifische Rolle von *CEP68* in der Entwicklung des menschlichen Gehirns ist nicht bekannt. Es konnte aber für mindestens 5 weitere Proteine des Zentrosoms (MCPH1, CDK5RAP2, ASPM, CENPJ und STIL) gezeigt werden, dass autosomal rezessive Mutationen zu einer primären Mikrozephalie, die wiederum häufig mit ID assoziiert ist, führen können (Kumar et al., 2009). Ein Maus-Modell mit einem Funktionsverlust von *CDK5RAP2* zeigt Proliferationsdefekte bei neuronalen Vorläuferzellen (Lizarraga et al., 2010). Zusammengefasst zeigt dies die Wichtigkeit des Zentrosoms in der Kontrolle der neuronalen Entwicklung. Da bei Patient 1 eine relative Mikrozephalie diagnostiziert wurde, ist eine Beteiligung von *CEP68* als Protein des Zentrosoms an der Ausbildung des Phänotyps denkbar. *RABIA* (HI: 10%) gehört zu der Familie der RAS-GTPasen und kontrolliert den Vesikel-Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. Maier et al. postulieren ein Modell, in dem die Interaktion von Rab1 und GTRAP3-18 die neuronale Differenzierung im Allgemeinen und das Wachstum der Neuriten im Besonderen steuern. (Maier et al., 2009). *ACTR2/ARP2* (*actin related protein 2 homolog (yeast)*) (HI: 31%) ist Teil des Arp2/3-Komplexes, der eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zytoskeletts spielt. Er ist von großer Wichtigkeit für eine Vielzahl zellulärer Prozessen wie der Lokomotion und dem intrazellulären Vesikeltransport und ist in der Regulation sowohl der "axon guidance" als auch der Filopodienbildung in *C. elegans* und *D. melanogaster* involviert (Norris et al., 2009).

Neben den gemeinsamen klinischen Merkmalen litten sowohl Patient 1 als auch der von Krabichler et al. publizierte Patient an einem Hörverlust (Patient 1: sensorineural), (Krabichler et al., 2012). *SPRED2* ist das einzige Gen, das bei diesen Patienten deletiert ist, nicht aber in Patientin 2, die keine Hörstörung aufweist. *SPRED2* gehört zu der Familie der SPRED-(*Sprouty-related proteins with Ena/Vasodilator-stimulated phosphoprotein homology-1 domain*) Proteine. Der *haploinsufficiency score* oder Haploinsuffizienzwert (HI), der auf einem statistische Vorhersagemodell für die Wahrscheinlichkeit einer Haploinsuffizienz eines Genes basiert (Huang et al., 2010), liegt für *SPRED2* bei 19% und sagt damit eine wahrscheinliche Haploinsuffizienz voraus (je kleiner der Wert, desto wahrscheinlicher liegt eine Haploinsuffizienz vor). SPRED-Proteine sind membran-assoziiert und unterdrücken zahlreiche extrazelluläre mitogene Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Cytokine und Chemokine. Ihr inhibitorischer Effekt scheint sich auf den RAS/RAF/MAPK-Signalweg zu beschränken (Wakioka et al., 2001). In der frühen Embryonalentwicklung der Maus wird das *SPRED2*-Maus-Ortholog im Ektoderm und im Mesoderm exprimiert, in der späteren Embryonalentwicklung im neuronalem Gewebe, im Herzen, in der Lunge, im Verdauungstrakt, im Urogenitaltrakt und den Extremitäten (Tuduce et al., 2010). Die *SPRED2*-Expression in neuronalen Geweben lassen eine Beteiligung von *SPRED2* an der Ätiologie des "neuronalen" Phänotyps der Patienten (ID, Krämpfe, sensorineuraler Hörverlust) nicht ausschließen. Darüber hinaus umfasst die Deletion des dritten Patienten die kodierende Sequenz des Gens *MEIS1*. *MEIS1* ist ein Homöobox-Gen, dem aufgrund seiner Expression u.a. in den semizirkulären Kanälen des sich entwickelnden Innenohres im Hühnchen eine Rolle in der Morphogenese des Ohrs zugeschrieben wird (Sanchez-Guardado et al., 2011). Für den Hörverlust der Patienten P1 und P3 gibt es daher mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen kann die Haploinsuffizienz von *SPRED2* zur Entwicklung des Hörverlustes führen, wobei eine spezifische *SPRED2*-Expression während der Entwicklung des Ohres in der Literatur nicht beschrieben wird. Zum zweiten besteht die Möglichkeit, dass eine verringerte Expression von *MEIS1*, welches einen *haploinsufficiency score* von 6% hat und so mit großer Wahrscheinlichkeit haploinsuffizient ist, zum Hörverlust der Patienten P1 und P3 führt. Obwohl *MEIS1* nicht von der Deletion in Patient P1 betroffen ist, besteht die Möglichkeit, dass regulatorische Elemente, die die Expression von *MEIS1* beeinflussen, innerhalb der Deletion von Patient P1 liegen. Drittens besteht die Möglichkeit, dass Gene in der SRO der drei Patienten mit einer unvollständigen Penetranz zur Ausprägung des Hörverlustes führen.

Die *de novo*-Deletionen in 2p14-p15 der drei Patienten liegen in der Nähe der kritischen Region für das 2p15-p16-Mikrodeletionssyndrom. Die Patienten zeigen jedoch weder eine genomische noch eine klinische Überlappung mit dem 2p15-p16-Mikrodeletionssyndrom. Typische klinische Merkmale von Patienten mit Deletionen in der kritischen Region des 2p15-p16 Mikrodeletionssyndroms sind eine moderate bis schwere ID, mit einem Fehlen von Sprache, einer geringen Körpergröße, einer Mikrozephalie und spezifischen fazialen Merkmalen, wie einer bitemporalen Verengung und einem Telekanthus/Hypertelorismus (Rajcan-Separovic et al., 2007; Liang et al., 2009). Im Gegensatz dazu zeigen die Patienten mit Deletionen in 2p14-p15 eine milde ID und keine so ausgeprägten spezifischen

fazialen Merkmale. Nur Patient 1 zeigte eine relative Mikrozephalie. Die genomische Distanz zwischen der SRO der Deletionen in 2p14-p15 und der kritischen Region für das 2p15-p16-Mikrodeletionssyndrom beträgt ca. 1,5 Mb. Auch die distalste Deletion (Patientin 2) ist noch 301 kb entfernt. Nichtsdestotrotz wäre denkbar, dass die Deletion regulatorischer Elemente in 2p14-p15 einen Einfluss auf die Expression von Genen des 2p15-p16-Mikrodeletionssyndroms hat. Die Literatur beschreibt Einflüsse von regulatorischen Elementen über mehr als 1 Mb (Klopocki et al., 2008). Da aber die drei Patienten keine spezifischen Merkmale des 2p15-p16-Mikrodeletionssyndroms aufweisen, ist dies unwahrscheinlich.

Eine engere Eingrenzung des ID-Kandidatengens ist im vorliegenden Fall schwierig, da eine Rolle in der neuronalen Entwicklung bzw. der Entwicklung neuronaler Phänotypen für keines der Gene aufgrund ihrer Funktion und/oder des Haploinsuffizienzwert ausgeschlossen werden kann. Der Haploinsuffizienzwert eines Gens ist ein rein statistisches Modell und trifft keine Aussage über eine mögliche Pathogenität eines Gens und ist daher nur ein Hilfsmittel zur Priorisierung von Kandidatengen. So ist *CEP68* aufgrund seiner Funktion als Zentromerprotein ein geeignetes Kandidatengen. Sein hoher Haploinsuffizienzwert (92%) spricht wiederum gegen eine Beteiligung an der Ätiologie des Phänotyps der drei Patienten. *UGP2* ist das Gen mit dem niedrigsten HI, aber aufgrund seiner Funktion ein eher unwahrscheinliches Kandidatengen für eine ID. Legt man sowohl die Funktion als auch den HI zur Beurteilung eines Gens zu Grunde, ist *RAB1A*, das einen Einfluss auf die neuronale Differenzierung und die Kontrolle der Axon-Leitung und -Zielführung hat und mit einem HI von 6% höchstwahrscheinlich haploinsuffizient ist, das geeignetste Kandidatengen. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass es sich hier um ein "*contiguous gene syndrome*" und damit um einen additiven Effekt mehrerer Gene handelt. Dafür spräche, dass einige der deletierten Gene in ähnlichen biologischen Prozessen, wie dem Vesikel-Transport (*VPS54*, *AFTPH*, *RAB1A*) oder der Organisation des Aktin-Zytoskeletts (*VPS54*, *ACTR2*) involviert sind. Für eine genauere Charakterisierung des SRO und ggf. eine Einengung auf nur ein Kandidatengen bedarf es weiterer Patienten mit Kopienzahlveränderungen in 2p14-p15 und/oder Mutationen in den beschriebenen Genen.

5.3. De novo Mikrodeletion Xp11.3-p11.4

Bei Patientin 72/00 wurde eine moderate ID der Stufe 3 nach Zhang et al. (Zhang et al., 2005) diagnostiziert. Weiterhin wies die Patientin eine schwere Mikrozephalie sowie faziale Dysmorphien wie ansteigende Lidachsen, einen Telekanthus, eine breite Nasenwurzel und -spitze, eine hypoplastische Maxilla und große Ohren auf. Das kraniale MRT ergab eine pontocerebelläre Hypoplasie. Eine molekulare Karyotypisierung durch einen Illumina H610Q-Array ergab eine 4,46 Mb große heterozygote Deletion in Xp11.3-p11.4. Die Segregationsanalyse zeigte eine *de novo*-Entstehung. Die X-Inaktivierung der Patientin war stark verschoben (93:7). Die Deletion enthielt mit *CXorf36*, *UTX*,

DUSP21, *FUNDC1*, *EFHC2*, *NDP*, *MAOB*, *MAOA*, *GPR82*, *GPR34* und *CASK* insgesamt 11 proteinkodierende RefSeq-Gene. Für sieben der elf deletierten Gene kann eine mögliche Rolle in neuronalen Phänotypen vermutet werden. Für *CXorf36* wurde durch Sequenzvergleich eine enge Verwandtschaft mit *DIA1* (*Deleted In Autism-1*) ermittelt. Homozygote Deletionen von *DIA1* sind mit Autismus assoziiert (Morrow et al., 2008; Aziz et al., 2011). *UTX* ist in die Histon-Demethylierung involviert, die wiederum ist unter anderem für die Regulierung der Genexpression im Gehirn verantwortlich ist (Xu & Andreassi, 2011). Interessanterweise unterliegt *UTX* nicht der X-Inaktivierung. Es findet sich hier also eine unterschiedliche Expression zwischen den Geschlechtern (Greenfield et al., 1998). *FUNDC1* reguliert die durch Hypoxie induzierte Mitophagie, dem selektiven Abbau von geschädigten Mitochondrien, in Säugetierzellen (Lin & Beal, 2006; Liu et al., 2012). Fehlfunktionen der Mitochondrien können zu neurodegenerativen Krankheiten führen (Lin & Beal, 2006). Mutationen und Deletionen von *NDP* führen zum seltenen Norrie-Syndrom (Schuback et al., 1995). Das X-chromosomale Norrie-Syndrom geht mit einer Erblindung und Taubheit der Betroffenen einher. Hauptsächlich sind Männer betroffen und ungefähr 50 % der Betroffenen zeigen eine intellektuelle Beeinträchtigung (Berger et al., 1992). *MAOA* und *MAOB* kodieren für Monoaminoxidasen, die Monoamine durch Desaminierung spalten. Zu den Substraten der Monoaminoxidasen gehören unter anderem die Neurotransmitter Serotonin, Norepinephrin und Dopamin (Shih & Thompson, 1999). Polymorphismen in *MAOA* und *MAOB* wurden mit der Ausbildung von Verhaltensauffälligkeiten und bipolaren Störungen assoziiert (O'Donovan & Owen, 1999; Hayden & Nurnberger, 2006). In Männern führt der Funktionsverlust von *MAOA* und *MAOB* zu einer schweren ID mit ungewöhnlichen stereotypen Handbewegungen (Brunner et al., 1993; Whibley et al., 2010). "Loss-of-function"-Mutationen von *CASK* führen bei betroffenen Patientinnen zu einer meist schweren ID, einer postnatalen Mikrozephalie und einer pontocerebellären Hypoplasie (Najm et al., 2008) (OMIM #300749). *CASK* kodiert für eine Calcium/Calmodulin-abhängige Serin/Protein-Kinase aus der Familie der membranassoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK). *CASK* interagiert mit mindestens 18 verschiedenen Bindungspartnern und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Gehirns und der synaptischen Funktion. So reguliert *CASK* präsynaptisch die Freisetzung von Neurotransmittern und postsynaptisch die Aufrechterhaltung der Ionenkanäle. In der kortikalen Entwicklung steuert *CASK* die Expression wichtiger Gene wie zum Beispiel *RELN* und *GRIN2B* (Hsueh, 2006, 2009). Trotz der möglichen Beteiligung der weiteren oben genannten Gene in der Entwicklung eines neurologischen Phänotyps scheint *CASK* aufgrund seiner Funktion und der überzeugenden Genotyp-Phänotyp-Korrelation das hauptverantwortliche Gen für den Phänotyp der Patientin zu sein. Moog et al. publizierten 25 Patientinnen mit *CASK* betreffenden CNVs und Mutationen, u.a. die oben beschriebene Patientin 72/00 aus dem Bonner Kollektiv (Moog et al., 2011), Patientin 15). Sämtliche dort publizierten Patientinnen mit Mutationen und CNVs in *CASK* haben einen ähnlichen und wiedererkennbaren Phänotyp, u.a. eine pontoerebelläre Hypoplasie mit Erweiterung des vierten Ventrikels unterschiedlichen Ausmaßes. Der Corpus callosum war dagegen bei allen Patientinnen unauffällig.

Zusätzlich zeigten alle Patientinnen eine starke Mikrozephalie, eine überwiegend schwere ID und eindeutige faziale Dysmorphien. Zu diesen fazialen Dysmorphien gehörten ein breiter Nasenrücken bzw. eine breite Nasenspitze, eine kurze Nase, ein langes Philtrum, ein kleines Kinn sowie große Ohren (Moog et al., 2011). Der Phänotyp von Patienten mit größeren Deletionen, die nicht nur *CASK* betrafen, war nicht vom Phänotyp von Patientinnen mit ausschließlich *CASK* betreffenden Mutationen zu unterscheiden. Interessanterweise zeigte die Bonner Patientin die im Vergleich mildeste klinische Ausprägung aller 25 Patientinnen, obwohl sie die größte Deletion besaß. Dies könnte auf ihre stark verschobene X-Inaktivierung (97:3) zurückzuführen sein (Moog et al., 2011), durch die das X-Chromosom mit der Deletion in nur 3% der Leukozyten aktiv ist und somit in nur 3% der Leukozyten keine *CASK*-Expression vorliegt. Die X-Inaktivierung in weiteren Geweben konnte nicht untersucht werden. Die mildere ID der Bonner Patientin im Vergleich zu den Patienten mit einer zufälligen X-Inaktivierung ist jedoch ein Hinweis auf eine ebenfalls im Gehirn verschobene X-Inaktivierung. Über einen eventuellen Einfluss der weiteren bei Patientin 72/00 deletierten Gene kann keine verlässliche Aussage getroffen werden. Aufgrund der vorliegenden Genotyp-Phänotyp-Korrelation für fast alle bei Patientin 72/00 vorliegenden Symptome ist jedoch sicher von einer Ursächlichkeit der Mikrodeletion auszugehen.

5.4. De novo Mikrodeletion 5q31

Der beschriebene Patient (29/09) zeigte einen relativ milden Phänotyp mit einer milden Entwicklungsverzögerung (DD= **d**evelopmental **d**elay) vor allem der Sprache, einer Mikrozephalie, einem grenzwertigen Kleinwuchs (P3), einer muskulären Hypotonie und milden Dysmorphien wie einer milden Mikroretrognathie und einem hohen Gaumen. Eine molekulare Karyotypisierung zeigte ein 0,94 Mb große Deletion in 5q31.2.

In der Literatur wurden bisher nur wenige Patienten mit *de novo*-Mikrodeletionen in 5q31 beschrieben. Unter anderem wurden bei diesen Patienten neben ID/DD Kleinwuchs, Gedeihstörungen, muskuläre Hypotonie, Klumpfüße und Hüftgelenkluxationen beobachtet. Ebenso wurden charakteristische Dysmorphiezeichen wie eine prominente Stirn, ein Telekantus / Hypertelorismus, antevertierte Nasenlöcher, Gaumenspalten bzw. hohe Gaumen, Mikro-/Retrognathie und Auffälligkeiten der Ohren beobachtet (Mosca et al., 2007; Rosenfeld et al., 2011). Die berichteten Mikrodeletionen variieren in ihrer Größe zwischen 1,6 und 8,1 Mb, eine gemeinsame SRO wurde nicht beschrieben (Mosca et al., 2007; Rosenfeld et al., 2011). Die Deletion des vorgestellten Patienten 29/09 aus dem Bonner Kollektiv trug die bisher kleinste berichtete Deletion in 5q31.2. Überlappende Mikrodeletionen wurden bisher in insgesamt sieben Patienten beschrieben. Fünf dieser Patienten trugen neben ihren Mikrodeletionen in 5q31 keine weiteren potentiell pathogenen CNVs (DECIPHER 249097; Mosca et al., 2007; DECIPHER 248784; Shimojima et al., 2011; Rosenfeld et al. 2011, Patient 3). Bei zwei Patienten (DECIPHER

249028; Rosenfeld et al., 2011, Patient 1) wurde neben den 5q31-Mikrodeletionen noch je eine zusätzliche *de novo*-Deletion nachgewiesen. Im Gegensatz zu der 0,94 Mb großen Deletion des Bonner Patienten sind die Deletionen von vier der sieben Patienten mit 5,0 - 8,1 Mb sehr groß und reichen proximal bis in die Subbande 5q31.1 oder distal bis in die Subbande 5q31.3 oder beides (Abb. 36). Bei drei Patienten betreffen die Deletionen wie bei Patient 29/09 ausschließlich die Subbande 5q31.2. Interessanterweise zeigte einer dieser drei Patienten mit einer milden ID, einer geringen Körpergröße und einer Mikrognathie mehrere klinische Merkmale, die mit den Symptomen des Bonner Patienten vergleichbar sind (Mosca et al., 2007).

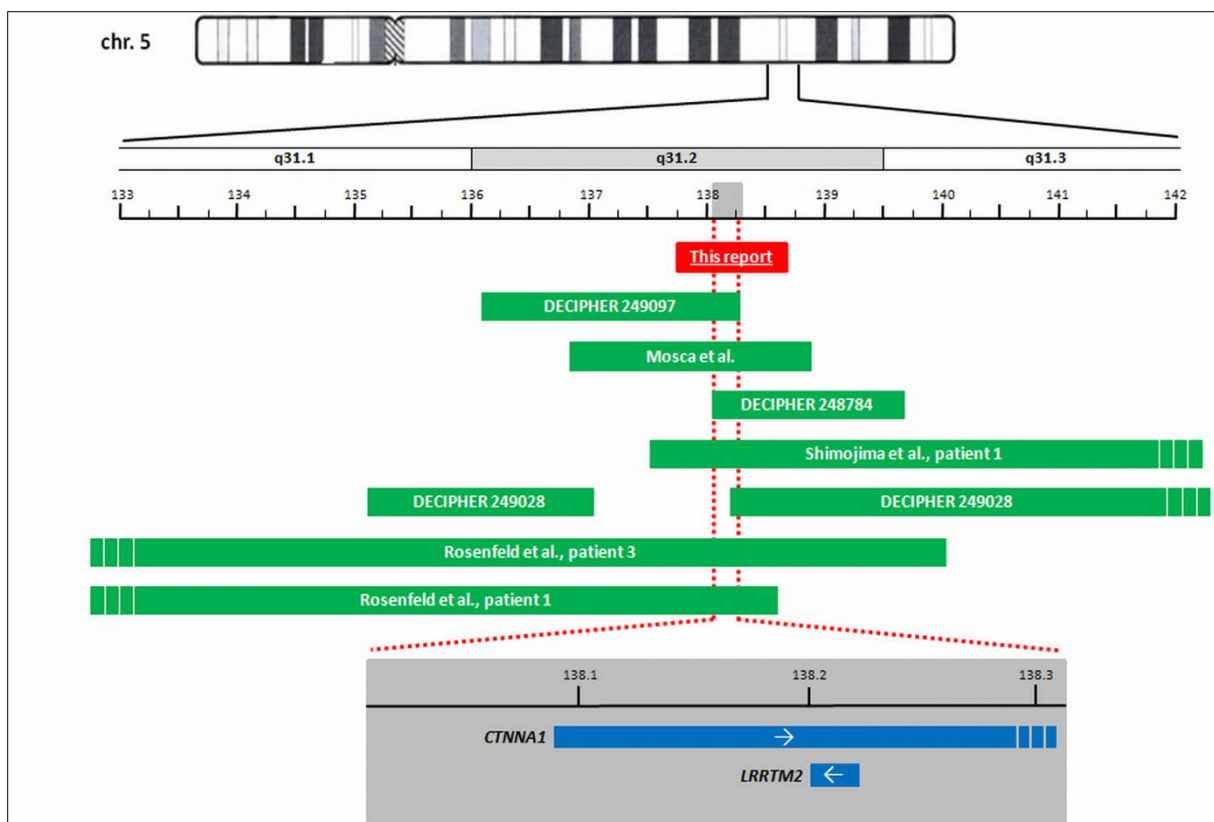


Abb. 36. Schematische Übersicht der Deletionen in 5q31.1-q31.3. Roter Balken: *de novo*-Deletion des Patienten 29/09. Grüne Balken: Deletionen der weiteren Patienten. Rot gestrichelte Linie: Grenzen der SRO. Grauer Kasten SRO samt Geninhalt. Pfeile Transkriptionsrichtung der Gene. Entnommen aus Kleffmann, Zink et al. (2012) *5q31 Microdeletions: Definition of a Critical Region and Analysis of LRRTM2, a Candidate Gene for Intellectual Disability*. Mol Syndromol, 3: 68-75

Die beiden weiteren Patienten mit kleineren, ausschließlich 5q31.2 betreffenden Deletionen wurden über die Datenbank DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk/>) identifiziert. Der männliche Patient 248784 trägt eine überlappende 1,6 Mb große Deletion in 5q31.2. Seine klinischen Merkmale umfassen eine Muskelhypotonie sowie eine Entwicklungsverzögerung (persönliche Kommunikation). Die Deletion in 5q31.2 der Patientin 249097 umfasst 2,1 Mb. Als klinische Merkmale werden eine DD, Kleinwuchs und Mikrognathie berichtet. Neben der Deletion in 5q31.2 trägt sie zusätzlich eine wahrscheinlich benigne 300 kb große *de novo*-Duplikation in 6p22.1. Drei Faktoren sprechen gegen einen großen Einfluss dieser zusätzlichen Duplikation auf den Phänotyp der Patientin: 1) Der Einfluss

von Duplikationen auf die Genexpression wird als weitaus geringer angesehen als der Einfluss von Deletionen (Veitia & Birchler, 2010). 2) Besonders bei kleinen CNVs wie dieser 300 kb großen Duplikation ist eine *de novo*-Entstehung alleine nicht aussagekräftig genug, um einen CNV als pathogen einzustufen (Vermeesch et al., 2011). 3) Die Duplikation enthält nur fünf RefSeq-Gene, darunter vier Geruchsrezeptor-Gene, die für ihre Kopienzahlvariabilität bekannt sind (Waszak et al., 2010). Das fünfte Gen ist ein provisorisches RefSeq-Gen, dessen Funktion bisher nicht weiter charakterisiert wurde. Wegen der klinischen Übereinstimmungen mit den Patienten, die ausschließlich eine *de novo*-Mikrodeletion 5q31.2 tragen, ist es wahrscheinlich, dass der Einfluss der Mikrodeletion in 5q31.2 des DECIPHER-Patienten 249097 stark genug ist, um die Patientin 249097 in die Genotyp-Phänotyp-Korrelation mit einzubeziehen. Ein geringer Einfluss der zusätzlichen *de novo*-Duplikation auf die Ausprägung des Phänotyps kann dabei nicht ausgeschlossen werden.

Größere Deletionen, die sich distal in die Subbande 5q31.3 erstrecken, scheinen mit einem schwereren Phänotyp assoziiert zu sein, der klar vom klinischen Bild der Patienten mit kleineren 5q31.2-Deletionen (Patient 29/09, (Mosca et al., 2007)) unterscheidbar ist. Patient 1 aus der Veröffentlichung von Shimojima et al. (2011) trug eine 5 Mb große Deletion in 5q31.2-q31.3 und litt an einer schweren ID/DD, einer Enzephalopathie, einer schweren Hypotonie, einer deutlichen postnatalen Mikrozephalie, angeborenen Herzfehlern und charakteristischen fazialen Auffälligkeiten (Shimojima et al., 2011). Patient 2 aus der gleichen Veröffentlichung zeigte ein ähnlich schweres klinisches Bild, trug jedoch eine distalere Deletion, die die Deletion des Bonner Patienten nicht überlappte. Daher kann der schwere Phänotyp dieser beiden Patienten wahrscheinlich einer SRO in 5q31.3 zugeschrieben werden.

In der Datenbank DECIPHER ist ein weiterer Patient (249028) mit einer weiter distal ausgedehnten Deletion eingetragen, der aufgrund einer zweiten, nicht überlappenden *de novo*-Mikrodeletion in 5q31.1-q31.2 für die Erstellung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation ungeeignet ist. Klinische Merkmale des Patienten waren eine ID/DD, eine muskuläre Hypotonie, ein persistierender Ductus arteriosus, Anomalien der Trachea / Larynx und grobe Gesichtszüge.

Rosenfeld et al. berichteten von einem Patienten mit einer größeren, proximal bis in die Subbande 5q31.1 reichende Deletion (Patient 1, Rosenfeld et al., 2011). Neben der 6,1 Mb großen Deletion in 5q31.1-q31.2 trug er eine 1,1 Mb große Deletion in 5q11.2, die 14 Gene enthielt und den Phänotyp des Patienten mit beeinflussen könnte, so dass auch er für die Erstellung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation nur eingeschränkt geeignet ist (Rosenfeld et al., 2011). Neben einer Entwicklungsverzögerung zeigte er einen Hydrozephalus, eine Gaumenspalte, eine bilaterale Hüftdysplasie, einen ausgeprägten postnatalen Kleinwuchs, eine Mikrozephalie und Dismorphiezeichen. Bei Patient 3 aus derselben Veröffentlichung wurde eine 8,1 Mb große Deletion in 5q31.1-q31.3, die im Vergleich zum Patienten 29/09 sowohl distal als auch proximal eine größere Ausdehnung hatte (Rosenfeld et al., 2011). Als klinische Merkmale zeigte der Neugeborene multiple angeborene Anomalien wie eine große Gaumenspalte, eine schwere Mikrognathie, eine präaxiale

Polydaktylie, Klumpfüße, eine Hallux-Duplikation, multiple Herzdefekte, eine signifikante Hypotonie und mehrere Dysmorphiezeichen.

Anhand der veröffentlichten Patienten lassen sich die Deletionen in 5q31 in drei unterscheidbare klinische Kategorien unterteilen: Kleinere Mikrodeletionen in 5q31.2 (Patient 29/09, Mosca et al., 2011, DECIPHER 248784, DECIPHER 249028) scheinen mit einem relativ milden Phänotyp (milde Entwicklungsverzögerung, grenzwertiger bzw. milder Kleinwuchs) ohne Fehlbildungen assoziiert zu sein. Als spezifisches Dysmorphiezeichen käme lediglich eine Mikrognathie bzw. Mikroretrognathie in Frage. Im Gegensatz dazu ist bei Patienten mit größeren Deletionen, die zusätzlich die proximale Subbande 5q31.1 betreffen (Rosenfeld et al., 2011) der Kleinwuchs sehr ausgeprägt. Zusätzlich wurden angeborene Herzdefekte, Gaumenspalten und skeletale Anomalien der Hände und Füße beobachtet. Mikrodeletionen mit einer distalen Ausdehnung in 5q31.3 scheinen mit einer Kombination aus schwerer ID/DD, typischen kranialen MRT-Befunden und charakteristischen fazialen Auffälligkeiten assoziiert zu sein. Obwohl die acht Patienten mit überlappenden Mikrodeletionen in 5q31 keinen gemeinsamen Phänotyp aufweisen, wurde bei allen Patienten, bei denen die psychomotorische Entwicklung beurteilt werden konnte, eine ID/DD diagnostiziert, die vor allem die Sprache betrifft.

Sowohl die SRO aller acht Patienten als auch die der sechs Patienten, die sicher nur eine pathogene Mikrodeletion aufweisen, betrifft nur zwei Gene: *CTNNA1* (*catenin (cadherin-associated protein), alpha 1*) liegt teilweise in der SRO und *LRRTM2* (*leucine rich repeat transmembrane neuronal protein 2*) vollständig. *CTNNA1* ist aufgrund seiner Funktion als Tumorsuppressor-Gen (Shibata et al., 2007) und seines relativ hohen Haploinsuffizienz-Scores von 22% (Huang et al., 2010) wahrscheinlich kein Kandidatengenen für eine ID. *LRRTM2* dagegen ist aufgrund seiner Funktion als Regulator sowohl der Entwicklung als auch der Funktion der exzitatorischen Synapsen ein vielversprechendes ID-Kandidatengenen. Für *LRRTM2* wird mit einem Haploinsuffizienz-Score von 7,4% eine wahrscheinliche Haploinsuffizienz vorhergesagt (Huang et al., 2010). *LRRTM2* wird während der Mausembryogenese im Neuralrohr exprimiert (Haines & Rigby, 2007). *LRRTM2* induziert die präsynaptische Differenzierung und seine Interaktion mit Neurexin 1 spielt eine kritische Rolle in der Entwicklung der exzitatorischen Synapsen (de Wit et al., 2009). Für *Neurexin1* konnte eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von ID/DD (Zweier et al., 2009) nachgewiesen werden und es wurden Assoziationen von *Neurexin*-Mutationen mit Autismus und Schizophrenie berichtet (Rujescu et al., 2009).

In der Datenbank des deutschen MRNET-Konsortiums (Mental Retardation Netzwerk, <http://www.german-mrnet.de>) konnte in 1891 Patienten keine weitere Deletion in 5q31.2 identifiziert werden. Daher wurde *LRRTM2* in 300 Patienten mit einer ID/DD sequenziert. Bei 20 Patienten wurden ein bekannter SNP (rs11744283) und bei sechs Patienten ein unbekannter wahrscheinlich benigner intronischer SNP identifiziert. Da in 330 ID Patienten keine kausativen Mutationen gefunden werden konnten, konnten Mutationen in *LRRTM2* als ein häufiger Grund für die Entwicklung einer ID/DD in Patienten ohne Mikrodeletionen ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz deuten die genannten

Befunde darauf hin, dass die Haploinsuffizienz von *LRRTM2* die wahrscheinlichste Ursache für die Entwicklung einer ID im Bonner Patienten und in den Patienten mit kleinen Deletionen in 5q31.2 ist.

5.5. De novo Mikrodeletion 15q22.1-q22.2

Patient 22/09 mit einer Mikrodeletion in 15q22.1-q22.2 zeigte eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung mit einem IQ von 55-60 (Zhang et al., 2005) und einen Kleinwuchs bei retardiertem Knochenalter. Des Weiteren lagen ein Strabismus, eine stammbetonte Adipositas und milde Dysmorphiezeichen vor wie dünne Augenbrauen, leicht ansteigende Lidachsen, ödematös erscheinende Oberlider mit schmalen Lidspalten, eine kugelige Nasenspitze, ein langes Philtrum, eine dünne Oberlippe, eine evertierte, volle Unterlippe sowie eine milde Klinodaktylie des fünften Fingers rechts. Fehlbildungen lagen nicht vor. Die molekulare Karyotypisierung ergab eine 5,3 Mb große *de novo*-Mikrodeletion in 15q22.1-q22.2, die insgesamt 27 proteinkodierende Gene umfasste.

In der Literatur und der DECIPHER-Datenbank waren insgesamt sieben weitere ID-Patienten mit Deletionen in 15q22.1-q22.2 beschrieben. Drei der Patienten hatten eine zytogenetisch sichtbare Deletion, deren Bruchpunktangaben bedingt durch die Detektionsmethode ungenau (Yip et al., 1987; Martin et al., 1990; Tempesta et al., 2008) und daher zu einer Eingrenzung der kritischen Region und einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation nicht geeignet waren. Laut Literaturangaben lagen die Deletionen dieser drei Patienten im Vergleich zum Bonner Patienten proximaler und betrafen nicht die Subbande 15q22.2.

Lalani et al. veröffentlichten einen Patienten mit einer maximal 10,54 Mb großen Deletion in 15q21.1-q22.2. Der Patient litt an einer milden bis moderaten ID, einem Strabismus und MRT-Auffälligkeiten (Lalani et al., 2006). Die 5,52 Mb große Deletion des DECIPHER-Patienten 250885 in 15q21.3-q22.2 überlappte weitestgehend mit der Deletion des Bonner Patienten. Patient 250885 wies neben einer milden ID Finger- und Zehenauffälligkeiten, eine breite Nasenwurzel, eine muskuläre Hypotonie sowie Auffälligkeiten des Zahnschmelzes auf. Die Deletion des DECIPHER-Patienten 965 war insgesamt 10,56 Mb groß, enthielt 59 Gene und betraf die Subbanden 15q21.2-q22.2. DECIPHER-Patient 965 wies ebenfalls eine ID unbekanntes Schweregrades auf sowie zusätzlich eine Agenesie/Hypoplasie des Corpus Callosum und Herzanomalien. DECIPHER Patient 255754 trug ebenfalls eine *de novo*-Deletion in 15q22.2. Sie war mit 30 kb sehr klein und führt zur Deletion eines Exons des *RORA*-Gens. Der Patient litt an einer ID mit Sprachentwicklungsverzögerung. Aufgrund der vorliegenden Patientendaten aus der Literatur (Lalani et al., 2006), der DECIPHER-Datenbank (Patienten 250885; 965; 255754) und dem Bonner Patienten kann ein gemeinsamer Phänotyp für Patienten mit Deletionen in 15q22.1-q22.2

beschrieben werden. So war die ID alle vier Patienten mit 15q22.2 betreffenden Deletionen und bekanntem ID-Schweregrad moderat bis mild. Des Weiteren konnte bei zwei Patienten ein Strabismus nachgewiesen werden. Bis auf DECIPHER Patient 965 und den von Lalani et al. veröffentlichten Patienten konnten bei keinem der Patienten Fehlbildungen nachgewiesen werden.

Neben der Beschreibung eines gemeinsamen Phänotyps war es aufgrund der Patientendaten zusätzlich möglich, eine kleine kritische Region für die Entwicklung des Phänotyps bei Patienten mit Deletionen in 15q22.1.-q22.2 zu definieren. Für die Definition dieser kritischen Region sind vor allem der Bonner Patient 22/09 und DECIPHER-Patient 250885 entscheidend, weil ihr Phänotyp einschließlich fehlender Fehlbildungen / MRT-Auffälligkeiten sehr ähnlich ist und weil ihre Deletionen mit ca. 3-5 Mb im Vergleich zu den Deletionen des DECIPHER-Patienten 965 und des von Lalani et al. publizierten Patienten deutlich kleiner sind. Die SRO der Deletionen des Bonner Patienten 22/09 und des DECIPHER-Patienten 250885 ist 4,97 Mb groß und umfasst 23 Gene (Abb. 37). Die Kandidatenregion für hochpenetrante ID-Gene konnte durch Deletionen, die bei gesunden bzw. nicht von ID betroffenen Patienten nachgewiesen wurden, deutlich weiter eingegrenzt werden. So wird der ca. 1,87 Mb große proximale Teil der o.g. SRO von der Deletion des DECIPHER-Patienten 250973 überdeckt. Grund der molekularen Karyotypisierung dieses Patienten war eine Nierenanomalie, die auch bei der Mutter vorlag. Das Vorliegen einer ID/DD wurde auf gezielte Nachfrage ausdrücklich ausgeschlossen. Daher scheiden die 14 Gene, die sowohl bei DECIPHER-Patient 250973 deletiert vorliegen als auch in der o.g. SRO lokalisiert sind, als hochpenetrante Kandidatengene für eine ID/DD aus. Eine weitere Verkleinerung der kritischen Region um 0,65 Mb und drei Gene ergibt sich aus der Deletion des DECIPHER-Patienten 250670, die auch bei einem gesunden Elternteil vorliegt. Diese Deletion überdeckt interessanterweise vollständig die Deletion des DECIPHER-Patienten 255754. Daher scheint auch die 0,03 Mb große *de novo-Deletion* dieses Patienten zumindest nicht direkt ursächlich für die Entwicklung der ID in diesem Patienten zu sein. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Vermeesch et al., dass der *de novo*-Status eines CNVs nicht zwangsläufig eine Pathogenität mit sich führt (Vermeesch et al., 2011). Nichtsdestotrotz kann z.B. eine Demaskierung einer rezessiven Mutation im Gen *RORA* bei DECIPHER-Patient 255754 als ätiologischer Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. Sowohl die Deletion des DECIPHER-Patienten 965 als auch die des von Lalani et al. publizierten Patienten dehnen sich bis in 15q22.2 aus und betreffen aus der kritischen Region nur das Gen *FOXB1*. Sowohl der Patient aus der Veröffentlichung von Lalani et al. als auch DECIPHER-Patient 965 weisen allerdings neben der ID zusätzlich noch MRT-Auffälligkeiten und Herzanomalien auf. Die proximalen Bruchpunkte der Deletionen dieser beiden Patienten liegen aber weit außerhalb der oben beschriebenen kritischen Region, wodurch sich die Anzahl der betroffenen und damit potentiell ursächlichen Gene erhöht. Ein Einfluss von *FOXB1* auf den Phänotyp des Patienten von Lalani et al. und DECIPHER Patient 965 ist aber nicht auszuschließen.

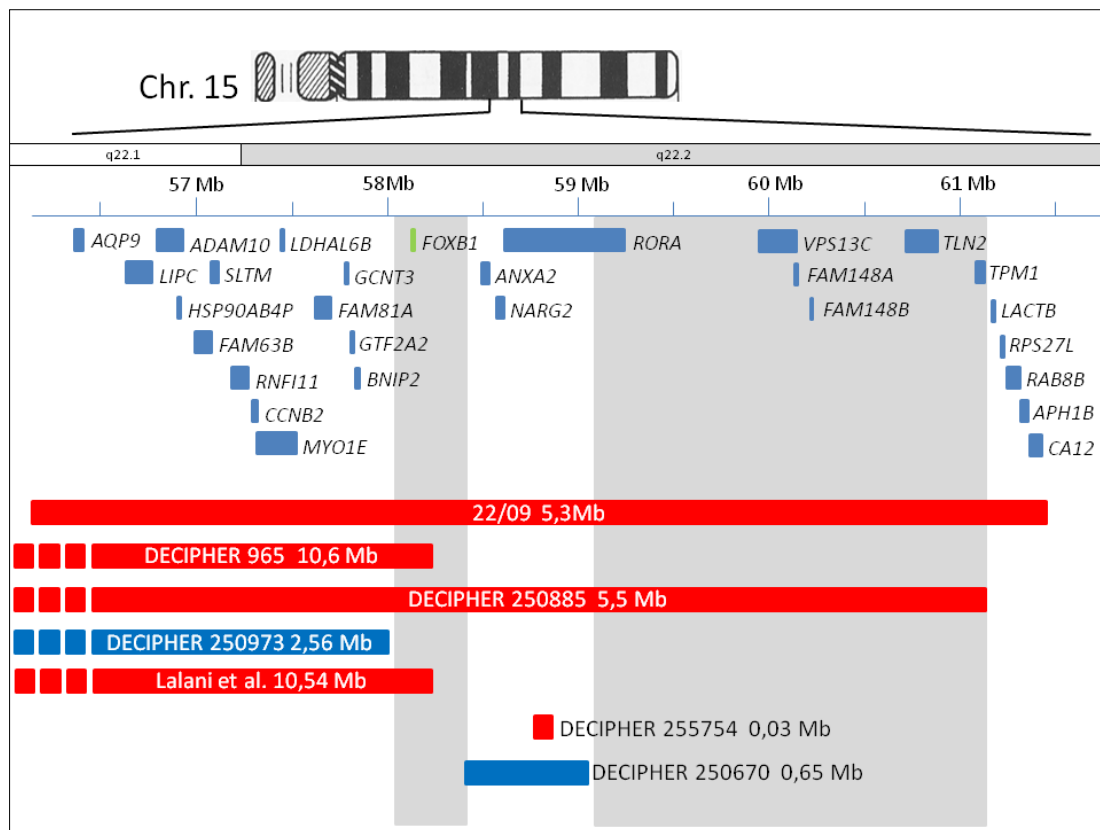


Abb. 37. Schematische Übersicht der Deletionen in 15q22.1-q22.2. Rote Balken: *de novo*-Deletionen von ID-Patienten. Blaue Balken: Deletionen, die in Bezug auf eine ID wahrscheinlich neutral sind. Graue Kästen: wahrscheinlich kritische Region der Deletionen in 15q22.2. *FOXB1* (grün) ist das einzige Kandidatengen der kritischen Region.

In der so ermittelten kritischen Region befinden sich insgesamt sieben Gene (Abb. 37). Eine Beteiligung von *RORA* an der Ätiologie des Phänotyps, wurde aufgrund der von einem gesunden Elternteil vererbten Deletion des DECIPHER Patienten 250670 ausgeschlossen. Für zwei Gene (*FAM148* und *FAM148A*) ist eine funktionelle Einordnung aufgrund fehlender Informationen in der Literatur nicht möglich. Mutationen in *TPM1* (*tropomyosin 1 (alpha)*) sind mit der Entwicklung einer hypertrophen Kardiomyopathie assoziiert (Jaaskelainen et al., 2012), nicht aber mit einem neuronalen Phänotyp. Eine mögliche Rolle in der Entwicklung neuronaler Phänotypen kann für drei Gene vermutet werden. *TLN2* (*talin2*) ist ein Adapter zwischen Integrinen und Aktin, welcher bi-direktional Integrin-Signale bei der Zelladhäsion vermittelt (Calderwood & Ginsberg, 2003). Morgan et al. konnten für Talin eine Rolle in der Clathrin-vermittelten Endozytose in Synapsen nachweisen (Morgan et al., 2004). In Synapsen ist die Endozytose entscheidend für die erneute Bereitstellung von in den präsynaptischen Spalt freigesetzten Neurotransmittern (Teng & Wilkinson, 2000). *VPS13C* (*vacuolar protein sorting 13 homolog C (S. cerevisiae)*) wird in verschiedenen Hirnarealen stark exprimiert und Mutationen in *VPS13A*, einem eng verwandten Mitglied der VPS-Genfamilie, sind verantwortlich für die autosomal-rezessive Chorea-Akanthozytose (Mizuno et al., 2007). Die seltene Chorea-Akanthozytose ist durch fortschreitende Neurodegeneration gekennzeichnet (Rubio et al., 1997). Aufgrund der Haploinsuffizienzswerte sowohl von *TLN2* (37%) als auch von *VPS13A* (46%) ist eine Haploinsuffizienz

und dadurch eine Beteiligung an der Entwicklung des Phänotyps bei Deletion aber unwahrscheinlich. Das vielversprechendste Kandidatengen der ermittelten kritischen Region für die Entwicklung einer ID ist *FOXB1*. *FOXB1* (*forkhead box B1*) (HI: 8%) gehört zur Familie der *Forkhead*-Transkriptionsfaktoren, die in eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen entscheidend involviert sind. In der frühen Embryogenese von *Xenopus laevis* spielt *FOXB1* eine wesentliche Rolle in der Etablierung der dorso-ventralen und der anterior-posterioren Achsenbildung (Takebayashi-Suzuki et al., 2011). Die verstärkte *FOXB1*-Expression während der Embryogenese führt zur neuralen Induktion und blockiert die BMP-abhängige epidermale Differenzierung (Takebayashi-Suzuki et al., 2011). In Mäusen mit einer *FOXB1*-Mutation spielt *FOXB1* eine entscheidende Rolle in der Histogenese des Diencephalons (Alvarez-Bolado et al., 2000). Aufgrund dieser Daten ist *FOXB1* ein gutes Kandidatengen für die Entwicklung einer ID. Wegen der entscheidenden Rolle von *FOXB1* in sehr frühen und wichtigen Entwicklungsprozessen könnte sogar angenommen werden, dass eine Deletion zu einem deutlich schwereren Phänotyp führen könnte als die hier beobachtete, eher mild ausgeprägte ID der Patienten. Dieser milde kognitive Phänotyp könnte durch eine vorhandene Genredundanz innerhalb der FOX-Genfamilie erklärt werden (Benayoun et al., 2011). Auch eine Beteiligung der anderen Gene innerhalb der jeweiligen Deletionen kann nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt kann anhand der durchgeführten Genotyp-Phänotyp-Korrelation mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von einer Pathogenität der Deletion ausgegangen werden. Zudem liegt mit *FOXB1* ein geeignetes Kandidatengen in der Region vor. Sequenzierungsexperimente in 330 ID-Patienten erbrachten bisher noch keine weiteren Mutationen in *FOXB1*.

5.6. De novo Mikrodeletion 3q26.33

Patientin 43/01 war bei der genetischen Beratung 2 ⁵/₁₂ Jahre alt und das erste Kind deutscher nicht verwandter Eltern. Nach unauffälliger Geburt und anfänglicher Entwicklung waren im weiteren Verlauf sowohl die sprachliche als auch die motorische Entwicklung verzögert. Im ersten Lebensjahr wurden Schluckbeschwerden aufgrund einer Speiseröhrenverengung festgestellt und im Alter von 1 ³/₄ Jahren eine kindliche Epilepsie. Zum Zeitpunkt der Beratung wurde ihre Entwicklungsverzögerung als Stufe 3 (nach (Zhang et al., 2005)) klassifiziert. Eine molekulare Karyotypisierung mit einem Illumina 660k SNP-Array ergab eine *de novo* entstandene heterozygote 0,23 Mb große Deletion in der Chromosomensubbande 3q26.33. Die Deletion enthielt mit *SOX2* (*SRY (sex determining region Y)-box 2*) nur ein proteinkodierendes Gen. *SOX2* ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen (Masui et al., 2007). Komitova und Eriksson konnten 2004 zeigen, dass *SOX2* in der Ratte in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wird (Komitova & Eriksson, 2004). In der Literatur wurden Deletionen und Mutationen von *SOX2* zunächst als Ursache von Anophthalmien bzw. Mikrophthalmien berichtet (Fantès et al., 2003) und später u.a. mit der Entwicklung des AEG-Syndroms (AEG: Anophthalmie; Esophageal atresia (Ösophagusatresie), Genital abnormalities

(Genitalfehlbildungen)) (OMIM #206900) in Verbindung gebracht. Neben der Entwicklung einer bi- oder unilateralen Anophthalmie / Mikrophtalmie, die bis auf einen Patienten mit Retina-Dystrophie bei allen Patienten vorlag, wurden zum Teil zusätzliche klinische Merkmale bei Patienten mit *SOX2*-Mutationen und Deletionen berichtet. Dazu gehörten eine milde bis schwere Lernbehinderung bzw. Entwicklungsverzögerung, Muskelhypotonie und. Die Ausprägung der klinischen Merkmale schien dabei unabhängig davon zu sein, ob eine Mutation oder eine Deletion von *SOX2* vorliegt (Fantes et al., 2003; Ragge et al., 2005; Kelberman et al., 2006; Bakrania et al., 2007; Chassaing et al., 2007; Kelberman et al., 2008). Dieses bekannte klinische Bild könnte jedoch stark von einem *bias* der Patientenauswahl beeinflusst sein, da bisher ausschließlich Patientenkollektive mit den Einschlusskriterien Anophthalmie oder AEG-Syndrom oder damit assoziierten Hirnanomalien untersucht wurden. In der Datenbank DECIPHER, in der ein solcher *bias* nicht vorliegen sollte, wurde mit Patient 252518 der Träger einer überlappenden 1,57 Mb großen Deletion identifiziert, die neben vier weiteren Genen auch *SOX2* enthielt. Neben einer ID wurden bei Patient 252518 u.a. ein Strabismus und eine Ataxie diagnostiziert. Während für DECIPHER-Patient 252518 mit einem Strabismus nur ein sehr milder Augenphänotyp berichtet wird, zeigt Patientin 43/01 keinerlei Augenauffälligkeiten. Dies steht klar im Widerspruch zu den bisher publizierten Ergebnissen. Eine mögliche Erklärung wäre der erwähnte *bias* in der Patientenauswahl der systematischen Suche nach *SOX2*-Deletionen und Mutationen. Mit einer Speiseröhrenstenose, einer Intelligenzminderung und einer Muskelhypotonie passt Patientin 43/01 bis auf die fehlende Augensymptomatik sehr gut phänotypisch in das berichtete klinische Spektrum von Patienten mit *SOX2*-Deletionen und -Mutationen. Dies macht eine Ursächlichkeit der *SOX2*-Deletion sehr wahrscheinlich. Wie häufig *SOX2*-Mutationen zu der Entwicklung einer ID ohne Anophthalmie / Mikrophtalmie führen, ist bisher unklar. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit *SOX2* bei 191 ID-Patienten aus dem Bonner Kollektiv (Kohortenbeschreibung, S. 54) sequenziert, ohne jedoch weitere Mutationen zu identifizieren. Dies schließt *SOX2*-Mutationen als sehr häufige Ursache für eine ID ohne schweren Augenphänotyp aus. Die Identifizierung weiterer Patienten mit *SOX2*-Mutationen und -Deletionen, die wie Patientin 43/01 und Patient 252518 keinen schweren Augenphänotyp aufweisen, könnten das klinische Spektrum dieser Mutationen erweitern.

5.7. De novo Mikrodeletion 9q33.3-q34.11

Bei Patientin 51/10 (im folgenden Patientin P1 genannt) wurden neben einer moderaten Entwicklungsverzögerung / ID (Stufe 4 nach Zhang et al.) u.a. eine Mikro- / Brachyzephalie, eine starke Muskelhypotonie, Strabismus, Epilepsie und einmalig ein pathologisches EEG diagnostiziert. Ihre Sprachentwicklung war stark verzögert und sie konnte im Alter von drei Jahren nicht gehen. Den Angaben ihres Vaters entsprechend erkennt sie keine Familienmitglieder und zeigt ein fehlendes Schmerzempfinden. Ihre deutlichen Dysmorphiezeichen umfassten u.a. einen hohen vorderen Haaransatz, ein rundes Gesicht, abfallende Lidachsen, eine kurze Nase und konische Finger. Die

molekulare Karyotypisierung mit einem Illumina HumanOmni1-Quad-ChipSNP-Array detektierte eine 1,76 Mb große heterozygote Deletion in 9q33.3-q34.11, die 40 proteinkodierende RefSeq-Gene enthielt. qPCR-Analysen bestätigten die Deletion und zeigten ihre *de novo*-Herkunft.

In der MRNET-Datenbank und DECIPHER konnten fünf weitere Patienten (P2-P6) mit nicht rekurrenten heterozygoten Deletionen unterschiedlicher Größe (0,43 Mb - 4,13 Mb) in 9q33.3-q34.11 identifiziert und rekrutiert werden. Vier der Deletionen waren *de novo* entstanden, während Patientin P4 eine maternal vererbte Deletion trug. Interessanterweise wies die Mutter von Patientin P4 ebenfalls eine milde ID auf. Ihre postnatalen Körpermaße waren im Normbereich. Bei allen sechs Indexpatienten mit Deletionen in 9q33.3-q34.11 wurde eine ID unterschiedlichen Grades diagnostiziert. Zudem zeigten alle sechs Index-Patienten eine deutliche Sprachentwicklungsverzögerung und eine z.T. sehr ausgeprägte muskuläre Hypotonie. Vier der sechs Indexpatienten wiesen eine schwere motorische Entwicklungsverzögerung auf, während die motorische Entwicklung von Patientin P4 nur leicht verzögert war. Aufgrund des Alters konnte bei Patientin P3 noch keine Aussage über eine eventuell vorhandene motorische Entwicklungsverzögerung getätigt werden. Eine postnatale (und in zwei Fällen auch pränatale) Mikrozephalie lag bei vier der sechs Indexpatienten vor. Kraniale MRT-Untersuchungen zeigten bei drei Indexpatienten Auffälligkeiten. Zwei Indexpatienten litten an Epilepsie, zwei waren kleinwüchsig und bei einem wurde eine Gedeihstörung diagnostiziert. Ein Strabismus wurde in fünf der sechs Indexpatienten festgestellt (Tab. 23; S.83).

Beschreibungen von drei weiteren Patienten mit überlappenden Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11 wurden in der Literatur veröffentlicht (Abb. 38) (Saito et al., 2008; Mignot et al., 2011; Saito et al., 2012). Die erste dieser Patientinnen (Saito et al., 2008) mit einer ca. 2 Mb großen *de novo*-Mikrodeletion wurde wegen ihrer frühkindlichen epileptischen Enzephalopathie (EIEE, OMIM #308350), einer schweren Epilepsieform, auf CNVs untersucht (Saito et al., 2008). Zusätzlich wies sie eine ID, eine motorische und Sprachentwicklungsverzögerung, eine postnatale Mikrozephalie und eine muskuläre Hypotonie auf. Die zweite Patientin (Saito et al., 2012) mit einer 2,8 Mb großen *de novo*-Mikrodeletion in 9q33.3-q34.11 wies ebenfalls eine schwere ID auf sowie einen Kleinwuchs, eine Gedeihstörung, eine Epilepsie und kraniale MRT-Auffälligkeiten (Saito et al., 2012). Bei der von Mignot et al. beschriebenen, Trägerin einer ca. 3,3 Mb großen *de novo*-Deletion in 9q33.3-q34.11, wurde neben einer ID ein postnataler Mikrozephalus, eine schwere motorische und Sprachentwicklungsverzögerung, ein Kleinwuchs, eine Gedeihstörung sowie Krampfanfälle und MRT-Auffälligkeiten diagnostiziert (Mignot et al., 2011).

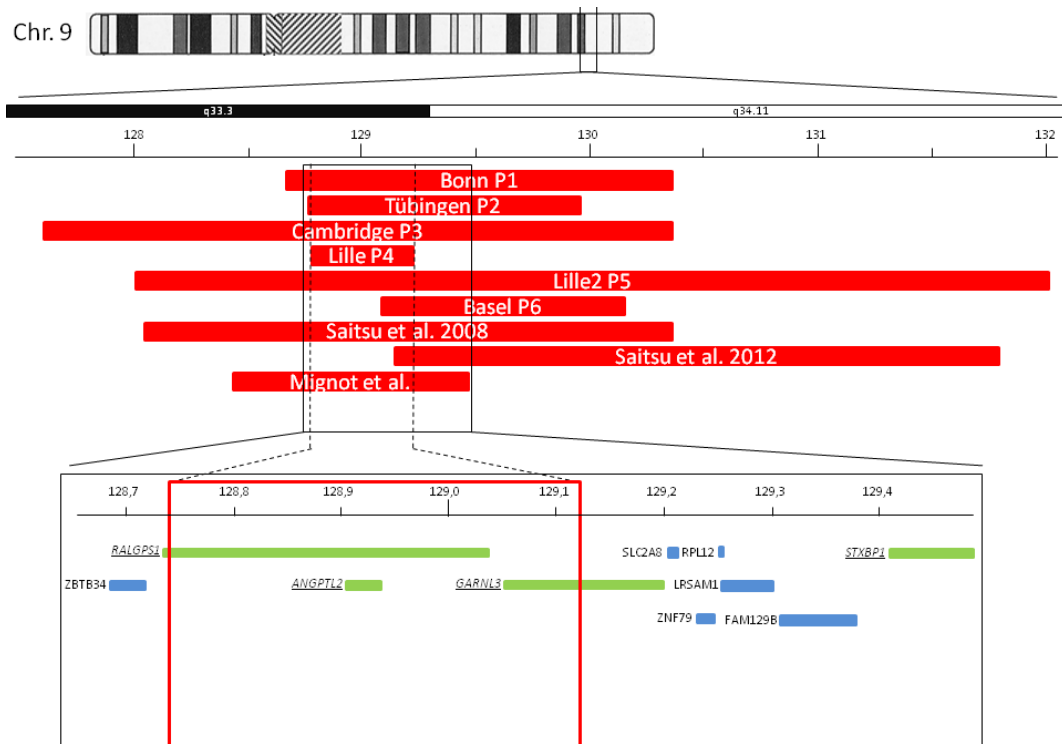


Abb. 38. Schematische Darstellung der Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11. Rote Balken: Mikrodeletionen. Der untere Teil der Abb. ist eine Vergrößerung der genomischen Kernregion. Blaue / grüne Balken: in der Region enthaltene Gene. Grün: ID-Kandidatengene der Region. Die gestrichelte Linien (oben) und der rote Kasten beschreiben die kritische Region des Mikrodeletionssyndroms.

Anhand der insgesamt neun Patienten mit überlappenden Mikrodeletionen von 9q33.3-q34.11 ergibt sich eine überzeugende Genotyp-Phänotyp-Korrelation, aus der sich ein Kernphänotyp ableiten lässt. Dieser umfasst ID (9/9 Patienten), Sprachentwicklungsverzögerung (8/8), motorische Entwicklungsverzögerung (7/8), muskuläre Hypotonie (7/7), postnatale Mikrozephalie (6/9), Epilepsie (6/9) und Strabismus (5/6). Aufgrund der Genotyp-Phänotyp-Korrelation kann von einer Ursächlichkeit der Mikrodeletionen ausgegangen werden.

Der ätiologische Mechanismus der Mikrodeletionen ist bisher unklar. Die Deletionen der neun Patienten variieren in ihrer Größe (0,43 Mb- 4,13 Mb) und dementsprechend auch in ihrem Gehalt (3-76 RefSeq Gene). Patientin P4 trägt mit 0,43 Mb die kleinste Deletion, die mit *RALGPS1*, *ANGPTL2* und *GARNL3* nur drei Gene enthält. Obwohl Patientin P4 die kleinste Deletion besaß, entsprachen ihre klinischen Merkmale weitestgehend dem Kernphänotyp. Demnach kann die 0,43 Mb große Deletion zur Einengung einer kritischen Region herangezogen werden. Durch Berücksichtigung der Mikrodeletionen der Patientin P6 und des von Saitsu et al. (2012) veröffentlichten Patienten könnte die SRO der Mikrodeletionen auf die zwei Gene *RALGPS1* und *GARNL3* reduziert werden. Im Gegensatz zu den meisten Patienten weisen diese beiden Patienten jedoch keine Mikrozephalie auf. Daher bestimmt die Mikrodeletion von Patientin P4, die sämtliche Merkmale des Kernphänotyps aufweist, die für diesen Kernphänotyp kritische Region mit den drei Genen *RALGPS1*, *ANGPTL2* und *GARNL3*. *RALGPS1*

(*Homo sapiens Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 1*) ist ein Guanin-Austauschfaktor (GEF= *Guanin Exchange Factor*) und aktiviert RAL (v-ral simian leukemia viral oncogene homolog) aus der Familie der RAS-GTPasen. Die Aktivierung von RAL bzw. RAS findet durch einen Austausch des an RAL bzw. RAS gebundenen GDP durch GTP statt (Rebhun et al., 2000). Nagase et al. zeigten eine schwache *RALGPS1*-Expression für alle untersuchten Gewebe (u.a. Gehirn) (Nagase et al., 1997). Neben einer Rolle in der Entwicklung zahlreicher Tumoren (Smith et al., 2012), konnte für RAL-GTPasen eine Beteiligung an der Regulation der synaptischen Vesikel gezeigt werden (Polzin et al., 2002). Dies könnte auch für *RALGPS1* zutreffen. Des Weiteren konnten Kishore et al. zeigen, dass in der Maus das alternative Spleißen der *RALGPS1*-prä-mRNA durch die snoRNA (snoRNA= *Small nucleolar RNA*) MBII-52 reguliert wird (Kishore et al., 2010). MBII-52 ist das Maus-Ortholog zum menschlichen HBII-52, welches im SNURF-SNRPN-Locus lokalisiert ist. Deletionen des gesamten SNURF-SNRPN-Locus führen zur Ausbildung des Prader-Willi-Syndroms, eines Retardierungssyndroms mit den Hauptsymptomen ID, Adipositas und postnatalem Kleinwuchs. Es wird allerdings nur eine indirekte Beteiligung des snoRNA clusters HBII-52 an der Ausbildung des Prader-Willi-Syndroms vermutet (Sahoo et al., 2008).

Ebenso wie *RALGPS1* ist auch *GARNL3* (*GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 3*) an der Regulation von GTPasen beteiligt - in diesem Fall RAP-GTPasen. In Wirbeltieren und *Drosophila* konnten Rap-Proteine unter anderem mit der Immun-Antwort, der Zellzykluskontrolle, der Ras-Regulation, der Zelladhäsion und dem Aufbau des Zytoskeletts in Verbindung gebracht werden (Bos & Zwartkuis, 1999; Rangarajan et al., 2003; Price et al., 2004; Lundquist, 2006). Ein weiteres Protein der GARNL-Familie, *GARNL1* (*GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 1*) wurde als wichtiges Kandidatengen bei Mikrodeletionen in 14q13.1-q21.1 diskutiert, welche u.a. mit psychomotorischer Entwicklungsverzögerung, schwerer Mikrozephalie, verzögerter Myelinisierung und Corpus callosum-Auffälligkeiten assoziiert sind (Schwarzbraun et al., 2004). *ANGPTL2* (*angiopoietin-like 2*) ist ein den Angiopoietinen ähnliches Protein. Angiopoietine sind Wachstumsfaktoren, die an der Bildung der Blutgefäße (Angiogenese) beteiligt sind. *ANGPTL2* fördert das Sprießen von vaskulären Endothelzellen und wird im Menschen u.a. im Herz, im Magen und in der Niere exprimiert (Kim et al., 1999). Während früher Phasen der Embryonalentwicklung (E3-E4) im Hühnchen konnte eine *Angptl2* Expression im Vorder- und im Hinterhirn detektiert werden. Die Expression entspricht den Ursprüngen des middorsalen Sinus und der mittleren zerebralen Vene, die beide für die Blutversorgung des sich entwickelnden Gehirns zuständig sind (Niki et al., 2009). In Mäusen konnte ein Zusammenhang zwischen einer gestörten Angiogenese und der Entwicklung einer Mikrozephalie gezeigt werden (Raab et al., 2004).

Der *haploinsufficiency score* oder Haploinsuffizienzwert (HI) (Huang et al., 2010), liegt für *RALGPS1* bei 9%, für *ANGPTL2* bei 7% und für *GARNL3* bei 34%. Dies bedeutet, dass *ANGPTL2* und *RALGPS1* mit hoher Wahrscheinlichkeit haploinsuffizient sind und *GARNL3* mit deutlich geringerer

Wahrscheinlichkeit. Aufgrund ihrer Funktion und ihrer Expression in Modellorganismen sind alle drei Gene aus der kritischen Region gute Kandidatengene für die Entwicklung des Kernphänotyps von Patienten mit Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11. Somit bleibt unklar, ob die Deletion eines der Gene oder die Kombination mehrerer Gene im Sinne eines *contiguous gene*-Syndroms für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich sein könnte. Die Tatsache, dass sowohl *RALGPS1* als auch *GARNL3* in die Funktion von GTPasen eingreifen und daher in einem funktionellem Zusammenhang stehen könnten, könnte für das Vorliegen eines *contiguous gene*-Syndroms sprechen.

Zur weiteren Aufklärung der Ätiologie des Phänotypen werden z. Zt. mit *ANGPTL2*, *RALGPS1* und *GARNL3* jene Gene, die in der SRO der sechs Patienten liegen, in 192 ID-Patienten aus dem Bonner Kollektiv und in der Bonner Indexpatientin (P1) sequenziert. Dabei konnten bisher keine krankheitsverursachenden Mutationen identifiziert werden.

Neben den drei Kandidatengenen in der SRO ist mit einem Abstand von ca. 250 kb nur knapp außerhalb der SRO das bekannte ID- und Epilepsie-Gen *STXBP1* (*syntaxin binding protein 1*) lokalisiert. *STXBP1* ist ein Syntaxin-bindendes Protein, das an der Bindung und der Fusion von Vesikeln in den Synapsen beteiligt ist (Pevsner et al., 1994; Wierda et al., 2007). *STXBP1-Knockout*-Mäuse zeigen anfänglich eine normale Gehirnentwicklung, aber mit fortlaufender Entwicklung einen verstärkten Zelltod von ausgewachsenen Neuronen (Saitsu et al., 2008). Durch eine Literaturrecherche und eine Abfrage der MRNET-Datenbank konnten insgesamt 23 Patienten mit *STXBP1*-Punktmutationen identifiziert werden (Saitsu et al., 2008; Hamdan et al., 2009; Otsuka et al., 2010; Saitsu et al., 2010; Hamdan et al., 2011; Mignot et al., 2011; Vatta et al., 2012) (Tab. 36). Zweiundzwanzig der Patienten zeigten eine moderate bis schwere ID; ein Patient war mit zwei Monaten zu jung, um Aussagen über eine eventuell vorliegende Entwicklungsverzögerung treffen zu können. Alle sechs Patienten mit Angaben zur Sprachentwicklung vor zeigten eine schwere Sprachentwicklungsverzögerung. Sechzehn von 17 Patienten mit Angaben zur motorische Entwicklung zeigten eine schwere motorische Entwicklungsverzögerung. Krampfanfälle wurden in 22 der 23 Patienten beobachtet. In nur einem von 18 Patienten mit Informationen zum Kopfumfang wurde eine milde Mikrozephalie diagnostiziert (-2 SD). Somit gehören zum Kernphänotyp von Patienten mit Mutationen von *STXBP1* eine moderate bis schwere ID, Epilepsie, eine motorische und Sprachentwicklungsverzögerung, jedoch keine Mikrozephalie (Tab. 36).

Publikation	Patient #	Alter (Jahre)	ID	Geschlecht	postnatale Mikrozephalie	Sprach-EWVZ	Hypotonie	motorische EWVZ	Krämpfe
Vatta et al. 2012		² / ₁₂	(?)	m	-	k.A.	k.A.	k.A.	+
Mignot et al. 2011	1	5	+	w	-	++	k.A.	++	+
Mignot et al. 2011	2	22	++ (schwer)	w	-	++	k.A.	++	+
Hamdan et al. 2009	1	27	++ (schwer)	w	-	k.A.	+	k.A.	+
Hamdan et al. 2009	2	15	++ (schwer)	w	-	k.A.	+	k.A.	+
MR-NET001 (MRNET)		2 ¹ / ₂	+ (moderat /schwer)	w	-	k.A.	k.A.	-	- (path. EEG)
P4276 (MRNET)		10 ¹ / ₄	+ (moderat /schwer)	w	-	k.A.	k.A.	k.A.	+
Hamdan et al. 2011		21	++ (schwer)	m	-	++	-	+	-
Saitsu et al. 2008	3	k.A.	++ (schwer)	m	k.A.	+	k.A.	++	+
Saitsu et al. 2008	6	k.A.	++ (schwer)	w	k.A.	k.A.	k.A.	++	+
Saitsu et al. 2008	7	k.A.	++ (schwer)	w	k.A.	+	k.A.	++	+
Saitsu et al. 2008	11	k.A.	++ (schwer)	m	k.A.	+	k.A.	++	+
Saitsu et al. 2010	9 Patienten		8x ++ (Schwer) 1x+	3 x w 6 x m	8x - 1x mild	k.A.	k.A.	9x ++	9x +
Otsuka et al. 2010	1	¹¹ / ₁₂	+	m	-	k.A.	k.A.	k.A.	+
Otsuka et al. 2010	2	2	+	w	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	+
Zusammen			22/22 (100%)		1/18 (5,5%)	6/6 (100%)	2/3 (67%)	16/17 (94%)	21/23 (91%)

Tab. 36. Klinische Zusammenfassung der Patienten mit *STXBPI*-Mutationen. w: weiblich; m: männlich; (?): zu jung für die Beurteilung einer ID. EWVZ; Entwicklungsverzögerung; +: betroffen; ++: schwer betroffen. k.A.: keine Angaben; -: nicht vorhanden. Zusammen: Zur Berechnung der Prozentzahlen wurden nur die Patienten herangezogen, bei denen für die jeweiligen klinischen Merkmale Aussagen gemacht werden konnten / wurden.

Ein Vergleich der Kernphänotypen von Patienten mit Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11 und *STXBPI*-Mutationen zeigt mit den Symptomen ID, motorische und Sprachentwicklungsverzögerung und Epilepsie deutliche Überlappungen. Dies könnte für eine Beteiligung von *STXBPI*, das in acht der neun vorgestellten Patienten deletiert ist, an der Entwicklung des Phänotyps von Patienten mit Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11 sprechen. Neben den klinischen Gemeinsamkeiten bestehen mit der Mikrozephalie und dem Strabismus aber auch klare Unterschiede zwischen den beiden Kernphänotypen. Auf Strabismus wurde bei keinem der Patienten mit *STXBPI*-Mutationen hingewiesen. Während sechs von neun Patienten (69%) mit Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11 eine Mikrozephalie aufwiesen, wurde diese nur bei einem von 18 Patienten (5,5%) mit *STXBPI*-Mutationen beschrieben. Dies spricht dagegen, dass lediglich *STXBPI* für die Entwicklung der Phänotypen von Patienten mit Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11 verantwortlich ist und für eine Beteiligung von mindestens einem der drei Gene aus der SRO.

Auch die Mikrodeletion der Patientin P4, die als einzige der hier vorgestellten Mikrodeletionen *STXBPI* nicht betrifft, spricht für eine solche Beteiligung von mindestens einem der drei Gene aus der SRO an der Ätiologie des Phänotyps von Patienten mit Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11. Mit dem Vorliegen

von ID, Mikrozephalie, muskulärer Hypotonie, Strabismus, Epilepsie sowie sprachlicher und motorischer Entwicklungsverzögerung entspricht ihr klinisches Bild dem der restlichen Patienten mit Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11, wobei sie als einzige nur eine milde motorische Entwicklungsverzögerung aufweist. Daher kann vermutet werden, dass die Deletion eines oder mehrerer der drei Gene *ANGPTL2*, *RALGPS1* und *GARNL3* zu einem ähnlichen Phänotyp wie *STXBPI*-Mutationen führen können. Eine alternative Erklärung für den Phänotyp der Patientin P4 könnte die Deletion regulatorischer Elemente, die die Expression von *STXBPI* beeinflussen, sein. Der Bruchpunkt der Mikrodeletion von Patientin P4 liegt ca. 250 kb von *STXBPI* entfernt. Für diese Entfernung konnte der Einfluss von cis-regulatorischen Elementen auf Gene beschrieben werden (Klopocki et al., 2008; Klopocki & Mundlos, 2011). Inwiefern daher eine verminderte Expression von *STXBPI* an der Entwicklung des Phänotyps der Patientin P4 beteiligt ist, muss noch geklärt werden. Dazu sind Expressionsstudien an mRNA aus Vollblut aller sechs Indexpatienten in Planung. Diese konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, weil sich die Rekrutierung der mRNA aus den verschiedenen Zentren und insbesondere für P4 wegen schwierigem Patientenkontakt verzögerte.

Zusammenfassend konnten für Mikrodeletionen in 9q33.3-q34.11 anhand der sechs Indexpatienten und einem Literaturvergleich ein Kernphänotyp aus ID, sprachlicher und motorischer Entwicklungsverzögerung, Hypotonie, Strabismus sowie mit unvollständiger Penetranz postnataler Mikrozephalie und Krampfanfällen beschrieben werden. Mit Ausnahme der Mikrozephalie und dem Strabismus entspricht dieser Kernphänotyp dem Phänotyp von Patienten mit *STXBPI*-Mutationen. Aufgrund der unterscheidenden Symptome Mikrozephalie und Strabismus und der Mikrodeletion von Patientin P4, die *STXBPI* nicht betrifft könnten eines oder mehrere der drei Gene *ANGPTL2*, *RALGPS1* und *GARNL3* in der SRO neben *STXBPI* zum Phänotyp der Patienten beitragen, so dass es sich hierbei um ein *contiguous gene*-Syndrom handeln würde. Des Weiteren konnte im Unterschied zu den publizierten Beschreibungen anhand von Patienten, welche aufgrund ihrer Epilepsie untersucht wurden, gezeigt werden, dass Epilepsie bei *STXBPI*-Deletionen nur mit unvollständiger Penetranz auftritt.

5.8. De novo Mikrodeletion Xq27.3-q28

Im Bonner Kollektiv wurde eine Patientin mit einer heterozygoten *de novo*-Deletion in Xq27.3-q28 identifiziert. In der Datenbank DECIPHER konnten zwei weitere Patientinnen mit überlappenden *de novo*-Deletionen gefunden und rekrutiert werden. Die drei Deletionen variierten in ihrer Größe zwischen 3,5 und 9,2 Mb und enthielten 7-31 Gene. Die SRO entsprach der Deletion von Patientin 1 und enthielt mit *FMR1*, *FMR1NB*, *AFF2/FMR2*, *IDS* und *CXorf40A* fünf Gene. Bei allen Patientinnen wurde eine zufällige X-Inaktivierung nachgewiesen. Alle Patientinnen hatten eine ID/DD und Patientinnen 1 und 2 zusätzlich eine Adipositas, eine Makrozephalie, eine muskuläre Hypotonie und eine Überbeweglichkeit der kleinen Gelenke. ID/DD, ein großer Kopfumfang und muskuläre Hypotonie sind charakteristische klinische Merkmale von weiblichen und männlichen Patienten mit Fragilem X-Syndrom (FXS). FXS ist eine der häufigsten Ursachen für angeborene ID/DD und hat eine Prävalenz von 1/4.500 unter Männern und 1/9.000 unter Frauen (O'Donnell & Warren, 2002). Betroffene Frauen weisen unter anderem in Abhängigkeit von der X-Inaktivierung eine hohe phänotypische Variabilität auf (de Vries et al., 1996). Die häufigste Ursache für das FXS sind Expansionen einer sich wiederholenden CGG-Sequenz (CGG-Repeat) in der 5'-untranslatierten Region des Gens *FMR1* (*fragile X mental retardation gene*). Liegen mehr als 200 Repeats vor, führt dies zu einer Methylierung des *FMR1*-Promotors und es findet keine Transkription des *FMR1*-Gens statt. In diesem Fall spricht man von einer Vollmutation. Vollmutationen sind in >99% der FXS-Fälle die genetische Ursache. Weitere ätiologische Mechanismen, wie partielle oder komplette Deletionen oder Mutationen des *FMR1*-Gens sind selten (Hammond et al., 1997).

Während Vollmutationen bei Männern zur vollen Ausprägung und bei Frauen in Abhängigkeit u.a. vom X-Inaktivierungs-Status zu einem variablen FXS-Phänotyp führen, sind die sogenannten Prä-Mutationen (55-200 CGG-Repeats) mit der Ausbildung des Fragilen X-assoziierten Tremor/Ataxia Syndrom (FXTAS) assoziiert. Trägerinnen einer Prämutation haben zudem ein erhöhtes Risiko für eine Ovarialinsuffizienz (POF = **p**remature **o**varian **f**ailure). Interessanterweise konnte in Personen mit *FMR1*-Prämutation eine erhöhte *FMR1*-Expression, die mit zunehmender Repeatlänge steigt, nachgewiesen werden (Tassone et al., 2000; Allen et al., 2004; García-Alegría et al., 2007). Dagegen sinken die *FMR1*-Protein-Level mit zunehmender Repeatlänge (Feng et al., 1995). Aufgrund der unterschiedlichen X-Inaktivierungs-Verhältnisse ist die Korrelation zwischen der Anzahl der CGG-Repeats und der *FMR1*-Expression bei weiblichen Prämutationsträgern schwierig und auch die *FMR1*-Transkript-Level gesunder weiblicher Individuen variieren deutlich (Allen et al., 2004; García-Alegría et al., 2007). Neben der X-Inaktivierung und der Zahl der CGG-Repeats bestehen Hinweise auf einen zusätzlichen familienspezifischen Effekt, der die unterschiedliche *FMR1*-Transkription bei nicht verwandten gesunden Frauen erklären könnte. So beobachteten García-Alegría et al., dass die *FMR1*-Transkriptions-Level innerhalb einer Familie vergleichbarer waren als zwischen nicht verwandten weiblichen Personen (García-Alegría et al., 2007). Interessanterweise konnte in POF-Patienten keine

Korrelation zwischen der Anzahl der CGG-Repeats und dem FMR1-Transkript-Level beobachtet werden (Schuettler et al., 2011).

Bisher wurden in der Literatur nur vier weitere Patientinnen mit kleinen, *FMR1* umfassenden Deletionen, beschrieben. Probst et al. beschrieben eine Patientin mit einer Deletion, die mit der oben beschriebenen SRO vergleichbar war, und ebenfalls zufälliger X-Inaktivierung. Sie zeigte neben einer ID sowohl eine Adipositas als auch eine Makrozephalie sowie eine Überbeweglichkeit der kleinen Gelenke (Probst et al., 2007). Drei weitere in der Literatur beschriebene Patientinnen hatten deutlich größere Deletionen. Wolff et al. berichteten von zwei Patientinnen mit unterschiedlichen Deletionen in Xq26.3-q27.3 (Wolff et al., 1997). Die erste Deletion war 9,3 Mb groß und betraf 26 RefSeq-Gene, darunter *FMR1*, *FMR1NB* und *FMR2/AFF2*. Das betroffene X-Chromosom war in nur 15-20% der Blutzellen aktiv und die Patientin war bis auf eine Lernbehinderung unauffällig. Die zweite Deletion war 8,3 Mb groß und enthielt unter anderem *FMR1*, *FMR1NB* und wahrscheinlich auch *FMR2/AFF2*. Die Patientin litt an einer moderaten bis schweren ID und ihr Gewicht lag auf der 97. Perzentile. Weiterhin lagen ein langes Gesicht und ein prominentes Kinn sowie "grand mal"- Krampfanfälle und eine Schilddrüsenunterfunktion vor. Ihr Verhalten war sehr freundlich und sie hatte krampfartige Lachanfälle. Die X-Inaktivierung war zufällig verteilt (Wolff et al., 1997). Dahl et al. veröffentlichten eine weitere Patientin mit einer 2,71 Mb großen Deletion, die u.a. *FMR1* und wahrscheinlich *MTM1* (*myotylar myopathy gene 1*) beinhalten. Die Patientin litt ebenfalls an einer Entwicklungsverzögerung, einer Adipositas und einer schweren Hypotonie. Die Autoren vermuteten, dass die Schwere der Hypotonie ihrer Patientin durch die Deletion von *MTM1* zu erklären sein könnte. Das von der Deletion betroffene X-Chromosom war in 80% der Leukozyten aktiv (Dahl et al., 1995).

Zusammengefasst waren alle sieben Patientinnen mit Deletionen in Xq27.3 von einer ID bzw. einer Entwicklungsverzögerung betroffen. Fünf der Patientinnen waren zudem adipös. Eine Überbeweglichkeit der Gelenke sowie eine Makrozephalie konnte bei den drei Patientinnen mit den kleinsten Deletionen beobachtet werden

Da alle hier vorgestellten Patientinnen Merkmale des fragilen X-Syndroms aufweisen und *FMR1* in allen Deletionen enthalten ist, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass *FMR1* einen großen Anteil an der Ätiologie des Phänotyps der Patientinnen 1-3 hat.

Zur Untersuchung dieser Rolle von *FMR1* in der Ätiologie des Phänotyps der drei hier vorgestellten Patientinnen wurden die Expression von drei der fünf (*FMR1*, *FMR2/AFF2* und *IDS*) Gene der SRO in RNA aus Vollblut untersucht. Die Expression von *FMR2/AFF2* zeigte sowohl in den fünf gesunden weiblichen Kontrollpersonen als auch in den Patientinnen und deren Müttern eine ausgeprägte Variabilität. Obwohl Patientin 3 eine im Vergleich zu den Kontrollpersonen signifikant reduzierte Expression zeigte, ist aufgrund der Variabilität der Expression ein Einfluss von *FMR2/AFF2* auf die Entwicklung des Phänotyps unwahrscheinlich. Das Gen *IDS* kodiert die Iduronat-2-Sulfatase, deren Mangel zum klinischen Bild eines Hunter-Syndroms führt. Obwohl die *IDS*-Expression der Patientinnen

1 und 3 im Vergleich zu den fünf gesunden weiblichen Kontrollen signifikant reduziert war, kann auch ein Einfluss von *IDS* auf die Entwicklung des Phänotyps wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da die Patientinnen keines der typischen Symptome des Hunter-Syndroms wie Atemwegserkrankungen, einen Kleinwuchs oder Hörverlust aufweisen. Zusätzlich zeigen weibliche Patientin mit einem Hunter-Syndrom mit Mutationen in *IDS* typischerweise eine starke Verschiebung der X-Inaktivierung zum nicht mutierten *IDS*-Allel (Tuschl et al., 2005), während die hier beschriebenen Patientinnen eine zufällige Verteilung der X-Inaktivierung aufweisen. Ein weiteres Argument gegen eine Beteiligung von *IDS* ist der Ausschluss einer Mukopolysaccharidose durch Urinuntersuchungen bei Patientin 1.

Da die hier beschriebenen Patientinnen in das phänotypische Spektrum des fragilen X-Syndroms passen, jeweils ein *FMRI*-Allel deletiert ist und das X-Chromosom mit der Deletion in mindestens 38% der Zellen aktiv ist, wäre eine signifikant reduzierte *FMRI*-Expression in den Patientinnen eine mögliche Erklärung für die Entwicklung des Phänotyps. Entgegen der Hypothese zeigten nur die Patientinnen 1 und 3 eine signifikant reduzierte *FMRI*-Expression im Vergleich zu fünf gesunden weiblichen Kontrollpersonen, während die *FMRI*-Expression von Patientin 2 nicht signifikant reduziert war. Auch die Mütter der Patientinnen 1 und 3 zeigten eine signifikant reduzierte *FMRI*-Expression, obwohl sie keine klinischen Symptome des fragilen X-Syndroms zeigten und die Deletionen ihrer Töchter *de novo* entstanden sind. Dies kann als Hinweis auf einen von Deletionen unabhängigen familienspezifischen Effekt in der *FMRI*-Expression gedeutet werden, wie er ähnlich von García-Alegría et al. beobachtet wurde (García-Alegría et al., 2007).

Interessanterweise war die *FMRI*-Expression in allen von *FMRI*-Deletionen betroffenen Patientinnen im Vergleich zu ihren Müttern signifikant reduziert. Im Vergleich zu ihren jeweiligen Müttern war die *FMRI*-Expression in Patientin 1 um 72,8%, in Patientin 2 um 49,8% und in Patientin 3 um 26,7% reduziert. Angesichts der Variabilität der *FMRI*-Expression konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die signifikanten Unterschiede in der *FMRI*-Expression zwischen Müttern und Töchtern zufallsbedingt waren und eventuell häufig in weiteren Töchter-Mütter-Paaren vorliegen könnten. Daher wurde die *FMRI*-Expression in weiteren Mutter-Tochter-Paaren untersucht. Bei diesen Kontrollpersonen handelte es sich um drei Mutter-Tochter-Paare, die aufgrund der Diagnose prämaturre Ovarialinsuffizienz (POF) der Töchter POF1-POF3 (und im Fall von POF2 auch der Mutter) rekrutiert wurden. In keiner dieser Kontrolltöchter und -Mütter wurde eine ID oder andere Anzeichen des FXS diagnostiziert. Kontrollperson POF3 trug eine mikroskopisch sichtbare terminale Xq-Deletion, die auch *FMRI* betraf. Die X-Inaktivierung in POF3 war allerdings zu 100% verschoben und Kontrollperson POF3 zeigte keinerlei Anzeichen einer ID. Keine der Töchter mit POF zeigte eine reduzierte *FMRI*-Expression im Vergleich zu ihrer Mutter, sondern eher eine leicht erhöhte Expression. Eine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer POF und der *FMRI*-Expression bei den POF-Mutter-Tochter-Paaren ist unwahrscheinlich, da die maternale *FMRI*-Expression sowohl in POF2M, der von einer POF betroffenen Mutter, als auch in den nicht betroffenen Müttern POF1M und POF3M im Vergleich zu den

Töchtern leicht reduziert war. Analog ist ein Einfluss von *FMRI*-Prämutationen auf das *FMRI*-Expressionmuster unwahrscheinlich. POF1 und POF1M waren beide Trägerinnen einer *FMRI*-Prämutation. Das Mutter-Tochter Paar POF1 und POF1M zeigte jedoch das gleiche Expressionsmuster wie die restlichen Paare ohne Prämutation. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass die signifikante Reduktion der *FMRI*-Expression der Patientinnen 1-3 gegenüber ihren jeweiligen Müttern spezifisch für Deletionspatientinnen mit zufälliger X-Inaktivierung ist und nicht häufig in Kontroll-Mutter-Tochter-Paaren vorliegt.

In Zusammenschau ergaben die *FMRI*-Expressionsstudien keinen Hinweis auf einen absoluten Schwellenwert, dessen Unterschreiten zur Ausprägung des FXS-Phänotyps führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die zuvor berichtete Variabilität der *FMRI*-Expression (García-Alegría et al., 2007; Schuettler et al., 2011) und unterstützen die Idee eines familiären Effektes (García-Alegría et al., 2007). Dieser familiäre Effekt erklärt möglicherweise zumindest teilweise die ausgeprägte Variabilität der *FMRI*-Expression bei Nicht-Verwandten. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten könnten weiterhin einen Hinweis auf einen familienspezifischen Normbereich der *FMR1*-Expression darstellen und damit auch eventuell auf einen familien-spezifischen Schwellenwert, dessen Unterschreitung zur Ausprägung des Phänotyps führt. Um diese Theorie gegebenenfalls weiter zu untermauern, wären Expressionsanalysen an umfangreichen Patientenkollektiven mit *FMR1*-Deletionen und evtl. -Vollmutationen sowie ihren nahen weiblichen Familienmitgliedern, vornehmlich ihren Müttern, notwendig.

Da die Patientinnen 1 und 2 einen schwereren Phänotyp als Patientin 3 zeigen und gleichzeitig mit mindestens 50% gegenüber 27% bei Patientin 2 eine stärker reduzierte *FMRI*-Expression, könnte ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Reduzierung der *FMRI*-Expression und der Schwere des Phänotyps postuliert werden.

Trotz der starken Hinweise auf eine starke Beteiligung von *FMRI* an der Ätiologie des Phänotyps der hier beschriebenen Patientinnen ist es vorstellbar, dass auch andere Faktoren, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden konnten, beteiligt sind. So sind Expressionsuntersuchungen eine Abbildung des Zustandes zum Zeitpunkt der Blutentnahme und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eines der beschriebenen Gene zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung durch die Deletion entscheidend beeinflusst wurde und dann zur Entwicklung des Phänotyps beitrug. Zudem konnte die Expression der unterschiedlichen Gene nur im Blut untersucht werden. Es ist vorstellbar, dass die untersuchten Gene und die Gene, die aufgrund einer zu schwachen Expression im Blut nicht untersucht werden konnten, in anderen Zellsystemen ein anderes Expressionsmuster zeigen. Ebenso konnte der Einfluss des Alters und des Hormonstatus der untersuchten Personen in dieser Arbeit nicht erfasst werden. Daher kann man nur vermuten, dass die im Vergleich zu den Müttern verringerte *FMRI*-Expression neben der X-Inaktivierung ein weiterer entscheidender Faktor in der Ausbildung des FXS-ähnlichen Phänotyps der Patientinnen ist.

5.9. De novo Mikrodeletion 5q14.3-q15

Anhand der im Ergebnisteil beschriebenen Patienten mit Mikrodeletionen in 5q14.3 aus Bonn, Erlangen und Cambridge konnte ein neues Mikrodeletionssyndrom beschrieben werden (Engels et al., 2009). Als charakteristische Merkmale des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms wurden eine schwere ID mit fehlender Sprachentwicklung und motorischer Entwicklungsverzögerung, muskulärer Hypotonie, Krampfanfällen und unterschiedliche, meist milde strukturelle Auffälligkeiten des Gehirns ermittelt. Die drei Patienten wiesen keine gemeinsamen fazialen Dysmorphien auf. Die kleinste gemeinsam deletierte Region aller Patienten in 5q14.3 lokalisiert war 1,64 Mb groß und enthielt mit *CETN3* (Centrin-3), *AC093510.2*, *POLR3G* (*polymerase (RNA)III (DNA directed) polypeptide G*), *LYSMD3* (*LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 3*) und dem proximalen Teil von *GPR98/MASS1* (*G-protein coupled receptor 98 precursor/monogenic audiogenic seizure susceptibility protein 1 homologue*) fünf Gene vollständig oder teilweise. Der proximale, 1,28 Mb große Teil der SRO enthielt keine bekannten Gene, jedoch einige Regionen mit einem hohen genomischen Konservierungsgrad zwischen 31 höheren Säugetieren (*GERP conservation score*). Dies könnte unter anderem ein Hinweis auf *cis*-regulatorische Elemente von benachbarten Genen sein.

Das Gen *MEF2C* war nur in den o.g. Patienten aus Erlangen und Cambridge sowie einem Patienten aus Cardoso et al. (2009) deletiert, konnte aber von Zweier et al. in Zusammenarbeit mit der Bonner Arbeitsgruppe als das ursächliche Gen des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms identifiziert werden (Zweier et al., 2010). Durch die Rekrutierung weitere Patienten und durch Mutationssuche durch Sanger-Sequenzierung in einem großen Patientenkollektiv mit ID konnten insgesamt neun Patienten mit Deletionen in 5q14.3 und Mutationen in *MEF2C* beschrieben werden, die die typischen Merkmale des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms aufwiesen. Expressionsstudien zeigten eine herabgesetzte *MEF2C*-Expression in sieben Patienten mit Deletionen und "*truncating*"-Mutationen in *MEF2C*. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die *MEF2C*-Expression auch im Blut der Bonner Index-Patientin erniedrigt war, obwohl *MEF2C* nicht in ihrer Deletion lokalisiert war. Dies kann mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Deletion von *cis*-regulatorische Faktoren erklärt werden (Klopocki et al., 2008; Klopocki & Mundlos, 2011). Zwei Patienten mit "*missense*"-Mutationen in *MEF2C* wiesen die für das 5q14.3-Mikrodeletionssyndrom typischen klinischen Merkmale auf, zeigten aber keine herabgesetzte *MEF2C*-Expression. Im Gegenteil zeigte einer dieser Patienten sogar eine signifikant verstärkte Expression. Die wichtige ätiologische Rolle von *MEF2C* wurde durch die Publikation von sechs weiteren Patienten mit Deletionen, die z.T. ausschließlich *MEF2C* umfassten, und Mutationen in *MEF2C* und typischen Merkmalen des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms (Le Meur et al., 2010) bestätigt. *MEF2C* gehört zu der myocyte enhancer factor 2 (*MEF2*)-Unterfamilie der *MADS*- (MCM1-agamous-deficiens-serum response factor) Transkriptionsfaktoren. Die *MEF2*-Transkriptionsfaktoren werden durch eine hochkonservierte N-terminale *MADS*-box und eine benachbarte *MEF2*-Domäne charakterisiert. Zusammen sind beide Domänen für die Dimerisierung, die DNA-Bindung und die

Interaktion mit weiteren Co-Faktoren verantwortlich. MEF2-Transkriptionsfaktoren sind zentrale Regulatoren einer Vielzahl von Entwicklungsvorgängen, wie z.B. der neuronalen Differenzierung oder der Entwicklung der Neuralleistenzellen (Pothoff & Olson, 2007). Zweier et al. konnten zeigen, dass eine herabgesetzte *MEF2C*-Expression zu einer verminderten Expression sowohl von *MECP2*, dem für das klassische Rett-Syndrom ursächliche Gen, als auch von *CDKL5* führt. Mutationen in *CDKL5* wurden in Patienten mit atypischem Rett-Syndrom nachgewiesen. Diese funktionelle Interaktion zwischen den ursächlichen Genen ist besonders interessant im Zusammenhang mit der phänotypischen Überlappung des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms und des Rett-Syndroms (Zweier et al., 2010). Beide Syndrome weisen eine schwere ID, variable Hirnanomalien und Krampfanfälle auf. Insgesamt wurden in der Zwischenzeit 29 Patienten mit Mikrodeletionen in 5q14.3 und Mutationen in *MEF2C* veröffentlicht. 97% der Patienten zeigten eine schwere ID und 86% Krampfanfälle. Eine Hypotonie konnte 85% der Fälle diagnostiziert werden. Somit sind die schwere ID, die Krampfanfälle und die Hypotonie die Leitsymptome des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms. 86% der Patienten wiesen zudem Hirnanomalien auf (Zweier & Rauch, 2011; Toral-Lopez et al., 2012). Da sich die Hirnanomalien in ihrer Gesamtheit stark unterschieden, werden sie nicht zu den Leitsymptomen des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms gezählt.

Zur weiteren Aufklärung der Ätiologie des Syndroms wurden weitere zehn Patienten mit *de novo*-Deletionen in 5q14.3-q15 rekrutiert und im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemeinsam mit vier bereits veröffentlichten Patienten (Engels et al., 2009; Zweier et al., 2010) durch genomweite Expressionsuntersuchungen mit einem HT12 Gene Expression Chip (Illumina, San Diego, USA) analysiert. Nach dem aktuellen Stand der Literatur handelt es sich um den ersten Versuch, den Einfluss von Mikrodeletionen auf die genomweite Expression zu untersuchen. Die Durchführung und Analyse der genomweiten Expressionsexperimente stellte daher in mehreren Punkten eine Herausforderung dar. So wird für genomweite Expressionsanalysen meistens eine große Anzahl von Personen untersucht (> 40) (Morley et al., 2004; Dombroski et al., 2010; Becker et al., 2012), während in der hier vorgestellten Analyse aufgrund der Seltenheit des Syndroms "nur" 14 Patienten zur Verfügung standen. Eine weitere Herausforderung lag in der Tatsache, dass Mikrodeletionen in 5q14.3-q15 nicht wie z.B. die Mikrodeletionen, welche das DiGeorge- oder das Williams-Beuren-Syndrom verursachen, fast immer identische Bruchpunkte aufweisen, sondern nicht-rekurrent sind und somit unterschiedliche Genomregionen betreffen. Aufgrund dieser genetischen Heterogenität durch die unterschiedlichen Deletionen war es nicht sinnvoll, die Patienten als eine Einheit zu behandeln. Daher wurden für eine statistisch valide Analyse die Patienten anhand gemeinsam deletierter Genomabschnitte in sieben unterschiedliche Gruppen von je vier bis sieben Patienten eingeteilt. Dabei waren die meisten untersuchten Patienten wegen der unterschiedlichen Deletionen in mehr als einer Gruppe vertreten. Lediglich die gemeinsamen Genomabschnitte der Gruppen 1 und 2 überdeckten *MEF2C*. Die genomweiten Expressionsergebnisse der so definierten sieben Gruppen wurden anschließend mit acht Kontrollpersonen verglichen. Neben den unterschiedlichen Deletionen zeigten die Patienten z. T. auch

unterschiedliche klinische Phänotypen. Alle neun Patienten wiesen mit einer schweren ID und einer muskulären Hypotonie zwei typische Merkmale des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms auf. Die Patienten P3, P4, P6, P8, P9 und P11 zeigten zudem Krampfanfälle. Variable Hirnanomalien wurden in den Patienten P2-P5, P8 und P9 diagnostiziert.

Die Ergebnisse der genomweiten Untersuchungen wurden anschließend durch quantitative PCR (qPCR) der Patienten-RNAs und im Vergleich mit zehn Kontrollpersonen (5 weiblichen und 5 männlichen) validiert. Aus organisatorischen Gründen erfolgte die qPCR Validierung an 12 Patienten. Von Patient P6 aus der genomweiten Untersuchung stand keine ausreichende RNA mehr zur Verfügung. Vier zusätzliche Patienten (P1, P7, P12, P14), die erst während oder nach den genomweiten Expressionsanalysen rekrutiert wurden, konnten in die qPCR-Validierung mit einbezogen werden. Diese drei Patienten wurden ebenfalls nach den genomischen Grenzen ihrer Deletionen in die Gruppen 1-7 eingeteilt. Da *MEF2C* als das zumindest hauptsächlich ursächliche Gen für das 5q14.3-Mikrodeletionssyndrom bekannt und die *MEF2C*-Expression auch bei Patienten erniedrigt war, deren Deletionen *MEF2C* nicht betrafen, wurde hier auch die Expression von *MEF2C* der 12 Patienten durch qPCR untersucht. Dies ermöglichte zum einen eine methodisch vergleichbare Quantifizierung der *MEF2C*-Expression in allen untersuchten Patienten und zum anderen konnte so eine mögliche Korrelation der Expression der in den genomweiten Untersuchungen ermittelten Gene und *MEF2C* gezeigt werden.

Ziel der genomweiten Expressionsuntersuchungen war es also 1) festzustellen, ob die Methodik trotz der nicht-rekurrenten Deletionen und der geringen Fallzahl anwendbar ist und so statistisch signifikante Ergebnisse erhoben werden konnten. Zusätzlich sollten 2) ggf. Anpassungen der Methodik an die Besonderheiten des Untersuchungskollektives erprobt werden. Weiter Ziele der Untersuchung war 3) die Identifizierung weiterer Gene mit veränderter Expression und 4) die Erkennung möglicher Korrelationen der Expression dieser Gene mit *MEF2C* und damit die Identifizierung etwaiger neuer Interaktionspartner von *MEF2C*. So sollte zur Identifizierung und Charakterisierung von Netzwerken beigetragen werden, die an der Entstehung des Phänotyps des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms beteiligt sind und damit zum besseren ätiologischen Verständnis speziell des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms. Andererseits stellt die Identifizierung und Charakterisierung weiterer funktioneller Interaktionen im Allgemeinen eine wichtige Grundlage für das Verständnis der ID als Störung komplexer intra- und interzellulärer molekularer Netzwerke dar (Barabasi et al., 2011). Vertreter der "network medicine" versprechen sich davon neben der Identifizierung neuer Krankheitsgene auch Fortschritte im Verständnis krankheitsassoziiierter Mutationen und bei der Entwicklung neuer Biomarker und gezielter Pharmakotherapien. Zusätzlich können so auch Algorithmen zur Priorisierung von Kandidatengenomen verbessert werden. Solche Netzwerk- oder attributbasierten Klassifikatoren gewinnen zunehmend an Bedeutung durch den rasanten Zuwachs an Sequenzierdaten und Kandidatengenomen, die durch genomweite "next generation sequencing"-Techniken

(NGS) generiert werden (Kou et al., 2012), sind aber oft durch die noch lückenhaften Kenntnisse des menschlichen Interaktoms limitiert.

Zur Analyse der genomweiten Expressionsdaten wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet. Während der erste Ansatz bereits erprobt und veröffentlicht wurde (Becker et al., 2012), wurde der zweite Ansatz der vorliegenden Heterogenität der Patienten angepasst. Im ersten Ansatz wurden nur die Sonden in die Analyse mit einbezogen, die in allen Hybridisierungen (sowohl Patienten als auch Kontrollpersonen) einen DPV $<0,01$ zeigten und damit deutlich detektierbar waren. Im zweiten Ansatz wurde versucht, diejenigen Sonden zu identifizieren, die entweder deutlich in den Kontrollen und nur im geringen Maße in den Patienten oder umgekehrt detektierbar waren. 3.953 der ursprünglich ca. 47.000 Sonden des HT12 Gene Expression Chip (Illumina, San Diego, USA) erfüllten die Kriterien der Qualitätskontrolle des ersten Ansatzes. Die Sonde für *MEF2C* erfüllte die Kriterien der Qualitätskontrolle nicht und konnte daher nicht weiter untersucht werden. Dies galt ebenso für die bei Zweier et al analysierten Gene *MECP2* und *CDKL5* (Zweier et al., 2010). Der Vergleich der Kontrollgruppe mit den einzelnen Patientengruppen zeigte signifikante Expressionsunterschiede für eine Sonde. Die Sonde für das Gen *TRABD* zeigte für die Patientengruppen 1-4 und 7 eine signifikante verringerte Expression (Signifikanz G1: $p=1,133 \times 10^{-5}$, G2: $p=7,532 \times 10^{-6}$, G3: $p=0,4203 \times 10^{-6}$, G4: $p=2,842 \times 10^{-6}$, G7: $p=6,065 \times 10^{-5}$).

In der Validierung durch qPCR zeigten bis auf Gruppe 6 alle Patientengruppen einen signifikanten Expressionsunterschied für *TRABD* gegenüber den zehn gesunden Kontrollpersonen, während in den genomweiten Expressionsuntersuchungen nur die Gruppen 1-4 und 7 einen signifikanten Unterschied gezeigt hatten. Dieser Unterschied könnte durch die höhere Sensitivität der qPCR erklärt werden. Eine Rolle der zwischen genomweiten und Validierungsexperimenten unterschiedlichen Zusammensetzung der Patienten und der Kontrollen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz bestätigen die qPCR-Ergebnisse die Methode der klassischen Auswertung. Damit konnte bewiesen werden, dass die Methodik bei Kollektiven mit nicht-rekurrenten Deletionen und geringen Fallzahlen anwendbar ist.

Ein möglicher Nachteil dieser etablierten Methode der Auswertung und Qualitätskontrolle für die hier durchgeführte Studie an Deletionspatienten besteht darin, dass eventuell Sonden nicht in die Analyse eingehen, die gerade als Folge der Deletion einen veränderten DPV aufweisen und so entweder in den Kontrollen oder in den Patienten nicht von der Hintergrundstrahlung zu unterscheiden sind. Geht man von der Annahme aus, dass die Deletion in 5q14.3 in bestimmten Patienten eine verringerte Expression eines Gens X zur Folge hat und die Fluoreszenz der Sonde daher nicht von der Hintergrundstrahlung zu unterscheiden ist (DPV $>0,01$), würde das Gen X im ersten Ansatz nicht weiter analysiert, obwohl seine Expression als Folge der Deletion verändert ist. Daher wurden im zweiten Auswertungsansatz anhand des DPV solche Sonden identifiziert, die besonders ausgeprägte Expressionsunterschiede zwischen Patienten und Kontrollen aufwiesen. Dabei wurden alle Sonden ermittelt, die entweder in allen Kontrollhybridisierungen DPVs $<0,01$ (deutliche Signale) zeigten und in mindestens 80% der

Patientenhybridisierungen DPVs $>0,01$ (schwache Signale) oder umgekehrt. Insgesamt entsprachen 12 Sonden den Kriterien, von denen *COX7B* (*cytochrome c oxidase subunit VIIIb*) beim Vergleich der ungefilterten Rohdaten den deutlichsten Expressionsunterschied zwischen Kontrollpersonen und Patienten zeigte (1,7-1,8 fache Expression in den Patienten). Daher war es am wahrscheinlichsten, dass der Expressionsunterschied für *COX7B* durch eine qPCR detektiert werden konnte. Auch der hier entwickelte zweite Ansatz konnte durch qPCR bestätigt werden. Wie in den genomweiten Untersuchungen wurde für *COX7B* auch ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Gruppe 2 und den Kontrollen bestätigt. Zusätzlich zeigte sich auch für Gruppe 3 ein signifikanter Unterschied. Der durch die qPCR ermittelte Expressionsunterschied zwischen den Kontrollen und den Patientengruppen war dabei geringer (1,1-1,2fach erhöhte Expression in den Patienten) als der aus den ungefilterten Rohdaten der genomweiten Untersuchungen ermittelte. Dies zeigt, dass die ungefilterten Rohdaten zwar zur Identifizierung von Expressionsunterscheiden geeignet sind, jedoch nicht zu deren Quantifizierung. Dies zeigt zudem die hohe Sensitivität der qPCR und den Bedarf einer stringenten Qualitätskontrolle vor der Analyse der Daten.

MEF2C erfüllte in beiden Methoden der genomweiten Untersuchungen nicht die Kriterien der Qualitätskontrolle, da die Sonde für *MEF2C* in insgesamt 27 von 34 Hybridisierungen einen DPV $<0,01$ aufwies. Dies entsprach nicht den Kriterien der Qualitätskontrolle und die Sonde wurde nicht weiter analysiert. In der zweiten Methode wurde *MEF2C* nicht weiter analysiert, weil es in nur 12 Hybridisierungen der Kontrollpersonen mit einem DPV $<0,01$ sichtbar detektierbar war. Die Voraussetzung für die weitere Analyse in der zweiten Methode war ein DPV $<0,01$ in allen oder in keiner Hybridisierung der Kontrollpersonen. In den qPCR-Verifizierungsexperimenten zeigte sich aber in allen Patientengruppen eine gegenüber den Kontrollen signifikant veränderte Expression. Ohne Berücksichtigung der Patientengruppen, d.h. für alle Patienten gemeinsam, konnte ebenfalls ein signifikanter Expressionsunterschied für *MEF2C* zwischen den Kontrollen und den Patienten ermittelt werden ($p=0,023$).

Neben der Auswertung unter Berücksichtigung der Gruppeneinteilung, die zum Erreichen einer statistischen Signifikanz bei der Identifizierung neuer Gene notwendig war, wurden die qPCR-Ergebnisse für die drei als relevant erkannten Gene *MEF2C*, *TRABD* und *COX7B* auch für jeden Patienten einzeln im Vergleich mit den Kontrollpersonen analysiert. Dabei zeigte sich bezüglich der *MEF2C*-Expression, dass bei allen Patienten mit einer kompletten *MEF2C*-Deletion die *MEF2C*-Expression im Vergleich zu zehn Kontrollen signifikant vermindert war (Tab. 37).

Patient	MEF2C	TRABD	COX7B
P1	↓	↓	↑
P2	-	-	-
P3	↓	-	-
P4	↓	↓	↑
P5	↓	-	-
P7	↓	↓	↑
P8	↓	↓	-
P9	↓	-	-
P10	↓	↓	↑
P11	↑	↑	↓
P12	↓	↓	↑
P14	-	-	-

Tab. 37. qPCR-Einzelergebnisse der Patienten (↓/rot: signifikant erniedrigte Expression, ↑ / grün: signifikant erhöhte Expression, -: keine signifikante Veränderung)

Diese Ergebnisse stimmen mit den Voruntersuchungen (Zweier et al., 2010) überein und ergänzen diese. Jedoch erscheint bei Patient 2, bei dem nur der proximale / 3'-Teil von *MEF2C* deletiert vorliegt, die Expression in den hier durchgeführten Experimenten unverändert. Dieses Ergebnis wich von den Ergebnissen der Voruntersuchungen ab (Zweier et al., 2010), in denen eine signifikante Verminderung der Expression beschrieben wurde. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte in der Verwendung unterschiedlicher Sonden liegen. Die bei Zweier et al. verwendete Sonde liegt ca. 20 kb proximaler als die in dieser Arbeit verwendete Sonde, die wiederum nur ca. 37kb vom distalen Bruchpunkt der Deletion entfernt liegt. Da die Bruchpunkte der Deletion von Patient P2 nur anhand der Array-Daten bestimmt wurden, entsprechen sie eventuell nicht den tatsächlichen Bruchpunkten. So können beim verwendeten Array Affymetrix 6.0 in einigen Fällen CNV-Größenüberschätzungen von >10kb beobachtet (Pinto et al., 2011) werden. Daher besteht die Möglichkeit, dass die bei Zweier et al. verwendete Sonde im tatsächlich deletierten Bereich und die hier verwendete Sonde im nicht-deletierten Bereich von *MEF2C* liegt.

Interessanterweise konnte auch für die Patienten P9, P10, P11 und P12, deren Deletionen 0,2 - 2 Mb distal von *MEF2C* liegen, eine signifikant veränderte *MEF2C*-Expression beobachtet werden. Für die veränderte *MEF2C*-Expression in diesen Patienten kommen mehrere Erklärungen in Frage: Vorstellbar sind zum einen Deletionen von positiv wirkenden *cis*-regulatorischen Elementen, die die Expression von Genen in einem Abstand von über einem Mb beeinflussen können (Klopocki et al., 2008; Klopocki & Mundlos, 2011). Zum anderen ist es ebenfalls vorstellbar, dass durch die Deletion *cis*-regulatorische Elemente, die die Expression von Genen negativ beeinflussen, in die Nähe von *MEF2C* gebracht werden

(Klopocki & Mundlos, 2011). Eine Beeinflussung der Chromatinfaltung durch die Deletionen und eine dadurch veränderte Expression könnte ebenfalls eine Rolle bei der veränderten *MEF2C*-Expression spielen (Simonis et al., 2007). Eine weitere Erklärung könnten die Deletionen von nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs= non-coding RNAs), zu denen auch mikro-RNAs (miRNAs) gehören, sein. In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass miRNAs einen Einfluss auf die neuronale Entwicklung nehmen können (Klopocki & Mundlos, 2011; Im & Kenny, 2012). Für keines der Gene, die in den Deletionen der Patienten P9, P10, P11 und P12 liegen, wurden bisher Interaktionen mit *MEF2C* beobachtet. Daher ist eine Beeinflussung der *MEF2C*-Expression durch diese Gene unwahrscheinlich. In der gemeinsam deletierten Region der Patienten P9, P10, P11 und P12 liegen mehrere hochkonservierte Bereiche, die ein Hinweis auf *cis*-regulatorische Elemente sein könnten (Klopocki & Mundlos, 2011). Ebenso sind in der Region einige ncRNAs vorhanden, wodurch auch die mögliche Beeinflussung der *MEF2C*-Expression durch ncRNAs nicht ausgeschlossen werden kann.

Während sowohl die Patienten mit einer Deletion von *MEF2C* als auch die Patienten P9, P10 und P12, deren Deletionen *MEF2C* nicht umfasste, eine signifikant herabgesetzte Expression zeigten, war die *MEF2C*-Expression von P11 signifikant erhöht. Im Vergleich zu den Patienten P9, P10 und P12 besaß die Deletion von Patient P11 keine genomische Region, die ausschließlich in Patient P11 deletiert war und die für die verstärkte Expression verantwortlich sein könnte. Der einzige Unterschied zwischen der Deletion von Patient P11 und den anderen Deletionen ist ihre geringe Größe. Dies könnte ein Hinweis auf die Beeinflussung der Chromatinfaltung und der dadurch veränderten Interaktion von Genomabschnitten sein. Es ist aber auch vorstellbar, dass die Deletion in Patient P11 regulatorische Elemente oder ncRNAs betrifft, die die *MEF2C*-Expression direkt oder indirekt beeinflussen und zu einer verstärkten Expression führen, während die Deletionen der Patienten P9, P10 und P12 zwar die gleichen Elemente betreffen, aber zusätzlich noch weitere Elemente, die eine verminderte Expression zur Folge haben und deren Einfluss stärker ist. Patient P14 hatte die distalste Deletion und zeigte keine veränderte *MEF2C*-Expression. Die Deletion scheint daher keine regulatorischen Elemente oder ncRNAs, die die Expression von *MEF2C* beeinflussen können, zu besitzen.

Ein Vergleich der Phänotypen der Patienten mit den jeweiligen *MEF2C*-Expressionen bestätigt zum größten Teil die Rolle von *MEF2C* in der Ätiologie der für das 5q14.3-Mikrodeletionssyndrom typischen klinischen Merkmale wie schwere ID, Hypotonie und Krampfanfälle. Die Patienten P1, P3, P4, P7, P8 und P9 zeigten eine signifikant verringerte Expression von *MEF2C* und alle typischen klinischen Merkmale des 5q14.3-Mikrodeletionssyndrom. Patient P5 zeigte ebenfalls eine signifikant herabgesetzte *MEF2C*-Expression, aber es wurden keine Krampfanfälle diagnostiziert. Patient P2, der nur eine partielle *MEF2C*-Deletion aufwies, zeigte in der vorliegenden Untersuchung keine signifikant veränderte *MEF2C*-Expression. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Zweier et al., der für diesen Patienten eine signifikant herabgesetzte Expression zeigen konnte. Das klinische Bild dieses Patienten stimmt, bis auf die fehlenden Krampfanfälle, mit dem der anderen Patienten überein. Die

beiden Patienten mit "Missense"-Mutationen aus der Zweier et al.-Publikation zeigten ebenfalls keine verminderte *MEF2C*-Expression, aber alle klinischen Merkmale des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms (Zweier et al., 2010). Neben der verminderten Expression könnte daher anscheinend auch ein Funktionsverlust des *MEF2C*-Proteins, hervorgerufen durch Mutationen oder partielle Deletionen zur Entwicklung des Phänotyps führen. Neben einer herabgesetzten Expression scheint auch eine erhöhte *MEF2C*-Expression zur Ausbildung der typischen klinischen Merkmale zu führen. Patient P11 wies eine erhöhte Expression auf und zeigte mit alle drei Leitsymptome des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms. Patientin P12 bildet eine Ausnahme innerhalb der Patienten mit Deletionen in 5q14.3, da bei ihr nur eine milde ID diagnostiziert wurde. Ihre *MEF2C*-Expression ist signifikant herabgesetzt. Im Gegensatz zu den übrigen Patienten erstreckte sich ihre Deletion aber bis in die Subbande 5q15. Phänotypisch ist die Patientin eher mit Patient P14 zu vergleichen. Auch bei diesem Patienten wurde eine milde ID und zusätzlich eine milde Hypotonie diagnostiziert. Seine Deletion ist die distalste der hier beschriebenen Patienten und liegt komplett in 5q15. Die *MEF2C*-Expression in Patient P14 lag im Bereich der Kontrollpersonen. Vermutlich sind die genomischen Faktoren für diesen Phänotyp außerhalb des *MEF2C*-Spektrums anzusiedeln, obwohl eine indirekte Rolle des *MEF2C*-Netzwerkes nicht ausgeschlossen werden kann, da der Patient eine ID, eine Hypotonie und Krampfanfälle aufweist. Bei allen Patienten mit signifikant herabgesetzten *MEF2C*-Expressionen ließ sich keine Korrelation zwischen dem Schweregrad der klinischen Merkmale und der Stärke bzw. Schwäche der *MEF2C*-Expression erkennen.

Bei der Betrachtung die Ausprägung der verschiedenen klinischen Merkmale der Patienten mit Deletionen in 5q14.3 und Mutationen in *MEF2C* fällt deren Variabilität auf. Nicht alle Patienten zeigen alle drei Leitsymptome des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms und auch die variablen Hirnfehlbildungen, die in einem Großteil der Patienten zu beobachten sind, lassen darauf schließen, dass es neben *MEF2C* noch weitere Faktoren geben muss, die den Phänotyp der Patienten beeinflussen. Daher war das nächste Ziel der genomweiten Expressionsuntersuchungen der Versuch, einen Einblick in ein mögliches Protein-Netzwerk, das durch die Mikrodeletionen in 5q14.3 beeinflusst wird, zu bekommen. Dazu musste zuerst gezeigt werden, dass es sich bei der veränderten Expression von *TRABD* und *COX7B* nicht um Zufallsbefunde handelte, sondern dass beide mit *MEF2C* korreliert sind. Auch dies konnte durch die qPCR belegt werden. So zeigten die Expressions-Level von *MEF2C* und *TRABD* eine Korrelation ($p=8,82 \times 10^{-7}$), ebenso wie die Expression von *MEF2C* und *COX7B* ($p=8,32 \times 10^{-3}$) und die Expression von *TRABD* und *COX7B* ($p=4,45 \times 10^{-3}$). Die Korrelation der Expressions-Level war sowohl in den Patienten als auch in den Kontrollen zu beobachten. Da *COX7B* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, wurde die *COX7B*-Expression zusätzlich geschlechtsspezifisch analysiert, was aber die Ergebnisse nicht veränderte. Die Korrelation der drei Gene ist ein wichtiger Hinweis auf eine zumindest indirekte Interaktion von *MEF2C*, *TRABD* und *COX7B*. Am deutlichsten wird die Korrelation am Beispiel der Patienten P4 und P11. Patient P4 zeigte eine signifikant verminderte Expression für *MEF2C* und *TRABD*, während die Expression von *COX7B* signifikant erhöht war. Patient P11 dagegen zeigte

ein "invertiertes" Muster: Während die Expressionswerte von *MEF2C* und *TRABD* signifikant erhöht waren, war die Expression von *COX7B* signifikant herabgesetzt. Nichtsdestotrotz waren die Expressionen von *TRABD* und *COX7B* nicht in allen Patienten mit signifikant verminderter *MEF2C*-Expression signifikant verändert. Es ließ sich aber für keines der Gene ein Schwellenwert ermitteln, ab dem eines der korrelierten Gene seine Expression signifikant verändert. Die gezeigte Korrelation der drei Gene *MEF2C*, *TRABD* und *COX7B* könnte aber ein Hinweis auf ein gemeinsames Vorkommen in einem Protein-Netzwerk sein.

Nachdem eine Korrelation zwischen *MEF2C*, *TRABD* und *COX7b* gezeigt werden konnte, stellte sich nun die Frage, wie *TRABD* und *COX7B* mit *MEF2C* interagieren und ggf. in ein Protein-Netzwerk um *MEF2C* einzuordnen sind. Dazu wurde in Kooperation mit Herrn Professor Dr. Holger Fröhlich (Bonn-Aachen International Center for Information Technology) eine Netzwerkanalyse durchgeführt. Ausgehend von *MEF2C* wurden anhand von Literaturdaten und Daten der KEGG Datenbank (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), die eine umfassende Analyse veröffentlichter Interaktionen zwischen Genprodukten ermöglicht, Verbindungen zwischen *MEF2C* und den Genen *TRABD* und *COX7B* aus den beiden Auswertungen der genomweiten Expressionsanalysen, sowie mit dem bekannten ID-Gen *MECP2*, welches für die Ausprägung des Rett-Syndroms verantwortlich ist und für das eine Korrelation der Expression von Zweier et al. (2010) nachgewiesen wurde (Zweier et al., 2010), untersucht. Für Protein-Interaktions-Analysen wurde gezeigt, dass die durchschnittliche Länge der kürzesten Verbindungen zwischen Interaktionspartnern, denen eine gemeinsame Rolle in Krankheiten zugeschrieben wird, kürzer ist als zwischen zufällig ausgewählten Proteinen (Kou et al., 2012). Daher wurden auch in dieser Analyse nur die kürzesten belegten Verbindungen in Betracht gezogen. Die Netzwerkanalyse zeigte, dass *MEF2C* über *PPARGC1* (*PGC1-alpha*) (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*) und *NRF2* (*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) einen Einfluss auf die Expression von *COX7B* ausübt (Abb. 39). *PPARGC1* ist ein transkriptioneller Co-Aktivatoren, der die Biogenese der Mitochondrien und die Oxidation von Fettsäuren reguliert. In transgenen Mäusen konnte ein Einfluss von MEF2 auf die Expression von *PPARGC1A* gezeigt werden. Die MEF2-Bindung an den *PPARGC1*-Promotor wird durch zwei MEF2-Bindestellen ermöglicht (Czubryt et al., 2003). Verstärkte *PPARGC1*-Expression wiederum induziert die Expression der nuklearen Atmungsfaktoren (NRFs= nuclear respiratory factors) *NRF1* und *NRF2* (Liang & Ward, 2006). Die verstärkte *NRF2*-Expression ist entscheidend für die mitochondriale Entwicklung u.a. in Neuronen, da *NRF2* ein transkriptioneller Hauptregulator für alle zehn kernkodierten Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheiten ist, zu denen auch *COX7B* gehört (Ongwijitwat & Wong-Riley, 2005). Die Korrelation zwischen *MEF2C* und *COX7B*, der *Cytochrome C Oxidase Untereinheit VIIIb*, ist insofern beachtenswert, als bei Patienten mit Rett-Syndrom morphologische Anomalien in den Mitochondrien, Fehler in der mitochondrialen Atmungskette und Hinweise für verstärkten oxidativen Stress beobachtet wurden (Gibson et al., 2010). Dies ist ein erneuter Hinweis auf eine genetische Überlappung zwischen dem 5q14.3-Mikrodeletionssyndrom und dem Rett-Syndrom. Zweier et al. konnten schon zeigen, dass

die verringerte *MEF2C*-Expression zu einer verminderten Expression von *MECP2*, dem ursächlichen Gen für das Rett-Syndrom, zur Folge hat. (Zweier et al., 2010).

Ähnlich wie *COX7B* konnte durch die Netzwerkanalyse auch für *TRABD* eine indirekte Beeinflussung von *MEF2C* gezeigt werden (Abb. 39). So aktiviert *MEF2C* *c-Jun*, welches wiederum die Expression von *Securin* beeinflusst. *Securin* wiederum beeinflusst die Expression von *TRABD* (TraB domain containing). *C-Jun* (*jun proto-oncogene*) ist ein Proto-Onkogen und gehört zu den so genannten "immediate-early" Genen. Bei einer Stimulation der Zelle durch z.B. Wachstumsfaktoren oder elektrische Impulse sind es die "immediate-early"-Gene, die als erstes exprimiert werden. C-Jun reguliert *p53*-abhängig den korrekten Ablauf des Zellzyklus (Schreiber et al., 1999). Eine Dysregulation von Jun-"immediate-early"-Genen konnte in einen Zusammenhang mit ID und Hirnanomalien gebracht werden (Hashimoto et al., 2011; Kariminejad et al., 2011). *MEF2C* aktiviert nach Phosphorylierung die *c-Jun*-Expression (Wei et al., 2003). C-Jun wiederum kann an den Promotor von *PTTG1* (*Securin*) binden (Kakar, 1999). *Securin* gehört zu einer Klasse von Anaphase-Inhibitoren (Jallepalli et al., 2001) und ist somit wie *c-Jun* Teil der Zellzyklusregulation. *Securin* wiederum kann an den *TRABD*-Promotor binden (Tong et al., 2007). Ob die Bindung von *Securin* an den *TRABD*-Promotor eine aktivierende oder eine inhibierende Wirkung auf die *TRABD*-Expression hat, kann durch Literaturdaten nicht belegt werden. Über die Funktion von *TRABD* ist bisher nichts bekannt, aber aufgrund der Genkette *MEF2C* → *c-Jun* → *Securin* → *TRABD*, die einen Einfluss auf die *TRABD*-Expression ausübt, lässt sich vermuten, dass auch *TRABD* in den Zellzyklus involviert ist und möglicherweise wie *c-Jun* bei der Ausbildung von Hirnanomalien und einer ID eine Rolle spielt. Eine Beteiligung von Zellzyklus-kontrollierenden Genen wie z.B. *CCNA2* und *SCAPER* an der Entwicklung einer ID konnten schon mehrfach gezeigt werden (Brunton et al., 2011; Najmabadi et al., 2011). Für *Securin* konnte gezeigt werden, dass es eine Rolle in zahlreichen Tumoren und in der Entwicklung des fetalen Gehirns spielt (Boelaert et al., 2003).

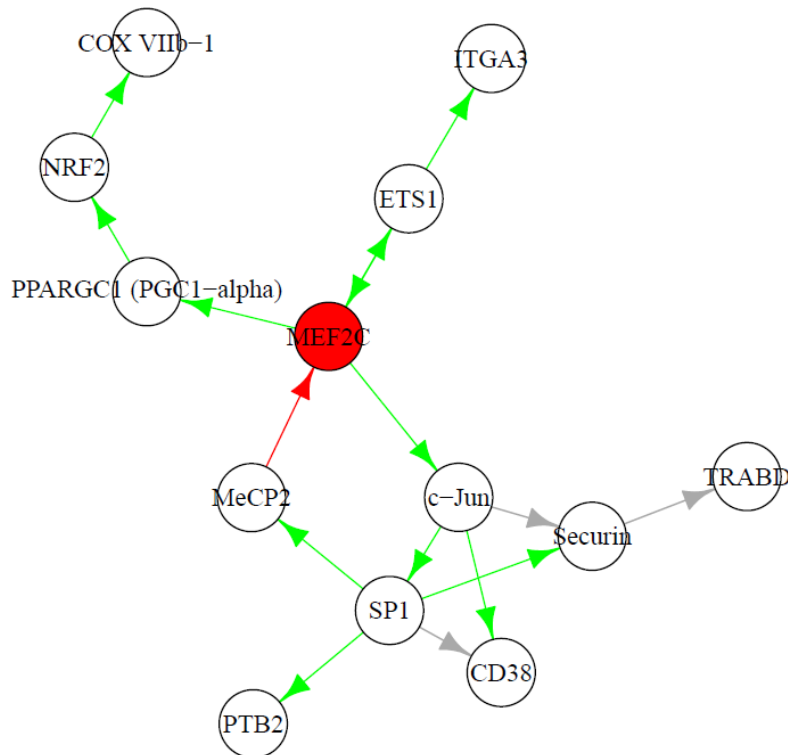


Abb. 39. Ausschnitt aus dem Ergebnis der MEF2C-Netzwerkanalyse. Die grünen Pfeile zwischen den Genen (Kreise) deuten auf einen aktivierenden Einfluss hin. Der rote Pfeil verdeutlicht einen inhibierenden Einfluss. Graue Pfeile zeigen einen Einfluss unbekannter Art. Der dargestellte Ausschnitt aus dem Netzwerk zeigt nur die kürzesten Verbindungen.

Zusätzlich zu den durch qPCR bestätigten Genen konnte durch die Netzwerkanalyse auch ein indirekter Einfluss von *MEF2C* auf die Expression von *ITGA3*, *CD38* und *PTB2*, welche ebenfalls durch den zweiten Ansatz der genomweiten Expressionsanalysen gefunden wurden, aber mangels RNA durch eine qPCR noch nicht validiert werden konnten, gezeigt werden (Abb. 39). *ITGA3* (*Integrin, alpha 3*) ist ein Zelladhäsionsmolekül und wird unter anderem von *ETS1* (*v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*), einem Mitglied der ETS-Transkriptionsfaktoren, die einen Einfluss auf zahlreiche Entwicklungsvorgänge haben, aktiviert (Katabami et al., 2006; Dwyer et al., 2007). *ETS1* wiederum wird durch *MEF2C* aktiviert. *ETS1* wiederum spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Lymphhoidzellen (Stehling-Sun et al., 2009). Der Einfluss von *MEF2C* auf *CD38* (*CD38 molecule*), einem multifunktionellen Ektoenzym, findet über das oben beschriebene C-Jun statt (Tirumurugaan et al., 2007). *PTB2* (*polypyrimidine tract binding protein 2*) ist ein RNA-bindendes Protein, das in Spleiß-Prozesse und die miRNA-Regulation involviert ist (Engels et al., 2012). Im MEF2C-Netzwerk wird *PTB2* über c-jun und *SP1* (*SP1 transcription factor*) aktiviert (Kardassis et al., 1999; Romanelli et al., 2005). Die Verbindung von *MEF2C* → *C-Jun* → *SP1* ist neben der Aktivierung von *PTB2* auch durch die Aktivierung von *MECP2* (Marin et al., 1997) sehr interessant. Die Beobachtung, dass *MEF2C* über zwei Stationen *MECP2* aktiviert, stimmt mit den Beobachtungen von Zweier et al. überein, die bei einer signifikant verminderten Expression von *MEF2C* eine ebenfalls signifikant verminderte Expression von

MECP2 zeigen konnten (Zweier et al., 2010). Es stellt sich auch die Frage, inwiefern eine Beeinflussung über zwei Schritte (z.B. *MEF2C*→*PPARGC1*→*NRF2*→*COX7B*) eine spezifische Interaktion ist. Zwei Tatsachen sprechen aber dagegen, dass man durch intensives Suchen über zwei Schritte eine Interaktion mit nahezu jedem Gen finden könnte. Zum einen konnte über die qPCR eine Korrelation zwischen *MEF2C* und *TRABD* bzw. *COX7B* gefunden werden und zum anderen ermittelten Xu et al. eine durchschnittliche Verbindungslänge von ca. vier Verbindungen innerhalb des PPI (Protein-Protein-Interaktion-Netzwerk) (Xu et al., 2011). Im Vergleich dazu sind die maximal zwei Verbindungen zwischen *MEF2C* und *TRABD* bzw. *COX7B* wesentlich spezifischer.

Obwohl bei der genomweiten Expressionsuntersuchung ein Großteil der Sonden nicht die Kriterien der Qualitätskontrolle erfüllte, war es durch die Anwendung der zwei Auswertungsmethoden möglich, Gene zu identifizieren, die in ihrer Expression durch die Deletionen in 5q14.3 beeinflusst werden können. Die so identifizierten Gene *TRABD* und *COX7B*, deren Korrelation mit *MEF2C* durch eine qPCR bewiesen werden konnten, aber auch die weiteren Gene aus der 2. Methode (*CD38*; *PTB2*) stehen indirekt unter dem Einfluss von *MEF2C*. Die "zwischen geschalteten" Gene wie z.B. *c-Jun* fielen bei der genomweiten Expressionsuntersuchung durch die Qualitätskontrolle, konnten aber aufgrund der Netzwerkanalyse identifiziert werden. Die Expression dieser Gene könnte in einem nächsten Schritt durch eine qPCR in den Patienten untersucht werden.

Welche neuen Erkenntnisse zur die Ätiologie können daraus gewonnen werden? Anhand der genomweiten Expressionsanalysen und der qPCR konnte gezeigt werden, wie sich Deletionen in 5q14.3 auf das Netzwerk um *MEF2C* auswirken. Zusätzlich bestätigte die Netzwerkanalyse einmal mehr, dass *MEF2C* in viele Entwicklungsvorgänge involviert ist (Potthoff & Olson, 2007). So konnte anhand der genomweiten Expressionsdaten und der Netzwerkanalyse eine Verbindung von *MEF2C* in die Kontrolle der Mitochondrien, der Zelladhäsion und des Zell-Zyklus beschrieben werden. Daher ist *MEF2C*, wie von Zweier et al. und Le Meur et al. beschrieben, weiterhin das Hauptkandidatengen für den Phänotypen des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms (Le Meur et al., 2010; Zweier et al., 2010). Inwiefern die durch die genomweiten Untersuchungen identifizierten Gene eine Rolle bei der Entwicklung des Phänotypen spielen, ist unklar. Für einen Teil der "zwischen geschalteten" Gene wurde aber bereits eine Rolle in der Entwicklung von Neuronen bzw. in der Entwicklung einer ID beschrieben. Für die Jun *immediate-early* Gene wurde eine Beteiligung in der Entwicklung von Hirnanomalien und einer ID, zwei klinischen Merkmalen des 5q14.3 Mikrodeletionssyndroms, nachgewiesen (Hashimoto et al., 2011; Kariminejad et al., 2011). Für *NRF2*, welches in diesem Netzwerk *COX7B* aktiviert, wurde eine Beteiligung in der Entwicklung von Neuronen beschrieben (Lee et al., 2010). *Securin* ist wiederum in die Entwicklung des fetalen Gehirns involviert (Boelaert et al., 2003). *ETSI* induziert in niedrigen Chordaten die Bildung des neuralen Gewebes (Bertrand et al., 2003). *SPI* kontrolliert die Transkription des fragile X mental retardation protein (FMRP), dem entscheidenden Protein des fragilen-X-Syndroms (Garber et al., 2006). Anhand der Netzwerkanalyse konnte ein möglicher negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen

MEF2C und MECP2 über c-Jun und SP1 identifiziert werden. So aktiviert MEF2C, wie beschrieben, c-Jun und c-Jun aktiviert SP1, welches wiederum MECP2 aktiviert, welches MEF2C inhibiert. Die Expressionsdaten von Patient P11 und des Patienten mit einer gesteigerten Expression aus Zweier et al. zeigen, dass auch eine vermehrte *MEF2C*-Expression zur Entwicklung des Phänotyps führen kann.

Anhand dieser Daten ist zu erkennen, dass diese Gene durchaus auch in der Entwicklung des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms involviert sein können. Sie ermöglichen einen ersten kleinen Blick in das Geflecht der beteiligten Gene. Zusammenfassend konnte anhand der ersten drei vorgestellten Patienten mit Mikrodeletionen in 5q14.3 ein neues Mikrodeletionssyndrom beschrieben werden und in Kooperation mit *MEF2C* das ursächliche Gen für das 5q14.3-Mikrodeletionssyndrom identifiziert werden. Nach der Rekrutierung weiterer Patienten war es möglich, durch genomweite Expressionsuntersuchungen mit *TRABD* und *COX7B* zwei Gene zu identifizieren, die bei einer signifikant verringerten *MEF2C*-Expression in einem Teil der Patienten ebenfalls ein signifikant verändertes Expressionsmuster zeigten. Durch eine qPCR wurden zum einen die Ergebnisse der genomweiten Analyse verifiziert und zum zweiten beide angewendeten bzw. neu entwickelten Methoden der Analyse bestätigt. Über eine Netzwerkanalyse konnten die identifizierten Gene *TRABD* und *COX7B* in ein Netzwerk um *MEF2C* eingeordnet werden. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sie an der Entwicklung des Phänotyps beteiligt sind. Des Weiteren ermöglichte die Netzwerkanalyse einen kleinen Einblick in ein Netzwerk von Genen, die zum größten Teil in neurale Entwicklungsprozesse involviert sind.

6. Zusammenfassung

Kopienzahlveränderungen (CNVs=Copy Number Variations) sind chromosomale DNA-Segmente, die zwischen 1 kb und mehreren Megabasen groß sind und zwischen Individuen einer Spezies in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen können. Schätzungen besagen, dass CNVs ca. 13% des menschlichen Genoms betreffen (Stankiewicz & Lupski, 2010). In Abhängigkeit von ihrer genomischen Lokalisation und den betroffenen Genen und/oder regulatorischen Elementen können CNVs einen Einfluss auf die Genexpression und dadurch auf die Entwicklung des jeweiligen Phänotyps haben (Lupski et al., 1992). Eine zentrale Aufgabe bei der Interpretation von CNVs ist die Differenzierung zwischen benignen bzw. neutralen und pathogenen CNVs (Altshuler et al., 2010).

Intelligenzminderung (ID=Intellectual Disability) hat eine Prävalenz von 1%-3% (Roeleveld et al., 1997) und bezeichnet einen Zustand verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten (ICD-10-WHO Version 2011). Die Ursachen für die Entwicklung einer ID sind mannigfaltig und können genetisch, umweltbedingt und multifaktoriell sein (Rauch et al., 2006). In ca. 10% der ID-Patienten sind CNVs die Ursache für die Entwicklung einer ID (Miller et al., 2010). Bisher sind darüber hinaus Mutationen in ca. 450 Genen mit ID assoziiert. Nach Schätzungen, basierend auf der Anzahl an ID Genen auf dem X-Chromosom wird mit insgesamt 1500-2000 ID-Genen gerechnet (van Bokhoven, 2011).

Ziel der Arbeit war es, bisher unbekannte hochpenetrant ursächliche CNVs bei Patienten mit einer Intelligenzminderung zu identifizieren, darauf basierend durch Genotyp-Phänotyp-Korrelationen neue Mikrodeletions-/Duplikationssyndrome zu beschreiben, in den betroffenen chromosomalen Regionen bisher nicht beschriebene ID-Gene zu identifizieren und die Pathophysiologie von CNVs bzw. den identifizierten ID-Genen zu untersuchen. Dazu wurden zunächst insgesamt 312 Patienten mit einer isolierten oder syndromalen ID unterschiedlichen Grades und unbekannter Ursache mit SNP-Arrays der Firma Illumina genomweit auf CNVs untersucht. Aus den Rohdaten wurden anschließend mit dem Algorithmus QuantiSNP, potentielle CNVs errechnet (Colella et al., 2007). Da CNVs, die in der Allgemeinbevölkerung sehr häufig vorkommen, als hochpenetrante Ursache für eine ID ausgeschlossen werden können (Kaminsky et al., 2011), wurden nur putative CNVs, die nicht häufig in Kontrollpersonen zu finden waren, mit einer qPCR verifiziert und auf ihre Segregation hin untersucht. Eine *de novo*-Entstehung der CNVs wurde dabei als erster Hinweis für eine Pathogenität gewertet (Buyse et al., 2009). Als einziges Kriterium ist die *de novo*-Entstehung eines CNVs für eine Aussage über eine mögliche Ursächlichkeit aber nicht aussagekräftig genug (Vermeesch et al., 2011). Die weitere Beurteilung der identifizierten seltenen CNVs hinsichtlich ihres Beitrags zur ID erfolgte daher anhand von Patientendaten aus Literatur und Datenbanken.

Die SNP-Array Untersuchungen der 312 ID-Patienten ergaben insgesamt 351 potentielle seltene CNVs, die durch qPCR verifiziert und auf eine *de novo* oder elterliche Herkunft untersucht wurden. 252 der CNVs konnten bestätigt und für 40 CNVs eine *de novo*-Herkunft nachgewiesen werden. Da bei drei Patienten jeweils zwei *de novo*-CNVs nachgewiesen wurden, trugen insgesamt 37 Patienten (11,9%) *de novo*-CNVs. Die CNVs von 31 Patienten konnten als wahrscheinliche Ursache der ID identifiziert werden. Zusätzlich wurde in einem Patienten eine UPD15 als Ursache ermittelt. Dies entspricht einer Detektionsrate von 10,5% und stimmt mit den Detektionsraten in der Literatur überein (Miller et al., 2010). Die dabei detektierten Ursachen waren in insgesamt 24 Fällen bereits in der Literatur berichtet: So betrafen 17 CNVs die kritischen Regionen bekannter Deletions-/Duplikationssyndrome, wie z.B. Deletionen in den Chromosomenbanden 2q33.1 und 17q21.31 oder Duplikationen in 15q11-q13. Des Weiteren wurden sieben CNVs identifiziert, die mit *EHMT1*, *CASK*, *FMRI/FMR2*, *Neurexin* und *CHRNA7* bekannte ID-Gene betrafen. Zusätzlich wurde eine unbalancierte Translokation zwischen großen Segmenten der Chromosomen 4 und 13 identifiziert. Die verbleibenden sechs CNVs konnten anhand evidenzbasierter Maßstäbe als pathogen eingestuft werden. Für fünf dieser CNVs konnten im Rahmen dieser Arbeit anhand von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen mit Patientendaten aus der Literatur, den Datenbanken und aus Kooperationen neue Syndrome beschrieben werden: die Mikrodeletionssyndrome 2p14-p15 (Wohlleber, Kirchhoff, Zink et al., 2011), 5q31.2 (Kleffmann, Zink et al. 2012), 5q14.3 (Engels et al., 2009), 15q22.1-q22.2, und 9q33.3-q34.11.

Basierend auf den identifizierten seltenen CNVs wurden zum einen mehrere ID-Kandidatengene identifiziert und analysiert. Zum anderen konnten Untersuchungen zur Pathophysiologie von ID-Genen durchgeführt werden, die wie im Fall von *FMRI* bereits bekannt waren oder die im Rahmen der Arbeit, z.T. in Zusammenarbeit mit anderen Gruppen identifiziert worden waren.

Anhand einer im Bonner Kollektiv identifizierten Mikrodeletion in den Chromosomenbanden Xq27.3-q28 wurde nach Erstellung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation die Pathophysiologie der Mikrodeletionen untersucht. Die 3,53 Mb große *de novo*-Mikrodeletion der Bonner Patientin enthielt insgesamt fünf Gene, von denen mit *FMRI*, *FMRI1NB*, *AFF2/FMR2* und *IDS* vier Gene bereits genauer charakterisiert waren. Durch die Datenbank DECIPHER konnten zwei weitere Patientinnen mit überlappenden *de novo*-Deletionen rekrutiert werden. Neben einer ID zeigten die Patientinnen weitere typische Merkmale des fragilen X-Syndroms (FXS). Daher wurde *FMRI*, das ursächliche Gen des Syndroms, zum Ziel weiterer ätiologischer Analysen. Dazu wurde die *FMRI*-Expression im Blut der drei Patientinnen und ihrer Mütter untersucht. Eine im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant verringerte *FMRI*-Expression in allen drei Patientinnen konnte nicht gezeigt werden. Anhand der Ergebnisse wurde aber festgestellt, dass die *FMRI*-Expression aller drei Patientinnen im Vergleich zu ihren Müttern signifikant reduziert war. Untersuchungen in Kontroll-Mütter-Töchter Paaren zeigten, dass die gegenüber den Müttern verringerte Expression spezifisch für die Mikrodeletionspatientinnen war. Dies ist ein Hinweis darauf, dass nicht wie bei anderen Syndromen die Unterschreitung eines

absoluten Expressions-Schwellenwertes zur Ausprägung des Phänotyps führt, sondern die physiologisch notwendige Menge an *FMRI*-RNA von familienspezifischen Faktoren abhängt.

Durch Analyse der identifizierten Mikrodeletionssyndrome und seltenen CNVs konnten mit *LRRTM2* (*leucine rich repeat transmembrane neuronal 2*) in 5q31.2, *FOXBI* (*forkhead box B1*) in 15q22.1-q22.2 und *SOX2* (*SRY (sex determining region Y)-box 2*) in 3q26.33 drei neue ID-Kandidatengene aufgrund ihrer Funktion und zentralnervösen Expression identifiziert werden. Durch die Sequenzierung dieser Gene in 191 bzw. 330 weiteren ID-Patienten konnten keine weiteren Mutationen identifiziert werden, was gegen Mutationen der untersuchten Gene als häufige Ursache für die Entwicklung einer ID spricht.

Die kritische Region für das im Rahmen der Arbeit identifizierte 9q33.3-q34.11 Mikrodeletionssyndrom enthält mit *ANGPTL2*, *GARNL3* und *RALGPS1* drei Gene, die als potentielle ID-Kandidatengene in Frage kommen. 250kb außerhalb der kritischen Region liegt mit *STXBPI* ein bekanntes ID-Gen. Für diese Entfernung konnte die Wirkung von regulatorischen Elementen auf die Genexpression nachgewiesen werden (Klopocki et al., 2008). Zur Aufklärung der Pathophysiologie des Syndroms werden Sequenzierungen der drei Gene innerhalb der kritischen Region in 191 ID-Patienten durchgeführt und Expressionsstudien von *STXBPI*, *ANGPTL2*, *GARNL3* und *RALGPS1* sind in Vorbereitung.

Nach der Beschreibung des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms (Engels et al., 2009) im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik der Universität Erlangen *MEF2C* als das zumindest hauptsächlich ursächliche Gen für das 5q14.3-Mikrodeletionssyndrom und *MEF2C*-Mutationen als häufigere ID-Ursache identifiziert (Zweier et al., 2010). Interessanterweise lag *MEF2C* außerhalb der Deletion der Bonner Indexpatientin, zeigte in ihrem Blut aber eine reduzierte Expression. Nach der Rekrutierung weiterer elf Patienten war es möglich, zur Identifizierung interagierender Gene erstmals genomweite Expressionsanalysen bei Mikrodeletionspatienten mit nicht-rekurrenten Bruchpunkten durchzuführen. Mit *TRABD* und *COX7B* wurden zwei Gene identifiziert, die bei einer signifikant veränderten *MEF2C*-Expression in Teilen der Patienten ebenfalls eine signifikant veränderte Expression zeigten. Dazu wurden zwei unterschiedliche Analysemethoden angewendet. Zusätzlich zu einer bei genomweite Expressionsstudien etablierten allgemein anwendbaren Methodik (Becker et al., 2012) wurde eine zweite Methode speziell für nicht-rekurrente Mikrodeletionen neu entwickelt. qPCR-Analysen verifizierten die Ergebnisse beider Auswertungsmethoden der genomweiten Expressionsanalysen. Über eine Netzwerkanalyse konnten die in der genomweiten Expressionsanalyse identifizierten Gene *TRABD* und *COX7B* in ein genetisches Netzwerk um *MEF2C* eingeordnet werden. Die Einordnung der Gene in ein genetisches Netzwerk ermöglichte gleichzeitig die Identifizierung von "zwischengeschalteten" Genen, die ebenfalls potentielle ID-Kandidatengene sein könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Identifizierung von ursächlichen seltenen CNVs bei ID-Patienten ein geeignetes Mittel zur Identifizierung neuer zum Teil häufiger ID-

Kandidatengene sein kann. Durch weiterführende Expressionsanalysen war es nicht nur möglich den Einfluss der CNVs auf die betroffenen Gene, sondern auch den Einfluss auf das Transkriptom zu beschreiben und so die Pathophysiologie von ID-Syndromen zu analysieren.

7. Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung pathogener CNVs bei 312 ID-Patienten durch molekulare Karyotypisierung mittels SNP-Arrays sowie die Identifizierung bisher unbekannter Kandidatengene für ID in neu identifizierten CNV-Regionen und deren Charakterisierung und pathophysiologische Analyse. Mögliche und zum Teil bereits begonnene Folgeuntersuchungen umfassen einerseits weitere genetische und funktionelle Untersuchungen zu den in der Arbeit identifizierten Kandidatengenen und andererseits die Entwicklung neuer Analysemethoden. Durch letztere sollen aus den vorhandenen SNP-Array-Daten in Kombination mit Expressionsstudien und Next-Generation-Sequencing sowohl CNVs mit neuen, z.B. regulatorischen ätiologischen Mechanismen als auch rezessive ID-Gene identifiziert werden.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit durch molekulare Karyotypisierung in 10,5 % der Patienten die wahrscheinliche genetische Ursache für die Entwicklung einer ID ermittelt werden. Dabei wurden zwei neue Mikrodeletionssyndrome beschrieben und mehrere weitere pathogene CNV-Regionen identifiziert. Anhand dreier dieser neu beschriebenen pathogenen CNVs in 5q31.2, 15q22.1-q22.2 und 3q26.33 konnten mit *LRRTM2*, *FOXB1* und *SOX2* drei potentielle ID-Kandidatengene identifiziert werden. Die Sequenzierung dieser Kandidatengene in 191 bzw. 330 weiteren ID Patienten ergab bisher keine weiteren Mutationen. Eine weitere Aufklärung der Beteiligung dieser Gene an der Entwicklung einer ID kann durch weitere ID-Patienten mit Deletionen oder Mutationen in den entsprechenden Genen und anschließende funktionelle Untersuchungen erreicht werden.

Die kritische Region für das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte 9q33.3-q34.11 Mikrodeletionssyndrom enthält mit *ANGPTL2*, *GARNL3* und *RALGPS1* drei potentielle ID-Kandidatengene und in einer Entfernung von 250 kb mit *STXBPI* ein bekanntes ID-Gen. Da es Überschneidungen im phänotypischen Spektrum zwischen Patienten mit *STXBPI*-Mutationen und den hier beschriebenen Patienten gibt, und in der Literatur der Einfluss regulatorischer Elemente auf mehr als 1 Mb entfernte Gene beschrieben wurden (Klopocki & Mundlos, 2011), ist ein Einfluss von *STXBPI* auf die Entwicklung des Phänotyps nicht auszuschließen. Zur weiteren Aufklärung der Pathophysiologie werden zurzeit die drei Gene aus der kritischen Region des 9q33.3-q34.11 Mikrodeletions-Syndroms in den sechs Indexpatienten und weiteren 192 ID-Patienten sequenziert. Zusätzlich sind Expressionsanalysen der drei Gene der kritischen Region und von *STXBPI* bei Mikrodeletionsträgern in Planung. Die Expressionsanalysen sollen zeigen, ob die drei Gene aus der SRO kopienzahlsensitiv sind und ob die *STXBPI*-Expression durch die Deletionen beeinflusst wird und somit ein Einfluss von *STXBPI* auf den Phänotyp der Patienten vorliegen könnte.

Nach der Beschreibung des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms in der vorliegenden Arbeit (Engels et al., 2009) und der Identifizierung von *MEF2C* (Zweier et al., 2010) als ursächliches Gen, wurden in der

vorliegenden Arbeit an 14 rekrutierten Mikrodeletionspatienten genomweite Expressionsanalysen durchgeführt. Zur Identifizierung interagierender und somit potentiell an der Ätiologie des 5q14.3-Mikrodeletionssyndroms beteiligter Gene wurde dabei zusätzlich zu einer etablierten Auswertungsmethode eine zweite Methode speziell zur Analyse nicht-rekurrenter Mikrodeletionen entwickelt und angewandt. Durch diese Methoden wurden mit *TRABD* und *COX7B* zwei Gene identifiziert, deren Expression mit der *MEF2C*-Expression korreliert, und deren genomweite Expressionsergebnisse durch qPCR verifiziert. Zudem konnte durch eine Netzwerkanalyse ein funktionelles Netzwerk um *MEF2C* beschrieben und beide Gene darin eingeordnet werden. Anhand der zweiten genomweiten Analysemethoden konnten neben *COX7B* elf weitere Gene identifiziert werden, die nur in den Mikrodeletionspatienten und nicht in den Kontrollpersonen eine detektierbare Expression zeigten. Mit *ITGA3* und *CD38* konnten zwei dieser elf Gene ebenfalls in das Netzwerk um *MEF2C* eingeordnet werden. Inwiefern die weiteren neun Gene ebenfalls in das Netzwerk um *MEF2C* eingegliedert sind, muss durch weitere Analysen geklärt werden. Durch die weitere Anwendung der hier entwickelten Methodik auf andere Mikrodeletionssyndrome können wichtige weitere Beiträge zur Beschreibung funktioneller Netzwerke und damit zu einem Grundlagenverständnis der ID geliefert werden.

Ziel der Arbeit war die Identifizierung hochpenetranter ursächlicher CNVs und darin enthaltener Kandidatengene. Dementsprechend wurden die durch die SNP-Array-Analyse gewonnenen CNV-Daten einem Filterprozess unterzogen, der u.a. sämtliche CNVs, die keine Gene bzw. kodierende Sequenz enthielten, aussortierte. Damit waren CNVs, die eventuell nur regulatorische Elemente beinhalten und so die Expression von ID-Genen beeinflussen könnten, nicht Teil der bisherigen Analyse. In der Literatur wurde der Einfluss von regulatorischen Elementen auf die Expression von Genen in einer Entfernung von bis zu ~1 Mb beschrieben (Klopocki & Mundlos, 2011). Daher ist die Identifizierung von CNVs, die keine Gene enthalten, aber in maximal ~1 Mb Abstand zu einem bekannten ID-Gen liegen, der nächste logische Schritt bei der Analyse der erhobenen CNV-Daten. Nach der *in silico*-Identifizierung solcher CNVs kann die Expression der benachbarten Gene im jeweiligen Patienten untersucht werden. Zeigt sich eine signifikante Abweichung der Expression des jeweiligen Gens im Vergleich zu geeigneten Kontrollpersonen, so kann davon ausgegangen werden, dass der CNV die Expression des Gens beeinflusst. In Voruntersuchungen wurden innerhalb des Bonner Kollektivs bei zwei Patienten CNVs identifiziert, die konservierte Sequenzen enthielten und in 25 kb Abstand zum bekannten ID-Gen *GRIN2A* lokalisiert waren. Beide Patienten weisen ein klinisches Erscheinungsbild auf, das dem beschriebenen Phänotyp von *GRIN2A*-*loss-of-function*-Mutationen ähnelt. Expressionsuntersuchungen dazu sind in Planung. Analog dazu sollen die vorhandenen Daten auf weitere CNVs, die eventuell regulatorische Elemente enthalten, untersucht werden.

Die Verwendung von SNP-Arrays ermöglicht weiterhin nicht nur die Bestimmung der Kopienzahl einer chromosomalen Region, sondern zusätzlich die Identifizierung von homozygoten Regionen. Dies

ermöglicht die Identifizierung von autosomalen ID-Genen, die einem rezessiven Erbgang folgen. Bisher fand die Suche nach autosomal rezessiven ID-Genen (ARID) anhand des so genannten "*Homozygosity mapping*" in großen, mehrfach betroffenen Familien, die aus Populationen mit einem hohen Anteil an Verwandtenehen stammen, statt (Najmabadi et al., 2011). Im Gegensatz dazu ermöglicht die Verwendung von SNP-Arrays die Identifizierung homozygoter Regionen auch in einzelnen, nicht verwandten Patienten. Hildebrandt et al. zeigten in einer "*proof of principle*"-Studie von Einzelpatienten mit homozygoten Mutationen in verschiedenen rezessiven Krankheitsgenen, dass in 12 von 13 Fällen die ursächlichen Gene innerhalb der durch ein neuartiges *multipoint homozygosity mapping* aus SNP-Array Daten bestimmten homozygoten Regionen lagen (Hildebrandt et al., 2009). In Kombination mit Next-Generation-Sequencing (NGS) Methode wäre es möglich, die in solchen homozygoten Kandidatenregionen liegenden Gene in relativ kurzer Zeit kosteneffektiv zu sequenzieren (Korbel et al., 2007). In Vorarbeiten wurden in Kooperation mit der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Friedhelm Hildebrandt 232 nicht-verwandte ID-Patienten auf Homozygotien untersucht. In 24 der Patienten wurden homozygote Regionen gefunden. Ein Abgleich mit bekannten ARID-Genen zeigte, dass bei 17 Patienten in den homozygoten Regionen bekannte ARID Gene lokalisiert sind. In Zukunft sollen weitere ID-Patienten mit homozygoten Regionen identifiziert und durch Next-Generation-Sequencing diese Regionen auf rezessive Mutationen hin untersucht werden, um neue ARID-Gene zu identifizieren.

Neben der Sequenzierung von Genen innerhalb homozygoter Regionen bietet das Next-Generation-Sequencing die Möglichkeit, nahezu das gesamte Exom von ID-Patienten ohne Hinweise auf Homozygotien zu sequenzieren und dabei heterozygote, *de novo* entstandene und damit potentiell dominant pathogene Mutationen in Genen zu identifizieren. Im Rahmen des MRNET-Konsortiums wurden unter Beteiligung des Bonner Projekts und mit meiner Mitarbeit die Exome von 51 ID-Patienten und den jeweiligen phänotypisch unauffälligen Eltern sequenziert. Dabei wurden innerhalb des Patienten-Kollektivs 1,73 *de novo*-Varianten / Patient gefunden, während es in einem Kontrollkollektiv aus 20 Trios 1,14 *de novo*-Varianten / Person waren. 16 Patienten trugen dabei Mutationen in bekannten ID-Genen, wie *STXBPI*, *SYNGAP1* und *SCN2A*. Des Weiteren wurden in sieben bisher nicht mit ID assoziierten Genen Mutationen gefunden, die höchstwahrscheinlich zu einem Funktionsverlust (*loss-of-function*) des Gens führen. Aufgrund verschiedener Kriterien (Expression im Gehirn, bekannte Phänotypen in Mausmodellen, funktionelle Hinweise) wurde diese sieben Mutationen als höchstwahrscheinlich pathogen klassifiziert, so dass bei insgesamt 45% der Patienten die genetische Ursache der ID identifiziert wurde und neue Kandidatengene ermittelt wurden. Aufgrund der hohen Aufklärungsrate durch NGS wird die Technik in naher Zukunft umfassender in der Erforschung und Diagnostik der ID angewendet (Rauch et al., 2012).

8. Literaturverzeichnis

- Albers Ca, Paul DS, Schulze H, Freson K, Stephens JC, Smethurst Pa, Jolley JD, Cvejic A, Kostadima M, Bertone P, Breuning MH, Debili N, Deloukas P, Favier R, Fiedler J, Hobbs CM, Huang N, Hurles ME, Kiddle G, Krapels I, Nurden P, Ruivenkamp CaL, Sambrook JG, Smith K, Stemple DL, Strauss G, Thys C, van Geet C, Newbury-Ecob R, Ouwehand WH, Ghevaert C (2012) Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat Genet*, 44: 435-439.
- Allen EG, He W, Yadav-Shah M, Sherman SL (2004) A study of the distributional characteristics of FMR1 transcript levels in 238 individuals. *Hum Genet*, 114: 439-447.
- Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Dermitzakis E, Schaffner SF, Yu F, Bonnen PE, de Bakker PIW, Deloukas P, Gabriel SB, Gwilliam R, Hunt S, Inouye M, Jia X, Palotie A, Parkin M, Whittaker P, Chang K, Hawes A, Lewis LR, Ren Y, Wheeler D, Muzny DM, Barnes C, Darvishi K, Hurles M, Korn JM, Kristiansson K, Lee C, McCarroll SA, Nemesh J, Keinan A, Montgomery SB, Pollack S, Price AL, Soranzo N, Gonzaga-Jauregui C, Anttila V, Brodeur W, Daly MJ, Leslie S, McVean G, Moutsianas L, Nguyen H, Zhang Q, Ghorri MJR, McGinnis R, McLaren W, Takeuchi F, Grossman SR, Shlyakhter I, Hostetter EB, Sabeti PC, Adebamowo CA, Foster MW, Gordon DR, Licinio J, Manca MC, Marshall PA, Matsuda I, Ngare D, Wang VO, Reddy D, Rotimi CN, Royal CD, Sharp RR, Zeng C, Brooks LD, McEwen JE (2010) Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*, 467: 52-58.
- Alvarez-Bolado G, Zhou X, Voss AK, Thomas T, Gruss P (2000) Winged helix transcription factor Foxb1 is essential for access of mammillothalamic axons to the thalamus. *Development*, 127: 1029-1038.
- Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM (2007) Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A*, 143A: 1431-1441.
- Aziz A, Harrop SP, Bishop NE (2011) Characterization of the deleted in autism 1 protein family: implications for studying cognitive disorders. *PloS One*, 6: e14547.
- Bakrania P, Robinson DO, Bunyan DJ, Salt A, Martin A, Crolla JA, Wyatt A, Fielder A, Ainsworth J, Moore A, Read S, Uddin J, Laws D, Pascuel-Salcedo D, Ayuso C, Allen L, Collin JR, Ragge NK (2007) SOX2 anophthalmia syndrome: 12 new cases demonstrating broader phenotype and high frequency of large gene deletions. *Brit J Ophthalmol*, 91: 1471-1476.
- Barabasi AL, Gulbahce N, Loscalzo J (2011) Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev Genet*, 12: 56-68.
- Bartesaghi R, Guidi S, Ciani E (2011) Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome? *Rev Neuroscience*, 22: 419-455.

- Bartsch O, Wagner A, Hinkel GK, Krebs P, Stumm M, Schmalenberger B, Böhm S, Balci S, Majewski F (1999) FISH studies in 45 patients with Rubinstein-Taybi syndrome: deletions associated with polysplenia, hypoplastic left heart and death in infancy. *Eur J Hum Genet*, 7: 748-756.
- Becker J, Wendland JR, Haenisch B, Nöthen MM, Schumacher J (2012) A systematic eQTL study of cis-trans epistasis in 210 HapMap individuals. *Eur J Hum Genet*, 20: 97-101.
- Ben-Shachar S, Lanpher B, German J, Qasaymeh M, Potocki L, Nagamani SCS, Franco L, Malphrus A, Bottenfield G, Spence J, others (2009) Microdeletion 15q13. 3: a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders. *J Med Genet*, 46: 382-388.
- Benayoun BA, Caburet S, Veitia RA (2011) Forkhead transcription factors: key players in health and disease. *Trends Genet*, 27: 224-232.
- Berger W, Meindl A, van de Pol T (1992) Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. *Nat Genet*, 1: 199-203.
- Bertrand V, Hudson C, Caillol D, Popovici C, Lemaire P (2003) Neural tissue in ascidian embryos is induced by FGF9/16/20, acting via a combination of maternal GATA and Ets transcription factors. *Cell*, 115: 615-627.
- Boelaert K, Tannahill LA, Bulmer JN, Kachilele S, Chan SY, Kim D, Gittoes NJL, Franklyn JA, Kilby MD, McCabe CJ (2003) A potential role for PTTG/securin in the developing human fetal brain. *FASEB J*, 17: 1631-1639.
- Bos JL, Zwartkruis FJ (1999) Signal transduction. Rhapsody in G proteins. *Nature*, 400: 820-821.
- Breckpot J, Thienpont B, Arens Y, Tranchevent LC, Vermeesch JR, Moreau Y, Gewillig M, Devriendt K (2011) Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects. *Cytogenet Genome Res*, 135: 251-259.
- Brunner HG, Nelen MR, van Zandvoort P, Abeling NG, van Gennip AH, Wolters EC, Kuiper MA, Ropers HH, van Oost BA (1993) X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *Am J Hum Genet*, 52: 1032-1039.
- Brunton H, Goodarzi AA, Noon AT, Shrikhande A, Hansen RS, Jeggo PA, Shibata A (2011) Analysis of human syndromes with disordered chromatin reveals the impact of heterochromatin on the efficacy of ATM-dependent G2/M checkpoint arrest. *Mol Cell Biol*, 31: 4022-4035.
- Burman JL, Wasiak S, Ritter B, de Heuvel E, McPherson PS (2005) Aftiphilin is a component of the clathrin machinery in neurons. *FEBS LETT*, 579: 2177-2184.
- Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM, Carroll AJ, Robin NH, Youngs EL, Gadi IK, Keitges E, Jaswaney VL, Papenhausen PR, Potluri VR, Risheg H, Rush B, Smith JL, Schwartz S, Tepperberg JH, Butler MG (2011) Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet*, 130: 517-528.

- Buysse K, Delle Chiaie B, Van Coster R, Loeys B, De Paepe A, Mortier G, Speleman F, Menten B (2009) Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur J Med Genet*, 52: 398-403.
- Calderwood DA, Ginsberg MH (2003) Talin forges the links between integrins and actin. *Nat Cell Biol*, 5: 694-697.
- Chassaing N, Gilbert-Dussardier B, Nicot F, Fermeaux V, Encha-Razavi F, Fiorenza M, Toutain A, Calvas P (2007) Germinal mosaicism and familial recurrence of a SOX2 mutation with highly variable phenotypic expression extending from AEG syndrome to absence of ocular involvement. *Am J Med Genet A*, 143: 289-291.
- Cheong JK, Gunaratnam L, Zang ZJ, Yang CM, Sun X, Nasr SL, Sim KG, Peh BK, Rashid SBA, Bonventre JV, Salto-Tellez M, Hsu SI (2009) TRIP-Br2 promotes oncogenesis in nude mice and is frequently overexpressed in multiple human tumors. *J Transl Med*, 7: 8.
- Chocholska S, Rossier E, Barbi G, Kehrer-Sawatzki H (2006) Molecular cytogenetic analysis of a familial interstitial deletion Xp22.2-22.3 with a highly variable phenotype in female carriers. *Am J Med Genet A*, 140: 604-610.
- Colella S, Yau C, Taylor JM, Mirza G, Butler H, Clouston P, Bassett AS, Seller A, Holmes CC, Ragoussis J (2007) QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res*, 35: 2013-2025.
- Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, Macdonald JR, Onyiah I, Pang AWC, Robson S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Hurles ME (2010) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*, 464: 704-712.
- Cooper DN, Chen JM, Ball EV, Howells K, Mort M, Phillips AD, Chuzhanova N, Krawczak M, Kehrer-Sawatzki H, Stenson PD (2010) Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Hum Mutat*, 31: 631-655.
- Craig JM, Bickmore WA (1993) Chromosome bands--flavours to savour. *BIOESSAYS*, 15: 349-354.
- Cubells JF, Deoreo EH, Harvey PD, Garlow SJ, Garber K, Adam MP, Martin CL (2011) Pharmacogenetically guided treatment of recurrent rage outbursts in an adult male with 15q13.3 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*, 155A: 805-810.
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM, Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J (1997) Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 72: 468-477.

- Czubryt MP, McAnally J, Fishman GI, Olson EN (2003) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 1711-1716.
- Dahl N, Hu LJ, Chery M, Fardeau M, Gilgenkrantz S, Nivelon-Chevallier a, Sidaner-Noisette I, Mugneret F, Gouyon JB, Gal A (1995) Myotubular myopathy in a girl with a deletion at Xq27-q28 and unbalanced X inactivation assigns the MTM1 gene to a 600-kb region. *Am J Hum Genet*, 56: 1108-1115.
- de Ravel TJ, Balikova I, Thiry P, Vermeesch JR, Frijns J-P (2009) Another patient with a de novo deletion further delineates the 2q33.1 microdeletion syndrome. *Eur J Med Genet*, 52: 120-122.
- de Vries BB, Wiegers AM, Smits AP, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Fryns JP, Curfs LM, Halley DJ, Oostra Ba, van den Ouweland AM, Niermeijer MF (1996) Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am J Hum Genet*, 58: 1025-1032.
- de Wit J, Sylwestrak E, O'Sullivan ML, Otto S, Tiglio K, Savas JN, Yates JR, Comoletti D, Taylor P, Ghosh A (2009) LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. *Neuron*, 64: 799-806.
- Dibbens LM, Mullen S, Helbig I, Mefford HC, Bayly MA, Bellows S, Leu C, Trucks H, Obermeier T, Wittig M, Franke A, Caglayan H, Yapici Z, Sander T, Eichler EE, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF (2009) Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in idiopathic generalized epilepsy: precedent for disorders with complex inheritance. *Hum Mol Genet*, 18: 3626-3631.
- Doherty JL, O'Donovan MC, Owen MJ (2012) Recent genomic advances in schizophrenia. *Clin Genet*, 81: 103-109.
- Dombroski BA, Nayak RR, Ewens KG, Ankener W, Cheung VG, Spielman RS (2010) Gene expression and genetic variation in response to endoplasmic reticulum stress in human cells. *Am J Hum Genet*, 86: 719-729.
- Dwyer J, Li H, Xu D, Liu JP (2007) Transcriptional regulation of telomerase activity: roles of the the Ets transcription factor family. *Ann NY Acad Sci*, 1114: 36-47.
- Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, Zettel M, Coleman P (1992) Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 3010-3014.
- Elsa SH, Girirajan S (2008) Smith-Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet*, 16: 412-421.
- Engels B, Jannot G, Remenyi J, Simard MJ, Hutvagner G (2012) Polypyrimidine Tract Binding Protein (hnRNP I) Is Possibly a Conserved Modulator of miRNA-Mediated Gene Regulation. *PloS One*, 7: e33144.
- Engels H, Wohlleber E, Zink A, Hoyer J, Ludwig KU, Brockschmidt FF, Wieczorek D, Moog U, Hellmann-Mersch B, Weber RG, Willatt L, Kreiss-Nachtsheim M, Firth HV, Rauch A (2009) A novel microdeletion syndrome involving 5q14.3-q15: clinical and molecular cytogenetic characterization of three patients. *Eur J Hum Genet* 17: 1592-1599.

- Faletta F, D'Adamo AP, Santa Rocca M, Carrozzi M, Perrone MD, Pecile V, Gasparini P (2012) Does the 1.5 Mb microduplication in chromosome band Xp22.31 have a pathogenetic role? New contribution and a review of the literature. *Am J Med Genet A*, 158A: 461-464.
- Fantes J, Ragge NK, Lynch SA, McGill NI, Collin JR, Howard-Peebles PN, Hayward C, Vivian AJ, Williamson K, van Heyningen V, FitzPatrick DR (2003) Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet*, 33: 461-463.
- Feng Y, Zhang F, Lokey LK, Chastain JL, Lakkis L, Eberhart D, Warren ST (1995) Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science*, 268: 731-734.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*, 7: 85-97.
- Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW (2006) Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No: R57-66.
- Fiedler Ta, Karpova TS, Fleig U, Young ME, Cooper Ja, Hegemann JH (2002) The vesicular transport protein Cgplp/Vps54p/Tcs3p/Luv1p is required for the integrity of the actin cytoskeleton. *Mol Genet Genomics*, 268: 190-205.
- Flipsen-ten Berg K, van Hasselt PM, Eleveld MJ, van der Wijst SE, Hol Fa, de Vroede MaM, Beemer Fa, Hochstenbach PFR, Poot M (2007) Unmasking of a hemizygous WFS1 gene mutation by a chromosome 4p deletion of 8.3 Mb in a patient with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Eur J Hum Genet*, 15: 1132-1138.
- Froyen G, Esch AHV, Bauters M, Hollanders K, Frints SGMSGM, Vermeesch JR, Devriendt K, Fryns J-pJP, Marynen P, Van Esch H (2007) Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. *Hum Mutat*, 28: 1034-1042.
- Garber K, Smith KT, Reines D, Warren ST (2006) Transcription, translation and fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev*, 16: 270-275.
- García-Alegría E, Ibáñez B, Mínguez M, Poch M, Valiente A, Sanz-Parra A, Martínez-Bouzas C, Beristain E, Tejada M-I (2007) Analysis of FMR1 gene expression in female premutation carriers using robust segmented linear regression models. *RNA*, 13: 756-762.
- Gibson JH, Slobedman B, K NH, Williamson SL, Minchenko D, El-Osta A, Stern JL, Christodoulou J (2010) Downstream targets of methyl CpG binding protein 2 and their abnormal expression in the frontal cortex of the human Rett syndrome brain. *BMC Neurosci*, 11: 53.
- Gijsbers ACJ, Schoumans J, Ruivenkamp CAL (2011) Interpretation of Array Comparative Genome Hybridization Data: A Major Challenge. *Cytogenet Genome Res*, 135: 222-227.

- Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C, Mefford HC, Kidd JM, Browning SR, Browning BL, Dickel DE, Levy DL, Ballif C, Platky K, Farber DM, Gowans GC, Wetherbee JJ, Weaver DD, Mark PR, Dickerson J, Garg BP, Sara A, Smith R, Banks VC, Smith W, McDonald MT, Hoo JJ, French BN, Hudson C, Johnson JP, Ozmore JR, Moeschler JB, Escobar LF, El-khechen D, Gorski JL, Kussmann J, Salbert B, Lacassie Y, Biser A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Matthew A, Shaikh TH, Haan E, Friend KL, Fichera M, Romano C, Géczy J, Lynn E, Sebat J, King M-c, Shaffer LG, Eichler EE, Ballif BC, Asamoah A, Ellingwood Sa, Surti U, Deardorff Ma, DeLisi LE (2010) A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet*, 42: 203-209.
- Graser S, Stierhof Y-D, Nigg EA (2007) Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *J Cell Sci*, 120: 4321-4331.
- Greenfield A, Carrel L, Pennisi D (1998) The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans. *Hum Mol Genet*, 7: 737-742.
- Gronskov K, Poole RL, Hahnemann JM, Thomson J, Tumer Z, Brondum-Nielsen K, Murphy R, Ravn K, Melchior L, Dedic A, Dolmer B, Temple IK, Boonen SE, Mackay DJ (2011) Deletions and rearrangements of the H19/IGF2 enhancer region in patients with Silver-Russell syndrome and growth retardation. *J Med Genet*, 48: 308-311.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*, 1: 4.
- Gunderson KL, Kruglyak S, Graige MS, Garcia F, Kermani BG, Zhao C, Che D, Dickinson T, Wickham E, Bierle J, others (2004) Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome Res*, 14: 870.
- Gunderson KL, Steemers FJ, Ren H, Ng P, Zhou L, Tsan C, Chang W, Bullis D, Musmacker J, King C, Lebruska LL, Barker D, Oliphant A, Kuhn KM, Shen R (2006) Whole-genome genotyping. *Method Enzymol*, 410: 359-376.
- Haines BP, Rigby PWJ (2007) Developmentally regulated expression of the LRRTM gene family during mid-gestation mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns*, 7: 23-29.
- Hamdan FF, Gauthier J, Dobrzeniecka S, Lortie A, Mottron L, Vanasse M, D'Anjou G, Lacaille JC, Rouleau GA, Michaud JL (2011) Intellectual disability without epilepsy associated with STXBP1 disruption. *Eur J Hum Genet*, 19: 607-609.
- Hamdan FF, Piton A, Gauthier J, Lortie A, Dubeau F, Dobrzeniecka S, Spiegelman D, Noreau A, Pellerin S, Cote M, Henrion E, Fombonne E, Mottron L, Marineau C, Drapeau P, Lafreniere RG, Lacaille JC, Rouleau GA, Michaud JL (2009) De novo STXBP1 mutations in mental retardation and nonsyndromic epilepsy. *Ann Neurol*, 65: 748-753.
- Hammond LS, Macias MM, Tarleton JC, Shashidhar Pai G (1997) Fragile X syndrome and deletions in FMR1: new case and review of the literature. *Am J Med Genet* 72: 430-434.

- Hannes FD, Sharp aJ, Mefford HC, de Ravel T, Ruivenkamp Ca, Breuning MH, Fryns J-P, Devriendt K, Van Buggenhout G, Vogels a, Stewart H, Hennekam RC, Cooper GM, Regan R, Knight SJL, Eichler EE, Vermeesch JR (2009) Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet*, 46: 223-232.
- Hashimoto S, Boissel S, Zarhrate M, Rio M, Munnich A, Egly JM, Colleaux L (2011) MED23 mutation links intellectual disability to dysregulation of immediate early gene expression. *Science*, 333: 1161-1163.
- Håvik B, Le Hellard S, Rietschel M, Lybæk H, Djurovic S, Mattheisen M, Mühleisen TW, Degenhardt F, Priebe L, Maier W, Breuer R, Schulze TG, Agartz I, Melle I, Hansen T, Bramham CR, Nöthen MM, Stevens B, Werge T, Andreassen Oa, Cichon S, Steen VM (2011) The Complement Control-Related Genes CSMD1 and CSMD2 Associate to Schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 70: 35-42.
- Hayden EP, Nurnberger JI, Jr. (2006) Molecular genetics of bipolar disorder. *Genes Brain Behav*, 5: 85-95.
- Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, Guipponi M, Fichera M, Franke A, Muhle H, de Kovel C, Baker C, von Spiczak S, Kron KL, Steinich I, Kleefuss-Lie AA, Leu C, Gaus V, Schmitz B, Klein KM, Reif PS, Rosenow F, Weber Y, Lerche H, Zimprich F, Urak L, Fuchs K, Feucht M, Genton P, Thomas P, Visscher F, de Haan GJ, Moller RS, Hjalgrim H, Luciano D, Wittig M, Nothnagel M, Elger CE, Nurnberg P, Romano C, Malafosse A, Koeleman BP, Lindhout D, Stephani U, Schreiber S, Eichler EE, Sander T (2009) 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet*, 41: 160-162.
- Henrichsen CN, Chaignat E, Reymond A (2009) Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet*, 18: R1-8.
- Hildebrandt F, Heeringa SF, Ruschendorf F, Attanasio M, Nurnberg G, Becker C, Seelow D, Huebner N, Chernin G, Vlangos CN, Zhou W, O'Toole JF, Hoskins BE, Wolf MT, Hinkes BG, Chaib H, Ashraf S, Schoeb DS, Ovunc B, Allen SJ, Vega-Warner V, Wise E, Harville HM, Lyons RH, Washburn J, Macdonald J, Nurnberg P, Otto EA (2009) A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. *PLoS Genet*, 5: e1000353.
- Hsueh Y-P (2006) The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function. *Curr Med Chem*, 13: 1915-1927.
- Hsueh Y-P (2009) Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase and mental retardation. *Ann Neurol*, 66: 438-443.
- Huang N, Lee I, Marcotte EM, Hurles ME (2010) Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome. *PLoS Genet*, 6: e1001154.
- Im HI, Kenny PJ (2012) MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci*.

- Jaaskelainen P, Helio T, Aalto-Setälä K, Kaartinen M, Ilveskoski E, Hamalainen L, Melin J, Nieminen MS, Laakso M, Kuusisto J, Kervinen H, Mustonen J, Juvonen J, Niemi M, Uusimaa P, Huttunen M, Kotila M, Pietilä M (2012) Two founder mutations in the alpha-tropomyosin and the cardiac myosin-binding protein C genes are common causes of hypertrophic cardiomyopathy in the Finnish population. *Ann Med*.
- Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (2001) Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell*, 105: 445-457.
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*, 34: 27-29.
- Kakar SS (1999) Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG). *Gene*, 240: 317-324.
- Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mülle JG, Warren ST, Richard G, Compton JG, Fuller AE, Gliem TJ, Huang S, Collinson MN, Beal SJ, Ackley T, Pickering DL, Golden DM, Aston E, Whitby H, Shetty S, Rossi MR, Rudd MK, South ST, Brothman AR, Sanger WG, Iyer RK, Crolla JA, Thorland EC, Aradhya S, Ledbetter DH, Martin CL (2011) An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med*, 13: 777-784.
- Kardassis D, Papakosta P, Pardali K, Moustakas A (1999) c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1. *J Biol Chem*, 274: 29572-29581.
- Kariminejad R, Lind-Thomsen A, Tümer Z, Erdogan F, Ropers HH, Tommerup N, Ullmann R, Møller RS (2011) High frequency of rare copy number variants affecting functionally related genes in patients with structural brain malformations. *Hum Mutat*, 32: 1427-1435.
- Katabami K, Kato T, Sano R, Ogura M, Mizuno H, Itoh S, Tsuji T (2006) Characterization of the promoter for the alpha3 integrin gene in various tumor cell lines: roles of the Ets- and Sp-family of transcription factors. *J Cell Biochem*, 97: 530-543.
- Kaufman L, Ayub M, Vincent JB (2010) The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord*, 2: 182-209.
- Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST (2011) American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*, 13: 680-685.

- Kelberman D, de Castro SC, Huang S, Crolla JA, Palmer R, Gregory JW, Taylor D, Cavallo L, Faienza MF, Fischetto R, Achermann JC, Martinez-Barbera JP, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Gerrelli D, Dattani MT (2008) SOX2 plays a critical role in the pituitary, forebrain, and eye during human embryonic development. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 1865-1873.
- Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, Chong WK, Kirk JM, Achermann JC, Ross R, Carmignac D, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT (2006) Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest*, 116: 2442-2455.
- Kim I, Moon SO, Koh KN, Kim H, Uhm CS, Kwak HJ, Kim NG, Koh GY (1999) Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein. angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem*, 274: 26523-26528.
- Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet*, 15: 70-73.
- Kishore S, Khanna A, Zhang Z, Hui J, Balwierz PJ, Stefan M, Beach C, Nicholls RD, Zavolan M, Stamm S (2010) The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. *Hum Mol Genet*, 19: 1153-1164.
- Kleffmann W, Zink AM, Lee JA, Senderek J, Mangold E, Moog U, Rappold GA, Wohlleber E, Engels H (2012) 5q31 Microdeletions: Definition of a Critical Region and Analysis of LRRTM2, a Candidate Gene for Intellectual Disability. *Mol Syndromol*, 3: 68-75.
- Kleinjan Da, van Heyningen V (2005) Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet*, 76: 8-32.
- Klopocki E, Graul-Neumann LM, Grieben U, Tönnies H, Ropers H-H, Horn D, Mundlos S, Ullmann R (2008) A further case of the recurrent 15q24 microdeletion syndrome, detected by array CGH. *Eur J Pediatr*, 167: 903-908.
- Klopocki E, Mundlos S (2011) Copy-Number Variations, Noncoding Sequences, and Human Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*.
- Klopocki E, Ott C-E, Benatar N, Ullmann R, Mundlos S, Lehmann K (2008) A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome. *J Med Genet*, 45: 370-375.
- Klopocki E, Schulze H, Strauss G, Ott C-E, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM, Habenicht R, König R, Seemanova E, Megarbane A, Ropers H-H, Ullmann R, Horn D, Mundlos S (2007) Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet*, 80: 232-240.
- Komitova M, Eriksson PS (2004) Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci Lett*, 369: 24-27.

- Koolen Da, Herbergs J, Veltman Ja, Pfundt R, van Bokhoven H, Stroink H, Sistermans Ea, Brunner HG, Geurts van Kessel A, de Vries BBa (2006) Holoprosencephaly and preaxial polydactyly associated with a 1.24 Mb duplication encompassing FBXW11 at 5q35.1. *J Hum Genet*, 51: 721-726.
- Koolen Da, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG, van Kessel AG, Veltman Ja, de Vries BBa (2009) Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat*, 30: 283-292.
- Korbel JO, Urban AE, Affourtit JP, Godwin B, Grubert F, Simons JF, Kim PM, Palejev D, Carriero NJ, Du L, Taillon BE, Chen Z, Tanzer A, Saunders AC, Chi J, Yang F, Carter NP, Hurles ME, Weissman SM, Harkins TT, Gerstein MB, Egholm M, Snyder M (2007) Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science*, 318: 420-426.
- Kou Y, Betancur C, Xu H, Buxbaum JD, Ma'ayan A (2012) Network- and attribute-based classifiers can prioritize genes and pathways for autism spectrum disorders and intellectual disability. *Am J Med Genet C*, 160C: 130-142.
- Krabichler B, Karall D, Rottensteiner A, Hirst-Stadlmann A, Zschocke J, Fauth C. (2012). De novo microdeletion 2p14-p15 in a boy with developmental delay, facial dysmorphisms and sensorineural hearing loss with dysplasia of the inner ear. European Society of Human Genetics (ESHG) conference. Nürnberg.
- Kudo H, Emi M, Ishigaki Y, Tsunoda U, Hinokio Y, Ishii M, Sato H, Yamada T, Katagiri H, Oka Y (2011) Frequent loss of genome gap region in 4p16.3 subtelomere in early-onset type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res*, 2011: 498460.
- Kuhn K, Baker SC, Chudin E, Lieu MH, Oeser S, Bennett H, Rigault P, Barker D, McDaniel TK, Chee MS (2004) A novel, high-performance random array platform for quantitative gene expression profiling. *Genome Res*, 14: 2347-2356.
- Kumar A, Girimaji SC, Duvvari MR, Blanton SH (2009) Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *Am J Hum Genet*, 84: 286-290.
- Lalani SR, Sahoo T, Sanders ME, Peters SU, Bejjani Ba (2006) Coarctation of the aorta and mild to moderate developmental delay in a child with a de novo deletion of chromosome 15(q21.1q22.2). *BMC Med Genet*, 7: 8.
- Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelemy C, Moraine C, Briault S (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet*, 74: 552-557.
- Lawson-Yuen A, Saldivar JS, Sommer S, Picker J (2008) Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet*, 16: 614-618.

- Le Meur N, Holder-Espinasse M, Jaillard S, Goldenberg A, Joriot S, Amati-Bonneau P, Guichet A, Barth M, Charollais A, Journal H, Auvin S, Boucher C, Kerckaert J-P, David V, Manouvrier-Hanu S, Saugier-Weber P, Frébourg T, Dubourg C, Andrieux J, Bonneau D (2010) MEF2C haploinsufficiency caused by either microdeletion of the 5q14.3 region or mutation is responsible for severe mental retardation with stereotypic movements, epilepsy and/or cerebral malformations. *J Med Genet*, 47: 22-29.
- Lee Ja, Carvalho CMB, Lupski JR (2007) A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*, 131: 1235-1247.
- Lee KJ, Lee KM, Jo S, Kang KW, Park CS (2010) Induction of cereblon by NF-E2-related factor 2 in neuroblastoma cells exposed to hypoxia-reoxygenation. *Biochem Biophys Res Commun*, 399: 711-715.
- Lesca G, Sinilnikova O, Theuil G, Blanc J, Edery P, Till M (2005) Xp22.3 microdeletion including VCX-A and VCX-B1 genes in an X-linked ichthyosis family: no difference in deletion size for patients with and without mental retardation. *Clin Genet*, 67: 367-368.
- Lesch KP, Selch S, Renner TJ, Jacob C, Nguyen TT, Hahn T, Romanos M, Walitza S, Shoichet S, Dempfle A, Heine M, Boreatti-Hummer A, Romanos J, Gross-Lesch S, Zerlaut H, Wulsch T, Heinzl S, Fassnacht M, Fallgatter A, Allolio B, Schafer H, Warnke A, Reif A, Ropers HH, Ullmann R (2011) Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: association with neuropeptide Y gene dosage in an extended pedigree. *Mol Psychiatry*, 16: 491-503.
- Li D, Tekin M, Buch M, Fan YS (2012) Co-existence of other copy number variations with 22q11.2 deletion or duplication: a modifier for variable phenotypes of the syndrome? *Mol Cytogenet*, 5: 18.
- Li F, Shen Y, Köhler U, Sharkey FH, Menon D, Coulleaux L, Malan V, Rio M, McMullan DJ, Cox H, Fagan Ka, Gaunt L, Metcalfe K, Heinrich U, Hislop G, Maye U, Sutcliffe M, Wu B-L, Thiel BD, Mulchandani S, Conlin LK, Spinner NB, Murphy KM, Batista DaS (2010) Interstitial microduplication of Xp22.31: Causative of intellectual disability or benign copy number variant? *Eur J Med Genet*, 53: 93-99.
- Li W, Cui Y, Kushner Sa, Brown RaM, Jentsch JD, Frankland PW, Cannon TD, Silva AJ (2005) The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr Biol*, 15: 1961-1967.
- Liang H, Ward WF (2006) PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*, 30: 145-151.
- Liang J-S, Shimojima K, Ohno K, Sugiura C, Une Y, Yamamoto T (2009) A newly recognised microdeletion syndrome of 2p15-16.1 manifesting moderate developmental delay, autistic behaviour, short stature, microcephaly, and dysmorphic features: a new patient with 3.2 Mb deletion. *J Med Genet*, 46: 645-647.

- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443: 787-795.
- Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, Ma Q, Zhu C, Wang R, Qi W, Huang L, Xue P, Li B, Wang X, Jin H, Wang J, Yang F, Liu P, Zhu Y, Sui S, Chen Q (2012) Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 14: 177-185.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lizarraga SB, Margossian SP, Harris MH, Campagna DR, Han A-P, Blevins S, Mudbhary R, Barker JE, Walsh CA, Fleming MD (2010) Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development* 137: 1907-1917.
- Lucas RE, Vlangos CN, Das P, Patel PI, Elsea SH (2001) Genomic organisation of the approximately 1.5 Mb Smith-Magenis syndrome critical interval: transcription map, genomic contig, and candidate gene analysis. *Eur J Hum Genet*, 9: 892-902.
- Lundquist EA (2006) Small GTPases. *WormBook*1-18.
- Lupski JR, Stankiewicz P (2005) Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*, 1: e49.
- Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG, Ledbetter DH, Greenberg F, Patel PI (1992) Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet*, 1: 29-33.
- Maier S, Reiterer V, Ruggiero AM, Rothstein JD, Thomas S, Dahm R, Sitte HH, Farhan H (2009) GTRAP3-18 serves as a negative regulator of Rab1 in protein transport and neuronal differentiation. *J Cell Mol Med*, 13: 114-124.
- Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*, 89: 619-628.
- Martin F, Platt J, Tawn EJ, Burn J (1990) A de novo interstitial deletion of 15(q21.2q22.1) in a moderately retarded adult male. *J Med Genet*, 27: 637-639.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 9: 625-635.
- Masurel-Paulet A, Andrieux J, Callier P, Cuisset JM, Le Caignec C, Holder M, Thauvin-Robinet C, Doray B, Flori E, Alex-Cordier MP, Beri M, Boute O, Delobel B, Dieux A, Vallee L, Jaillard S, Odent S, Isidor B, Beneteau C, Vigneron J, Bilan F, Gilbert-Dussardier B, Dubourg C, Labalme A, Bidon C, Gautier A, Pernes P, Pinoit JM, Huet F, Mugneret F, Aral B, Jonveaux P, Sanlaville D, Faivre L (2010) Delineation of 15q13.3 microdeletions. *Clin Genet*, 78: 149-161.

- Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S (2011) Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disabil*, 32: 419-436.
- McBride SMJ, Choi CH, Wang Y, Liebelt D, Braunstein E, Ferreira D, Sehgal A, Siwicki KK, Dockendorff TC, Nguyen HT, McDonald TV, Jongens Ta (2005) Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a *Drosophila* model of fragile X syndrome. *Neuron*, 45: 753-764.
- Meisler MH, Russ C, Montgomery KT, Greenway M, Ennis S, Hardiman O, Figlewicz Da, Quenneville NR, Conibear E, Brown RH (2008) Evaluation of the Golgi trafficking protein VPS54 (wobbler) as a candidate for ALS. *Amyotroph Lateral Sc*, 9: 141-148.
- Mignot C, Moutard ML, Trouillard O, Gourfinkel-An I, Jacquette A, Arveiler B, Morice-Picard F, Lacombe D, Chiron C, Ville D, Charles P, LeGuern E, Depienne C, Heron D (2011) STXBP1-related encephalopathy presenting as infantile spasms and generalized tremor in three patients. *Epilepsia*, 52: 1820-1827.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla Ja, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH (2010) Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86: 749-764.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 1215.
- Mittal K, Kabra M, Juyal R, Bk T (2011) De novo deletion in MECP2 in a monozygotic twin pair: a case report. *BMC Med Genet*, 12: 113.
- Mizuno E, Nakamura M, Agemura A, Kusumoto A, Ichiba M, Kurano Y, Muroya S, Sano A (2007) Brain-specific transcript variants of 5' and 3' ends of mouse VPS13A and VPS13C. *Biochem Biophys Res Commun*, 353: 902-907.
- Mochel F, Missirian C, Reynaud R, Moncla A (2008) Normal intelligence and social interactions in a male patient despite the deletion of NLGN4X and the VCX genes. *Eur J Med Genet*, 51: 68-73.
- Moog U, Kutsche K, Kortüm F, Chilian B, Bierhals T, Apeshiotis N, Balg S, Chassaing N, Coubes C, Das S, Engels H, Van Esch H, Grasshoff U, Heise M, Isidor B, Jarvis J, Koehler U, Martin T, Oehl-Jaschkowitz B, Ortibus E, Pilz DT, Prabhakar P, Rappold G, Rau I, Rettenberger G, Schlüter G, Scott RH, Shoukier M, Wohlleber E, Zirn B, Dobyns WB, Uyanik G (2011) Phenotypic spectrum associated with CASK loss-of-function mutations. *J Med Genet*, 48: 741-751.
- Morgan JR, Di Paolo G, Werner H, Shchedrina VA, Pypaert M, Pieribone VA, De Camilli P (2004) A role for talin in presynaptic function. *J Cell Biol*, 167: 43-50.

- Morley M, Molony CM, Weber TM, Devlin JL, Ewens KG, Spielman RS, Cheung VG (2004) Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature*, 430: 743-747.
- Morrow EM (2010) Genomic copy number variation in disorders of cognitive development. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49: 1091-1104.
- Morrow EM, Yoo S-Y, Flavell SW, Kim T-K, Lin Y, Hill RS, Mukaddes NM, Balkhy S, Gascon G, Hashmi A, Al-Saad S, Ware J, Joseph RM, Greenblatt R, Gleason D, Ertelt JA, Apse KA, Bodell A, Partlow JN, Barry B, Yao H, Markianos K, Ferland RJ, Greenberg ME, Walsh CA (2008) Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*, 321: 218-223.
- Mosca AL, Callier P, Leheup B, Marle N, Jalloul M, Coffinet L, Feillet F, Valduga M, Jonveaux P, Mugneret F (2007) Fortuitous FISH Diagnosis of an Interstitial to Present a Cri-Du-Chat Syndrome. *Am J Med Genet* 1347: 1342 - 1347.
- Moynagh PN (2009) The Pellino family: IRAK E3 ligases with emerging roles in innate immune signalling. *Trends Immunol*, 30: 33-42.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method Enzymol*, 155: 335-350.
- Nagase T, Ishikawa K, Nakajima D, Ohira M, Seki N, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O (1997) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res*, 4: 141-150.
- Nagtzaam IF, Stegmann AP, Steijlen PM, Herbergs J, Van Lent-Albrechts JA, Van Geel M, Van Steensel MA (2012) Clinically manifest X-linked recessive ichthyosis in a female due to a homozygous interstitial 1.6-Mb deletion of Xp22.31. *Brit J Dermatol*, 166: 905-907.
- Najm J, Horn D, Wimplinger I, Golden Ja, Chizhikov VV, Sudi J, Christian SL, Ullmann R, Kuechler A, Haas Ca, Flubacher A, Charnas LR, Uyanik G, Frank U, Klopocki E, Dobyns WB, Kutsche K (2008) Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum. *Nat Genet*, 40: 1065-1067.
- Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P, Zecha A, Mohseni M, Puttmann L, Vahid LN, Jensen C, Moheb LA, Bienek M, Larti F, Mueller I, Weissmann R, Darvish H, Wrogemann K, Hadavi V, Lipkowitz B, Esmaeeli-Nieh S, Wieczorek D, Kariminejad R, Firouzabadi SG, Cohen M, Fattahi Z, Rost I, Mojahedi F, Hertzberg C, Dehghan A, Rajab A, Banavandi MJ, Hoffer J, Falah M, Musante L, Kalscheuer V, Ullmann R, Kuss AW, Tzschach A, Kahrizi K, Ropers HH (2011) Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*, 478: 57-63.
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalonde M (1989) Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondelation Prader-Willi syndrome. *Nature*, 342: 281-285.
- Niki D, Katsu K, Yokouchi Y (2009) Ontogeny of angiopoietin-like protein 1, 2, 3, 4, 5, and 7 genes during chick embryonic development. *Dev Growth Differ*, 51: 821-832.

- Norris AD, Dyer JO, Lundquist EA (2009) The Arp2/3 complex, UNC-115/abLIM, and UNC-34/Enabled regulate axon guidance and growth cone filopodia formation in *Caenorhabditis elegans*. *Neural Dev*, 4: 38.
- O'Donnell WT, Warren ST (2002) A decade of molecular studies of fragile X syndrome. [Journal]. *Annu Rev Neurosci*, 25: 315-338.
- O'Donovan MC, Owen MJ (1999) Candidate-gene association studies of schizophrenia. *Am J Hum Genet*, 65: 587-592.
- Ongwijitwat S, Wong-Riley MT (2005) Is nuclear respiratory factor 2 a master transcriptional coordinator for all ten nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits in neurons? *Gene*, 360: 65-77.
- Otsuka M, Oguni H, Liang JS, Ikeda H, Imai K, Hirasawa K, Tachikawa E, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T (2010) STXBP1 mutations cause not only Ohtahara syndrome but also West syndrome--result of Japanese cohort study. *Epilepsia*, 51: 2449-2452.
- Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A, Craddock N (2011) Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Brit J Psychiatry*, 198: 173-175.
- Patil SR, Bartley Ja (1984) Interstitial deletion of the short arm of chromosome 17. *Hum Genet*, 67: 237-238.
- Pelak K, Need AC, Fellay J, Shianna KV, Feng S, Urban TJ, Ge D, De Luca A, Martinez-Picado J, Wolinsky SM, Martinson JJ, Jamieson BD, Bream JH, Martin MP, Borrow P, Letvin NL, McMichael AJ, Haynes BF, Telenti A, Carrington M, Goldstein DB, Alter G (2011) Copy Number Variation of KIR Genes Influences HIV-1 Control. *PLoS Biol*, 9: e1001208.
- Perry GH, Ben-dor A, Tsalenko A, Sampas N, Rodriguez-revenga L, Tran CW, Scheffer A, Steinfeld I, Tsang P, Yamada NA, Park HS, Kim J-i, Seo J-s, Yakhini Z, Laderman S, Bruhn L, Lee C (2008) The Fine-Scale and Complex Architecture of Human Copy-Number Variation. *J Hum Genet* 685-695.
- Pevsner J, Hsu SC, Scheller RH (1994) n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 1445-1449.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 20: 207-211.
- Pinto D, Darvishi K, Shi X, Rajan D, Rigler D, Fitzgerald T, Lionel AC, Thiruvahindrapuram B, Macdonald JR, Mills R, Prasad A, Noonan K, Gribble S, Prigmore E, Donahoe PK, Smith RS, Park JH, Hurler ME, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Feuk L (2011) Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nat Biotechnol*, 29: 512-520.

- Polzin A, Shipitsin M, Goi T, Feig LA, Turner TJ (2002) Ral-GTPase influences the regulation of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Mol Cell Biol*, 22: 1714-1722.
- Potocki L, Bi W, Treadwell-Deering D, Carvalho CMB, Eifert A, Friedman EM, Glaze D, Krull K, Lee Ja, Lewis RA, Mendoza-Londono R, Robbins-Furman P, Shaw C, Shi X, Weissenberger G, Withers M, Yatsenko Sa, Zackai EH, Stankiewicz P, Lupski JR (2007) Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am J Hum Genet*, 80: 633-649.
- Potthoff MJ, Olson EN (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*, 134: 4131-4140.
- Prescott NJ, Dominy KM, Kubo M, Lewis CM, Fisher Sa, Redon R, Huang N, Stranger BE, Blaszczyk K, Hudspith B, Parkes G, Hosono N, Yamazaki K, Onnie CM, Forbes A, Dermitzakis ET, Nakamura Y, Mansfield JC, Sanderson J, Hurles ME, Roberts RG, Mathew CG (2010) Independent and population-specific association of risk variants at the IRGM locus with Crohn's disease. *Hum Mol Genet*, 19: 1828-1839.
- Price LS, Hajdo-Milasinovic A, Zhao J, Zwartkruis FJ, Collard JG, Bos JL (2004) Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, 279: 35127-35132.
- Probst FJ, Roeder ER, Enciso VB, Ou Z, Cooper ML, Eng P, Li J, Gu Y, Stratton RF, Chinault AC, Shaw CA, Sutton VR, Cheung SW, Nelson DL (2007) Chromosomal microarray analysis (CMA) detects a large X chromosome deletion including FMR1, FMR2, and IDS in a female patient with mental retardation. *Am J Med Genet A*, 143: 1358-1365.
- Raab S, Beck H, Gaumann A, Yuce A, Gerber HP, Plate K, Hammes HP, Ferrara N, Breier G (2004) Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost*, 91: 595-605.
- Ragge NK, Lorenz B, Schneider A, Bushby K, de Sanctis L, de Sanctis U, Salt A, Collin JR, Vivian AJ, Free SL, Thompson P, Williamson KA, Sisodiya SM, van Heyningen V, Fitzpatrick DR (2005) SOX2 anophthalmia syndrome. *Am J Med Genet A*, 135: 1-7; discussion 8.
- Rajcan-Separovic E, Harvard C, Liu X, McGillivray B, Hall JG, Qiao Y, Hurlburt J, Hildebrand J, Mickelson ECR, Holden JJa, Lewis MES (2007) Clinical and molecular cytogenetic characterisation of a newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15-16.1. *J Med Genet*, 44: 269-276.
- Rangarajan S, Enserink JM, Kuiperij HB, de Rooij J, Price LS, Schwede F, Bos JL (2003) Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol*, 160: 487-493.
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hu U, Thiel C, Ru F (2006) Diagnostic Yield of Various Genetic Approaches in Patients With Unexplained Developmental Delay or Mental Retardation. *Am J Med Genet* 2074: 2063 - 2074.

- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, Albrecht B, Bartholdi D, Beygo J, Di Donata N, Dufke A, Cremer K, Hempel M, Horn D, Hoyer J, Joset P, Röpke A, Moog U, Riess A, Thiel C, Tzschach A, Wiesener A, Wohlleber E, Zweier C, Ekici AB, Zink AM, Rump A, Meisinger C, Grallert H, Sticht H, Schenke A, Engels H, Rappold G, Schröck E, Wieacker P, Riess O, Meitinger T, Reis A, Strom TM (2012) Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *The Lancet*.
- Raymond FL, Tarpey P (2006) The genetics of mental retardation. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No: R110-116.
- Rebhun JF, Chen H, Quilliam LA (2000) Identification and characterization of a new family of guanine nucleotide exchange factors for the ras-related GTPase Ral. *J Biol Chem*, 275: 13406-13410.
- Ren H, Francis W, Boys A, Chueh AC, Wong N, La P, Wong LH, Ryan J, Slater HR, Choo KHA (2005) BAC-based PCR fragment microarray: high-resolution detection of chromosomal deletion and duplication breakpoints. *Hum Mutat*, 25: 476-482.
- Riggs ER, Church DM, Hanson K, Horner VL, Kaminsky EB, Kuhn RM, Wain KE, Williams ES, Aradhya S, Kearney HM, Ledbetter DH, South ST, Thorland EC, Martin CL (2011) Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. *Clin Genet* 1-10.
- Roeleveld N, Zielhuis Ga, Gabreëls F (1997) The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol*, 39: 125-132.
- Romanelli MG, Lorenzi P, Morandi C (2005) Identification and analysis of the human neural polypyrimidine tract binding protein (nPTB) gene promoter region. *Gene*, 356: 11-18.
- Ropers H-H, Hamel BCJ (2005) X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*, 6: 46-57.
- Ropers HH (2010) Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 11: 161-187.
- Rosenfeld JA, Drautz JM, Clericuzio CL, Cushing T, Raskin S, Martin J, Tervo RC, Pitarque JA, Nowak DM, Karolak JA, Lamb AN, Schultz RA, Ballif BC, Bejjani BA, Gajecka M, Shaffer LG (2011) Deletions and duplications of developmental pathway genes in 5q31 contribute to abnormal phenotypes. *Am J Med Genet A*, 155A: 1906-1916.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132: 365-386.
- Rubio JP, Danek A, Stone C, Chalmers R, Wood N, Verellen C, Ferrer X, Malandrini A, Fabrizi GM, Manfredi M, Vance J, Pericak-Vance M, Brown R, Rudolf G, Picard F, Alonso E, Brin M, Nemeth AH, Farrall M, Monaco AP (1997) Chorea-acanthocytosis: genetic linkage to chromosome 9q21. *Am J Hum Genet*, 61: 899-908.

- Rujescu D, Ingason A, Cichon S, Pietiläinen OPH, Barnes MR, Touloupoulou T, Picchioni M, Vassos E, Ettinger U, Bramon E, Murray R, Ruggeri M, Tosato S, Bonetto C, Steinberg S, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Petursson H, Gylfason A, Olason PI, Hardarsson G, Jonsdottir GA, Gustafsson O, Fossdal R, Giegling I, Möller H-j, Hartmann AM, Hoffmann P, Crombie C, Fraser G, Walker N, Lonnqvist J, Suvisaari J, Tuulio-Henriksson A, Djurovic S, Melle I, Andreassen OA, Hansen T, Werge T, Kiemenev LA, Franke B, Veltman J, Buizer-Voskamp JE, Sabatti C, Ophoff RA, Rietschel M, Nöthen MM, Stefansson K, Peltonen L, St Clair D, Stefansson H, Collier DA (2009) Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet*, 18: 988-996.
- Sahoo T, del Gaudio D, German JR, Shinawi M, Peters SU, Person RE, Garnica A, Cheung SW, Beaudet AL (2008) Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet*, 40: 719-721.
- Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Uruno K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A, Okada I, Yoshimura Y, Hirai S, Kumada T, Hayasaka K, Fukuda A, Ogata K, Matsumoto N (2008) De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet*, 40: 782-788.
- Saitsu H, Kato M, Okada I, Orii KE, Higuchi T, Hoshino H, Kubota M, Arai H, Tagawa T, Kimura S, Sudo A, Miyama S, Takami Y, Watanabe T, Nishimura A, Nishiyama K, Miyake N, Wada T, Osaka H, Kondo N, Hayasaka K, Matsumoto N (2010) STXBP1 mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. *Epilepsia*, 51: 2397-2405.
- Saitsu H, Kato M, Shimono M, Senju A, Tanabe S, Kimura T, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N (2012) Association of genomic deletions in the STXBP1 gene with Ohtahara syndrome. *Clin Genet*, 81: 399-402.
- Sanchez-Guardado LO, Ferran JL, Rodriguez-Gallardo L, Puelles L, Hidalgo-Sanchez M (2011) Meis gene expression patterns in the developing chicken inner ear. *J Comp Neurol*, 519: 125-147.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson aR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Schafer AJ, Hawkins JR (1998) DNA variation and the future of human genetics. *Nature Biotechnol*, 16: 33-39.
- Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Mohle-Steinlein U, Tian J, Karin M, Angel P, Wagner EF (1999) Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev*, 13: 607-619.
- Schuback DE, Chen ZY, Craig IW, Breakefield XO, Sims KB (1995) Mutations in the Norrie disease gene. *Hum Mutat*, 5: 285-292.
- Schuettler J, Peng Z, Zimmer J, Sinn P, von Hagens C, Strowitzki T, Vogt PH (2011) Variable expression of the Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) gene in patients with premature ovarian failure syndrome is not dependent on number of (CGG)_n triplets in exon 1. *Hum Reprod*, 26: 1241-1251.

- Schwarzbraun T, Vincent JB, Schumacher A, Geschwind DH, Oliveira J, Windpassinger C, Ofner L, Ledinegg MK, Kroisel PM, Wagner K, Petek E (2004) Cloning, genomic structure, and expression profiles of TULIP1 (GARNL1), a brain-expressed candidate gene for 14q13-linked neurological phenotypes, and its murine homologue. *Genomics*, 84: 577-586.
- Sebat J, Levy DL, McCarthy SE (2009) Rare structural variants in schizophrenia: one disorder, multiple mutations; one mutation, multiple disorders. *Trends Genet*, 25: 528-535.
- Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R, Broomer A, Casuga I, Wang Y, Xiao C, Barbacioru C, Gimelli G, Bernardina BD, Torniero C, Giorda R, Regan R, Murday V, Mansour S, Fichera M, Castiglia L, Failla P, Ventura M, Jiang Z, Cooper GM, Knight SJL, Romano C, Zuffardi O, Chen C, Schwartz CE, Eichler EE (2008) A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet*, 40: 322-328.
- Shibata H, Takano H, Ito M, Shioya H, Hirota M, Matsumoto H, Kakudo Y, Ishioka C, Akiyama T, Kanegae Y, Saito I, Noda T (2007) Alpha-catenin is essential in intestinal adenoma formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18199-18204.
- Shih JC, Thompson RF (1999) Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior. *Am J Hum Genet*, 65: 593-598.
- Shimajima K, Isidor B, Le Caignec C, Kondo A, Sakata S, Ohno K, Yamamoto T (2011) A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. *Am J Med Genet A*, 155A: 732-736.
- Shinawi M, Schaaf CP, Bhatt SS, Xia Z, Patel A, Cheung SW, Lanpher B, Nagl S, Herding HS, Nevinsky-Stickel C, Immken LL, Patel GS, German JR, Beaudet AL, Stankiewicz P (2009) A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet*, 41: 1269-1271.
- Shuib S, McMullan D, Rattenberry E, Barber RM, Rahman F, Zatyka M, Chapman C, Macdonald F, Latif F, Davison V, Maher ER (2009) Microarray based analysis of 3p25-p26 deletions (3p-syndrome). *Am J Med Genet A*, 149A: 2099-2105.
- Simonis M, Kooren J, de Laat W (2007) An evaluation of 3C-based methods to capture DNA interactions. *Nat Methods*, 4: 895-901.
- Skowronek MH, Georgi A, Jamra RA, Schumacher J, Becker T, Schmael C, Paul T, Deschner M, Höfels S, Wulff M, Schwarz M, Klopp N, Illig T, Propping P, Cichon S, Nöthen MM, Schulze TG, Rietschel M (2006) No association between genetic variants at the ASCT1 gene and schizophrenia or bipolar disorder in a German sample. *Psychiat Genet*, 16: 233-234.
- Slager RE, Newton TL, Vlangos CN, Finucane B, Elsea SH (2003) Mutations in RAI1 associated with Smith-Magenis syndrome. *Nat Genet*, 33: 466-468.

- Smith AC, McGavran L, Robinson J, Waldstein G, Macfarlane J, Zonona J, Reiss J, Lahr M, Allen L, Magenis E (1986) Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2) in nine patients. *Am J Med Genet* 24: 393-414.
- Smith SC, Baras AS, Owens CR, Dancik G, Theodorescu D (2012) Transcriptional signatures of Ral GTPase are associated with aggressive clinicopathologic characteristics in human cancer. *Cancer Res.*
- Speer CP, Gahr M. (2005). *Pädiatrie*. Berlin: Springer.
- Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet*, 18: 74-82.
- Stankiewicz P, Lupski JR (2010) Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*, 61: 437-455.
- Stemers FJ, Gunderson KL (2007) Whole genome genotyping technologies on the BeadArray platform. *Biotechnol J*, 2: 41-49.
- Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietilainen OP, Mors O, Mortensen PB, Sigurdsson E, Gustafsson O, Nyegaard M, Tuulio-Henriksson A, Ingason A, Hansen T, Suvisaari J, Lonnqvist J, Paunio T, Borglum AD, Hartmann A, Fink-Jensen A, Nordentoft M, Hougaard D, Norgaard-Pedersen B, Bottcher Y, Olesen J, Breuer R, Moller HJ, Giegling I, Rasmussen HB, Timm S, Mattheisen M, Bitter I, Rethelyi JM, Magnusdottir BB, Sigmundsson T, Olason P, Masson G, Gulcher JR, Haraldsson M, Fossdal R, Thorgeirsson TE, Thorsteinsdottir U, Ruggeri M, Tosato S, Franke B, Strengman E, Kiemenev LA, Melle I, Djurovic S, Abramova L, Kaleda V, Sanjuan J, de Frutos R, Bramon E, Vassos E, Fraser G, Ettinger U, Picchioni M, Walker N, Touloupoulou T, Need AC, Ge D, Yoon JL, Shianna KV, Freimer NB, Cantor RM, Murray R, Kong A, Golimbet V, Carracedo A, Arango C, Costas J, Jonsson EG, Terenius L, Agartz I, Petursson H, Nothen MM, Rietschel M, Matthews PM, Muglia P, Peltonen L, St Clair D, Goldstein DB, Stefansson K, Collier DA (2009) Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*, 460: 744-747.
- Stehling-Sun S, Dade J, Nutt SL, DeKoter RP, Camargo FD (2009) Regulation of lymphoid versus myeloid fate 'choice' by the transcription factor Mef2c. *Nat Immunol*, 10: 289-296.
- Takebayashi-Suzuki K, Kitayama A, Terasaka-Iioka C, Ueno N, Suzuki A (2011) The forkhead transcription factor FoxB1 regulates the dorsal-ventral and anterior-posterior patterning of the ectoderm during early *Xenopus* embryogenesis. *Dev Biol*, 360: 11-29.
- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ (2000) Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet*, 66: 6-15.

- Tempesta S, Sollima D, Ghezzi S, Politi V, Sinigaglia B, Balducci F, Celso B, Restuccia A, Stefani M, Cernetti R, Marzocchi C, Ciccone R, Zuffardi O, Bovicelli L, Santarini L (2008) Mild mental retardation in a child with a de novo interstitial deletion of 15q21.2q22.1: a comparison with previously described cases. *Eur J Med Genet*, 51: 639-645.
- Teng H, Wilkinson RS (2000) Clathrin-mediated endocytosis near active zones in snake motor boutons. *J Neurosci*, 20: 7986-7993.
- Thienpont B, Béna F, Breckpot J, Philip N, Menten B, Van Esch H, Scalais E, Salamone JM, Fong C-T, Kussmann JL, Grange DK, Gorski JL, Zahir F, Yong SL, Morris MM, Gimelli S, Fryns J-P, Mortier G, Friedman JM, Villard L, Bottani A, Vermeesch JR, Cheung SW, Devriendt K (2010) Duplications of the critical Rubinstein-Taybi deletion region on chromosome 16p13.3 cause a novel recognisable syndrome. *J Med Genet*, 47: 155-161.
- Tirumurugaan KG, Jude JA, Kang BN, Panettieri RA, Walseth TF, Kannan MS (2007) TNF-alpha induced CD38 expression in human airway smooth muscle cells: role of MAP kinases and transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Am J Physiol-Lung C*, 292: L1385-1395.
- Tong Y, Tan Y, Zhou C, Melmed S (2007) Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene*, 26: 5596-5605.
- Toral-Lopez J, Buentello-Volante B, Balderas-Minor MM, Amezcua-Herrera C, Valdes-Miranda JM, Gonzalez-Huerta LM, Gudino M, Cuevas-Covarrubias SA, Zenteno JC (2012) An intellectually disabled patient with the 5q14.3q15 microdeletion syndrome associated with an apparently de novo t(2;5)(q13;q14). *Am J Med Genet A*, 158A: 942-946.
- Tuduce IL, Schuh K, Bundschu K (2010) Spred2 expression during mouse development. *Dev Dynam*, 239: 3072-3085.
- Tuschl K, Gal A, Paschke E, Kircher S, Bodamer OA (2005) Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatr Neurol*, 32: 270-272.
- van Bokhoven H (2011) Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet*, 45: 81-104.
- van Bon BW, Mefford HC, Menten B, Koolen DA, Sharp AJ, Nillesen WM, Innis JW, de Ravel TJ, Mercer CL, Fichera M, Stewart H, Connell LE, Ounap K, Lachlan K, Castle B, Van der Aa N, van Ravenswaaij C, Nobrega MA, Serra-Juhe C, Simonic I, de Leeuw N, Pfundt R, Bongers EM, Baker C, Finnemore P, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, van Kalmthout M, Elia M, Vandeweyer G, Fryns JP, Janssens S, Foulds N, Reitano S, Smith K, Parkel S, Loeys B, Woods CG, Oostra A, Speleman F, Pereira AC, Kurg A, Willatt L, Knight SJ, Vermeesch JR, Romano C, Barber JC, Mortier G, Perez-Jurado LA, Kooy F, Brunner HG, Eichler EE, Kleefstra T, de Vries BB (2009) Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome. *J Med Genet*, 46: 511-523.

- Van Esch H, Hollanders K, Badisco L, Melotte C, Van Hummelen P, Vermeesch JR, Devriendt K, Fryns JP, Marynen P, Froyen G (2005) Deletion of VCX-A due to NAHR plays a major role in the occurrence of mental retardation in patients with X-linked ichthyosis. *Hum Mol Genet*, 14: 1795-1803.
- Vatta M, Tennison MB, Aylsworth AS, Turcott CM, Guerra MP, Eng CM, Yang Y (2012) A Novel STXBP1 Mutation Causes Focal Seizures With Neonatal Onset. *J Child Neurol*, 27: 811-814.
- Veitia RA, Birchler JA (2010) Dominance and gene dosage balance in health and disease: why levels matter! *J Pathol*, 220: 174-185.
- Veltman Ja (2007) Genomic copy number analysis in mental retardation: finding the needles in the haystack. *Eur J Hum Genet*, 15: 1-2.
- Vermeesch JR, Balikova I, Schrandt-Stumpel C, Fryns J-P, Devriendt K (2011) The causality of de novo copy number variants is overestimated. *Eur J Hum Genet* 19: 1112-1113.
- Veyrieras JB, Kudaravalli S, Kim SY, Dermitzakis ET, Gilad Y, Stephens M, Pritchard JK (2008) High-resolution mapping of expression-QTLs yields insight into human gene regulation. *PLoS Genet*, 4: e1000214.
- Wakioka T, Sasaki a, Kato R, Shouda T, Matsumoto a, Miyoshi K, Tsuneoka M, Komiya S, Baron R, Yoshimura a (2001) Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature*, 412: 647-651.
- Waszak SM, Hasin Y, Zichner T, Olender T, Keydar I, Khen M, Stutz AM, Schlattl A, Lancet D, Korbel JO (2010) Systematic inference of copy-number genotypes from personal genome sequencing data reveals extensive olfactory receptor gene content diversity. *PLoS Comput Biol*, 6: e1000988.
- Wei X, Sun W, Fan R, Hahn J, Joetham A, Li G, Webb S, Garrington T, Dakhama A, Lucas J, Johnson GL, Gelfand EW (2003) MEF2C regulates c-Jun but not TNF-alpha gene expression in stimulated mast cells. *Eur J Immunol*, 33: 2903-2909.
- Weis S, Llenos IC, Dulay JR, Verma N, Sabunciyan S, Yolken RH (2007) Changes in region- and cell type-specific expression patterns of neutral amino acid transporter 1 (ASCT-1) in the anterior cingulate cortex and hippocampus in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *J Neural Transm*, 114: 261-271.
- Weterman MA, van Ruissen F, de Wissel M, Bordewijk L, Samijn JP, van der Pol WL, Meggouh F, Baas F (2010) Copy number variation upstream of PMP22 in Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet*, 18: 421-428.
- Whibley A, Urquhart J, Dore J, Willatt L, Parkin G, Gaunt L, Black G, Donnai D, Raymond FL (2010) Deletion of MAOA and MAOB in a male patient causes severe developmental delay, intermittent hypotonia and stereotypical hand movements. *Eur J Hum Genet*, 18: 1095-1099.
- Wierda KD, Toonen RF, de Wit H, Brussaard AB, Verhage M (2007) Interdependence of PKC-dependent and PKC-independent pathways for presynaptic plasticity. *Neuron*, 54: 275-290.

- Wilcoxon F (1945) Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bull*, 1: 80-83.
- Williams SR, Girirajan S, Tegay D, Nowak N, Hatchwell E, Elsea SH (2010) Array comparative genomic hybridisation of 52 subjects with a Smith-Magenis-like phenotype: identification of dosage sensitive loci also associated with schizophrenia, autism, and developmental delay. *J Med Genet*, 47: 223-229.
- Wohlleber E, Kirchhoff M, Zink AM, Kreiss-Nachtsheim M, Kuchler A, Jepsen B, Kjaergaard S, Engels H (2011) Clinical and molecular characterization of two patients with overlapping de novo microdeletions in 2p14-p15 and mild mental retardation. *Eur J Med Genet*, 54: 67-72.
- Wolff DJ, Gustashaw KM, Zurcher V, Ko L, White W, Weiss L, Van Dyke DL, Schwartz S, Willard HF (1997) Deletions in Xq26.3-q27.3 including FMR1 result in a severe phenotype in a male and variable phenotypes in females depending upon the X inactivation pattern. *Hum Genet*, 100: 256-261.
- Xu J, Andreassi M (2011) Reversible histone methylation regulates brain gene expression and behavior. *Horm Behav*, 59: 383-392.
- Xu K, Bezakova I, Bunimovich L, Yi SV (2011) Path lengths in protein-protein interaction networks and biological complexity. *Proteomics*, 11: 1857-1867.
- Yip MY, Selikowitz M, Don N, Kovacic A, Purvis-Smith S, Lam-Po-Tang PR (1987) Deletion 15q21.1-q22.1 resulting from a paternal insertion into chromosome 5. *J Med Genet*, 24: 709-712.
- Zhang X, Nijders A, Seagraves R, Zhang X, Niebuhr A, Albertson D, Yang H, Gray J, Niebuhr E, Bolund L, Pinkel D (2005) High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet*, 76: 312-326.
- Zhou D, Ge H, Sun J, Gao Y, Teng M, Niu L (2008) Crystal structure of the C-terminal conserved domain of human GRP, a galectin-related protein, reveals a function mode different from those of galectins. *Proteins*, 71: 1582-1588.
- Zweier C, de Jong EK, Zweier M, Orrico A, Ousager LB, Collins AL, Bijlsma EK, Oortveld MAW, Ekici AB, Reis A, Schenck A, Rauch A (2009) CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in *Drosophila*. *Am J Hum Genet* 85: 655-666.
- Zweier M, Gregor A, Zweier C, Engels H, Sticht H, Wohlleber E, Bijlsma EK, Holder SE, Zenker M, Rossier E, Grasshoff U, Johnson DS, Robertson L, Firth HV, Ekici AB, Reis A, Rauch A (2010) Mutations in MEF2C from the 5q14.3q15 microdeletion syndrome region are a frequent cause of severe mental retardation and diminish MECP2 and CDKL5 expression. *Hum Mutat*, 31: 722-733.
- Zweier M, Rauch A (2011) The MEF2C-Related and 5q14.3q15 Microdeletion Syndrome. *Mol Syndromol*, 2: 164-170.

9. Eigene Publikationen

- Engels H, Wohlleber E, **Zink A**, Hoyer J, Ludwig KU, Brockschmidt FF, Wieczorek D, Moog U, Hellmann-Mersch B, Weber RG, Willatt L, Kreiss-Nachtsheim M, Firth HV, Rauch A. *A novel microdeletion syndrome involving 5q14.3-q15: clinical and molecular cytogenetic characterization of three patients*. Eur J Hum Genet. 2009 Dec;17(12):1592-9.
- Engels H, Schüler HM, **Zink AM**, Wohlleber E, Brockschmidt A, Hoischen A, Drechsler M, Lee JA, Ludwig KU, Kubisch C, Schwanitz G, Weber RG, Leube B, Hennekamm RC, Rudnik-Schöneborn S, Kreiß-Nachtsheim M, Reutter H. *A phenotype map for 14q32.3 terminal deletions*. Am J Med Genet A. 2012 Apr;158A(4):695-706
- Hoyer J, Ekici AB, Ende S, Popp B, Zweier C, Wiesener A, Wohlleber E, Dufke A, Rossier E, Petsch C, Zweier M, Göhring I, **Zink AM**, Rappold G, Schröck E, Wieczorek D, Riess O, Engels H, Rauch A, Reis A. *Haploinsufficiency of ARID1B, a member of the SWI/SNF-a chromatin remodeling complex, is a frequent cause of intellectual disability*. Am J Hum Genet. 2012 Mar 9; 90(3):565-72
- Kleffmann W*, **Zink AM***, Lee JA, Senderek J, Mangold E, Moog U, Rappold GA, Wohlleber E, Engels H (2012) *5q31 Microdeletions: Definition of a Critical Region and Analysis of LRRTM2, a Candidate Gene for Intellectual Disability*. Mol Syndromol, 3: 68-75.
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, Albrecht B, Bartholdi D, Beygo J, Di Donata N, Dufke A, Cremer K, Hempel M, Horn D, Hoyer J, Joset P, Röpke A, Moog U, Riess A, Thiel C, Tzschach A, Wiesener A, Wohlleber E, Zweier C, Ekici AB, **Zink AM**, Rump A, Meisinger C, Grallert H, Sticht H, Schenke A, Engels H, Rappold G, Schröck E, Wieacker P, Riess O, Meitinger T, Reis A, Strom TM (2012) *Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study* The Lancet, Nov 10;380(9854):1674-82.
- Schramm C, Draaken M, Bartels E, Boemers TM, Schmiedeke E, Grasshoff-Derr S, Märzheuser S, Hosie S, Holland-Cunz S, Baudisch F, Priebe L, Hoffmann P, **Zink AM**, Engels H, Brockschmidt FF, Aretz S, Nöthen MM, Ludwig M, Reutter H. *De novo duplication of 18p11.21-18q12.1 in female with anorectal malformation*. Am J Med Genet A. 2011 Feb; 155A(2):445-9

Wohlleber E*, Kirchhoff M*, **Zink AM***, Kreiss-Nachtsheim M, Küchler A, Jepsen B, Kjaergaard S, Engels H. *Clinical and molecular characterization of two patients with overlapping de novo microdeletions in 2p14-p15 and mild mental retardation*. Eur J Med Genet. 2011 Jan-Feb;54(1):67-72.

Zink AM*, Wohlleber E*, Lee JA*, Rødningen OK, Ravn KR, Heilmann S, Rehnitz J, Katzorke N, Kraus C, Blichfeldt S, Hoffmann P, Reutter H, Brockschmidt FF, Kreiß-Nachtsheim M, Vogt PH, Prescott TE, Tümer Z, Engels H (2012) *Microdeletions including FMR1 in three female patients with intellectual disability- delineation of the phenotype and expression studies*. Neurogenetics (submitted)

* Autoren mit geteilter Erstautorenschaft

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Nöthen, der es mir ermöglicht hat die Arbeit am Institut für Humangenetik der Universität Bonn anzufertigen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Hartmut Engels bedanken, der mich während der gesamten Arbeit exzellent betreut hat, jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte und dessen Anregungen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Eva Wohlleber sowohl für die Rekrutierung der Patienten als auch für die vielen Ratschläge und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein weiterer Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik und der Life & Brain GmbH. Ich wurde von allen sehr freundlich aufgenommen und während der Arbeit unterstützt.

Bei Frau Wiebke Kleffmann, Frau Julia Ehret, Frau Nicola Benthack und Frau Kerstin v. Kolontaj möchte ich mich für die Unterstützung im Labor bedanken.

Meiner Familie möchte ich für die Ermöglichung des Studiums und die große Unterstützung während der Arbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Denise Braun, die mich während der ganzen Arbeit moralisch unterstützt und immer zu mir gehalten hat, obwohl sie des Öfteren auf mich verzichten musste.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Tochter Marlene bedanken. Sie hat mir in den letzten drei Monaten nochmal den nötigen Anschub gegeben die Arbeit fertig zu stellen.