

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

**MOLEKULARZYTOGENETISCHE ANALYSEN ZUR
BEDEUTUNG DES INVERSIONSPOLYMORPHISMUS IN
DER CHROMOSOMENREGION 7q11.23
FÜR DIE ENTSTEHUNG DES
WILLIAMS-BEUREN-SYNDROMS**

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

vorgelegt von
JUDITH FROHNAUER
aus München

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Jenderny

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Arnold

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 01.07.2011

gez.: Prof. Dr. Siebert

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Klinische Beschreibung des Williams-Beuren-Syndroms.....	- 1 -
1.1.1 Erstbeschreibung und Namensgebung	- 1 -
1.1.2 Prävalenz.....	- 1 -
1.1.3 Leitsymptome	- 1 -
1.2 Genetische Ursachen des Williams-Beuren-Syndroms.....	- 2 -
1.2.1 Williams-Beuren-Syndrom Deletion	- 2 -
1.2.2 Flankierender Bereich der Chromosomenregion 7q11.23.....	- 3 -
1.2.3 Gene im Bereich der Deletion 7q11.23 und des flankierenden Bereiches	- 3 -
1.3 Diagnostik des Williams-Beuren-Syndroms	- 4 -
1.4 Entstehungsmechanismus der Deletion 7q11.23	- 5 -
1.4.1 Theorie zum Entstehungsmechanismus der Deletion 7q11.23.....	- 5 -
1.4.2 Bisherige Studien zum Inversionspolymorphismus 7q11.23	- 6 -
1.5 Ziel und Fragestellung dieser Arbeit.....	- 7 -
2 Material und Methoden	- 9 -
2.1 Material	- 9 -
2.1.1 Untersuchungsmaterial.....	- 9 -
2.1.2 Voruntersuchung	- 9 -
2.1.3 Patientengruppe	- 9 -
2.1.3.1 Eltern von Kindern mit Williams-Beuren-Syndrom	- 9 -
2.1.3.2 Kinder mit Williams-Beuren-Syndrom	- 10 -
2.1.4 Kontrollgruppen.....	- 10 -
2.1.4.1 Kontrollgruppe 1	- 10 -
2.1.4.2 Kontrollgruppe 2	- 10 -
2.1.4.3 Kontrollgruppe 3	- 10 -
2.1.5 Materialien	- 10 -
2.1.5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	- 11 -
2.1.5.2 Kits	- 11 -
2.1.5.3 Geräte	- 12 -
2.1.5.4 Software und Online-Datenbanken	- 12 -
2.1.5.5 Sonden	- 13 -
2.1.5.6 Puffer und Lösungen	- 14 -
2.2 Methoden.....	- 15 -
2.2.1 Prinzipien der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH)	- 15 -
2.2.2 Präparieren der BAC/PAC-DNA.....	- 16 -

2.2.3	Markieren und Reinigen der DNA-Proben	- 17 -
2.2.4	Präparation der markierten Sonden.....	- 17 -
2.2.5	Materialaufarbeitung und Erstellung der Präparate	- 17 -
2.2.6	Verdau.....	- 18 -
2.2.7	Hybridisierung.....	- 18 -
2.2.8	Waschen und Eindecken der Präparate	- 19 -
2.2.9	Dreifarb-FISH	- 19 -
2.2.10	Dokumentation	- 20 -
2.2.11	Festlegung der Fehlergrenze	- 21 -
2.2.12	Statistischer Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Patientengruppe	- 21 -
3	Ergebnisse.....	- 23 -
3.1	Etablierung des Dreifarb-FISH Assays	- 23 -
3.1.1	Sonden- und Farbwahl	- 23 -
3.1.2	Festlegung der auszuwertenden Signalkombinationen	- 24 -
3.1.3	Statistische Auswertung von Kontrollen und Festlegung von Nachweisgrenzen... -	26 -
3.1.4	Exemplarische Aufnahmen von Dreifarb-FISH markierten Interphasezellkernen . -	27 -
3.2	Patientengruppe	- 28 -
3.2.1	Eltern von Kindern mit Williams-Beuren-Syndrom.....	- 28 -
3.2.2	Kinder mit Williams-Beuren-Syndrom.....	- 29 -
3.3	Kontrollgruppen.....	- 30 -
3.3.1	Kontrollgruppe 1.....	- 30 -
3.3.2	Kontrollgruppe 2.....	- 30 -
3.3.3	Kontrollgruppe 3.....	- 31 -
3.4	Vergleich der Häufigkeit der Inversion zwischen den einzelnen Gruppen	- 31 -
3.5	Geschlechterverteilung der Inversion.....	- 32 -
3.6	Segregationsanalyse	- 32 -
4	Diskussion	- 34 -
4.1	Methodenkritik	- 34 -
4.2	Materialkritik	- 35 -
4.2.1	Kontrollgruppenwahl	- 35 -
4.2.2	Zellqualität	- 36 -
4.3	Diskussion der eigenen Ergebnisse im Vergleich mit anderen Studien	- 36 -
4.3.1	Patientengruppe vs. Kontrollgruppe	- 37 -
4.3.1.1	Eigene Ergebnisse	- 37 -
4.3.1.2	Vergleich mit anderen Studien.....	- 37 -
4.3.2	Geschlechterverteilung der Inversion 7q11.23	- 38 -
4.3.2.1	Eigene Ergebnisse	- 38 -

4.3.2.2	Vergleich mit anderen Studien.....	- 39 -
4.3.3	Segregationsanalyse.....	- 39 -
4.3.3.1	Eigene Ergebnisse.....	- 39 -
4.3.3.2	Andere Studien.....	- 41 -
4.3.3.3	Vergleich.....	- 42 -
4.4	ICSI-Kontrollgruppe: Zusammenhang zwischen Infertilität und Inversion.....	- 42 -
4.5	Alternative Theorien zur Deletionsentstehung.....	- 43 -
4.5.1	Nicht- allelische homologe Rekombination (NAHR).....	- 43 -
4.5.2	NHEJ (Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung).....	- 47 -
4.5.3	FoSTes (Fork Stalling und Template Switching).....	- 47 -
4.6	Duplikationen von 7q11.23.....	- 47 -
4.7	Evolutionäre Veränderungen von 7q11.23.....	- 49 -
4.8	Vergleich mit Ursachen für andere Mikrodeletionssyndrome.....	- 49 -
4.8.1	22q11.2 (Di George-Syndrom, Velo-cardio-faciales-Syndrom).....	- 49 -
4.8.2	Olfactory receptor gene cluster region.....	- 50 -
4.8.3	HNPP und CMT1A in 17p12.....	- 50 -
4.8.4	Smith-Magenis- und Potocki-Lupski-Syndrom in 17p11.2.....	- 50 -
4.8.5	Prader-Willi/Angelman-Syndrom.....	- 51 -
4.8.6	Andere Mikrodeletions-/Duplikationssyndrome.....	- 51 -
4.9	Bezug zur Fragestellung.....	- 51 -
5	Zusammenfassung.....	- 54 -
6	Literaturverzeichnis.....	VII
7	Anhang.....	XII
7.1	Komplette Ergebnislisten.....	XII
7.1.1	Kontrollgruppe 1.....	XII
7.1.2	Kontrollgruppe 2.....	XIII
7.1.3	Kontrollgruppe 3.....	XIII
7.1.4	Eltern von Kindern mit WBS.....	XIV
7.1.5	Kinder mit WBS.....	XV
7.1.6	Vorversuche.....	XV
7.2	Fluoreszenzfilter.....	XVI
7.3	Kontrollgruppe 2: Sterilitätsursachen.....	XVII
7.4	Kontrollgruppe 3: Karyotypen.....	XVIII
8	Danksagung.....	XIX
9	Lebenslauf.....	XXI
10	Veröffentlichung.....	XXII

Abkürzungsverzeichnis

A	Block A (LCRs Sequenz)
Abb.	Abbildung
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Angelman-Syndrom
B	Block B (LCRs Sequenz)
BAC	künstliches Bakterienchromosom (Bacterial artificial chromosome)
bp	Basenpaare
C	Block C (LCRs Sequenz)
c	Zentromer
cen	Zentromer
CMT1A	Charcot-Marie-Tooth Krankheit Typ 1A
CNVs	<u>C</u> opy <u>N</u> umber <u>V</u> ariations
Cot-1-DNA	DNA-Fraktion mit hohem Anteil repetitiver Sequenzen
DABCO	1,4-Diazabicyclooctan
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
dATP	2`-Desoxyadenosin 5`-triphosphat
dCTP	2`-Desoxycytidin 5`-triphosphat
del	Deletion (Verlust genetischen Materials)
der	Translokation nicht balanciert
dGTP	2`-Desoxyguanosin 5`-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	2`-Desoxynucleotid 5`-triphosphat
DSB	Doppelstrangbrüche
dTTP	2`-Desoxythymidin 5`-triphosphat
dup	Duplikation (Verdopplung von Chromosomenmaterial)
dUTP	2`-Desoxyuridin 5`-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintrichloressigsäure
<i>ELN</i>	Elastin-Gen
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FoSTes	Fork Stalling und Template Switching
g	Gramm
h	Stunde
HNPP	Hereditary neuropathy with liable pressure palsies
i	Inversion(Umkehrung von Chromosomenmaterial)
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IIH	idiopathische infantile Hyperkalziämie
ins	Insertion (eingefügtes Chromosomenmaterial)
inv	Inversion (Umkehrung von Chromosomenmaterial)
K	Person der Kontrollgruppe
KAT	Kryptoteratoasthenozoospermie
kb	Kilobasen
LB-Medium	<u>l</u> ysogeny <u>b</u> roth Medium
LCRs	Low-Copy-Repeats
<i>LIMK1</i>	LIM kinase 1

m	männlich
m	medial
M	molar
Mb	Megabasen
med	medial
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
Mio	Million
ml	Milliliter
n	Normal
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NAHR	Nicht-allelische homologe Rekombination
NCF1	neutrophilic cytosolic factor 1 Gen
ng	Nanogramm
NHEJ	Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung, Non-homologous endjoining
nm	Nanometer
NOX	NADPH Oxidase Komplex
Nr.	Nummer
OAT	Oligoasthenozoospermie
OR	olfaktorischer Rezeptor
p	kurzer Chromosomenarm (p = petit)
PAH	Phytohämagglutinin
PBS	phosphate buffered Saline (Salzlösung mit Phosphat gepuffert)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PN	Phosphat-Natrium-Puffer
PNM	Phosphat-Natrium-Milchpulver-Puffer
PS	Pulmonalstenose
PTLS	Potocki-Lupski-Syndrom
PWS	Prader-Willi-Syndrom
q	langer Chromosomenarm
s	Sekunde
SB	Spectrum Blue
SG	Spectrum Green
SMS	Smith-Magenis-Syndrom
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SO	spectrum orange
SSC	standard saline citrat (Standard Salzlösung aus Natriumchlorid und Natriumcitrat)
SSN	Site-Specific-Nucleotide-Assay
SVAS	supravalvuläre Aortenstenose
t	Telomer
tel	Telomer
TR	Texas Red
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vs	versus
w	weiblich

WBS Williams-Beuren-Syndrom
WBS-E Eltern von Kindern mit Williams-Beuren-Syndrom
z.B. zum Beispiel

Sonderzeichen:

α Signifikanzbereich
 δ Standardabweichung
 μ Mittelwert
 $^{\circ}\text{C}$ Grad Celcius

1 Einleitung

1.1 Klinische Beschreibung des Williams-Beuren-Syndroms

1.1.1 Erstbeschreibung und Namensgebung

Der neuseeländische Internist Williams publizierte 1961 klinische Befunde von vier Kindern, die alle eine supravalvuläre Aortenstenose (SVAS), eine psychomotorische Entwicklungsstörung und ein auffälliges Gesicht zeigten (Williams *et al.*, 1961). Ein Jahr später berichtete auch der deutsche Kardiologe Beuren von drei Kindern mit ähnlicher Symptomkonstellation. Beide Arbeitsgruppen äußerten den Verdacht, dass es sich um ein von der isolierten Form der SVAS abzugrenzendes Syndrom handelt. Ebeling und Mitarbeiter führten 1969 die Bezeichnung „Williams-Beuren-Syndrom“ (WBS) in die deutschsprachige Literatur ein, die sich mittlerweile auch international durchgesetzt hat (Ebeling *et al.*, 1969).

Korrekterweise muss erwähnt werden, dass bereits in den 50er Jahren eine schwere Form der „idiopathischen infantilen Hyperkalzämie“ von zwei Arbeitsgruppen (Fanconi *et al.*, 1952; Lightwood und Stapelton, 1953) beschrieben wurde, deren Leitsymptome denen des WBS ähneln. Möglich ist, dass es sich hierbei um die eigentliche Erstbeschreibung des Syndroms handelt (Black und Bonham, 1963).

1.1.2 Prävalenz

Betroffen sind zwischen 1/7500 bis 1/50000 der weltweiten Bevölkerung (Strømme *et al.*, 2002; Greenberg *et al.*, 1990). Die Angaben beruhen auf Schätzungen. Grund für die großen Unterschiede sind zum einen Schwierigkeiten bei der Schätzung und zum anderen eventuelle Dunkelziffern. Auch ist nicht klar, ob die Prävalenz regionsabhängig ist. So stützt sich zum Beispiel die Schätzung von Strømme *et al.* (2002) nur auf norwegische Daten und ist nicht sicher auf andere Populationen übertragbar.

1.1.3 Leitsymptome

Leitsymptome des WBS sind kraniofaziale Dysmorphien, kardiovaskuläre Fehlbildungen und eine mentale Retardierung mit einem charakteristischen Verhalten.

Typische kraniofaziale Dysmorphien sind markante Wangenknochen, eine breite Stirn, periorbitale Fülle, bitemporale Einziehungen, kurze Lidspalten, eingesunkene breite Nasenwurzel, ausladende Nasenflügel mit nach vorne gerichteten Nasenlöchern, eine leichte Mikrozephalie, eine Hypoplasie des Mittelgesichtes, prominente Ohrläppchen, ein langes Philtrum, volle, nach außen gewölbte Lippen und ein weiter, meist offenstehender Mund. Die Milchzähne zeigen eine Zahnschmelzhypoplasie und sind klein. Oft bestehen Lücken zwischen den einzelnen Zähnen (Williams *et al.*, 1961; Beuren *et al.*, 1962; Morris *et al.*, 1988).

Charakteristisch und in der frühen klinischen Diagnostik oft wegweisend sind kardiovaskuläre Fehlbildungen, die bei etwa 90 % der Kinder zu beobachten sind. Am häufigsten ist die supraaortale Aortenstenose (SVAS). Nicht selten sind periphere Pulmonalarterienstenosen, Nierenarterienstenosen, Fehlbildungen der abdominalen Aorta und ein altersunabhängiger Hypertonus zu finden (Wessel *et al.*, 1997; Wessel *et al.*, 1994).

Bei 17,7 % der Kinder mit WBS finden sich Veränderungen des Urogenitaltraktes. Das Spektrum reicht von kleineren Anomalien, wie Blasendivertikeln, bis zu schwerwiegenderen Formen wie renalen Hypo- und Aplasien (Pankau *et al.*, 1996).

Mit dem Syndrom assoziiert sind Bindegewebsanomalien wie z.B. übermäßige Gelenkbeweglichkeit, Hernien, Rektumprolaps und Divertikel (Morris *et al.*, 1988).

Ophthalmologisch fällt oft ein Strabismus auf. Individuen mit WBS haben überzufällig häufig eine blaue Iris mit einem typischen sternförmigen Muster (Winter *et al.*, 1996).

Endokrinologisch sind eine transiente Hyperkalzämie im Kindesalter, eine verminderte Glukosetoleranz und eine frühe Pubertät beschrieben (Meyer-Lindenberg *et al.*, 2006).

Hinzu kommen Probleme im Bereich des Gastrointestinaltraktes, die sich vor allem im Säuglingsalter als Trinkschwäche, Erbrechen, Durchfall und Koliken manifestieren (Morris *et al.*, 1988).

Charakteristisch sind einige Auffälligkeiten in der Entwicklung. Die Kinder zeigen eine unterschiedlich stark ausgeprägte mentale und psychomotorische Retardierung, begleitet von muskulärer Hypotonie und relativem Kleinwuchs (Heller *et al.*, 2003). Auffällig ist, dass die sprachlichen Fertigkeiten im Vergleich zu räumlichem Denken und Motorik überproportional gut ausgeprägt sind (Gosch *et al.*, 1994).

Kinder mit WBS werden häufig als hyperaktiv, ablenkbar, beharrlich, überängstlich, enthemmt, aber gleichzeitig auch einfühlsam, feinfühlig und vor allem überfreundlich beschrieben. Klassisch ist eine übermäßige Lärmempfindlichkeit und ein ausgeprägt gutes Musikempfinden (Meyer-Lindenberg *et al.*, 2006). Mit zunehmendem Alter kristallisiert sich ein erstaunlich gutes Personen- und Ortsgedächtnis heraus.

Nach der Pubertät ändern die Kinder häufig ihr Verhalten, werden adynamisch und oft sogar vorübergehend depressiv (Pober *et al.*, 2007).

1.2 Genetische Ursachen des Williams-Beuren-Syndroms

Das WBS gehört zu den Mikrodeletionssyndromen, bei denen ein kleiner Anteil des Genoms verloren gegangen ist (Osborne *et al.*, 2001).

1.2.1 Williams-Beuren-Syndrom Deletion

Das typische WBS wird in über 80 % der Fälle durch eine 1,55 Mb große Deletion auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q11.23) hervorgerufen, bei 8 % ist eine 1,84 Mb große Deletion

beschrieben. In einigen Fällen (2-3 %) wurde von einer kleineren Deletion, dem atypischen WBS, mit teilweise nicht komplett ausgeprägtem Phänotyp berichtet (Korenberg *et al.*, 2000; Pérez Jurado *et al.*, 2003; Howald *et al.*, 2006; Karmiloff-Smith *et al.*, 2003).

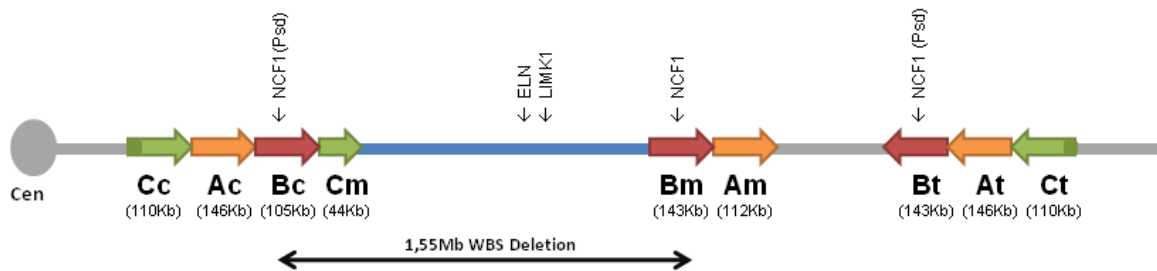


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur der Chromosomenregion 7q11.23. Es gibt drei große segmentale Duplikons oder LCRs: zentromer (c), medial (m) und telomer (t), jedes ist wiederum in drei Blöcke aufgeteilt: A, B und C. Diese sind mit verschiedenen farbigen Pfeilen dargestellt, die Orientierung der Blöcke untereinander wird durch die Richtung der Pfeile dargestellt. Die häufigste, 1,55 Mb große, WBS Deletion ist eingetragen, die Bruchpunkte liegen innerhalb der Blöcke Bc und Bm (Abbildung in Anlehnung an Cuscó *et al.*, 2008). Die klinisch wichtigen Gene *ELN*, *LIMK1* und *NCF1*, die beim WBS deletiert sind, sind eingetragen.

1.2.2 Flankierender Bereich der Chromosomenregion 7q11.23

Die WBS spezifische Region 7q11.23 ist umgeben von einer Region, die durch viele Veränderungen, vor allem Sequenzwiederholungen geprägt ist (Antonell *et al.*, 2005). Dabei handelt es sich um „low copy repeats“ (LCRs) oder auch Duplikons genannt. Dies sind ca. 400 kb lange repetitive DNA Abschnitte, die aus nahezu identischer DNA (> 95 % Übereinstimmung) bestehen (siehe Abbildung 1). Die Duplikons kodieren für aktiv transkribierte Gene, konservierte Pseudogene (nicht transkribiert) mit nahezu identischer Genomstruktur, Pseudogene, die einem transkribierten Gen an einer anderen Stelle des Chromosom 7 entsprechen, und vermutlich Telomer-assoziierte Wiederholungen (Repeats) (Osborne *et al.*, 2001).

Im Bereich 7q11.23 sind drei dieser LCRs-Sequenzen bekannt, die als Blöcke A, B und C bezeichnet werden. Diese Blöcke sind wiederum zu drei Komplexen verbunden, die zentromer (c), telomer (t) und medial (m) des WBS Locus gelegen sind (Ac Bc Cc, At Bt Ct, Am Bm Cm). Die telomeren Blöcke liegen in entgegengesetzter Orientierung zu dem medialen und zentromeren Block. Der Bruchpunkt für die häufige 1,55 Mb große Deletion liegt innerhalb von Bc und Bm, der Bruchpunkt der größeren, 1,84 Mb großen Deletion innerhalb Ac und Am (Bayés *et al.*, 2003).

1.2.3 Gene im Bereich der Deletion 7q11.23 und des flankierenden Bereiches

Trotz mittlerweile vollständiger Sequenzierung der Region 7q11.23, ist die Genotyp-Phänotyp-Zuordnung nach wie vor nur eingeschränkt möglich und die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu den 25-30 gefundenen Genen bleiben teilweise unverstanden (Bayés *et al.*, 2003). Im Folgenden wird nur auf die Funktion der am besten charakterisierten Gene eingegangen.

ELN:

In der Mitte der WBS spezifischen Region liegt das Elastin-Gen (*ELN*). Dessen Entdeckung half bei der Lokalisierung der Mikrodeletion. Das etwa 50 kb große *ELN* kodiert für das Kollagen Tropoelastin, das unter anderem für den Aufbau der Gefäßwände zuständig ist. Eine Punktmutation des Gens kann zu der für das WBS charakteristischen SVAS (supravalvulären Aortenstenose) führen, sowie zu einer allgemeinen Bindegewebsschwäche, die sich unter anderem durch eine hohe Anzahl an Leistenbrüchen bemerkbar macht. Auch eine Verengung anderer Arterien, z.B. periphere Pulmonalstenose, Stenose der Zerebralarterien, der Nierenarterien und Koronararterien lassen sich teilweise auf eine Mutation des *ELN*-Genes zurückführen (Wessel *et al.*, 1997; Francke *et al.*, 1999).

LIMK1:

Direkt telomerwärts von *ELN* liegt das *LIMK1*-Gen. Dieses kodiert für die rezeptorlose Serin-Threoninkinase-1. Zunächst wurde dieses Gen für visuell-räumliche Kognitionseinschränkungen beim WBS verantwortlich gemacht, im Laufe der Zeit wurde allerdings gezeigt, dass eine Mutation im *LIMK1*-Gen dafür alleine nicht ausreicht. Die visuell-räumliche Wahrnehmung ist vielmehr Ergebnis des Zusammenspiels mehrerer Gene, u.a. auch des *LIMK1*-Genes. Vermutlich ist die LIMK1-Kinase an Aktivitäten an neuromuskulären Synapsen und der Zellbewegung beteiligt (Francke *et al.*, 1999)

NCF1:

Das *NCF1*-Gen (neutrophilic cytosolic factor 1) kodiert für die p47^{phox} Untereinheit des NADPH Oxidase (NOX) Komplexes. Die aktive Form liegt auf dem mittleren Block B (Bm) der „Low copy repeats“ nahe an einem möglichen Bruchpunkt und ist nicht immer deletiert. Die anderen zwei Kopien hingegen liegen im zentromerwärtigen und telomerwärtigen Block B (Bc, Bt) und sind Pseudogene (Gorlach *et al.*, 1997; Pérez Jurado *et al.*, 1998).

Bei WBS-Patienten, bei denen sich das *NCF1*-Gen innerhalb des deletierten Bereiches befindet, fanden Del Campo *et al.* (2006) eine signifikant niedrigere Rate an Hypertonus. Heterozygotie scheint also ein protektiver Faktor zu sein (Del Campo *et al.*, 2006).

1.3 Diagnostik des Williams-Beuren-Syndroms

Neben der klinischen Diagnostik, die aber gerade im Säuglingsalter nicht immer einfach ist, wird die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) zur genetischen Diagnosesicherung verwendet. Dabei werden eine Sonde innerhalb des WBS kritischen Bereiches und eine außerhalb als Kontrolle gewählt.

1.4 Entstehungsmechanismus der Deletion 7q11.23

Wie bei vielen Mikrodeletionssyndromen stellt sich auch beim WBS die Frage, ob es prädisponierende Faktoren für die Entstehung der Deletion gibt. Da chromosomale Veränderungen in der Meiose (Keimzellreifung) entstehen können, sind vor allem balancierte strukturelle Chromosomenveränderungen von Bedeutung. Konkret wird in der Literatur eine paracentrische Inversion, also eine Inversion, die das Zentromer nicht umschließt, der WBS spezifischen Region 7q11.23 mit der Entstehung des WBS in Zusammenhang gebracht (Osborne *et al.*, 2001; Bayés *et al.*, 2003; Hobart *et al.*, 2010).

1.4.1 Theorie zum Entstehungsmechanismus der Deletion 7q11.23

Während der Meiose lagern sich die homologen Chromosomenpaare aneinander und es kommt zu einer Rekombination des mütterlichen und väterlichen Genmaterials durch Crossing-over. Diese neu zusammengestellte Erbinformation wird an die nächste Generation weitergegeben und mögliche Fehler machen sich erst in dieser bemerkbar. Es wird angenommen, dass es durch chromosomale Veränderungen, wie zum Beispiel Inversionen, während der Meiose zu ungleichem Crossing-over kommen kann (Osborne *et al.*, 2001).

Dies wird dadurch erklärt, dass auf den beiden homologen Chromosomen zwar die gleiche Information enthalten ist, aber nicht in gleicher Anordnung. Daher können sich die entsprechenden Abschnitte nicht richtig aneinander lagern. Die Bereiche außerhalb des invertierten Bereiches lagern sich korrekt aneinander. Im Streben nach größtmöglicher Kongruenz lagern sich auch einige repetitive DNA Abschnitte (Bm, Am) innerhalb des invertierten Bereiches aneinander. Um dies zu ermöglichen, muss sich die DNA allerdings in gegenläufige Schleifen legen. Dadurch kann es zu Querverbindungen, sozusagen Kurzschlüssen kommen, die im ungleichen Crossing-over enden. Folglich haben die neu rekombinierten Chromosomen nicht die gleiche Länge wie die Ausgangschromosomen. Der WBS spezifische Abschnitt geht dabei verloren.

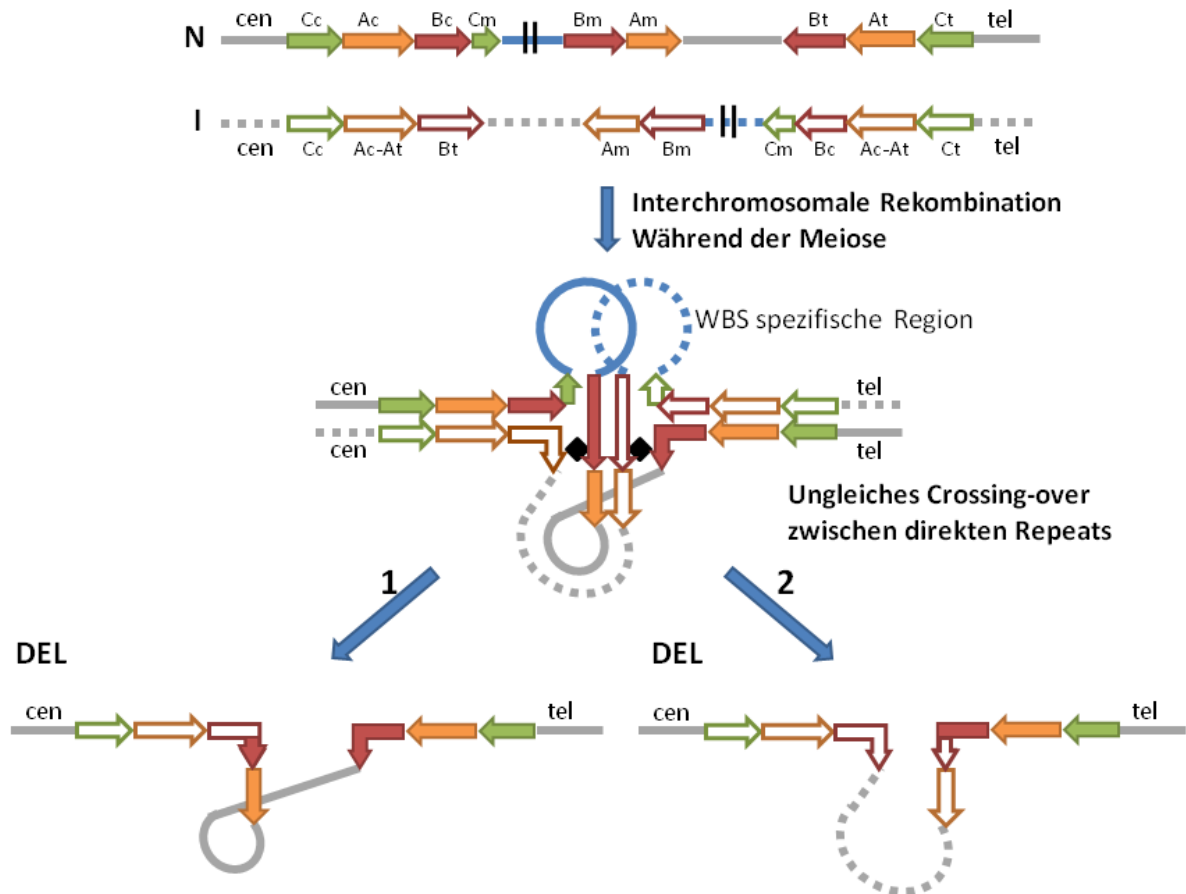


Abbildung 2: Theorie des Mechanismus der WBS-Deletionsentstehung bei Eltern, die Träger der heterozygoten parazentrischen Inversion 7q11.23 sind. **Oben:** Schematische Darstellung der Blöcke LCRs in verschiedenfarbigen Pfeilen (Block C grün, A orange, B rot), WBS spezifische Region stark verkleinert in blau; das obere Chromosom ist in normaler Anordnung, das untere mit Inversion; damit sich die Abschnitte Am und Bm während der Meiose homolog rekombinieren können, müssen sich Schleifen bilden. Der Bruchpunkt der parazentrischen Inversion 7q11.23 kann innerhalb der Blöcke A, B oder C liegen. In diesem Fall liegt der Bruchpunkt innerhalb von A, was durch die Beschriftung Ac-At symbolisiert werden soll. **Mitte:** Schleifenbildung und ungleiches Crossing-over. **Unten:** Neu entstandene Chromosomen mit Deletion, zwei Möglichkeiten. Da die B-Blöcke sich untereinander mehr ähneln als die A-Blöcke, ist die kleinere 1,55 Mb Deletion zwischen Bc und Bm häufiger als die zwischen Ac und Am (in Anlehnung an Bayés *et al.*, 2003).

1.4.2 Bisherige Studien zum Inversionspolymorphismus 7q11.23

Im Jahr 2001 konnten Osborne und Mitarbeiter erstmals nachweisen, dass Eltern von Kindern mit WBS Träger einer parazentrischen Inversion des WBS spezifischen Abschnittes 7q11.23 sein können (Osborne *et al.*, 2001). Mittels molekularzytogenetischer Methoden wurde bei 4 von 12 Familien (33 %) mit einem Kind mit WBS bei einem gesunden Elternteil eine Inversion 7q11.23 nachgewiesen. In einer Kontrollgruppe wurde keine Inversion gefunden. Diese bestand aus 26 Personen unterschiedlicher ethnischer Herkunft und 16 nicht die Deletion übertragenden Eltern von Kindern mit WBS.

Im Jahr 2003 publizierten Bayés und Mitarbeiter eine umfangreiche Studie unter anderem zum Inversionspolymorphismus beim WBS. Bei 28 % der Kinder mit WBS wurde ein molekulargenetischer indirekter Hinweis dafür gefunden, dass der deletionsübertragende Elternteil

Inversionsträger sein muss. Direkt wurde die Inversion bei einem Elternteil aber nur in 4 von 74 Fällen nachgewiesen. Als Kontrollgruppe wurden Eltern der Patienten mit einem WBS genommen, bei denen kein indirekter Hinweis dafür gefunden wurde, dass ein Elternteil Inversionsträger ist. Die Inversionsrate in der Kontrollgruppe lag bei 5,7 %.

In der zuletzt veröffentlichten Arbeit von Hobart *et al.* (2010) wurde in einer relativ großen Gruppe (257 Paare) von Eltern von Kindern mit WBS hinsichtlich der Inversion untersucht. Zunächst wurde mittels molekulargenetischer Methoden die elterliche Herkunft des Chromosoms mit Deletion bestimmt. Anschließend wurden die deletionsübertragenden Elternteile als Patientengruppe rekrutiert, während wie auch bei Bayés *et al.* (2003) die nicht-deletionsübertragenden Elternteile als Kontrollgruppe verwendet wurden. Dabei fand sich eine Inversionsrate von 24,9 % in der Patientengruppe, in der Kontrollgruppe von 5,84 %.

In allen drei Studien (Osborne *et al.*, 2003; Bayés *et al.*, 2001; Hobart *et al.*, 2010) wurden entweder schlecht charakterisierte, oder von der Patientengruppe abhängige Kontrollgruppen verwendet. Abgesehen von der Arbeit von Hobart *et al.* (2010), waren die Kontrollgruppen klein und es fehlte eine Aussage zur genauen Zusammensetzung sowie Geschlechterverteilung. Statistisch korrekter wäre es, eine Kontrollgruppe aus Paaren zu verwenden, die in keinem Zusammenhang mit der eigentlichen Patientengruppe stehen.

1.5 Ziel und Fragestellung dieser Arbeit

Eltern, bei deren Kind die Diagnose eines Williams-Beuren-Syndroms gestellt wird, fragen sich häufig, ob ein Wiederholungsrisiko für ein weiteres Kind besteht. Im Rahmen der genetischen Beratung ist es also von Interesse zu wissen, ob es Risikofaktoren gibt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die parazentrische Inversion von 7q11.23 gehäuft bei Eltern von Kindern mit WBS nachzuweisen ist. Um eine Aussage über die Bedeutung dieses Ergebnisses zu treffen, bedarf es einer unabhängigen Kontrollgruppe. Diese sollte ein repräsentatives Vergleichskollektiv darstellen. Dazu müssen den Elternpaaren, die ein Kind mit einem WBS haben, mit einem ausreichend großen Kollektiv von Elternpaaren mit Kindern ohne WBS verglichen werden. Wie auch die WBS Elterngruppe, soll die Kontrollgruppe, aus Paaren bestehen und keinen einzelnen Personen, über deren Geschlechterverteilung und Anzahl an gesunden Kindern nichts bekannt ist. In allen drei bisher publizierten Studien bleiben Zweifel an der Repräsentativität des untersuchten Kontrollkollektivs (Osborne *et al.*, 2001; Bayés *et al.*, 2003; Hobart *et al.*, 2010).

Ziel der vorliegenden Studie ist es, zum einen ein Kollektiv deutscher Familien mit Kindern mit WBS hinsichtlich der parazentrischen Inversion 7q11.23 in der Elterngeneration zu untersuchen. Zum anderen soll mit den gleichen Methoden eine repräsentatives Kontrollkollektiv untersucht werden. Die Kontrollgruppe, eingeteilt in drei Untergruppen, setzt sich zusammen aus Eltern von mindestens zwei

gesunden Kindern, Paaren mit unerfüllten Kinderwunsch und Eltern von Kindern mit mindestens zwei gesunden Kindern und einem Kind mit einer chromosomalen Aberration.

Die zentrale Frage dieser Arbeit ist:

Sind Elternpaare von Kindern mit WBS signifikant häufiger Träger der parazentrischen Inversion 7q11.23 als Paare einer Kontrollgruppe?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die Studie entstand in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Pankau (Kinderklinik Kreiskrankenhaus Walsrode, Wissenschaftlicher Beirat des WBS Bundesverbandes). Die Initiative der Studie kam aus dem wissenschaftlichen Beirat des WBS Selbsthilfeverbandes.

Die in die Studie einbezogenen WBS Patienten waren bereits vor Beginn der Studie diagnostiziert. Die Eltern der Patienten mit WBS wurden über den Ablauf der Studie informiert und erklärten sich einverstanden. Die Probanden der Kontrollgruppe waren über die mögliche Verwendung ihrer Blutproben für wissenschaftliche Studien informiert und einverstanden.

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Für sämtliche Untersuchungen wurde peripheres Heparinblut der Probanden analysiert. Die Lymphozyten wurden 72 Stunden mit Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung nach Standardmethoden, um eine reine Lymphozytensuspension zu erhalten. Die für zyto- bzw. molekularzytogenetische Untersuchungen nicht benötigte Lymphozytensuspension wurde in Carnoy's Fixativ (Methanol: Eisessig, 3:1) bei -20 °C aufbewahrt (siehe 2.2.5).

2.1.2 Voruntersuchung

Den eigentlichen Untersuchungen vorangehend wurden Zellen von Probanden untersucht, bei denen klinisch und molekularzytogenetisch kein WBS vorlag. Mit Hilfe dieser Kontrollen sollte die beste Sondenkombination gefunden werden und eine Fehlergrenze zur späteren Auswertung bestimmt werden. Es wurden nur solche Kontrollen zur Festlegung der Fehlergrenze verwendet, bei denen eine Inversion eindeutig ausgeschlossen werden konnte.

2.1.3 Patientengruppe

2.1.3.1 Eltern von Kindern mit Williams-Beuren-Syndrom

Im Rahmen der Studie wurde Blut von 24 Elternpaaren, die ein Kind mit einem WBS haben, auf die Inversion 7q11.23 hin untersucht. Insgesamt waren 62 einzelne Personen untersucht worden, für die Auswertung wurden letztendlich aber nur diejenigen berücksichtigt, bei denen beide Elternteile untersucht worden waren.

Die Blutproben der Eltern von Kindern mit WBS wurden von Herrn Prof. Dr. med. Pankau (Kinderklinik Kreiskrankenhaus Walsrode, Wissenschaftlicher Beirat des WBS Bundesverbandes) im Zeitraum zwischen 2002 und 2008 gesammelt. Voraussetzung war, dass bei deren Kind molekularzytogenetisch die für das WBS typische Deletion von 7q11.23 nachgewiesen worden war. Die Blutentnahme erfolgte mit Einverständnis der Eltern nach entsprechender Aufklärung.

2.1.3.2 Kinder mit Williams-Beuren-Syndrom

Alle Kinder mit nachgewiesenem WBS, deren Eltern Träger der Inversion 7q11.23 sind, wurden ebenfalls mit der im folgenden beschriebenen Methode untersucht. Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, ob auf dem zweiten, nicht deletierten Chromosom die Inversion der WBS-kritischen Region zu detektieren ist.

2.1.4 Kontrollgruppen

Das Kontrollkollektiv lässt sich in drei Gruppen einteilen und umfasst insgesamt 51 Paare. Es wurden nur Paare und keine Einzelpersonen untersucht. Die Blutentnahme erfolgte mit Einverständnis der Kontrollpersonen nach entsprechender Aufklärung.

2.1.4.1 Kontrollgruppe 1

In die Kontrollgruppe 1 wurden Paare eingeschlossen, die mindestens zwei gemeinsame gesunde Kinder haben. Das Blut wurde 24 Elternpaaren im Kreiskrankenhaus Walsrode im Anschluss an die Geburt ihres mindestens zweiten gesunden Kindes entnommen. Um die Möglichkeit, dass das gerade geborene Kind von einem WBS betroffen ist, ohne invasive Diagnostik möglichst gering zu halten, untersuchte Herr Prof. Dr. med. Pankau (Kinderklinik Kreiskrankenhaus Walsrode) die Kinder im Hinblick auf Dysmorphiezeichen. Konkret wurde nach Herzgeräuschen, Zyanosezeichen, Wachstumsretardierung und kraniofasziale Dysmorphien gesucht. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass die Kindern erst später phänotypische Merkmale des WBS zeigen, aber für erfahrene Untersucher sind erste Zeichen oft schon kurz nach der Geburt zu erkennen.

2.1.4.2 Kontrollgruppe 2

Die Kontrollgruppe umfasste 16 Paare, bei denen wegen einer Sterilität eine assistierte Reproduktion mittels intrazytoplasmatischer Spermieninjektion geplant war und bei denen im Rahmen der Voruntersuchungen eine zytogenetische Diagnostik erfolgte.

2.1.4.3 Kontrollgruppe 3

In dieser Gruppe wurden 11 Elternpaaren eingeschlossen, die sich zur genetischen Beratung im Institut für Humangenetik Kiel vorgestellt hatten. Alle haben ein Kind mit einer chromosomalen Aberration, die aber nicht die Region 7q11.23 betrifft, und mindestens zwei gesunde Kinder.

2.1.5 Materialien

Im Folgenden werden die in der Arbeit verwendeten Materialien und deren Hersteller beschrieben. Allgemein übliche Chemikalien und Laborgeräte (wie Pipetten, Bechergläser oder Objektträger) sind nicht einzeln aufgeführt.

2.1.5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- Agarose: Eurogentec, Seraing, Belgien
- Chloramphenicol: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Chroma Tide Texas Red: Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
- Cot-1: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- DABCO: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid): Serva, Heidelberg, Deutschland
- dATP (10 mM): Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- dCTP (10 mM): Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- dGTP (10 mM): Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- di-Natriumhydrogenphosphat: Merck, Darmstadt, Deutschland
- dTTP (10 mM): Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- dUTP Spectrum Aqua/DEAC (50 nmol): Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- dUTP Spectrum Green (50 nmol): Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- dUTP Spectrum Orange (50 nmol): Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- Essigsäure: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Fixogum-Kleber: Marabu, Tamm, Deutschland
- Glycerin: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Igepal: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Kanamycin: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Milchpulver: Nestle, Frankfurt, Deutschland
- Natriumazid: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumchlorid: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumcitrat: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumdihydrogenphosphat: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Paraformaldehyd: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Protease: Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- Proteaselösung: Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- Salzsäure: Merck, Darmstadt, Deutschland
- SSC (20×): Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- VectaShield: Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.5.2 Kits

- Bio Prime DNA Labeling System: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- JETSTAR Plasmid Purification Maxi: Genomed, Löhne, Deutschland
- Microcon® Säulen Ultracel YM-30: Millipore Corporation, Schwalbach, Deutschland

- Perfectprep® Plasmid Maxi: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.5.3 Geräte

- Brutschrank: Heraeus, Hanau, Deutschland
- Feinwaage MC1Laboratory: Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Filtersätze für Fluoreszenzmikroskop (siehe 7.2):
 - „Blaufilter“ (HC – mFISH filter set Spectrum Aqua): AHF, Tübingen, Deutschland
 - „Breitbandfilter“ (HC Multiband Filteset DAPI / SpGreen / SpOrange with tripleband exciter): AHF, Tübingen, Deutschland
 - „Goldfilter“ (HC - mFISH filter set Spectrum Gold): AHF, Tübingen, Deutschland
 - „Grünfilter“ (HC - mFISH filter set Spectrum Green): AHF, Tübingen, Deutschland
 - „Rotfilter“ (HC – mFISH filter set Spectrum Orange): AHF, Tübingen, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskope Axiophot und Axioskop: Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- Labor-Brutschrank: Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Phasenkontrastmikroskop: Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- Pipettenroboter RSP8051: TECAN SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland
- Schüttelinkubator für Zellkulturen: Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
- Schüttler: Ika-Labortechnik, Staufen, Deutschland
- Spektrophotometer (Nano Drop ND-1000): peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
- Thermotron CDS-5: Thermotron, Holland, USA
- Wasserbad: Labortechnik Köttermann, Hänigsen, Deutschland
- Zentrifugen:
 - Biofuge 22R: Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
 - CL-J6B: Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland
 - Mikro 200: Hettich, Tuttlingen, Deutschland
 - Pico Fuge: Stragogene, La Jolla, USA
 - Rotanta: Hettich, Tuttlingen, Deutschland
 - Sorvall Super T 21: Sorvall Products L.P., Newton, USA
 - Universal 16: Hettich, Tuttlingen, Deutschland
 - Vortex Genie 2: Scientific Industries, Bohemia, USA

2.1.5.4 Software und Online-Datenbanken

- ISIS V 5.2.11: MetaSystems, Altlußheim, Deutschland
- NanoDrop 3.2.1: peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
- SPSS: Statistiksoftware
- Vysis VP 2000: Abbott Molecular Inc, Des Plaines, USA

- Human Genome Browser Gateway: <http://genome.ucsc.edu/>

2.1.5.5 Sonden

Zur Herstellung der Sonden wurden E. coli Bakterienklone verwendet, die BAC (bacterial artificial chromosome)- oder PAC (P1 artificial chromosome)-DNA der WBS spezifischen Region 7q11.23 bzw. der flankierenden Region enthalten. Die Sonden RP11-815K3, CTA-208H19 und CTB-139P11 wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und die Sonde RP5-1186P10 vom Welcome Trust Sanger Institute (Cambridge, England) bezogen (siehe Tabelle 1).

	Name	Lage	Resistenz	Firma
BAC	RP11-815K3	7q11.22	Chloramphenicol	Invitrogen
BAC	CTA-208H19	7q11.23	Chloramphenicol	Invitrogen
PAC	RP5-1186P10	7q11.23	Kanamycin	Sanger Centre
BAC	CTB-139P11	7q11.23	Chloramphenicol	Invitrogen

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten BAC und PAC- Sonden (von links nach rechts: Name, Lage, Resistenz und Firma). Unter Resistenz wird das Antibiotikum verstanden, gegen das die Sonde enthaltene E. coli-Klon resistent ist. Dieses Antibiotikum wird beim Anzüchten des Bakterienklons hinzugegeben, um fremde Stämme am Wachsen zu hindern. Es wurden die von Osborne *et al.* (2001) eingeführten Sonden verwendet (siehe Abbildung 3). CTB-139P11 wurde nur beim anfänglichen Testen der besten Sondenkombination verwendet, nicht jedoch in den eigentlichen Untersuchungen.

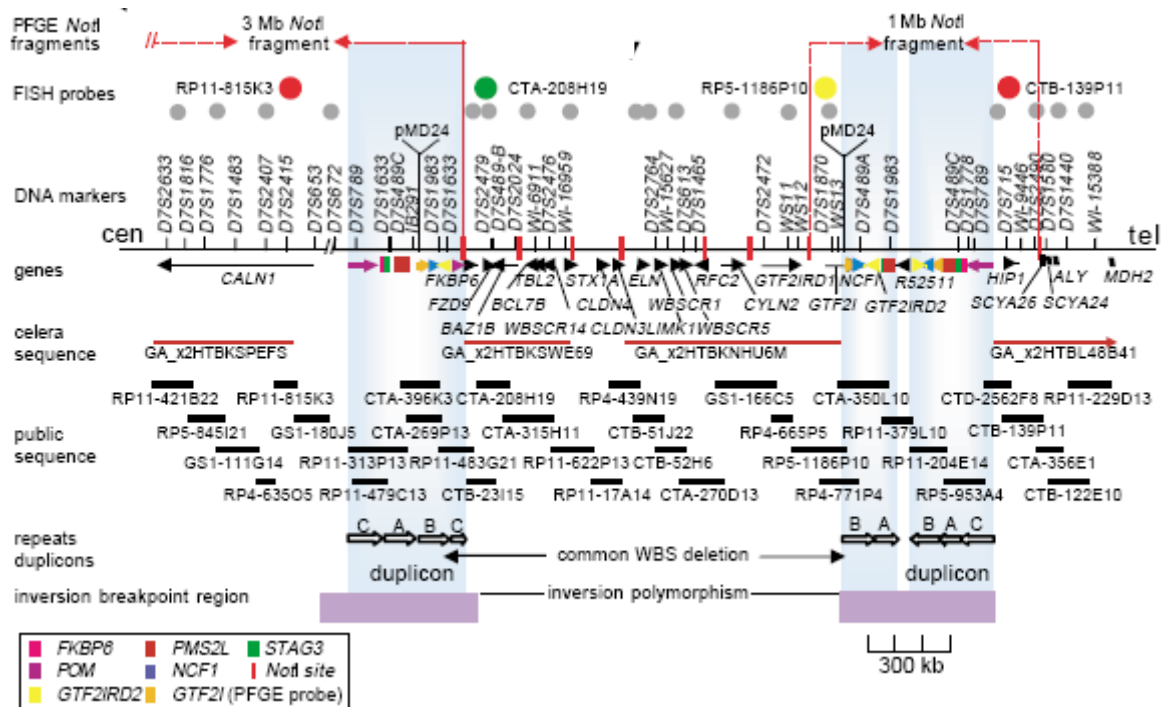


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Region 7q11.23 (Osborne *et al.*, 2001). Die vier verwendeten Sonden („FISH probes“) sind eingezeichnet (RP11-815K3, CTA-208H19, RP5-1186P10, CTB-139P11). Der WBS spezifische Bereich befindet sich zwischen den hellblauen Balken, ein schwarzer Pfeil markiert die üblichen Deletionsbruchpunkte. Die hellblauen Balken stellen die Duplikons dar, die Blöcke A, B und C sind eingezeichnet. Einige repetitive Gensequenzen sind gemäß der Legende links unten farbig eingezeichnet. Inversionsbrüche liegen normalerweise innerhalb der lila Balken.

2.1.5.6 Puffer und Lösungen

Carnoy's Fixativ:

Methanol und Eisessig wurden im Verhältnis 3:1 zusammengegeben und durch vorsichtiges Schütteln miteinander vermischt.

Chloramphenicol (40 mg/ml):

400 mg Chloramphenicol wurden in 10 ml absolutem Ethanol gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

DAPI-Gebrauchslösung:

500 µl DAPI-Stammlösung wurden in 500 ml 2×SSC-Lösung gegeben, verteilt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

DAPI-Stammlösung:

10 mg DAPI wurden in 50 ml Aqua dest. gelöst und bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

10× dNTP zur späteren Markierung mit Spectrum Orange, Spectrum Green und Spectrum Aqua / DEAC:

2,5 µl dATP (10mM), 2,5 µl dCTP (10mM), 2,5 µl dGTP (10mM), 1,25 µl dTTP (10mM), 12,5 µl dUTP-X(1mM) und 3,75 µl ddH₂O wurden zusammengegeben und kurz gemischt.

10× dNTP zur späteren Markierung mit Texas Red:

2,5 µl dATP (10mM), 2,5 µl dCTP (10mM), 2,5 µl dGTP (10mM), 1,62 µl dTTP (10mM), 8,75 µl dUTP-TR (1mM) und 7,13 µl ddH₂O wurden zusammengegeben und kurz gemischt.

Flüssignährmedium (LB-Medium):

20 g LB Broth Base (Invitrogen) wurden mit 1000 ml Aqua dest. aufgelöst, autoklaviert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Kanamycin (50 mg/ml):

500 mg Kanamycin wurden in 10 ml Aqua dest. gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Mastermix:

2,5 ml deionisiertes Formamid, 1,25 ml erwärmtes Dextransulfat (40 %) und 0,5 ml 20× SSC wurden mit 5N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit 1× SSC auf 4,5 ml aufgefüllt.

Paraformaldehyd (1 %):

10 g Paraformaldehyd wurden in 1000 ml Aqua dest. auf einer Heizplatte erwärmt, bis alles gelöst war, und anschließend im Kühlschrank gelagert.

PN-Puffer:

0,1 M NaH_2PO_4 und 0,1 M Na_2HPO_4 wurden in 800 ml Aqua dest. aufgelöst, auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Der PN-Puffer wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

PNM-Puffer:

Zu 1 l PN-Puffer wurden 50 g Magermilchpulver und 0,2 g Natriumazid hinzugefügt, für einige Stunden auf 37 °C erhitzt und anschließend 15 min mit 3000 UpM zentrifugiert. Der Überstand ergab den PNM-Puffer. Der PNM-Puffer wird bei -20 °C aufbewahrt.

Proteaselösung:

In eine 500 ml Flasche Proteaselösung (Abott) wurde ein Röhrchen Protease (Abbott) gelöst. Die Lösung konnte jeweils eine Woche zum Verdau genutzt werden.

2×SSC-Lösung:

20× SSC (Invitrogen) wurde mit Aqua dest. 1:10 verdünnt.

Waschpuffer I:

Zu 20 ml der 20× SSC-Lösung wurden 3 ml Igepal Detergenz gegeben und anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Waschpuffer II:

Zu 100 ml der 20× SSC-Lösung wurden 1000 µl Igepal Detergenz gegeben und anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Beide Waschpuffer wurden bei Raumtemperatur gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Prinzipien der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH)

Grundprinzip der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) ist die spezifische Basenpaarung zwischen der Sequenz der DNA-Sonde und korrespondierenden Sequenz der zu untersuchenden DNA. Zunächst wird die DNA der Sonden und des Untersuchungsmaterials durch Schmelzen in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung), anschließend kommt es durch Wiederabkühlen zu einer Hybridisierung. Korrespondiert die Sequenz der Sonde mit einem Abschnitt auf der Ziel DNA, wird

sie an dieser Stelle spezifisch binden. Wurde die Sonde vorher mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, kann sie später mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden.

FISH ist eine sehr verlässliche molekularzytogenetische Methode (Siebert und Weber-Matthiesen, 1997; Barth *et al.*, 2001). Im Gegensatz zur traditionellen Bänderungstechnik ist diese Untersuchung in allen Zellzyklusphasen, also sowohl an Metaphase- als auch Interphasezellen möglich. Auch bei geringer Zellzahl bzw. schlechter Qualität der Metaphasen sind Aussagen zu den untersuchten Regionen möglich.

2.2.2 Präparieren der BAC/PAC-DNA

Die ausgewählten BAC-/PAC Sonden waren in *E. coli* Bakterienklone integriert und wurden als Glycerinstock (500 µl Glycerin auf 500 µl Bakterienkultur) bei -80 °C konserviert. Um die Sonden für die FISH zu verwenden, mussten sie jedoch aus den Bakterien extrahiert (präpariert) werden.

Im ersten Schritt wurden die Bakterien kultiviert, also vermehrt. Dazu wurden gut 200 ml LB-Nährmedium mit 100 µl Glycerinstock und 100 µl Antibiotikum (Chloramphenicol 40 mg/ml bei RP11-815K3, CTA-208H19 und CTB-139P11; Kanamycin 50 mg/ml bei RP5-1186P10) vermengt. Das Antibiotikum wurde hinzugegeben, um gegebenenfalls andere als Verunreinigung eingedrungene Bakterienstämme abzutöten. Die jeweiligen *E. coli* Bakterien waren gegen das Antibiotikum resistent. Das Gemisch wurde dann über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator unter ständiger Bewegung kultiviert.

Am nächsten Tag folgte die Präparation der DNA mit Hilfe des Perfectprep® Plasmid Maxi Kit (Eppendorf) nach Angaben des Herstellers. Wegen einer Umstellung der Kits im Institut für Humangenetik erfolgte eine zweite, im Verlauf notwendig gewordene Präparation, mit dem JETSTAR® Plasmid Maxi Kit, das jedoch nach dem gleichen Grundprinzip vorgeht.

Im letzten Schritt beider Protokolle wurde die isolierte DNA über Nacht in 250 µl Aqua dest. gelöst. Um anschließend sicherzustellen, dass genug DNA in der Probe ist, wurde mit Hilfe des Spektrophotometer (Nano Drop ND-1000) der DNA Gehalt gemessen. Diese Angabe (in ng/µl) ist für die spätere Verarbeitung zur Mengenbestimmung wichtig.

Bei der Sonde RP11-815K13 zeigte sich an Kontrollproben (Metaphasen und Interphasen) zunächst, dass sie überhaupt nicht band oder nicht markierbar war. CTB-139P11 band nicht spezifisch, sondern war chimär. Deshalb wurde vor der Präparation versucht, einzelne Bakterienkolonien zu isolieren, um eine zu finden, die nur spezifisch bindende DNA in sich trägt. Dazu wurden Nährböden aus 500 ml Aqua dest., 10 g LB-Medium und 7 g Agarose gegossen, autoklaviert und die Glycerinstockbakterien nach der Dreiösentchnik ausgestrichen und inkubiert. Von den auf den Nährböden gewachsenen Kolonien wurden jeweils drei einzeln vermehrt (Inkubation über Nacht), die DNA wurde präpariert, markiert und an Kontrollen getestet. Die Kolonie, die am spezifischsten gebunden hatte, wurde nochmals vermehrt und als neuer Glycerinstock konserviert.

2.2.3 Markieren und Reinigen der DNA-Proben

Die isolierte BAC/PAC-DNA wurden mit Hilfe des Bio Prime DNA Labeling Systems in den Farben Spectrum Orange, Spectrum, Texas Red und Spectrum Aqua /DEAC markiert.

Dazu wurde 1 µg BAC bzw. PAC-DNA mit Aqua dest. auf ein Volumen von 24 µl verdünnt. Anschließend wurden 20 µl 2,5×Random Primer hinzugegeben, 5 min in kochendem Wasser denaturiert und anschließend sofort für wenige Minuten auf Eis gekühlt. Es wurden 5 µl 10×dNTP-Mix mit dUTP-Spectrum Green, dUTP-Spectrum Orange, dUTP-Texas Red oder dUTP-Spectrum Aqua/DEAC zu der jeweiligen DNA-Probe hinzugegeben. Ab diesem Schritt musste möglichst lichtgeschützt gearbeitet werden, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Sonden zu vermeiden. Nach vorsichtiger Zugabe von 1 µg eisgekühltem Klenow Fragment wurde das Gemisch kurz an zentrifugiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um Verunreinigungen und überständigen Farbstoff zu entfernen, wurde die DNA am nächsten Tag gereinigt. Eventuell noch aktive Enzymreaktionen wurden vor der Reinigung mit 5 µl Stop-Puffer gestoppt. Das Aufreinigen geschah mit Microcon®-Säulen der Firma Millipore. Die jeweilige markierte DNA wurde mit 300 µl Aqua dest. auf die Säule gegeben und 10 min bei 14000 UpM (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang noch zweimal wiederholt. Um die DNA aus den Microcon®-Säulen zu lösen, wurden 50 µl Aqua dest. auf die Säule pipettiert, diese umgedreht in ein neues Röhrchen gestellt und 5 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Die gereinigte DNA wurde in ein Originalröhrchen zurück pipettiert und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Präparation der markierten Sonden

Um die WBS-Region spezifisch mit Hilfe der Dreifarbf-FISH-Analyse zu untersuchen, wurde ein Gemisch aus den drei bereits markierten Sonden hergestellt. Jeweils 10 µl der Sonden RP11-815K3 Spectrum orange, CTA-208H19 Spectrum green und RP5-1186P10 Texas Red (im Vorversuch auch CTB-139P11 Spectrum Aqua/DEAC) wurden zusammen mit 5 µl Cot-1-DNA, 3,5 µl NaAc und 96,5 µl absolutem Ethanol 30 Minuten bei 17000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde mit Hilfe einer Vakuumentrifuge luftgetrocknet, anschließend in 10 µl Mastermix aufgelöst und je nach Bedarf weiterverwendet oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5 Materialaufarbeitung und Erstellung der Präparate

Zur Untersuchung wurden Heparin-Blutproben nach Standardmethoden im Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) aufgearbeitet und die erhaltene Lymphozytensuspension in Carnoy's Fixativ (Methanol: Eisessig, 3:1) bei -20 °C aufbewahrt. Wenige Tropfen der Zellsuspension wurden mit Hilfe einer Glaspipette auf den Objektträger aufgetropft und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Objektträger unter einem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Dabei wurde vor allem Augenmerk auf die Zellzahl, die Zellmorphologie und den Hintergrund gelegt. Wenn ein geeigneter, also zellreicher und möglichst hintergrundsarmer Abschnitt

zu finden war, wurde dieser auf der Rückseite des Objektträgers mit einem Diamantschreiber markiert. Gegebenenfalls musste nochmal nachgetropft werden. Für den Fall, dass der Hintergrund stark verunreinigt war und so später zu viele störende Hintergrundsignale entstanden wären, wurde die Probe gereinigt. Dazu wurde sie zunächst zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit frischem Carnoy's Fixativ aufgefüllt. Der Vorgang wurde bis zum gewünschten Ergebnis wiederholt.

2.2.6 Verdau

Bevor die markierten Sonden auf die Objektträger mit der aufgetropften Lymphozytensuspension gegeben wurden, mussten die Zellen einem Verdau unterzogen werden. Dabei wurden das nicht benötigte Zytoplasma und andere Überreste entfernt. Dies geschah mit Hilfe des VP 2000 Prozessors der Firma Vysis, der die Objektträger automatisch einem voreingestellten Protokoll unterzog. Für den Verdau folgte das Programm dabei folgendem Schema:

Zunächst wurden die Objektträger für 5 min bei 37 °C in der Proteaselösung inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit Aqua dest. gespült und zur Fixierung der Zellen 2 min in 1 % Paraformaldehyd gestellt. Nach einem zweiten Waschvorgang mit Aqua dest., folgte eine Dehydrierung der Präparate. Dies geschah in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 2 min in 70 %, 85 % und absoluten Ethanol). In einem letzten Schritt wurden die Objektträger luftgetrocknet.

FISH Verdau			FISH Waschung		
5 min	Protease	37 °C	2 min	Waschpuffer I	72 °C
1 min	Aqua dest.	Raumtemperatur	1 min	Waschpuffer II	Raumtemperatur
2 min	1 % Paraformaldehyd	Raumtemperatur	1 min	2x SSC	Raumtemperatur
1 min	Aqua dest.	Raumtemperatur	5 min	DAPI	Raumtemperatur
2 min	70 % Ethanol	Raumtemperatur	1 min	2x SSC	Raumtemperatur
2 min	80 % Ethanol	Raumtemperatur			
2 min	absoluter Ethanol	Raumtemperatur			
5 min	Trocknen	Raumtemperatur			

Tabelle 2: Protokoll nach dem der VP 2000 Prozessor der Firma Vysis den Verdau (links) und die Waschung (rechts) durchführte. Es sind jeweils (von links nach rechts) die notwendige Zeit, die Flüssigkeit in die die Objektträger getaucht werden, und deren Temperatur aufgelistet.

2.2.7 Hybridisierung

Unter Hybridisierung versteht man den Vorgang der spezifischen Bindung der markierten DNA Sonden mit der zu untersuchenden DNA.

Dazu wurde 1,3 µl der in Mastermix gelösten markierten Sonden auf das vorher von der Rückseite her markierte zellreiche Areal pipettiert. Um ein Austrocknen der Sonden zu verhindern, wurde die zu hybridisierende Stelle mit einem kleinen runden Deckgläschen möglichst luftbläschenfrei abgedeckt und mit Photokleber (Fixogum) abgedichtet.

Die Proben- und Ziel-DNA wurden zusammen mit einem feuchten Tuch in einer Metallbox 7 min bei 78 °C denaturiert und anschließend über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C hybridisiert.

2.2.8 Waschen und Eindecken der Präparate

Überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden müssen so weit wie möglich entfernt werden. Dazu wurden zunächst der Fixogum-Kleber und die kleinen runden Deckgläschen entfernt. Anschließend wurden die in Küvetten gestellten Objektträger mittels dem in 1.2.7 beschriebenen Gerät der Firma Vysis einem Waschprotokoll unterzogen:

Die Präparate wurden 2 min in Waschpuffer I (72 °C) und dann 1 min in Waschpuffer II (Raumtemperatur) gestellt. Es folgten zwei kurze Spülungen in SSC und für die Gegenfärbung der Zellkerne und Chromosomen mit DAPI-Lösung (5 min bei Raumtemperatur). Das zweimalige Spülen mit SSC wurde wiederholt. Als letztes wurden die nassen Objektträger vorsichtig von der Rückseite und Seite abgetropft und mit VectaShield® (Antifade) eingedeckt. Der ganze Vorgang, inklusive der anschließenden Aufbewahrung muss soweit wie möglich lichtgeschützt stattfinden, um ein vorzeitiges Verblässen der Sonden zu vermeiden.

2.2.9 Dreifarb-FISH

Um eine Inversion zu entdecken, muss man eine Aussage über die Orientierung des Bereiches im Verhältnis zu der nicht invertierten Nachbarregion treffen können. Dazu wurde an Interphasezellkernen die Reihenfolge von drei FISH-Sonden in der Region 7q11.23 bestimmt (in Anlehnung an Osborne *et al.* 2001). Die Auswahl und Markierung der verwendeten Sonden erfolgten nach Testung verschiedener Kombinationen an Kontrollen (siehe 3.1.1). Innerhalb des WBS spezifischen Bereiches wurden zwei unterschiedlich farbig markierte Sonden verwendet. CTA-208H19, eine Sonde, die am zentromeren Anfang des WBS spezifischen Bereiches bindet, wurde in Spectrum Green (SG) markiert. Eine zweite Sonde, RP5-1186P10, bindet am telomeren Ende des Bereiches und wurde in Texas Red (TR) markiert. Da Interphase-DNA nicht kondensiert ist und Telomer und Zentromer nicht zu unterscheiden sind, lässt sich die Orientierung des Abschnittes mit zwei Sonden alleine nicht feststellen. Es bedarf einer dritten Sonde, die einen festen Bezugspunkt außerhalb des Bereiches darstellt und ihre Position im Falle einer Inversion nicht verändert. Dazu wurde die zentromerwärts von 7q11.23 bindende Sonde RP11-815K3 verwendet. Markiert wurde sie in Spectrum Orange (SO). Im Normalfall, also ohne Inversion, erwartet man von Zentromer nach Telomer folgende Reihenfolge der Sonden: RP11-815K3 SO, CTA-208H19 SG, RP5-1186P10 TR. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennt man drei Signale auf jedem Chromosom, orange grün rot (OOO). Man könnte die Reihenfolge genauso gut von der Telomerseite aufzählen, also rot grün orange (ROO). Der Übersichtlichkeit wegen ist die erstgenannte Sonde in der gesamten Arbeit immer die am weitesten zentromerwärts liegende.

Im standardmäßigen „Breitbandfilter“ (HC Multiband Filteset DAPI / SpGreen / SpOrange with tripleband exciter) sind Texas Red (TR) und Spectrum Orange (SO) nicht zu unterscheiden, man nimmt sie beide als rote Signale wahr. Deswegen muss das Präparat noch im „Goldfilter“ (HC - mFISH filter set Spectrum Gold) betrachtet werden, der ausschließlich Spectrum Orange darstellt.

Kombiniert man die beiden Bilder, lassen sich die Signale unterscheiden. Im Falle einer Inversion ist der für das WBS kritische Bereich umgedreht, die Zentromermarkierung (RP11-815K3, SO) allerdings bleibt unverändert, deswegen liegen die Signale dann in der Reihenfolge: orange, rot, grün. (OOO; RP11-815K3 SO,RP5-1186P10 TR, CTA-208H19 SG). Ob die Sonden wirklich auf Chromosom 7q liegen, kann anhand der Analyse von Metaphasen überprüft werden. Die Sonden liegen allerdings zu nah aneinander, um sie an den Metaphasechromosomen als drei getrennte Signale wahrzunehmen, sie erscheinen als ein Fusionssignal.

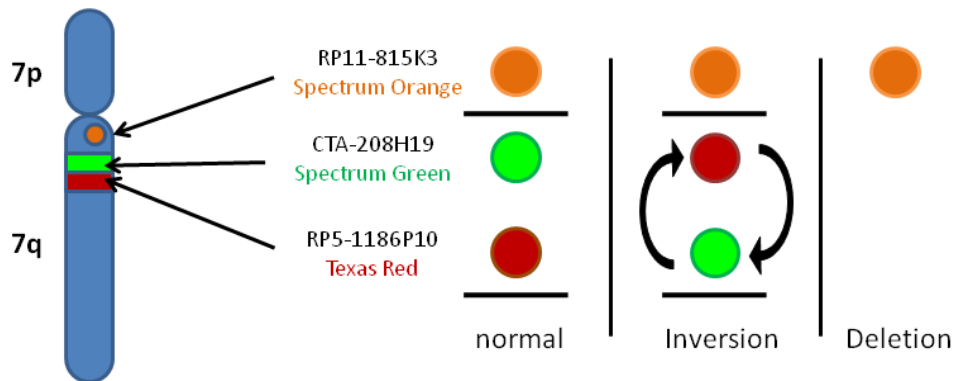


Abbildung 4: links: Schematische Darstellung des Chromosom 7, wobei der orange Punkt die Kontrollsonde RP11-815K3 in Spectrum Orange darstellt. Der WBS spezifische Bereich ist in zwei Balken unterteilt. Grün stellt die Sonde CTA-208H19 in Spectrum Green dar, rot die Sonde RP5-1186P10 in Texas Red. **rechts:** mögliche Sondenkonstellationen: Normal, Inversion, Deletion (von links nach rechts).

2.2.10 Dokumentation

Ausgewertet wurden die Hybridisierungssignale mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops der Firma Zeiss (Axioskop). Dabei wurden verschiedene Filter für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe, sowie ein „Breitbandfilter“ (HC Multiband Filterset DAPI / SpGreen / SpOrange with tripleband exciter) für die Kombination blau/grün/rot verwendet. Zur Dokumentation der Ergebnisse diente die ISIS V 5.2.11 Software der Firma MetaSystems.

Zum Auswerten wurde ein Simultanfilter verwendet, der DAPI, rot und grün darstellt. Allerdings können in dieser Darstellung die Farben Spectrum Orange und Texas Red nicht unterschieden werden, sondern sind beide als rot zu erkennen. Deshalb wurde zusätzlich ein „Goldfilter“ (HC - mFISH filter set Spectrum Gold) verwendet, der nur die Spectrum Orange Signale darstellt.

Von jedem Fall wurden 50 Interphasen im Hinblick auf eine Inversion ausgewertet und von einem zweiten unabhängigen Betrachter kontrolliert. Um eine Beeinflussung durch eventuelle Erwartungshaltungen zu vermeiden, erfolgte die Reihenfolge der Auswertung der Objektträger zufällig und nicht nach Paaren sortiert.

Zur Fotodokumentation wurden Einzelaufnahmen mit den Farbfiltern DAPI, Spectrum Green, Texas Red und Spectrum Orange gemacht und von der Software zu einem Bild integriert. Die Bilder wurden alle im Original gespeichert. Anschließend wurden selektive Aufnahmen in Falschfarben dargestellt,

um die beiden Rotfarbstoffe optisch besser zu differenzieren. So ist es zum Beispiel möglich, ein Bild mit roten, grünen und orangen Signalen zu erhalten. Die Fotos dienen jedoch nur der Dokumentation und nicht der Auswertung selbst. Von jedem unauffälligen Fall wurden drei, von jedem mit Inversion sechs repräsentative Interphasezellkerne fotografiert. Metaphasen wurden nur bei neu präparierten Sonden und neuen Markierungen fotografiert, um zu kontrollieren, ob die Sonden korrekt hybridisieren.

2.2.11 Festlegung der Fehlergrenze

Vor dem Auszählen der Zellkerne musste ein Schema festgelegt werden, nach dem ausgezählt wurde. Es wurde definiert, welche der möglichen Signalkonstellation gezählt werden, und wann es sich um einen Normalbefund und wann um eine Inversion handelt. Dazu musste in einem Vorversuch geprüft werden, welche Signalkonstellationen zu erwarten sind. Aus diesem Grund wurden fünf Kontrollen ausgewertet. Jeweils 100 Zellen, also insgesamt 500, wurden ausgezählt. Alle Signalkonstellationen, die unter den 500 ausgewerteten Zellkernen auftraten, wurden in der anschließenden eigentlichen Studie ausgezählt. Es muss außerdem definiert werden, ab welcher Anzahl an „normalen“ Zellkernen ein Fall als normal gewertet wird, und wann eine Inversion vorliegt. Dazu wurden zwei Cut-off-Werte (kritische Werte) berechnet. Zur Definierung normaler Zellkerne wurde der Mittelwert der Anzahl an normalen Zellkernen und der dreifachen Standardabweichung des Mittelwerts, berechnet. Alle Werte an normalen Zellkernen größer bzw. gleich der dreifachen Standardabweichung vom Mittelwert wurden als normal gewertet. Zur Definition der Inversion wurde der Mittelwert der Anzahl an invertierten Zellkernen sowie die dreifache Standardabweichung des Mittelwertes berechnet. Alle Fälle mit einer Anzahl an Zellkernen mit Inversion, größer als die dreifache Standardabweichung vom Mittelwert, wurden als Inversion gewertet (siehe 3.1.2).

2.2.12 Statistischer Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Patientengruppe

Um festzustellen, ob sich die Häufigkeit der Inversionen zwischen den Gruppen statistisch signifikant unterscheidet oder es sich nur um eine nicht signifikante Schwankungen handelt, wurde der exakte Fishertest angewendet (Sachs, 1997; Feldman und Klinger, 1963). Es wurde der zweiseitige Fishertest verwendet, da die Anzahl an Inversionen in der Kontrollgruppe sowohl signifikant niedriger als auch theoretisch signifikant höher sein könnte. Der Test kann schon bei kleineren Stichproben verwendet werden, um den p - Wert auszurechnen. Dieser drückt die Wahrscheinlichkeit aus, dass entweder der beobachtet Wert der Teststatistik oder ein noch extremerer auftritt, wenn die Nullhypothese vorliegt. Ist $p < 0,05$ (bei einem vorher festgelegten Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$) kann die Nullhypothese verworfen werden.

Die Nullhypothese dieser Studie ist, dass sich die Inversionsraten in der Kontrollgruppe und der Elterngruppe von Kindern mit WBS nicht unterscheiden. Die Alternativhypothese ist also, dass die Inversionsrate in der Kontrollgruppe kleiner oder größer ist. Die statistische Auswertung erfolgte in

Kooperation mit Frau Dr. Amke Caliebe (Institut für Medizinische Informatik und Statistik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel).

3 Ergebnisse

Es besteht der Verdacht, dass die Inversion 7q11.23 die Entstehung der ca. 1,5 Mb großen, zum WBS führenden Deletion 7q11.23 begünstigt. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass bei ca. 30 % der Eltern von Kindern mit WBS mindestens ein Elternteil Träger der Inversion 7q11.23 ist (Osborne *et al.*, 2001; Bayés *et al.*, 2003; Hobart *et al.*, 2010). Jedoch fehlte in allen Studien eine repräsentative Kontrollgruppe.

Deshalb sollte in dieser Arbeit neben Eltern von Kindern mit WBS auch eine größere und repräsentativere Kontrollgruppe im Hinblick auf die parazentrische Inversion untersucht werden. Dazu wurde Blut von Eltern mit mindestens zwei gesunden Kindern, Eltern mit Kindern mit anderen chromosomalen Aberrationen und Paaren mit unerfüllten Kinderwunsch untersucht.

Mit Hilfe von Dreifarbf-FISH sollte die zentrale Frage, ob Eltern von Kindern mit WBS signifikant häufiger Träger einer Inversion 7q11.23 als Paare der Kontrollgruppe sind, beantwortet werden.

3.1 Etablierung des Dreifarbf-FISH Assays

3.1.1 Sonden- und Farbwahl

Um die letztlich für die Analyse verwendete Sondenkombination auszuwählen, waren eine Reihe von Vorversuchen und Optimierungen notwendig. Zunächst ging es darum, die beste Sondenkombination herauszufinden. Was die Kontrollsonde, außerhalb des WBS spezifischen Abschnittes betrifft, gibt es zwei Möglichkeiten: Die Sonde kann entweder telomer- oder zentromerwärts von 7q11.23 binden. Es wurden zwei Sonden getestet, die in 7q11.22 liegende Sonde RP11-815K3 und die in 7q11.23 liegende Sonde CTB-139P11. CTB-139P11 erwies sich als chimär, mit multiplen Bindungsstellen. RP11-815K3 zeigte keine Signale. Beide wurden wie beschrieben neu aufgearbeitet (siehe 2.2.2). Bei der Hybridisierung mit Kontroll-DNA zeigten sich bei der neu aufgearbeiteten Sonde RP11-815K3 gut erkennbare Signale in der erwarteten Lokalisation. Deswegen wurde diese Sonde bei allen weiteren Versuchen als Kontrollsonde verwendet.

Die Sonden innerhalb des WBS spezifischen Abschnittes, RP5-1186P10 und CTA-208H19 zeigten nach Markierung von Anfang an eindeutige Signale ohne chimäres Bindungsmuster und mussten deswegen nicht weiter aufgearbeitet werden.

Im nächsten Schritt musste die beste Farbkombination ausgewählt werden. Im Idealfall hätte man drei komplett verschiedene Farben verwendet. Osborne *et al.* (2001) verwendeten aus diesem Grund rote, grüne und gelbe Signale. Gelbe Signale lassen sich theoretisch durch Fusionierung von Spectrum Orange und Spectrum Green erzeugen. Voraussetzung ist allerdings, dass die beiden Farbstoff gleich gut an der Sonde binden und die gleiche Fluoreszenzstärke aufweisen. Da sich aus diesen Bedingungen leichter Fehlinterpretationen der Ergebnisse ergeben können, z.B. bei nicht ganz

deckungsgleicher Bindung der Fusionssignale, wurde von Anfang an bewusst auf die Verwendung der Fusionsfarbe gelb verzichtet.

Eine Möglichkeit, die getestet wurde, war eine der Sonden mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Die Sonde RP5-1186P10, die innerhalb des WBS spezifischen Abschnittes liegt, wurde mit Spectrum Aqua / DEAC markiert. RP11-815K5 in Spectrum Orange und CTA-208H19 in Spectrum Green, so dass die Reihenfolge SO SG SB (OOO) zu erwarten war. Als problematisch erwies sich allerdings, dass Spectrum Aqua / DEAC im Mehrfachfilter nicht zu erkennen ist, sondern nur in einem speziellem „Blaufilter“ (HC – mFISH filter set Spectrum Aqua / DEAC). Betrachtet man den Objektträger also im „Breitbandfilter“, sieht man nur zwei Signale pro Chromosom, SO und SG (OO). Um die blauen Signale zu erkennen, muss jedes Mal in den „Blaufilter“ umgeschaltet werden, in dem man dann aber nur Spectrum Aqua / DEAC erkennt (O). Um eine Aussage über die Reihenfolge zu treffen, musste jeder Zellkern einzeln fotografiert werden. Das ist bei 50 Zellkernen pro Fall sehr aufwendig und birgt das Risiko von Fehlinterpretationen, wenn es z.B. beim Fotografieren unbemerkt zum Verwackeln oder durch Filterfehler zum „Signalshift“ kommt. Da sich die Auswertung dieser Farbkonstellation als nicht als praktikabel erwies, wurde sie nicht angewandt.

Trotz des Problems, dass Spectrum Orange und Texas Red im „Breitbandfilter“ beide als rote Signale zu sehen sind, war es in der Kombination mit Spectrum Green letztendlich die am zuverlässigsten zu beurteilende Farbkonstellation.

3.1.2 Festlegung der auszuwertenden Signalkombinationen

Bei 500 Interphasezellkernen wurde die Reihenfolge der Signalkonstellationen auf beiden Chromosomen betrachtet (siehe 2.1.2). Zur Quantifizierung wurde jedoch nur ein Chromosom herangezogen. Bei heterozygoter Signalkonstellation wurde das Chromosom mit der nicht normalen Signalkonstellation ausgewertet.

Bei den 500 ausgezählten Zellkernen traten folgende Signalkonstellationen auf (siehe Abbildung 5): SO SG TR (OOO), SO TR SG (OOO), SO SG SG (OOO), SG SO TR (OOO), SG SO SO (OOO).

Die genaue Verteilung ist Tabelle 3 zu entnehmen. Alle weiteren denkbaren Konstellationen wurden in den Kontrollkernen nicht gesehen und deswegen nicht miteinbezogen.

Da die DNA in den Interphasezellkernen nicht stark kondensiert vorliegt, ergibt sich zwangsläufig das Problem, dass sie nicht immer linear liegt, sondern auch in Schleifen, über- und untereinander. Dies hat zur Folge, dass die Signale nicht immer linear hintereinander liegen, sondern auch übereinander. In Folge einer Schleifenbildung können die Signale wie bei einer Inversion angeordnet sein, ohne dass die DNA selbst verändert ist. Außerdem können die eigentlich dreidimensionalen Zellkerne mit dem Mikroskop nur zweidimensional dargestellt werden.

Es wurden deswegen nur die Zellen gezählt, bei denen sechs Signale zu sehen waren (Ausnahme Kinder mit WBS) und so sichergestellt war, dass nicht zwei Signale übereinander liegen. Ein weiteres Kriterium war die Lage der Signale zueinander. Signale, die im Dreieck liegen, können nicht gewertet

werden, weil Zentromer und Telomer nicht zu unterscheiden sind und man keine Aussage über die Reihenfolge treffen kann. Erst ab einem Winkel von circa 110° wurde davon ausgegangen, dass die DNA linear liegt und die Reihenfolge zu werten ist (siehe Abbildung 5).

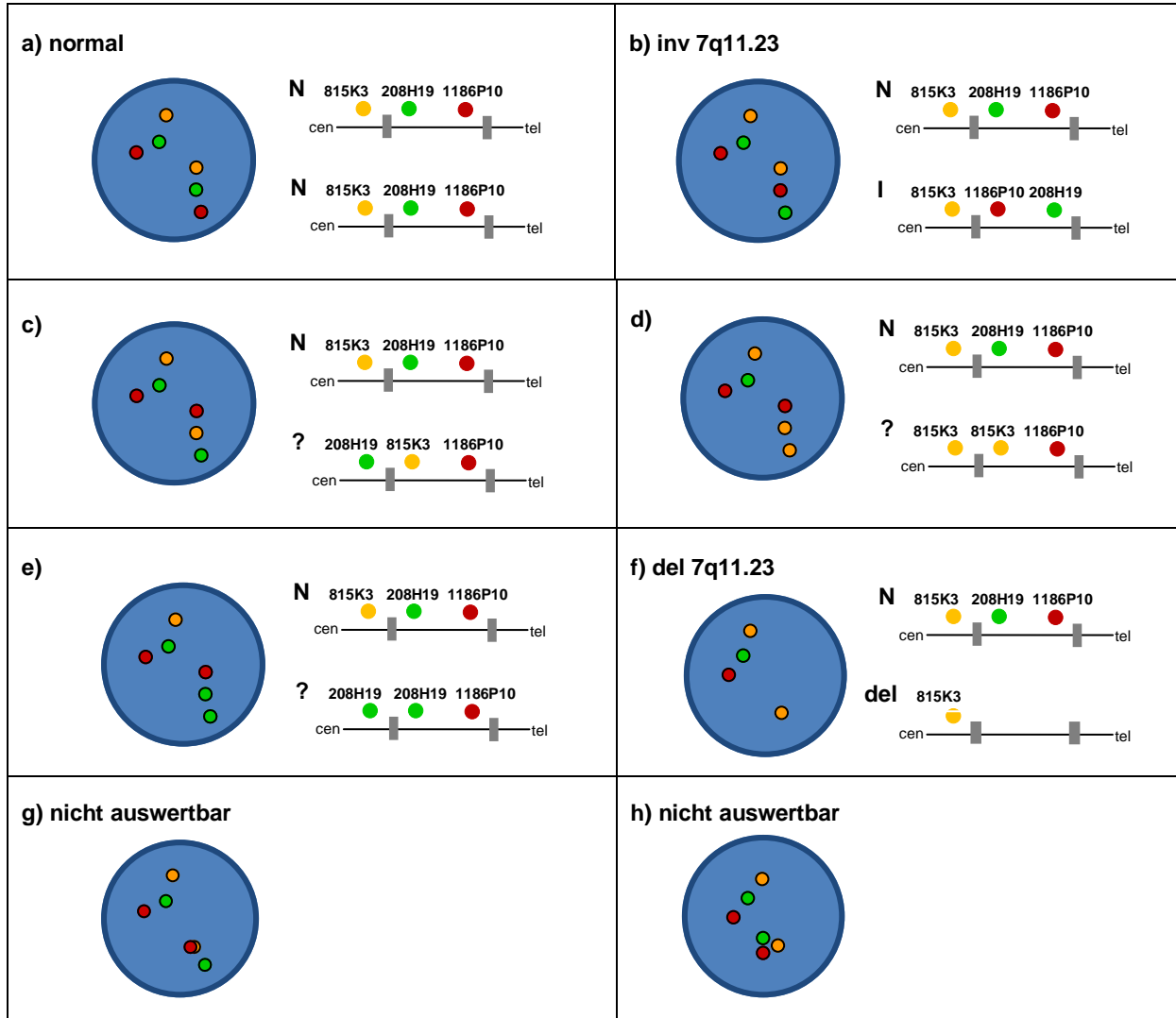


Abbildung 5: Schematische Darstellung aller in den Vorauszählung gefundenen Signalkonstellationen (a-e), WBS-Deletion (f), Beispiele für Konstellationen, die nicht auswertbar sind (g,h); jeweils links: schematisch dargestellter Interphasezellkern mit FISH-Signalkonstellationen der beiden Chromosomen 7, rechts: schematische Darstellung des Abschnittes 7q11.23 mit grober Lage der Sonden und der Kontrollsonde. **a)** Reihenfolge der Signale auf beiden Chromosomen normal. **b)** heterozygote Inversion 7q11.23. **c)** Inversion der Kontrollsonde und der benachbarten Sonde. Es handelt sich nicht um die gesuchte Inversion, da die Kontrollsonde nicht innerhalb der WBS spezifischen Region liegt und somit bei einer Inversion 7q11.23 nicht die Position verändern würde. **d)** scheinbare heterozygote Duplikation der Kontrollsonde RP11-815K3, CTA-208H19 nicht zu sehen. **e)** scheinbare heterozygote Duplikation von CTA-208H19, Kontrollsonde RP11-815K3 nicht zu sehen. **f)** Deletion 7q11.23, WBS **g)** Beispiel für nicht auswertbare Signalkonstellationen, RP11-815K3 (Spectrum Orange) und RP5-1186P10 (Texas Red) liegen quasi übereinander und sind nicht mehr als einzelne Punkte zu identifizieren, bei einem Wechsel in den Goldfilter ist jedoch zu sehen, dass beide Signale vorhanden sind. **h)** Dreieckskonstellation der Signale, zentromerwärts und telomerwärts ist nicht mehr zu unterscheiden, Reihenfolge also nicht feststellbar.

3.1.3 Statistische Auswertung von Kontrollen und Festlegung von Nachweisgrenzen

Vor der Auswertung der Präparate muss festgelegt werden, welche Ergebnisse als Inversion und welche als Normalbefund gewertet werden. Wie in 2.2.11 beschrieben, wurden vor den eigentlich zu untersuchenden Gruppen, Zellen von fünf Kontrollfällen ausgezählt. Zwar wurden von jedem Fall 100 Zellen ausgezählt, für spätere Berechnungen wurden die Ergebnisse jedoch halbiert. So lassen sich die Werte deutlich einfacher mit den Ergebnissen der eigentlichen Auszählung (50 Zellen pro Fall) vergleichen. Mit Hilfe dieser Kontrollfälle wurden zwei kritische Werte (Cut-off) festgelegt. Zum einen wurde ein Wert bestimmt, ab dem eine Probe als normal gewertet werden kann, zum anderen ein Wert, ab dem von einer Inversion ausgegangen werden muss. Für die Berechnung des kritischen Wertes für die Normalfälle wurde zunächst der Mittelwert der normalen Zellen bestimmt und die dazugehörige Standardabweichung ausgerechnet. Es wurde davon ausgegangen, dass die Werte in etwa standardnormalverteilt um den Mittelwert liegen. Dies trifft für den oberen Bereich nicht zu, da bei 50 eine Grenze liegt. Mehr als 50 normale Zellkerne können bei 50 ausgezählten Zellkernen nicht gefunden werden. Da es aber nur von Interesse ist, ab welchem Wert nicht mehr von einem normalen Befund auszugehen ist, wurde nur ein einseitiger kritischer Wert im unteren Bereich festgelegt und der obere Bereich, nahe 50, außer Acht gelassen. Der kritische Wert wurde ausgerechnet als Wert, der drei Standardabweichungen unter dem Mittelwert liegt.

In diesem Fall war der Mittelwert der Anzahl der normalen Zellkerne $\mu = 44,8$, die Standardabweichung der Anzahl der normalen Zellkerne vom Mittelwert $\delta = 1,44$ und die dreifache Standardabweichung $3\delta = 4,32$. Der kritische Wert (Cut-off) also die dreifache Standardabweichung vom Mittelwert ergab $\mu - 3\delta = 40,48$. Alle Fälle mit einer Anzahl an normalen Zellkernen größer/gleich 41 von 50 (entspricht 82 %) wurden als Normalfall gewertet.

Beachtet werden muss allerdings, dass aus einem Ergebnis kleiner dem kritischen Wert (40,48) nicht automatisch geschlossen werden kann, dass es sich um eine Inversion handelt. Deswegen wurde ein zweiter einseitiger kritischer Wert zur Definition einer Inversion bestimmt. Dazu wurde der Mittelwert der Zellkerne mit Inversion in den Vorversuchen bestimmt, $\mu = 1,5$, sowie dessen Standardabweichung $\delta = 1,23$. Der kritische Wert, wurde definiert als die dreifache Standardabweichung über dem Mittelwert aus den Zellkernen mit Inversion ($\mu + 3\delta = 5,19$). Alle Proben mit einer Zahl an Zellkernen mit Inversion über 6 von 50 (entspricht $> 12\%$) wurden als Inversion gewertet.

Fallnummer	Anzahl der Zellkerne mit folgenden Signalkonstellationen					Insg.
	SO SG TR (Normal)	SO TR SG (Inversion)	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	
V1	45	2	1,5	0,5	1	50
V2	44,5	0,5	3,5	1	0,5	50
V3	46	2	0,5	1,5	0	50
V4	42,5	3	1	2,5	1	50
V5	46	0	0,5	2	1,5	50
Mittelwert	44,8	1,5				
Standardabw.	1,44	1,23				
dreifache Standardabw.	4,32	3,69				
Cut-Off Wert	40,48	5,19				

Tabelle 3: Ergebnisse der Vorauszählung von fünf Kontrollen. Angegeben ist die jeweilige Anzahl der Zellkerne mit einer Signalkonstellation. Die Ergebnisse der 100 ausgezählten Zellkerne wurde halbiert. So lassen sich die Werte besser mit den späteren Ergebnissen vergleichen. Bei den eigentlichen Untersuchungsfällen wurden nur 50 Zellkerne ausgewertet. Der berechnete Cut-Off Wert für Zellkerne ohne Veränderung der Signalkonstellation lag bei 40,48, der Cut-Off Wert für Zellkerne mit Inversion bei 5,19.

3.1.4 Exemplarische Aufnahmen von mit Dreifarbf-FISH markierten Interphasezellkernen mit und ohne Inversion

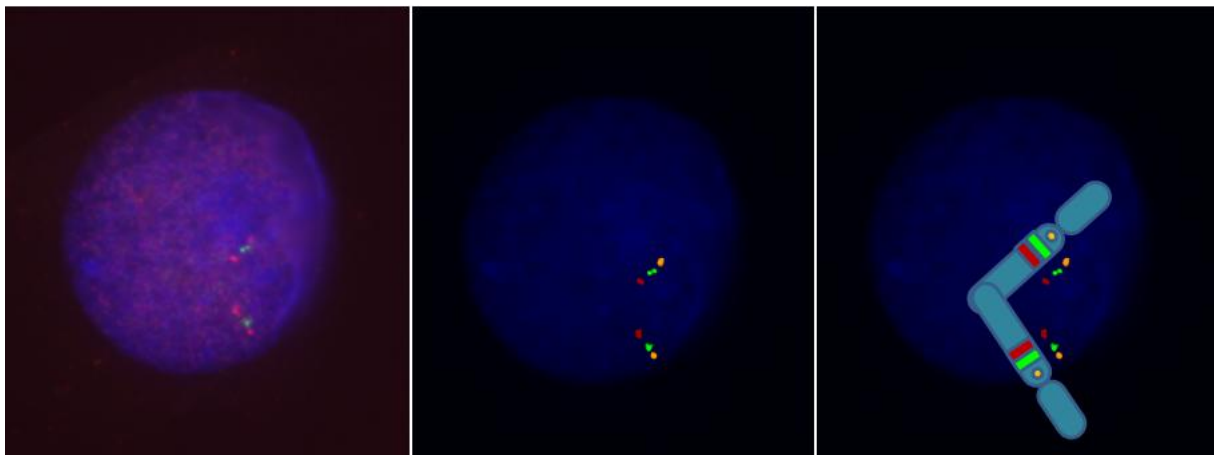


Abbildung 6: Dreifarbf-FISH eines normalen Interphasezellkerns: RP11-815K3 (Spectrum Orange), CTA-208H19 (Spectrum Green), RP5-1186P10 (Texas Red). **links:** originale Zellkerndarstellung **Mitte:** Falschfarbendarstellung **rechts:** Falschfarbendarstellung und schematische Darstellung von Metaphasechromosomen.

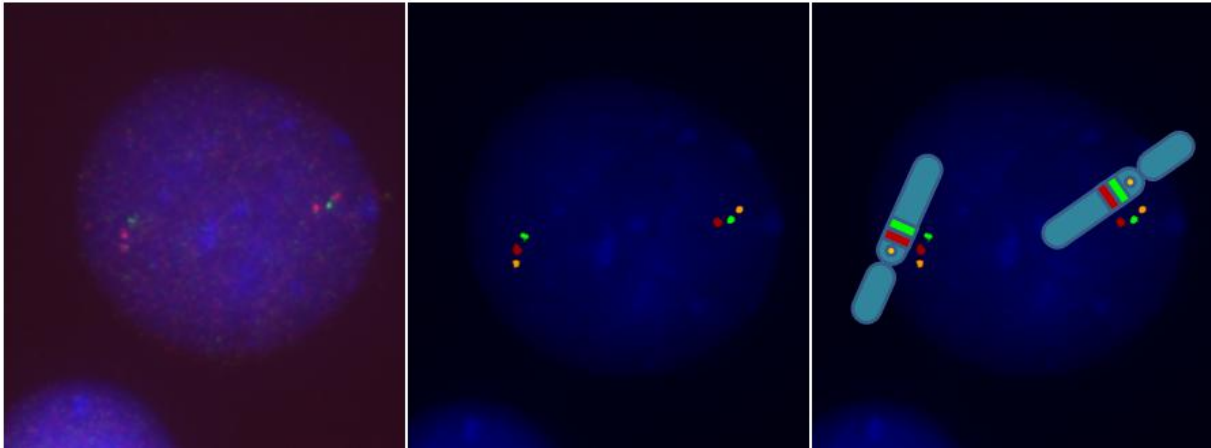


Abbildung 7: Dreifarb-FISH eines Interphasezellkerns mit **Inversion:** RP11-815K3 (Spectrum Orange), CTA-208H19 (Spectrum Green), RP5-1186P10 (Texas Red). **links:** originale Zellkerndarstellung **Mitte:** Falschfarbdarstellung **rechts:** Falschfarbdarstellung und schematische Darstellung von Metaphasechromosomen.

3.2 Patientengruppe

3.2.1 Eltern von Kindern mit Williams-Beuren-Syndrom

Im Rahmen der Studie wurden mit Hilfe der oben erläuterten Technik insgesamt 55 Elternteile untersucht. Um ein repräsentatives Kollektiv zu erhalten, wurden aber für die weiteren Berechnungen nur die Fälle ausgewertet, von denen beide Elternteile untersucht werden konnten. Dies war für 24 Paare möglich, das heißt es flossen 48 Fälle in die Auswertung ein.

In fünf Familien wurde die Inversion auf Chromosom 7q11.23 gefunden. In vier dieser Familien war jeweils einer der Eltern Träger der Inversion. In einer Familie waren sowohl Mutter als auch Vater Träger der Inversion. Das heißt, der Inversionspolymorphismus war in 21 % der Familien bei mindestens einem Elternteil zu finden. Fünf der insgesamt sechs gefundenen Inversionsträger waren männlich.

In allen sechs Inversionsfällen liegt die Zahl der invertierten Zellkerne weit über der anhand der Vorauszählung definierten Grenze von 6. Gleichzeitig liegt die Anzahl an normalen Zellkernen weit unter dem kritischen Wert für normale Fälle von 41. Damit handelt es sich definitionsgemäß um Inversionen.

Familie-Nr.	Geschlecht	Fallnummer	Anzahl der Zellkerne mit folgenden Signalkonstellationen					Insg.
			SO SG TR (Normal)	SO TR SG (Inversion)	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	
5	w	E.5.1	11	37	0	2	0	50
5	m	E.5.2	9	40	0	1	0	50
7	m	E.7.2	14	35	1	0	0	50
12	m	E.12.2	10	33	0	7	0	50
21	m	E.21.2	8	36	0	6	0	50
23	m	E.23.1	7	40	0	3	0	50

Tabelle 4: Ergebnisse der Auszählung der Fälle mit Inversion. Angegeben ist die jeweilige Anzahl der Zellkerne mit einer Signalkonstellation. Die Zahl der invertierten Zellkerne (SO SG TR) liegt jeweils weit über dem kritischen Wert für Inversionen von 6. Gleichzeitig liegt die Anzahl an normalen Zellkernen weit unter dem kritischen Wert für normale Fälle von 41. Damit handelt es sich definitionsgemäß um Inversionen. Komplette Tabelle siehe Anhang (7.1.4).

3.2.2 Kinder mit Williams-Beuren-Syndrom

Bei allen fünf Kindern von Inversionsträgern wurde die Deletion der für das WBS-Syndrom kritischen Region bestätigt. Bei den Kindern, deren Eltern Inversionsträger sind, zeigte sich in 4 Fällen ein zweites normales Chromosom 7. In einem Fall war das zweite Chromosom in 7q11.23 invertiert.

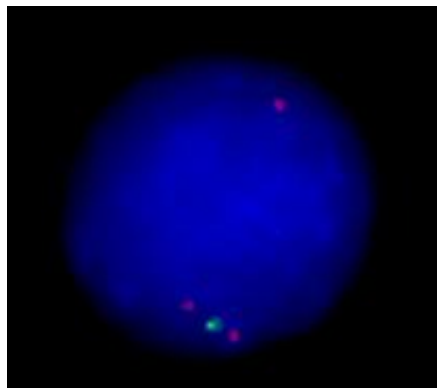


Abbildung 8: Interphasezellkern eines Kindes mit WBS. Auf einem Chromosom 7 (unten) sind alle drei Sonden zu sehen. Die Reihenfolge der Sonden ist normal und es handelt sich somit nicht um eine Inversion. Auf dem zweiten Chromosom 7 (oben) sieht man nur die Kontrollsonde RP11-815K3 (Spectrum Orange), die Sonden innerhalb des WBS spezifischen Bereiches (CTA-208H19 (Spectrum Green) und RP5-1186P10 (Texas Red)) sind nicht zu sehen. Der WBS spezifische Abschnitt ist deletiert.

Familie-Nr.	Geschlecht	Fallnummer	Anzahl an Zellkernen mit folgenden Signalkonstellationen					Insg.
			SO SG TR (Normal)	SO TR SG (Inversion)	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	
5	m	P1	45	3	0	2	0	50
7	m	P2	45	2	0	3	0	50
12	w	P3	46	2	0	2	0	50
21	w	P4	10	30	0	8	2	50
23	m	P5	48	2	0	0	0	50

Tabelle 5: Auflistung der Auszählergebnisse der Kinder mit WBS, deren Eltern Träger des Inversionspolymorphismus sind. Angegeben ist die Anzahl der Zellkerne mit der jeweiligen Signalkonstellation. Die in der Tabelle aufgelisteten Signalkonstellationen entsprechen dem Ergebnis des zweiten, nicht deletierten Chromosoms. In 4 von 5 Fällen war eine normale Konstellation zu sehen. In einem Fall war auf dem zweiten Chromosom eine Inversion zu finden.

Familie- Nr.	FISH –Ergebnis		
	Mutter	Vater	Kind
5	inv	inv	del
7	normal	inv	del
12	normal	inv	del
21	normal	inv	inv
23	normal	inv	del

Tabelle 6: Aufstellung der Familien in denen eine Inversion 7q11.23 gefunden worden ist. Ergebnis der FISH-Untersuchung von jeweils Mutter, Vater und Kind. Rechte Spalte: Karyotyp des Kindes.

3.3 Kontrollgruppen

Fasst man alle drei Kontrollkollektive zusammen, wurden insgesamt 51 Paare untersucht. Davon war bei 7 Paaren jeweils ein Elternteil Inversionsträger. Das entspricht einer Inversionsrate von 13,7 %.

3.3.1 Kontrollgruppe 1

In dem ersten Kontrollkollektiv, Eltern von mindestens zwei gesunden Kindern, fand sich bei 2 von 24 Elternpaaren (8,3 %) bei einem Elternteil die Inversion 7q11.23. Beide Inversionsträger waren männlich. In den beiden Inversionsfällen liegt die Zahl der normalen Zellkerne deutlich unter dem kritischen Wert von 41. Unter den anderen Signalkonstellationen überwiegt die Inversion eindeutig.

In einem Fall wurde ein Mosaik gefunden. 24 Zellkerne waren normal, 23 trugen die Inversion und 3 Zellkerne zeigten eine andere Signalkonstellation. Das Mosaik ist am ehesten postzygotisch entstanden. Das heißt nach der Keimzellverschmelzung ist es zur Inversionsentstehung gekommen, die nicht alle Körperzellen betrifft. Der Fall wurde als nicht invertiert in die Berechnung mit einbezogen, da nicht bekannt ist, ob die Keimzellen der betroffenen Person die Inversion tragen.

Familie-Nr.	Geschlecht	Fallnummer	Anzahl an Zellkernen mit folgenden Signalkonstellationen					Insg.
			SO SG TR (Normal)	SO TR SG (Inversion)	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	
4	M	K1.4.2	8	39	0	3	0	50
7	M	K1.7.2	12	35	0	3	0	50
16	W	K1.16.2	24	23	0	3	0	50

Tabelle 7: Auflistung der Auszählung der Inversionsfälle und einem Mosaik in der Kontrollgruppe 1. Angegeben ist die jeweilige Anzahl der Zellkerne mit einer Signalkonstellation. In den beiden Inversionsfällen (Familie 4 und 7) liegt die Zahl der normalen Zellkerne deutlich unter dem kritischen Wert von 40,48. Betrachtet man die anderen Konstellationen, überwiegt die Inversion (SO TR SG). Die Häufigkeit der übrigen Signalkonstellationen ist gering. In Familie 16 wurde ein Mosaik gefunden, welches in die Berechnung jedoch als normaler Fall eingeht. Komplette Tabelle siehe Anhang (7.1.1).

3.3.2 Kontrollgruppe 2

Bei 4 von 16 Paaren, bei denen vor einer ICSI-Behandlung eine Chromosomenanalyse durchgeführt wurde, zeigte einer der Partner die Inversion der WBS-Region. Das entspricht einer Rate von 25 %. In 3 von 4 der Inversionsfälle war der Inversionsträger männlich.

Die Anzahl der invertierten Zellkerne lag immer weit über dem kritischen Wert von 6. Gleichzeitig liegt die Anzahl an normalen Zellkernen weit unter dem kritischen Wert für normale Fälle von 41. Damit handelt es sich definitionsgemäß um Inversionen.

Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen Infertilität und Inversion zuerkennen, wurden auch die unterschiedlichen Ursachen der Infertilität betrachtet. Bei den drei männlichen Inversionsträgern lag jeweils eine andrologische Sterilität vor, bei der weiblichen Inversionsträgerin fraglich durchgängige Eileiter. Eine tabellarische Zusammenstellung der Infertilitätsursachen findet sich im Anhang (7.3: Tabelle 13).

Familie-Nr.	Geschlecht	Fallnummer	Anzahl an Zellkernen mit folgenden Signalkonstellationen					Insg.
			SO SG TR (Normal)	SO TR SG (Inversion)	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	
2	M	K2.2.2	12	36	0	2	0	50
3	M	K2.3.2	8	39	0	3	0	50
10	W	K2.10.1	5	44	0	1	0	50
11	M	K2.11.1	12	37	0	1	0	50

Tabelle 8: Ergebnisse der Auszählung der Inversionsfälle in der Kontrollgruppe 2. Angegeben ist die jeweilige Anzahl der Zellkerne mit einer Signalkonstellation. Die Anzahl der normalen Zellkerne liegt immer deutlich unter dem kritischen Wert von 40,48. Bei den restlichen Signalkonstellationen überwiegt eindeutig die Inversion. Komplette Tabelle siehe Anhang (7.1.2).

3.3.3 Kontrollgruppe 3

Alle Elternpaare haben ein Kind mit einer chromosomalen Aberration, die aber nicht die Region 7q11.23 betrifft, und des Weiteren mindestens zwei gesunde Kinder. In einer der 11 Familien fand sich bei einem Elternteil die Inversion (9,1 %).

In einem Fall liegt die Anzahl der invertierten Zellkerne über dem kritischen Wert für Inversionen von 6. Gleichzeitig liegt die Anzahl an normalen Zellkernen weit unter dem kritischen Wert für normale Fälle von 41. Damit handelt es sich definitionsgemäß um eine Inversion.

			Anzahl an Zellkernen mit folgenden Signalkonstellationen					Insg.
			SO SG TR (Normal)	SO TR SG (Inversion)	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	
1	W	K3.1.1	8	38	0	3	1	50

Tabelle 9: Ergebnis der Auszählung des Inversionsfall. Angegeben ist die jeweilige Anzahl der Zellkerne mit einer Signalkonstellation. Komplette Tabelle siehe Anhang (7.1.3).

3.4 Vergleich der Häufigkeit der Inversion zwischen den einzelnen Gruppen

Vergleicht man die Ergebnisse der Kontrollgruppe mit denen der Patientengruppe, stellt man fest, dass es in keiner der Kontrollgruppen einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Inversionsraten der Patientengruppe gibt ($p > 0,05$; Fisher exakt Test zweiseitig). Die Nullhypothese kann nicht verworfen werden. Beachtet werden muss jedoch, dass die Fallzahlen statistisch gesehen relativ gering sind.

	insg.	ohne inv	mit inv	mit inv weiblich	mit inv männlich	Anteil mit inv	p-Wert
Eltern von Kinder mit WBS (Paare)	24	19	5	1	5	20,8 %	
Kontrollgruppe: insgesamt (Paare)	51	44	7	2	5	13,7 %	
Kontrollgruppe 1: Paare mit mind. 2 gesunden Kindern	24	22	2	0	2	8,3 %	0,42
Kontrollgruppe 2: Paare vor ICSI-Behandlung	16	12	4	1	3	25,0 %	1,00
Kontrollgruppe 3: Paare mit mind. 2 gesunden Kindern + Kind mit chromosomaler Aberration	11	10	1	1	0	9,1 %	0,64

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Inversionsraten in den einzelnen Gruppen. In einer Familie der Elterngruppe von Kindern mit WBS waren beide Eltern Inversionsträger. Daraus ergeben sich sechs Inversionsträger in fünf betroffenen Familien.

3.5 Geschlechterverteilung der Inversion

Interessant könnte auch sein, ob die Inversion bei beiden Geschlechtern gleich häufig vorkommt. Von insgesamt 13 Inversionsträgern sind 10 männlich. Die Inversionsraten innerhalb eines Geschlechtes, unterscheiden sich allerdings statistisch nicht signifikant. 13,3 % aller in dieser Studie untersuchten Männer sind Träger der Inversion, hingegen nur 4 % der untersuchten Frauen.

	weiblich mit Inversion	männlich mit Inversion	insgesamt jeweils (Inversion + normal)
Patientengruppe	1	5	24
Kontrollgruppe 1	0	2	24
Kontrollgruppe 2	1	3	16
Kontrollgruppe 3	1	0	11
Insgesamt	3	10	75
Inversionsrate je Geschlecht	4,0 %	13,3 %	p= 0,078

Tabelle 11: Zusammenfassende Darstellung der Geschlechterverteilung. Unten: Berechnung der Inversionsrate je Geschlecht. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.6 Segregationsanalyse

Mit Hilfe einer Segregationsanalyse kann festgestellt werden, wie ein Genotyp innerhalb einer Familie vererbt wird. In diesem Fall geht es darum, zu sehen, auf welchem elterlichen Chromosom die Deletion entsteht und ob dieses auch die Inversion trägt.

Blut der Kinder mit WBS, deren Eltern Inversionsträger waren, wurde mit der oben beschriebenen Dreifarbf-FISH untersucht. In vier Fällen zeigte sich auf dem einem Chromosom die WBS typische Deletion, auf dem anderen die normale Reihenfolge. Ein Kind zeigte sowohl eine Deletion als auch eine Inversion.

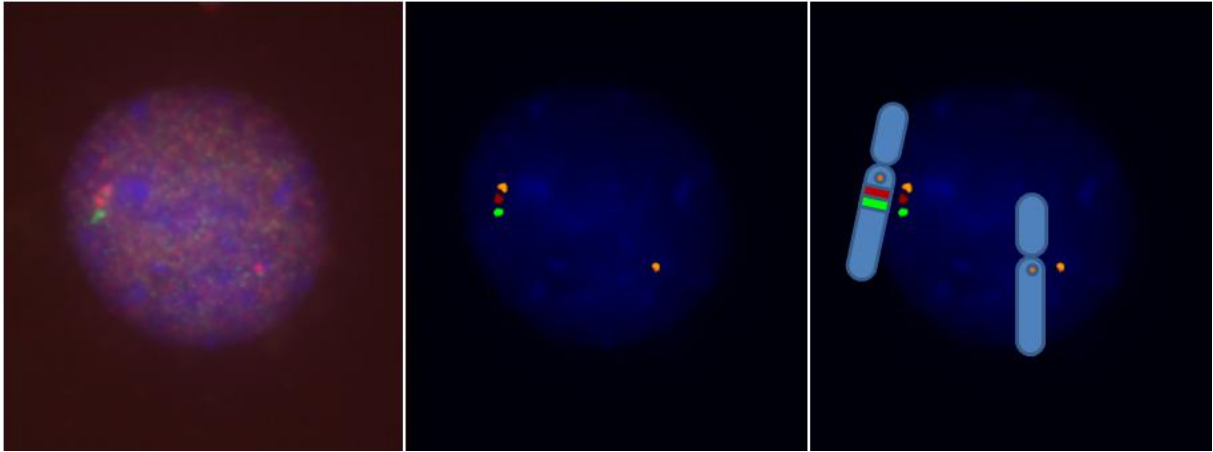


Abbildung 9: Drei-Farb-Interphase-FISH eines Zellkerns mit einer Deletion und einer Inversion von 7q11.23; **links:** originale Zellkerndarstellung **Mitte:** Falschfarbendarstellung **rechts:** Falschfarbendarstellung und schematische Darstellung von Metaphasechromosomen.

4 Diskussion

Im Folgenden werden zunächst die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden kritisch beurteilt, bevor die Ergebnisse dieser Arbeit interpretiert und im direkten Vergleich mit denen vorausgehender Studien diskutiert werden. Außerdem werden noch andere aus der Literatur bekannte Mechanismen erläutert, die zu einer Deletion führen können. Abschließend soll die zentrale Fragestellung dieser Arbeit beantwortet werden.

4.1 Methodenkritik

Wie im Ergebnisteil bereits angedeutet, gab es einige Schwierigkeiten bei der Etablierung und Durchführung der Methode. In der vorliegenden Arbeit wurden Inversionen molekularzytogenetisch nachgewiesen. Dazu wurden zwei Sonden innerhalb der WBS spezifischen Region und eine Kontrollsonde außerhalb gewählt. Die Kontrollsonde dient zur Feststellung der Orientierung der WBS spezifischen Region. Die Grundidee dieses Versuchsaufbaus stammt aus der 2001 von Osborne und Mitarbeitern veröffentlichten Arbeit zum Inversionspolymorphismus (Osborne *et al.*, 2001). Diese Gruppe verwendete die Signalkonstellation „rot gelb grün“. Theoretisch entspricht die Wahl von drei verschiedenen Farben dem Idealfall. Das gelbe Signal lässt sich jedoch nur durch Fusionierung von Spectrum Orange und Spectrum Green erzeugen. Voraussetzung ist, dass die beiden Farbstoffe gleich gut an der Sonde binden und die gleiche Fluoreszenzstärke aufweisen. Da sich aus diesen Bedingungen leichter Fehlinterpretationen der Ergebnisse ergeben können, z.B. durch unvollständige Überlagerung der beiden Signale, wurde in dieser Arbeit auf die Verwendung der Fusionsfarbe gelb verzichtet. Nachdem an Zellkernen ohne die paracentrische Inversion 7q11.23 verschiedene Farbkombinationen getestet worden waren, wurde die Kombination aus RP11-815K3 in Spectrum Orange als Kontrollsonde außerhalb, und CTA-208H19 in Spectrum Green und RP5-1186P10 in Texas Red im WBS spezifischen Bereich verwendet. Im „Breitbandfilter“ gibt diese Kombination ein einfach zu erkennendes Bild, „rot grün rot“. Im Inversionsfall liegen die beiden roten Signale nebeneinander. Nicht immer sieht man die Signale mit einem eindeutigen Abstand. Zwei rote Signale nebeneinander erscheinen leichter als ein Punkt, als zum Beispiel rot und grün, die auch bei geringem Abstand noch als zwei einzelne Punkte zu unterscheiden sind. Können die Signale nicht als zwei einzelne Signale erkannt werden, sieht man auf diesem Chromosom nur zwei Signale. Damit fällt der Zellkern nach der im Ergebnisteil (siehe 3.1.2) definierten Regel, dass nur Zellkerne mit sechs Signalen gezählt (Ausnahme Kinder mit WBS) werden, aus der Wertung. Vor allem bei kleinen Zellkernen, bei denen die Signale dichter aneinander liegen, könnten auf diese Weise einige Zellkerne mit Inversion fälschlicherweise nicht gewertet worden sein. Vielleicht wäre eine andere Reihenfolge der Signale, SO TR Sgr am Normalzellkern, besser auszuwerten. Bei einer Inversion wäre dann die leichter zu erkennende Reihenfolge „rot grün rot“ zu sehen, was vor allem an sehr kleinen Zellkernen eventuell einfacher ist. Zwar hätten die Ergebnisse der einzelnen Auszählungen geringfügig anders

ausfallen können, es ist allerdings zu bezweifeln, dass eine andere Sondenwahl insgesamt zu anderen Ergebnissen geführt hätte.

Nicht optimal ist, dass die in Spectrum Orange und Texas Red markierten Sonden im „Breitbandfilter“ nicht zu unterscheiden sind. Das macht ein dauerndes Umschalten der Filter in den „Goldfilter“ notwendig. Dabei passiert es trotz vorsichtigem Wechseln sehr leicht, dass der Objektträger minimal verwackelt wird, was bei enger Sondenlage dazu führt, dass die Reihenfolge auf dem Bild nicht zu erkennen ist. Durch das dann notwendige mehrmalige Fotografieren blassen die Objektträger jedoch schneller aus.

Ungünstig ist auch, dass die in Texas Red markierte Sonde lichtempfindlicher ist als die beiden anderen. Texas Red bleicht somit als erstes aus. Übrig bleiben Zellkerne mit vier Signalen, die nicht zu werten sind.

Ein kaum zu vermeidendes Problem stellt die Erfahrung des Auswerters dar. Das Auszählen des Dreifarbf-FISH bedarf etwas Übung. Problematisch ist vielleicht, dass die Auszählung der 500 Kontrollzellen, die zur Bestimmung des kritischen Wertes und zur Festlegung der zu zählenden Kombinationen diente, zu einem Zeitpunkt stattfand, an dem noch relativ wenig Erfahrung in der Auswertung bestand.

4.2 Materialkritik

Bereits in der Einleitung wurde an den vorangehenden Studien (Osborne *et al.*, 2001; Bayés *et al.*, 2003; Hobart *et al.*, 2010) bemängelt, dass die Kontrollgruppen wenig repräsentativ gewählt bzw. schlecht beschrieben sind (siehe 1.5). In dieser Arbeit wurde Wert darauf gelegt, eine repräsentative Kontrollgruppe zu untersuchen und diese auch ausreichend genau zu beschreiben. Trotzdem bleiben einige Kritik- bzw. Verbesserungspunkte zur Materialbeschaffenheit und Auswahl.

4.2.1 Kontrollgruppenwahl

Eine Kontrollgruppe sollte ein repräsentatives Vergleichskollektiv darstellen. In diesem Fall, gesunde Paare mit Kindern ohne WBS. Die Kontrollgruppe dieser Arbeit setzt sich aus drei Einzelgruppen zusammen.

Kontrollgruppe 1 besteht aus Paaren mit mindestens zwei gesunden Kindern, entspricht also am ehesten einem repräsentativen Vergleichskollektiv. Problematisch ist aber, dass zwei gesunde Kinder alleine, statistisch gesehen im Grunde noch zu wenige sind, um eine Aussage über Risiken für genetische Erkrankungen zu treffen. Am besten wäre eine Gruppe von Großfamilien, was in Deutschland kaum praktikabel ist.

Kontrollgruppe 2 (Gruppe der Paare die vor einer ICSI Behandlung standen) kann alleine nicht als repräsentativ bezeichnet werden. Alle Paare dieser Gruppe haben aufgrund von unterschiedlichen medizinischen Schwierigkeiten keine oder wenige Kinder.

Die Paare der Kontrollgruppe 3 haben mindestens zwei gesunde Kinder und ein Kind mit einer Chromosomenveränderung. Da diese in keinem Fall die Region 7q11.23 betraf, ist es unwahrscheinlich, dass ein Zusammenhang mit der Entstehung eines WBS besteht. Über eine familiäre Neigung zu genomischer Instabilität ist in der Literatur nichts bekannt. 2006 wurde in einer großen Studie (Ravel *et al.*, 2006), Blut von 10000 Männern hinsichtlich chromosomaler Aberrationen untersucht. Dabei fand sich bei 0,37 % eine Veränderung. In keinem der Fälle traten jedoch bei einer Person mehrere unterschiedliche Veränderungen auf. Männern mit mehreren chromosomalen Veränderungen hätten darauf hinweisen können, dass eine Person mit einer Aberration ein erhöhtes Risiko hat, Träger einer zweiten Aberration zu sein

Die drei Kontrollgruppen zusammengezählt, kommt man in dieser Studie auf eine Fallzahl von 51 Paaren (102 Einzelpersonen). Die Gruppen sind einzeln betrachtet jedoch nicht ausreichend groß und insbesondere Kontrollgruppe 1 sollte größer sein, da diese am ehesten repräsentativ ist. Durch die geringe Fallzahl ist die Power begrenzt, einen echten Effekt festzustellen. Fast man aber die drei Kontrollgruppen zusammen, lässt sich trotzdem eine Aussage über die Inversionshäufigkeit in der Normalbevölkerung treffen.

4.2.2 Zellqualität

Trotz standardisierter Aufarbeitung schwankt die Qualität der Lymphozytensuspensionen. Die Ursachen sind vielfältig und beginnen bereits bei der Blutabnahme. Störende Hintergrundsignale wurden durch Reinigung soweit wie möglich entfernt, lassen sich aber nicht komplett vermeiden und führen zu irritierenden zusätzlichen Signalen. Mit etwas Erfahrung sind diese im Normalfall zwar aufgrund ihrer Größe und Lage von den eigentlichen Signalen zu unterscheiden, können manchmal aber zu Fehlinterpretationen führen.

Ein weiteres Problem ist die Unregelmäßigkeit der Zellkernmorphologie. Sogar innerhalb einer Probe schwanken die Kerngrößen enorm und damit auch die Signalabstände. Auch das Zytoplasma stellt sich immer unterschiedlich dar und ist manchmal bei der Auswertung irritierend. Falls genug Zellkerne vorhanden waren, wurden deshalb nur die größeren und die mit klarem Zytoplasma gewertet.

4.3 Diskussion der eigenen Ergebnisse im Vergleich mit anderen Studien

Im folgenden Absatz werden die Ergebnisse dieser Studie erläutert und mit den Ergebnissen von Osborne *et al.* (2001), Bayés *et al.* (2003) und Hobart *et al.* (2010) verglichen. Dabei werden Patientengruppe vs. Kontrollgruppe, Geschlechterverteilung und die Segregationsanalyse diskutiert. In jedem Unterpunkt werden zunächst die eigenen Ergebnisse, dann die der beiden anderen Studien erwähnt und abschließend ein Vergleich gezogen.

4.3.1 Patientengruppe vs. Kontrollgruppe

4.3.1.1 Eigene Ergebnisse

Zwar wurde in der Patientengruppe tatsächlich eine erhöhte Rate an Inversionen (20,8 %) gefunden, allerdings war die Inversionsrate in der Kontrollgruppe insgesamt auch unerwartet hoch (13,7 %). Vergleicht man die einzelnen Kontrollgruppen mit der Patientengruppe, so stellt man fest, dass die Rate an Trägern der Inversion in zwei Kontrollgruppen niedriger und in einer höher ist. Statistisch gesehen besteht allerdings für keine der einzelnen Gruppen ein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zur Patientengruppe (siehe Tabelle 10). Die Inversionsrate in der Patientengruppe unterscheidet sich somit statistisch nicht signifikant von der der Kontrollgruppe. Allerdings ist die Inversionsrate in der repräsentativsten Kontrollgruppe 1 deutlich niedriger als in Patientengruppe.

4.3.1.2 Vergleich mit anderen Studien

Wie bereits in 1.4.2 erläutert, haben sich bisher drei Studien mit dem Inversionspolymorphismus beim WBS beschäftigt (Osborne *et al.*, 2001; Bayés *et al.*, 2003; Hobart *et al.*, 2010).

Die Inversionsrate in der Patientengruppe dieser Studie liegt mit 20,8 % leicht unter den Inversionsraten in den anderen Studien (Osborne *et al.*, 2001: 33 %; Bayés *et al.*, 2003: 28 %; Hobart *et al.*, 2010: 24,9 %). Vor allem die Studie von Osborne und Mitarbeitern (2001) hat mit 12 Familien eine kleine Patientengruppe. 74 Patienten in der Gruppe von Bayés scheinen viel zu sein, es muss aber betont werden, dass mittels eines molekulargenetischen, indirekten Nachweis an den WBS Patienten auf eine Inversion in der Elterngeneration geschlossen wurde. Nur in vier Fällen ist ein direkter Nachweis der Inversion erfolgt, was einer Inversionsrate von 5,5 % entsprechen würde. Geht man aber davon aus, dass der Rückschluss über die Bt-Blockanordnung korrekt ist, müsste das Ergebnis relativ repräsentativ sein. Nur die zuletzt von Hobart *et al.* (2010) veröffentlichte Arbeit verfügt mit 257 Paaren über ein großes Kollektiv an Eltern von Kindern mit WBS. Deren Inversionsrate von 24,9 % liegt am nächsten an den 20,8 % dieser Studie.

Überraschend sind die unterschiedlich hohen Inversionsraten in der Kontrollgruppe. Osborne und Mitarbeiter (2001) fanden in ihren Kontrollen keine einzige Inversion. Bayés *et al.* (2003) verwendeten als Kontrollgruppe diejenigen Eltern, bei deren Kindern kein indirekter Hinweis auf eine Inversion in der Elterngruppe gefunden worden ist. Die Inversionsrate lag bei 5,7 %, über die Größe der Kontrollgruppe gab es keine eindeutige Aussage. Hobart *et al.* (2010) verwendeten genauso wie Osborne *et al.* (2001) die nicht deletionsübertragenden Eltern als Kontrollgruppe und kamen auf eine Inversionsrate von 5,84 %.

Zwar ist die Kontrollgruppe von Hobart *et al.* (2010) relativ groß, jedoch handelt es sich wie auch bei den anderen beiden Studien um eine von der Patientengruppe abhängige Kontrollgruppe. Die vorliegende Studie verfügt über die Kontrollgruppe mit der genauesten Angabe über die Zusammensetzung. Außerdem besteht zwischen den Probanden der Kontrollgruppe und der

Patientengruppe kein Zusammenhang. Die Inversionsrate von 13,7 % in dieser Studie zeigte eine hohe Prävalenz der Inversion in dem deutschen Kontrollkollektiv, trotzdem bleibt auch in dieser Studie die Fallzahl ein Problem.

	Patientengruppe (Eltern)		Kontrollgruppe	
	ohne inv	mit inv	ohne inv	mit inv
Vorliegende Studie	19 Paare	5 Paare	44 Paare	7 Paare
	→ 20,8 % mit Inversion		→ 13,7 % mit Inversion (alle 3 Kontrollgruppen zusammen)	
2001: Osborne et al. , Toronto; Nature Genetics	8 Paare	4 Paare	42 Personen	0
	→ 33 % mit Inversion		→ 0 % mit Inversion	
2003: Bayés et al. , Barcelona; Am. J. Hum. Gen.	53 Paare	21 Paare	?	?
	→ 28 % mit Inversion		→ 5,7 %	
2010: Hobart et al. , South Alabama; Am. J. Hum. Gen.	Deletionsüberträger		Nicht-Deletionsüberträger	
	193	64	242	15
	→ 24,9 % mit Inversion		→ 5,84 % mit Inversion	

Tabelle 12: Vergleich der Inversionsraten der vorliegenden Studie mit drei anderen Studien (Osborne *et al.*, 2001; Bayés *et al.*, 2003; Hobart *et al.*, 2010). Angegeben sind die Ergebnisse der Patientengruppe, also der Eltern der WBS-Patienten, und die der Kontrollgruppen. In der Studie von Bayés und Mitarbeitern (2003) wurden nicht die Eltern direkt untersucht, sondern es wurde über die Bt-Blockanordnung bei den Kindern auf Inversionen in der Elterngeneration zurückgeschlossen. In der Kontrollgruppe handelt es sich bei Osborne und Mitarbeiter (2001) nicht um Paare sondern um einzelne Personen. Es wurde Blut von 26 nicht näher definierten Probanden verwendet und Blut von 16 Eltern der WBS-Patienten, hier jeweils die nicht deletionsübertragenden. Bayés und Mitarbeiter (2003) verwendeten diejenigen Eltern als Kontrollgruppe, deren Kinder keine Bt-Blockveränderung zeigten, also die Eltern nicht Inversionsträger sind. Zusätzlich untersuchten sie noch nicht näher beschriebene Kontrollen. Hobart und Mitarbeiter (2010) verwendeten als Patientengruppe nur die deletionsübertragenden Elternteile und als Kontrolle die nicht deletionsübertragenden Elternteile.

4.3.2 Geschlechterverteilung der Inversion 7q11.23

Um festzustellen, ob die Inversion vom Geschlecht des Trägers unabhängig ist oder nicht, müssen die Ergebnisse diesbezüglich analysiert werden.

4.3.2.1 Eigene Ergebnisse

Es fällt auf, dass nur 3 von 13 Inversionsträgern weiblich sind (siehe Tabelle 11). Es stellt sich die Frage, ob die Inversion 7q11.23 tatsächlich häufiger bei Männern vorkommt. Fasst man alle Gruppen zusammen, findet sich eine unerwartet hohe Rate an männlichen Inversionsträgern (10 von 75 Männern), während die Rate an weiblichen Inversionsträgern relativ niedrig ist (3 von 75 Frauen). Der Unterschied ist mit einem p-Wert > 0,05 statistisch nicht signifikant (p = 0,078). Es lässt sich also kein signifikanter Zusammenhang zwischen Inversion und Geschlecht feststellen. Es besteht lediglich eine Tendenz zu männlichen Inversionsträgern.

Es könnte auch sein, dass die Inversion zwar bei beiden Geschlechtern auftritt, jedoch bei Männern häufiger zur Deletionsentstehung führt. Das würde bedeuten, dass der Anteil der Inversionen bei Männern in der Gruppe der Eltern von Kindern mit WBS höher sein müsste als in der Kontrollgruppe. Vergleicht man die Prozentsätze, sieht man, dass dies nicht der Fall ist. In der Patientengruppe sind 83,3 % (5 von 6) der Inversionsträger männlich, in den Kontrollgruppen 71,4 % (5 von 7).

4.3.2.2 Vergleich mit anderen Studien

In der Studie von Osborne *et al.* (2001) traten 3 von 4 Inversionsfällen in der Patientengruppe mütterlicherseits und nur einer väterlicherseits auf. In der Kontrollgruppe gab es keine Inversionen. Bayés *et al.* (2003) machten weder in der Patientengruppe noch in der Kontrollgruppe eine Aussage zur Geschlechterverteilung. Die aussagekräftigsten Daten bezüglich der Geschlechterverteilung liefert die Studie von Hobart *et al.* (2010). Es fand sich kein signifikanter geschlechtsbezogener Unterschied der Rate an Inversionen. Die Inversionsrate unter den Frauen betrug 14,4 % (37 von 257), die unter Männern 16,3 % (42 von 257).

In der in dieser Studie untersuchten deutschen Population waren Männer zwar häufiger Inversionsträger als Frauen, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Dieses Ergebnis stimmt mit der von Hobart *et al.* (2010) untersuchten Population überein.

4.3.3 Segregationsanalyse

Mit Hilfe einer Segregationsanalyse kann festgestellt werden, wie ein Merkmal innerhalb einer Familie vererbt wird. In diesem Fall geht es darum zu sehen, auf welchem elterlichen Chromosom die Deletion entsteht, und ob dieses auch die Inversion trägt.

4.3.3.1 Eigene Ergebnisse

Mit dem Dreifarbf-FISH Ansatz lässt sich nicht nachweisen, von welchem Elternteil das Chromosom mit der Deletion 7q11.23 stammt. Betrachtet man die Kombinationsmöglichkeiten aus den elterlichen Chromosomen für den Fall, dass ein Elternteil die parazentrische Inversion der WBS-Region und das Kind die Deletion trägt, so ergeben sich bei dem Kind zwei Möglichkeiten:

1.) Ein Chromosom mit Deletion, das zweite normal. 2.) Ein Chromosom mit Deletion und das zweite mit Inversion (siehe Abbildung 10).

Für den ersten Fall, dass das Kind ein normales Chromosom und eines mit einer Deletion trägt (Abbildung 10: 1), lässt sich mit FISH nichts über die Herkunft der Deletion aussagen. Die Deletion könnte aus dem elterlichen Chromosom mit der Inversion entstanden sein (Abbildung 10: 1b). Genauso gut könnte sie neu entstanden sein und das elterliche Chromosom mit der Inversion wurde nicht weitergegeben (Abbildung 10: 1a, 1c, 1d).

Anders im zweiten möglichen Fall, wenn bei einem Kind auf einem Chromosom die WBS-typische Deletion, auf dem anderen Chromosom eine Inversion nachgewiesen wird (Abbildung 10: 2). Damit ist ein durch die Inversion vermittelter Meiosefehler als Ursache für die Deletion unwahrscheinlich.

Der Elternteil mit Inversion hat das Chromosom 7 mit Inversion direkt weitergegeben (Abbildung 10: 2e), das Chromosom 7 mit der Deletion muss vom anderen Elternteil stammen (Abbildung 10: 2f, 2g). Möglich, wenn auch sehr unwahrscheinlich, wäre, dass die Deletion aus einer Inversion entstanden ist und die Inversion auf dem zweiten Chromosom *de novo* entstanden ist.

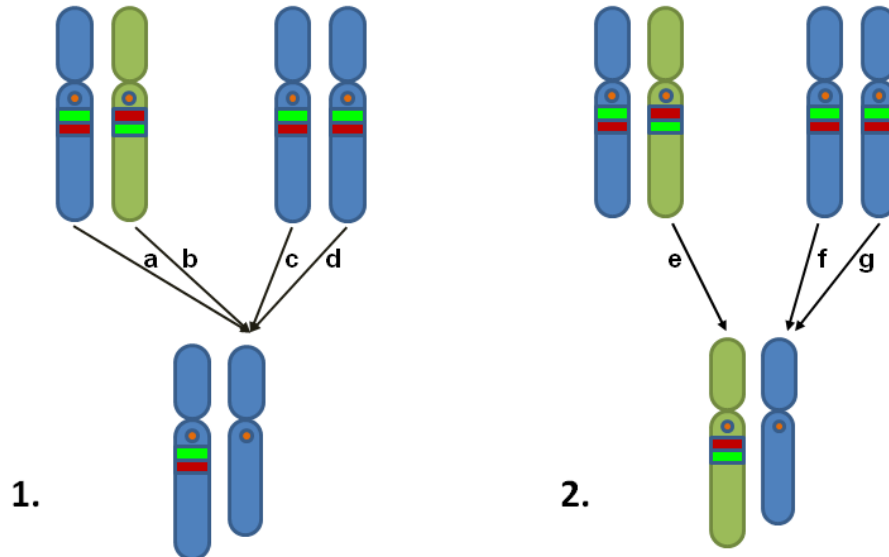


Abbildung 10: Darstellung zur Segregationsanalyse mit Hilfe schematischer Chromosomen. Grün: Chromosom mit Inversion, blau: Chromosom ohne Inversion, blau ohne rot-grün Streifen: Deletion; **1.:** Patient mit Deletion und normalem Chromosom, die Deletion kann entweder *de novo* (a, c, d) oder aus der Inversion entstanden sein (b); **2.:** Patient mit Deletion und Inversion, die Inversion wurde direkt von einem Elternteil weitergegeben, die Deletion muss *de novo* aus einem nicht invertierten Chromosom des anderen Elternteils entstanden sein.

Bei einem von fünf Kindern mit WBS, bei denen einer der Eltern Träger der Inversion ist, wurde sowohl die Deletion als auch eine Inversion 7q11.23 nachgewiesen (siehe 3.6). In diesem Fall scheint die Deletion nicht aus der Inversion in der Elterngeneration, sondern vorständig unabhängig entstanden zu sein. Mit nur einem nachgewiesenen Fall, lässt sich natürlich keine verlässliche Aussage treffen. Es ist jedoch ein Hinweis, dass auch noch andere Mechanismen als der Inversionspolymorphismus eine Rolle spielen.

Aus der Tatsache, dass nur bei einem von fünf Deletionsträgern eine Inversion auf dem zweiten Chromosom zu finden ist, lässt sich nicht rückschließen, dass in den anderen vier Fällen die Deletion aus der Inversion entstanden ist. Denn unabhängig davon, ob die Inversion zu einer Deletion führt oder nicht, beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass das parentale Chromosom mit Inversion überhaupt weitergegeben wird, 50 %. Das bedeutet, dass in 50 % der Fälle, in denen ein WBS Patient auf dem zweiten Chromosom keine Inversion trägt, die Deletion trotzdem aus einem normalen Chromosom entstanden ist (Abbildung 11). Diese Aussage stimmt jedoch nur, wenn die Wahrscheinlichkeit der Deletionsentstehung aus einer Inversion nicht erhöht ist, wie von Osborne und Mitarbeitern und Bayés und Mitarbeitern postuliert. Sonst müsste der Wert entsprechend der Risikoerhöhung korrigiert werden.

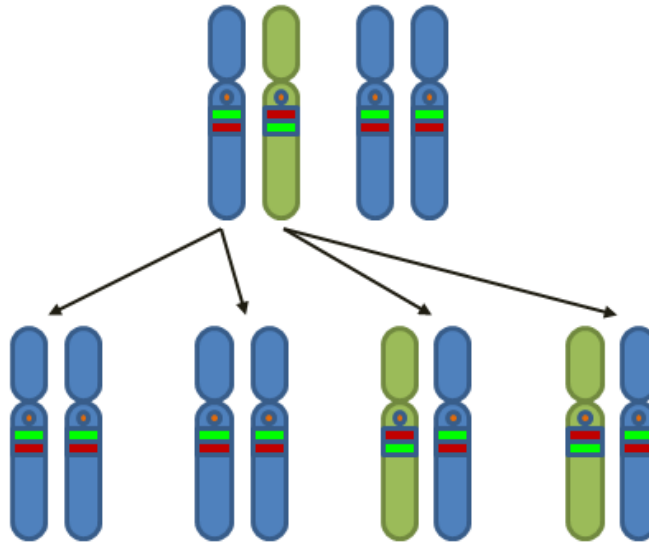


Abbildung 11: Darstellung der Rekombinationsmöglichkeiten elterlicher Chromosomen mit Hilfe von schematischen Chromosomen. Grün: Chromosom mit Inversion, blau: Chromosom ohne Inversion. Wenn ein Elternteil Träger der Inversion ist, ist die Wahrscheinlichkeit 50 %, in der nächsten Generation Träger der Inversion zu sein. Geht die Inversion allerdings mit einem erhöhten Risiko (x) der Deletionsentstehung einher, so sinkt die Wahrscheinlichkeit der Inversionsübertragung auf 50 % -x.

4.3.3.2 Andere Studien

Osborne *et al.* (2001) zeigten mittels Molekulargenetik, dass die Inversion nur bei dem Elternteil auftrat, auf dessen weitergegebenem Chromosom die Deletion entstanden war.

In der Studie von Bayés *et al.* (2003) waren 45 % der Deletionen maternalen, und 55 % paternalen Ursprungs. Alle waren *de novo* Deletionen. Ein eindeutiger Nachweis, dass der Elternteil, auf dessen Chromosom 7 die Deletion entstanden ist, auch wirklich Träger der Inversion7q11.23 war, gelang durch FISH. Allerdings wurde dies in der gesamten Arbeit in fünf Fällen durchgeführt, in den anderen Fällen reichte eine indirekte molekulargenetische Analyse.

Hobart *et al.* (2010) konnten keinen statistisch signifikanten Unterschied in der elterlichen Herkunft des Chromosoms mit Deletion feststellen.

Scherer und Mitarbeiter (2005) untersuchten zwei Familien mit jeweils zwei Kindern mit WBS. Bei einer Familie konnte gezeigt werden, dass bei zwei Geschwistern die Deletion jeweils aus einem elterlichen Chromosom mit Inversion hervorgegangen ist. Daraus wurde gefolgert, dass erstens die beiden Deletionen unabhängige Ereignisse waren (also nicht autosomal von einer Generation an die nächste weitergegeben wurden) und zweitens ein signifikant erhöhtes Risiko besteht, als Inversionsträger ein Kind mit WBS zu bekommen. Gleichzeitig bemerkten die Autoren aber, dass es insgesamt nur sehr wenige Familien mit mehreren betroffenen Kindern gibt und das Risiko, dass eine Deletion entsteht, selbst bei einem Träger der Inversion immer noch sehr gering ist.

4.3.3.3 Vergleich

Zumindest in einem von fünf Fällen gelang es in dieser Studie nachzuweisen, dass die Deletion vermutlich nicht aus der Inversion des Elternteils entstanden ist und deswegen auch noch andere Faktoren als der Inversionspolymorphismus eine Rolle spielen müssen. Im Gegensatz dazu wurde in den anderen Studien gezeigt, dass die Deletion immer aus dem elterlichen Chromosom mit Inversion entstanden ist.

Die Deletionsentstehung scheint unabhängig von der elterlichen Herkunft zu sein, dass heißt sowohl aus väterlichen als auch den mütterlichen Chromosomen kann die Deletion entstehen (Schubert *et al.*, 2008). Es gibt keinen Hinweis für genomische Prägung („imprinting“) innerhalb von 7q11.23. Ein Hinweis dafür wäre, wenn das deletierte Chromosom 7 immer paternaler oder maternaler Herkunft wäre. Von geprägten Genen (imprinted genes) spricht man, wenn nur ein Allel, das väterliche oder mütterliche, aktiv und das andere inaktiv ist. Dies kann zum Beispiel dazu führen, dass eine identische Veränderung auf dem väterlichen und dem mütterlichen Chromosom zu einem phänotypisch unterschiedliches Krankheitsbild führt. Die Inaktivierung erfolgt durch DNA-Methylierung in der frühen Embryogenese (Schubert *et al.*, 2008; Murken, 2006).

4.4 ICSI-Kontrollgruppe: Zusammenhang zwischen Infertilität und Inversion

Auffällig ist die hohe Inversionsrate in der Kontrollgruppe 2 (Paare vor ICSI Behandlung) mit 25 % im Vergleich zu den beiden anderen Kontrollgruppen (8,3 bzw. 9,1 %). Es kommt der Verdacht auf, dass ein Zusammenhang zwischen ungewünschter Kinderlosigkeit und der Inversion 7q11.23 besteht. Die Inversion könnte zu einer fehlerhaften Spermienproduktion oder zu gehäuften sehr frühen Fehlgeburten führen.

Das *FKBP6*-Gen, das innerhalb des WBS spezifischen Bereiches liegt, wird in der Literatur in Zusammenhang mit Infertilität bei Männern gebracht. Das Genprodukt, das FK506-Bindeprotein 6, ist Teil von synaptonemalen Komplexen, die an der Paarung und Rekombination homologer Chromosomen während der Meiose beteiligt sind. Genetische Varianten des synaptonemalen Komplexes könnten eine Rolle bei Infertilität bei Männern spielen (Page und Hawley, 2004).

Männliche Knock-out Mäuse sind aufgrund von Azoospermie infertil, bei weiblichen Mäusen konnte keine Veränderung gezeigt werden (Crackower *et al.*, 2003). Bei Menschen führt eine Mutation im *FKBP6*-Gen nicht zu Azoospermie (Metcalf *et al.*, 2005; Westerveld *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Trotzdem scheint *FKBP 6* auch beim Menschen einen Rolle bei der Spermatogenese zu spielen. Ein Teil des Genes (Allel A) soll bei erhöhter Amplifikation einen protektiven Faktor im Bezug auf Infertilität haben (Zhang *et al.*, 2005). In einer große Studie mit 323 infertilen Patienten, wurde eine signifikante Abnahme des Allels A des *FKBP*-Gens in der Patientengruppe, verglichen mit einer Kontrollgruppe beobachtet. Ein Zusammenhang des *FKBP6*-Gens mit Infertilität bei Männern kann deswegen nicht komplett ausgeschlossen werden (Zhang *et al.*, 2007).

Im Falle einer Inversion verliert das Gen normalerweise nicht seine Funktion. *FKBP6* liegt im zentromeren Bereich des WBS spezifischen Abschnittes und wird bei einer Inversion nicht geteilt. Chromosomale Veränderungen können auch Auslöser für vermehrte Fehlgeburten sein und damit eventuell zu unerwünschter Kinderlosigkeit führen. Es ist möglich, dass Paare, bei denen einer Träger der Inversion ist, ein höheres Risiko für spontane Fehlgeburten haben, aber solche Vermutungen können nur in großen Studien untersucht werden (Scherer *et al.*, 2005). Bayés und Mitarbeiter (2003) vermuteten, dass es bei einem durch die Inversion bedingten Crossing-over innerhalb der Single-Copy-Region (WBS spezifischer Abschnitt) zu einem azentrischen oder dizentrischen Chromosom 7 kommen könnte, was wiederum mit einem erhöhten Risiko für Frühaborte einhergehen würde. In bisherigen Studien konnten keine Hinweise dafür gefunden werden (Bayés *et al.*, 2003; Hobart *et al.*, 2010).

Betrachtet man die Gründe der Infertilität der Paare mit Inversion, handelt es sich bei zwei Männern um primäre andrologische Sterilität (Azoospermie bzw. Oligoasthenozoospermie), bei einem Mann um sekundäre andrologische Sterilität (Oligoasthenozoospermie) und bei einer Frau um fraglich durchgängige Eileiter. Es besteht kein Hinweis auf eine erhöhte Zahl an Frühaborten.

Aufgrund der geringen Fallzahl von 16 Paaren, kann es sich auch um eine zufällige Häufung der Inversionen in der Kontrollgruppe 2 handeln.

4.5 Alternative Theorien zur Deletionsentstehung

Die Entstehung einer Mikrodeletion ist ein komplexer Vorgang, der sich nicht pauschal durch einen Mechanismus erklären lässt. Im weiteren werden drei Mechanismen genannt, die alle mehr oder weniger an der Entstehung des WBS beteiligt sein könnten.

4.5.1 Nicht- allelische homologe Rekombination (NAHR)

Normalerweise kommt es während der Meiose zu einer Rekombination zwischen den gleichen Allelen auf dem Schwesterchromosom bzw. -chromatid. Das heißt, der Austausch findet an exakt gleicher Stelle innerhalb des Genoms statt. Bei der nicht allelischen homologen Rekombination, NAHR kommt es zum Austausch zweier Bereiche, die nicht an identischer Position liegen (nicht allelisch), aber trotzdem homologe, also übereinstimmende Sequenzen beinhalten. NAHR tritt vor allem an so genannten „hotspots“ innerhalb von LCR (low-copy repeats) auf. Diese weisen in der Regel eine Sequenzübereinstimmung von 95 – 97 % auf. Um NAHR zu begünstigen, müssen sie eine bestimmte Länge an identischer DNA aufweisen (MEPS: minimal efficient processing segments). Die notwendige Länge scheint zu schwanken und auch von der Entfernung der LCRs anhängen. Je näher die LCRs aneinander liegen, desto höher ist die Rate an NAHR und desto kürzer können die LCRs sein (Turner *et al.*, 2008; Lupski *et al.*, 1998; Stankiewicz *et al.*, 2002). Liegen die LCRs in derselben Orientierung, kommt es je nach Crossing-over zu Deletionen oder Duplikationen (Abbildung 13). Liegen die LCRs in entgegengesetzter Orientierung, entsteht eine Inversion (Abbildung 14).

Prinzipiell kann es während der Meiose zur Interchromosomen-, Interchromatid- und Intrachromatidrekombination kommen (Abbildung 12). NAHR zwischen Schwesterchromosomen oder -chromatiden kann sowohl zu Deletionen als auch Duplikationen führen. Da bei der Intrachromatidrekombination kein zusätzliches Erbmaterial des anderen Chromosoms oder Chromatids beteiligt ist, kann es hierbei nur zur Deletions- und nicht zur Duplikationsentstehung kommen.

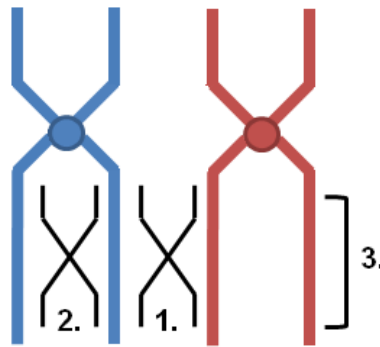


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Crossing-over Möglichkeiten. Die homologen Chromosomen sind blau und rot dargestellt. 1.) interchromosomal 2.) interchromatid 3.) intrachromatid. 2. und 3. können auch als intrachromosomal zusammengefasst werden.

NAHR kann sowohl in der Meiose als auch in der Mitose auftreten. Kommt es während der Meiose zu NAHR, sind die Keimzellen und damit in der nächsten Generation alle Zellen betroffen. Es entsteht eine chromosomale Aberration (Lupski *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2008). NAHR in der Mitose resultiert in einem Mosaik in den Körperzellen. Während der Embryogenese sind je nach Zeitpunkt unterschiedlich viele Zellen betroffen. Auch einige Tumorarten scheinen auf NAHR in Körperzellen zurückzuführen zu sein (Darai-Ramqvist *et al.*, 2008). Meiotische und mitotische NAHR sind zwar eventuell auf dieselben LCRs zurückzuführen, besitzen aber unterschiedliche „Hotspots“ innerhalb der LCRs. NAHR spielt bei vielen Mikrodeletionssyndromen eine entscheidende Rolle und ist einer der wichtigsten Mechanismen, die zu nicht-pathologischen Strukturvarianten führen (Thomas *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2008).

Außer Sequenzidentität, Lage und Größe können auch noch andere Faktoren dabei eine Rolle spielen, dass es an manchen Stellen des menschlichen Genoms gehäuft zu NAHR kommt. *Copy number variants* (CNVs) sind strukturelle Polymorphismen des menschlichen Genoms, das heißt Abweichungen der Anzahl der Kopien bestimmter Abschnitte. Dabei kann die Anzahl der Kopien sowohl erhöht als auch erniedrigt sein. Genome gesunder Personen unterscheiden sich in der Anzahl der Kopien verschiedener DNA Segmenten im Bereich von Kilo- und Megabasen (Flores *et al.*, 2007).

Solche Veränderungen innerhalb der LCRs könnten unterschiedliche Raten an NAHR hervorrufen. Bei der Untersuchung der LCRs, die den WBS kritischen Bereich flankieren, wurden bei 2,22 % der WBS übertragenden Elternteile Duplikationen (Abschnitt zwischen Bc und Bm) gefunden, aber auch bei 1,16 % einer Kontrollgruppe. Dies entspricht keinem statistisch signifikanten Unterschied (Cuscó *et al.*, 2008).

Bei 4,44 % (8 von 180) wurde eine Deletion innerhalb der LCRs gefunden. Die Prävalenz bei Kontrollindividuen war geringer (1 %, n = 600). Daraus wurde geschlossen, dass diese CNV ein prädisponierender Faktor für die Entstehung einer WBS-Deletion ist. Das Risiko ist 4,6 fach erhöht. Cuscó und Mitarbeiter stellten die Theorie auf, dass die Deletion zwischen den Blöcken Cc und Cm die Entstehung der WBS spezifische Deletion erleichtern soll. Dabei soll es, wie bei der Theorie des Inversionspolymorphismus, aufgrund von einer schwierigeren Chromosomenanlagerung zu ungleichem Crossing-over kommen (Cuscó *et al.*, 2008). Fraglich bleibt allerdings, wieso Deletionen innerhalb der LCRs von 7q11.23 die WBS-Deletion begünstigen, Duplikationen aber nicht. Man könnte denken, dass es in beiden Fällen zu ungleichem Crossing-over wegen schwieriger Chromosomenanlagerung kommt. Es gibt Hinweise dafür, dass auch andere CNVs und Polymorphismen innerhalb der LCRs um 7q11.23 existieren und vor allem sehr kleine Veränderungen häufig sind. Ähnliche Veränderungen wurden bereits zentromerwärts von 7q11.23 beschrieben (Scherer *et al.*, 2003; Hillier *et al.*, 2003).

Betrachtet man die WBS spezifische Region 7q11.23, so fällt auf, dass die LCRs sowohl in gleicher als auch entgegengesetzter Orientierung liegen. Alleine durch NAHR zwischen den LCRs lässt sich sowohl die Entstehung der Deletion als auch der Inversion 7q11.23 erklären (Abbildung 13, Abbildung 14). NAHR generiert Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen (Turner *et al.*, 2008). Für die Entstehung des WBS sind nicht zwangsweise Polymorphismen (z.B. Inversionen) oder CNVs im Genom der Elterngeneration notwendig. Bestimmte Veränderungen scheinen allerdings das Basisrisiko zusätzlich zu erhöhen.

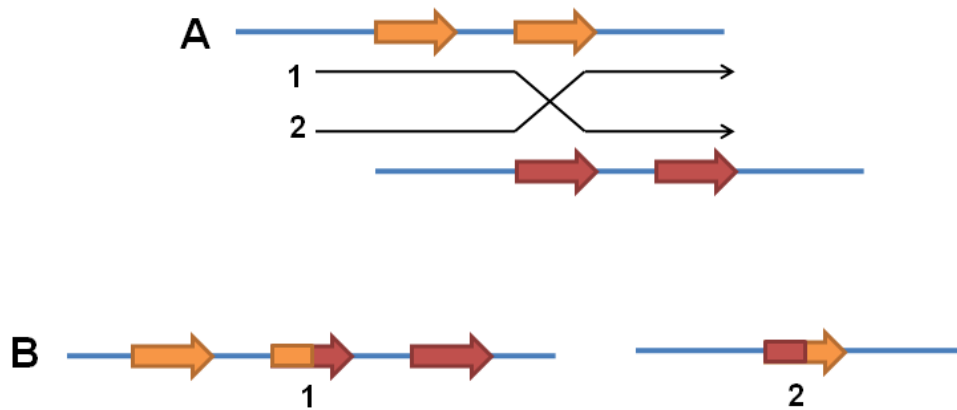


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Möglichkeiten von NAHR zwischen LCRs mit identischer Orientierung. Die repetitiven Sequenzen (LCRs) sind mit Pfeilen dargestellt. Die Farben (orange, rot) geben nur Auskunft über unterschiedliche Herkunft (Chromosom oder Chromatid) und bedeuten nicht, dass die Sequenzen unterschiedlich sind. A) Zwei schematische DNA-Stränge (blau) unterschiedlicher Herkunft (Chromosom oder Chromatid) mit LCRs. Eingezeichnet sind mit schwarzen Pfeilen die Möglichkeiten (1., 2.) des ungleichen Crossing-over (NAHR). B) Einzeldarstellung der neu rekombinierten DNA-Stränge. 1. Ergebnis der NAHR: Duplikation 2. Ergebnis der NAHR: Deletion.

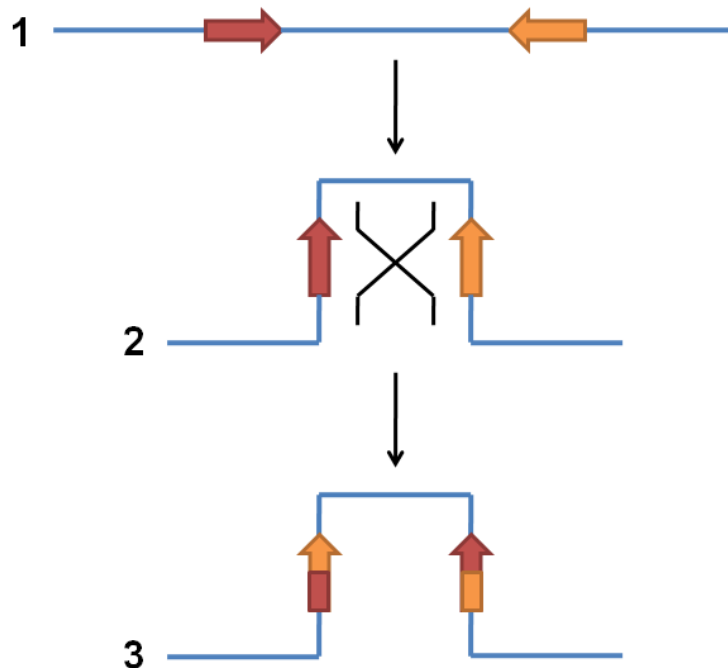


Abbildung 14: Schematische Darstellung von NAHR zwischen zwei invertierten Repeats (gelbe und rote Pfeile). Die Farbe der Pfeile soll lediglich darstellen, dass die Richtung der Repeats unterschiedlich ist. Die Sequenz ist identisch. 1.) DNA-Strang (blau) mit invertierten LCRs 2.) Crossing-Over zwischen invertierten LCRs. DNA-Strang bildet dazu Schleife. 3.) Inversion durch Crossing-Over zwischen invertierten LCRs. Der Bruchpunkt liegt innerhalb der LCRs.

4.5.2 NHEJ (Non-homologous endjoining, Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung)

Ein Mechanismus zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) ist Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ) (Lieber *et al.*, 2008; Murken, 2006). Zur Verknüpfung wird der DSB zunächst detektiert, dann werden die Enden so geschnitten, dass sie in einem letzten Schritt kovalent verknüpft werden können. Die Verknüpfung geht allerdings immer mit Informationsverlust einher. Zwar ist NHEJ im Gegensatz zu NAHR nicht strikt an LCRs gebunden, doch scheint auch hierbei der Genomaufbau eine Rolle zu spielen (Shaw *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2005). Bei großen Deletionen innerhalb der Introns 47 und 48 des Dystrophingens, die in den meisten Fällen der Grund der Muskeldystrophie Typ Duchenne und Becker sind, wurde gezeigt, dass NHEJ eine Rolle spielt. Die Deletionen sind nicht von LCRs umgeben, die Bruchpunkte fallen aber häufig in andere kurze repetitive DNA Elemente (Nobile *et al.*, 2002; Toffolati *et al.*, 2002). Inoue und Mitarbeiter identifizierten zwei NHEJ vermittelte Deletionen des PLP1 (proteolipid protein) Gen auf Xq22 bei Patienten mit der Pelizaeus-Merzbacher Krankheit. Bruchpunktanalysen zeigten, dass der distale Bruchpunkt beider Deletionen innerhalb eines LCRs liegt (Inoue *et al.*, 2002). Shaw und Lupski berichteten von zwei atypischen Smith-Magenis-Syndrom Deletionen, die scheinbar durch NHEJ entstanden sind und bei denen der proximale Bruchpunkt innerhalb von LCRs liegt (Shaw und Lupski, 2005). Auch in den repetitiven Segmenten des WBS-flankierenden Bereiches befinden sich Alu-Elemente (kurze repetitive DNA Abschnitte). Obwohl in der Literatur nichts davon berichtet wird, wäre es möglich, dass NHEJ auch bei der Deletion 7q11.23 zumindest eine untergeordnete Rolle spielt. Speziell bei atypischen WBS Fällen, bei denen der Bruchpunkt nicht immer innerhalb der LCRs liegt, könnte NHEJ als Ursache in Betracht gezogen werden.

4.5.3 FoSTes (Fork Stalling und Template Switching)

Dabei handelt es sich um einen Reparaturvorgang, der vor allem bei der Reparatur von komplexen chromosomalen Veränderungen eine Rolle spielt. FoSTes kann Veränderungen zwischen einzelnen bis zu mehreren hundert Basenpaaren generieren (Zhang *et al.*, 2009). Zwar wird FoSTes nicht direkt an der Entstehung des WBS beteiligt sein, scheint aber ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung von genomischen Varianten zu sein. Diese wiederum können bei der Entstehung des WBS eine entscheidende Rolle spielen. Ähnliches wurde für das Potocki-Lupski-Syndrom (PTLS) und die Charcot-Marie-Tooth Krankheit Typ 1A (CMT1A) gezeigt (Zhang *et al.*, 2009).

4.6 Duplikationen von 7q11.23

Durch NAHR entstehen sowohl Deletionen als auch Duplikationen (siehe 4.5.1). Es besteht der Verdacht, dass zu jeder Deletion eine reziproke Duplikation existiert (Potocki *et al.*, 2000). Duplikationen gehen in aller Regel mit einem milderem Phänotyp einher und werden vermutlich deshalb oft nicht diagnostiziert (Turner *et al.*, 2008).

Im Jahre 2005 wurde das erste Mal ein Patient mit einer *de novo* Duplikation von 7q11.23 beschrieben (Sommerville *et al.*, 2005). Weitere einzelne Fälle folgten. Vor allem von einer starken Sprachentwicklungsstörung, einer leichten globalen Entwicklungsverzögerung und in einigen Fällen Verhaltensauffälligkeiten wie ein Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS), Angststörungen und Autismus wird berichtet (Torniero *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2007). Van der Aa und Mitarbeiter veröffentlichten 2009 erstmals eine Beschreibung des Phänotyps, der bis dahin nicht eindeutig beschrieben werden konnte. Kinder mit einer Duplikation 7q11.23 haben danach typischerweise waagrechte, klar abgegrenzte Augenbrauen, eine hohe breite Nase, eine dünne Oberlippe, tiefliegende Augen, ein kurzes Philtrum sowie eine prominente Stirn. Die Prävalenz kann momentan nur grob auf 1/ 13000-20000 geschätzt werden (Van der Aa *et al.*, 2009).

Nur in einigen Fällen sind Synostosen oder Trigonozephalie mit einer breiten Nase, nach hinten rotierten Ohren, einem hohen Gaumen und kurzen Philtrum manifest. Nur milde, nicht spezifisch erscheinende Veränderungen der Hirnstruktur sind im MRT zu sehen (Torniero *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zum WBS wird bei der reziproken Duplikation häufig eine direkte Übertragung von den Eltern auf das Kind beschrieben. Auffällig ist dabei, dass die Eltern nicht diagnostiziert worden waren und die phänotypischen Merkmale nur sehr schwach ausgeprägt waren. In allen Fällen war jedoch eine Entwicklungsverzögerung in der Kindheit aufgefallen, die im Erwachsenenalter häufig fast verschwunden war. Unklar ist, ob sowohl die Verhaltensauffälligkeiten als auch die phänotypischen Merkmale bis ins Erwachsenenalter verschwinden oder es sich zufällig um Fälle mit mildem Verlauf handelte. Es bleibt zu klären, ob die Duplikation 7q11.23 auch in der Normalbevölkerung gefunden werden kann (Van der Aa *et al.*, 2009).

Untersuchungen von Spermienproben bezüglich Deletions- und Duplikationsraten des WBS-Lokus zeigten eine Deletionsrate von ca. 1/100 000 und Duplikationsraten von 5/1 000 000. Das entspricht einer Deletions-/Duplikationsrate von 2:1. Die höhere Rate an Deletionen könnte durch die hohe Rate an intrachromosomalen Rekombination entstehen, die zwar zu einer Deletion führen, jedoch nicht zu einer Duplikation (siehe 4.5.1) (Turner *et al.*, 2008). Bei der Duplikation 7q11.23 führt interchromosomale Rekombination in neun von 12 Fällen zur Duplikationsentstehung (Van der Aa *et al.*, 2009). Das Verhältnis von interchromosomaler zu intrachromosomaler (interchromatid und intrachromatid) Rekombination beträgt beim WBS 2/1 (Bayés *et al.*, 2003). Berechnet man aus der Keimzellrate für Deletionen die Prävalenz des WBS kommt man auf 1/7500 – 1/25000 (Turner *et al.*, 2008). Dieser Wert stimmt in etwa mit der in 1.1.2 angegebenen, geschätzten Prävalenz überein (Strømme *et al.*, 2002; Greenberg *et al.*, 1990).

4.7 Evolutionäre Veränderungen von 7q11.23

Vermutlich entstanden die LCRs während der letzten 35 Millionen Jahre der menschlichen Evolution. Es wurde gezeigt, dass Alu- Repeats an den Enden der segmentalen Duplikationen zu finden sind (Bailey *et al.*, 2003). Alu- Repeats sind kurze repetitive eingeschobene Kernelemente (SINE: short interspersed nuclear elements) mit weniger als 500 bp Länge. Sie enthalten eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym Alu. Alurepeats sollen für homologe Rekombination prädisponieren. Daraus resultieren variable genetische Veränderungen einschließlich Duplikationen, Deletionen und Translokationen. Die Existenz der Alu- Repeats an den Endstücken der Duplikons spricht dafür, dass die heutige Beschaffenheit der LCRs durch genomische Veränderungen entstanden ist, welche durch Alu repeats begünstigt wurden (Schubert *et al.*, 2008; Antonell *et al.*, 2005). Die außergewöhnlich hohe Rate an evolutionären Veränderungen der Region, die reich an LCRs ist, hat zu wichtigen genomischen Varianten geführt (Antonell *et al.*, 2005).

4.8 Vergleich mit Ursachen für andere Mikrodeletionssyndrome

Bei der Suche nach Theorien, die die Deletionsentstehung bei WBS erklären, ist es sinnvoll auch andere Mikrodeletionen zu betrachten. Bei allen im Folgenden beschriebenen Beispielen von Mikrodeletionssyndromen und deren reziproken Duplikationen spielt NAHR eine entscheidende Rolle. In allen Fällen sind repetitive Sequenzen bekannt. Bei einigen sind weitere Faktoren zur Deletionsentstehung untersucht.

4.8.1 22q11.2 (Di George-Syndrom, Velo-cardio-faciales-Syndrom)

Das häufigste Mikrodeletionssyndrom mit einer Inzidenz von 1/4000 ist die Deletion 22q11.2 (Di George-Syndrom, Velo-cardio-faciales-Syndrom). Der Bereich ist von LCRs umgeben und ungleiches Crossing-over könnte zur Deletions- und auch zur Inversionsentstehung der Region beitragen. Es bestand wie beim WBS der Verdacht, ein Inversionspolymorphismus könnte die Deletionsentstehung begünstigen. Bei Untersuchungen der Eltern von 18 Patienten und einer Kontrollgruppe wurde keine Inversion der Region 22q11.2 gefunden. Dies macht es unwahrscheinlich, dass ein Inversionspolymorphismus eine entscheidende Rolle für die Entstehung der Mikrodeletion 22q11.2 spielt. In der Arbeit von Gebhardt und Mitarbeitern (2002) wurden folgende Gründe genannt, die das Fehlen von Inversionen in der Elterngeneration erklären könnten: 1.) Die Entstehung von Inversionen zwischen invertierten Duplikons ist ein seltenes Ereignis. Die beobachteten Fälle von Inversionspolymorphismus (z.B. WBS) sind Ergebnis einzelner oder weniger Inversionsereignisse im Laufe der Evolution. In der Region 22q11.2 soll es nie zu solch einem Ereignis gekommen sein oder es ist zumindest nicht langfristig in der menschliche DNA verankert worden. 2.) Bestimmte Sequenzen begünstigen homologe Rekombination stärker als andere. 3.) Natürliche Selektion verhindert bestimmte Inversionspolymorphismen. Wenn innerhalb des Duplikonabschnittes ein

funktionales Gen vorhanden ist, kann dessen Funktion durch die Inversion beeinträchtigt sein. Beispiele von Inversionen, bei denen es zu einer Genfehlfunktionen kommt und die Prognose eine schon vorhandene Krankheit verschlechtern, sind das Hunter-Syndrom und Hämophilie A (Gebhardt *et al.*, 2002). Bei der Entstehung der Mikrodeletion 22q11.2 scheint eine maternale Herkunft des deletierten Chromosoms geringfügig häufiger vorzukommen. Der größte Teil der Deletionen (86 %) entsteht durch interchromosomale Rekombination (Thomas *et al.*, 2006).

4.8.2 Olfactory receptor gene cluster region

Die Familie der olfaktorischen Rezeptor (OR)- Gene ist ein Cluster von mindestens 10 Wiederholungen, das auf fast allen menschlichen Chromosomen zu finden ist. Einige Chromosomen enthalten sogar mehrere Cluster. Giglio und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass ungleiches Crossing-Over zwischen zwei OR Gen- Cluster auf Chromosom 8p für chromosomale Veränderungen verantwortlich ist. Es tritt eine invertierte Duplikation der Region auf, *inv dup(8p)*, eine Abweichung im Sinne eines überzähligen Markerchromosom mit nicht balancierter Translokation (*+der(8)(8p23.1pter)*) und einer Deletion 8p. Da die *inv dup (8p)* immer während der mütterlichen Meiose entstanden ist, wurden 8 Mütter von betroffenen Kindern und eine Mutter eines Kindes mit dem Derivatvchromosom untersucht. Bei allen Müttern zeigte sich eine submikroskopische Inversion von 8p. Die Region wird vom OR-Gen-Cluster begrenzt. Der Inversionspolymorphismus war auch bei 26 % der Normalbevölkerung europäischer Herkunft nachzuweisen. Giglio und Mitarbeiter (2001) zogen die Schlussfolgerung, dass Mütter mit einer Inversion von 8p trotzdem nur ein gering erhöhtes Risiko haben, ein Kind mit einer invertierten Duplikation oder einem Derivatvchromosom 8p zu bekommen, da die Heterozygotenrate in der Population hoch ist, die Prävalenz der Veränderungen jedoch gering ist. Außerdem waren in keinem der mindestens 50 beschriebenen Fälle ein Geschwister betroffen (Giglio *et al.*, 2001). Ähnliches könnte auch für das WBS gelten.

4.8.3 HNPP und CMT1A in 17p12

Eine Deletion der 1,5 Mb großen Region 17p12 ist mit dem HNPP (Hereditary neuropathy with liable pressure palsies) assoziiert. Die reziproke Duplikation führt zum Charcot-Marie-Tooth Krankheit Typ 1A (CMT1A) und ist in den meisten Fällen paternaler Herkunft. Ursache ist in beiden Fällen ungleiches Crossing-over (NAHR) zwischen 24 kb großen flankierenden Repeats, den sogenannten CMT1A. Interessanterweise gehen beide mit einer peripheren Neuropathie einher, obwohl das betroffene Gen, *PMP22*, einmal deletiert und einmal dupliziert ist (Lupski *et al.*, 1998; Potocki *et al.*, 2000).

4.8.4 Smith-Magenis- und Potocki-Lupski-Syndrom in 17p11.2

Beim Smith-Magenis-Syndrom (SMS) handelt es sich um eine Mikrodeletion in 17p11.2. In dieser Region sind drei ca. 250 kb lange LCRs zu finden. Die proximalen haben die gleiche Orientierung wie

die kleineren distalen LCRs. Die mittleren LCRs sind entgegengesetzt gerichtet. NAHR zwischen den proximalen und distalen LCRs, also den beiden gleichgerichteten, führt zur typischen ca. 4 Mb großen SMS Deletion. Bei 20 -30 % der Deletionen lag der Bruchpunkt nicht an den proximalen und distalen LCRs. Es wurde von zwei Fällen berichtet, in denen NHEJ für die Deletionsentstehung verantwortlich sein soll (Shaw *et al.*, 2005). Neben der Deletion tritt auch eine Duplikation der Region 17p11.2 auf, nach dem Erstbeschreiber Potocki-Lupski-Syndrom (PTLS) genannt. Es ist das reziproke Ereignis zur Deletion. Es zeigte sich, dass die dup(17)(p11.2p11.2) vor allem während der väterlichen Keimzellreifung entsteht (Potocki *et al.*, 2000).

4.8.5 Prader-Willi/Angelman-Syndrom

Sowohl das Prader-Willi-Syndrom (PWS) als auch das Angelman-Syndrom (AS) haben in 70 -75 % der Fälle als genetische Ursache die Deletion 15q11-q13 (Robinson *et al.*, 1998). „Hotspots“ für NAHR sind bekannt (Christian *et al.*, 1999). Betrifft die Deletion das väterliche Chromosom 15, resultiert das PWS, ist das mütterliche Chromosom 15 betroffen, kommt es zum AS. In ungefähr 2/3 der Fälle war interchromosomale Rekombination Ursache für die Entstehung der Deletion, in 1/3 intrachromosomale (Interchromatid und Intrachromatid) Rekombination (Thomas *et al.*, 2006). Während paternale Deletionen durch beide Mechanismen entstehen, entstehen maternale Rekombinationen deutlich häufiger durch interchromosomale Rekombination (Robinson *et al.*, 1998). Auch bei dem reziproken Duplikationssyndrom scheint Imprinting eine Rolle zu spielen. Der Phänotyp, der mit maternaler Herkunft assoziiert ist, ist deutlich ausgeprägter (Thomas *et al.*, 2006).

4.8.6 Andere Mikrodeletions-/Duplikationssyndrome

Einen anderen Ansatz zur Suche von Mikrodeletions-/Duplikationssyndromen verfolgten Sharp und Mitarbeiter (2005). Sie untersuchten das Genom im Hinblick auf potentielle „hotspots“ für die NAHR. Dazu lokalisierten sie 130 Stellen mit paarweise angeordneten LCRs (Abstand 50 kb bis 10 Mb), die mindestens 10 kb lang sind und > 95 % Sequenzübereinstimmung zeigen (Sharp *et al.*, 2005). Danach untersuchten sie DNA von Kontrollindividuen und Patienten mit idiopathischer mentaler Retardierung und fanden Deletionen an vier Chromosomen Loci (17q21.31, 1q21.1, 15q13 und 15q24). Drei dieser Rekombinationen stellten sich als neue Mikrodeletionssyndrome dar, und weitere Patienten wurden gefunden (Sharp *et al.*, 2006). Die dazugehörigen reziproken Duplikationen wurden bereits teilweise gefunden (Gu *et al.*, 2008).

4.9 Bezug zur Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, zum einen ein deutsches Kollektiv an Eltern von Kindern mit WBS hinsichtlich der parazentrischen Inversion 7q11.23 zu untersuchen. Zum anderen sollte mit gleichen Methoden ein repräsentatives Kontrollkollektiv untersucht werden.

Im einem Kollektiv von 24 deutschen Familien mit WBS waren bei 20,8 % der Paare mindestens ein Elternteil Inversionsträger. Insgesamt fand sich die Inversion in der Kontrollgruppe bei 13,7 % der Paare bei einem Partner. Die Kontrollgruppe war in drei Gruppen unterteilt. In der Gruppe der Eltern von mindestens zwei gesunden Kindern beträgt die Inversionsrate 8,3 %. Überraschend viele Inversionen (25 %) fanden sich in der Gruppe von Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch. Eltern von Kindern mit anderen chromosomalen Aberrationen tragen die Inversion in 9,1 % der Fälle.

Die zentrale Frage dieser Arbeit ist:

Sind Elternpaare von Kindern mit WBS signifikant häufiger Träger einer Inversion 7q11.23 als die Paare der Kontrollgruppe?

In dieser Studie, an einem Kollektiv deutscher Familien, unterscheidet sich die Rate an Inversionen in der Patientengruppe (20,8 %) nicht signifikant ($p > 0,05$) von der der Kontrollgruppe (13,7 %). Eltern von Kindern mit WBS sind, nach den Ergebnissen dieser Studie, somit nicht signifikant häufiger Träger der parazentrischen Inversion 7q11.23. Die Aussagekraft dieser Studie ist aufgrund der geringen Fallzahl jedoch eingeschränkt.

Bei der Suche nach Faktoren, die die Entstehung des WBS begünstigen, ist es sinnvoll auch andere Mikrodeletionssyndrome zu betrachten. So vermutet man auch bei der Deletion 22q11.2 eine Inversion in der Elterngeneration als wichtigen Mechanismus zur Deletionsentstehung. Es konnte aber sowohl in der Elterngruppe als auch in einer Kontrollgruppe keine Inversion gefunden werden. Bei der Entstehung der Deletion müssen daher noch andere Faktoren eine Rolle spielen (Gebhardt *et al.*, 2002).

Am OR- Rezeptor konnten gehäuft Inversionen bei Kindern mit Veränderungen der Region gezeigt werden. Allerdings haben die Mütter mit der Inversion trotzdem nur ein gering erhöhtes Wiederholungsrisiko. Die Heterozygotenrate in der Normalbevölkerung (26 %) ist hoch, die Prävalenz der Veränderung von 8p trotzdem gering (Giglio *et al.*, 2001).

Bayés und Mitarbeiter (2003) beschäftigten sich mit der Frage, wieso das Wiederholungsrisiko unter den Inversionsträgern gering zu sein scheint. Dieses hängt von der Wahrscheinlichkeit ab, wie oft es genau in dieser Region zu einer Fehlanlagerung und ungleichem Crossing-over kommt. Die Absolutrate ist gering. Diese niedrige Rekombinationsrate könnte erklären, wieso das Wiederholungsrisiko (1/500; (Schubert *et al.*, 2008)) für ein Kind mit WBS auch unter Inversionsträgern nicht hoch zu sein scheint (Bayés *et al.*, 2003). Es sind auch nur sehr wenige Familien mit mehreren betroffenen Kindern bekannt (Scherer *et al.*, 2005).

Bei vielen anderen Mikrodeletionssyndromen wurde gezeigt, dass NAHR eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Deletionen und Duplikationen spielt. Über den Mechanismus von NAHR lassen sich Deletionen in Regionen mit LCRs, wie beim WBS, erklären. Für die Entstehung des WBS sind also

nicht zwangsweise Polymorphismen, wie z.B. die Inversion 7q11.23, notwendig. Bestimmte Strukturvarianten machen die Region insgesamt instabil (Turner *et al.*, 2008; Cuscó *et al.*, 2008).

5 Zusammenfassung

Das Williams-Beuren-Syndrom (WBS) gehört zu den Mikrodeletionssyndromen, bei denen ein kleiner DNA-Abschnitt verloren gegangen ist. Leitsymptome sind kraniofaziale Dysmorphiezeichen, eine Entwicklungsverzögerung, ein typisches Persönlichkeitsprofil und kardiovaskuläre Fehlbildungen wie supraaortale Aortenstenosen und periphere Pulmonalstenosen. Bei den meisten Patienten lässt sich eine 1,5 Mb große heterozygote Deletion am langen Arm von Chromosom 7 (7q11.23) nachweisen. Ein wichtiges Gen, das bei der Deletion verloren geht, ist das Elastin-Gen, dessen Verlust zu Veränderungen der Gefäßwände führt und maßgeblich an der Entstehung der kardiovaskulären Veränderungen beteiligt ist. Umgeben ist der Williams-Beuren-Syndrom spezifische Bereich von sogenannten Low-Copy-Repeats, repetitiven Sequenzen aus nahezu identischer DNA.

Im Jahr 2001 wurde erstmals davon berichtet, dass Eltern, deren Kind von einem Williams-Beuren-Syndrom betroffen ist, gehäuft eine Inversion im Bereich der für das Williams-Beuren-Syndrom spezifischen Region aufweisen (Osborne *et al.*, 2001). Das Ergebnis wurde durch weitere Studien bestätigt (Bayés *et al.*, 2003; Hobart *et al.* 2010). Die Vermutung ist, dass es aufgrund der Inversion während der Meiose zu Schwierigkeiten bei der Chromosomenanlagerung und deswegen zu ungleichem Crossing-over mit Deletionsentstehung kommt. Allerdings waren die Kontrollkollektive dieser Arbeiten nicht ausreichend charakterisiert. Die Kontrollgruppen waren teils klein, Angaben zu Geschlecht und Anzahl eventuell gesunder Kinder wurden nicht gemacht.

Es stellt sich die Frage, ob Eltern von Kindern mit Williams-Beuren-Syndrom tatsächlich häufiger Träger der Inversion 7q11.23 sind, oder ob es sich um einen in der Normalbevölkerung vorkommenden, nicht-pathologischen Polymorphismus (Sequenzvariabilität) handelt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Gruppe von Eltern, deren Kind von einem Williams-Beuren-Syndrom betroffen ist, und eine Kontrollgruppe in Hinblick auf die Inversion 7q11.23 untersucht. Wie in den vorausgehenden Studien wurde dazu Dreifarb-Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung verwendet. Die Kontrollgruppe dieser Studie sollte größer und vor allem besser charakterisiert sein.

Es wurde Blut von 24 Elternpaaren, die ein Kind mit Williams-Beuren-Syndrom haben, und von insgesamt 51 Kontrollpaaren untersucht. Die 51 Kontrollpaare setzen sich aus drei Gruppen zusammen: 1.) 24 Elternpaare, die bereits zwei und mehr gesunde Kinder haben 2.) 16 Paare, die kurz vor einer künstlichen Befruchtung standen 3.) 11 Paare, die mindestens zwei gesunde Kinder haben und ein Kind mit einer chromosomalen Aberration, die nicht 7q11.23 betrifft.

Zwar war die Inversionsrate in der Elterngruppe wie erwartet relativ hoch, in 20,8 % war mindestens einer der Partner Träger der Inversion. Überraschenderweise konnte aber auch in der Kontrollgruppe bei 13,7 % der Paare eine Inversion nachgewiesen werden. Dies entspricht keinem statistisch signifikanten Unterschied. Ferner konnte bei einem Kind, dessen eines Elternteil den Inversionspolymorphismus trägt, gezeigt werden, dass das Chromosom 7 mit Deletion mit hoher Wahrscheinlichkeit von dem Elternteil ohne Inversion stammt.

Auffällig ist eine Inversionsrate von 25 % in der Gruppe der Paare mit unerfülltem Kinderwunsch vor künstlicher Befruchtung. Dies lässt zunächst vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen Infertilität und der Inversion 7q11.23 besteht. Dafür findet sich in der aktuellen Literatur allerdings kein Hinweis. Andere Mechanismen wie nicht-allelische homologe Rekombination, begünstigt durch die Low-Copy-Repeats, die die Region flankieren, könnten die Deletionsentstehung auch erklären.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der genomische Aufbau der Region 7q11.23 mit vielen gleichgerichteten aber auch invertierten Sequenzwiederholungen diese instabil und anfällig für strukturelle Veränderungen macht. Die für das Williams-Beuren-Syndrom typische Deletion und die reziproke Duplikation sind Beispiele hierfür. Der Inversionspolymorphismus spielt dabei nach den Ergebnissen dieser Studie eine geringere Rolle als bisher angenommen und eignet sich nur wenig als prognostischer Marker für die Entstehung des Williams-Beuren-Syndroms.

6 Literaturverzeichnis

- Antonell A, Luis de O, Domingo-Roura X, Pérez-Jurado LA (2005): Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23. *Genome Res.* 15(9): 1179-1188.
- Bailey JA, Liu G, Eichler EE (2003): An *Alu* transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. *Am J Hum Genet.* 73(4): 823-834.
- Barth TFE, Bentz M, Leithäuser F, Stilgenbauer S, Siebert R, Schlotter M, Schlenk RF, Döhner H, Möller P (2001): Molecular cytogenetic comparison of mucosa-associated marginal zone B-cell lymphoma and large B-cell lymphoma arising in the gastro-intestinal tract. *Gene Chromosomes Cancer* 31(4): 316-325.
- Bayés M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Pérez Jurado LA (2003): Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet.* 73(1): 131-151.
- Beuren AJ, Aritz J, Harmjanz D (1962): Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation* 26: 1235-1240.
- Black JA, Bonham-Carter RE (1963): Association between aortic stenosis and facies of severe infantile hypercalcaemia. *Lancet* II: 745-749.
- Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH (1999): Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet.* 8(6): 1025-1037.
- Crackower MA, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kikuchi K, Kaneko H, Kobayashi E, Kawai Y, Kozieradzki I, Landers R *et al.* (2003): Essential role of *Fkbp6* in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science.* 300(5623): 1291-1295.
- Cuscó I, Corominas R, Bayés M, Flores R, Rivera-Brugués N, Campuzano V, Pérez-Jurado (2008): Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genome Res.* 18(5): 683-694.
- Darai-Ramqvist E, Sandlund A, Müller S, Klein G, Imreh S, Kost-Alimova M (2008): Segmental duplications and evolutionary plasticity at tumor chromosome break-prone regions. *Genome Res.* 18(3): 370-379.
- Fanconi G, Girardet P, Schlesinger B, Butler N, Black J (1952): Chronic hyperglycemia, combined with osteosclerosis, hyperazotemia, nanism and congenital malformations. *Helv Paediatr Acta* 7(4): 314-349.
- Feldman SE, Klinger E (1963): Short cut calculation of the Fisher-Yates 'exact test'. *Psychometrika* 28: 289-291.
- Flores M, Morales L, Gonzaga-Jauregui C, Domínguez-Vidaña R, Zepeda C, Yañez O, Gutiérrez M, Lemus T, Valle D, Avila MC *et al.* (2007): Recurrent DNA inversion rearrangements in the human genome. *PNAS* 104(15): 6099-6106.
- Francke U (1999): Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. Review. *Hum Mol Genet.* 8(10): 1947-1954.

-
- Gebhardt GS, Devriendt K, Thoelen R, Swillen A, Gewillig M (2002): No evidence for a parental inversion polymorphism predisposing to rearrangements at 22q11.2 in the DiGeorge/Velocardiofacial syndrome. *Eur J Hum Genet.* 11(2): 109-111.
- Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R *et al.* (2001): Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet.* 68(4): 874-883.
- Gosch A, Standing G, Pankau R (1994): Linguistic abilities in children with Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet.* 52(3): 291-296.
- Greenberg F (1990): Williams syndrome professional symposium. *Am J Med Genet* 6 (Suppl): 85-88.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008): Mechanisms for human genomic rearrangements. *Patho Genet* 1(4).
- Heller R, Rauch A, Luttgen S, Schroder B, Winterpacht A (2003): Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome. *J Med Genet* 40(8).
- Hillier LW, Fulton RS, Fulton LA, Graves TA, Pepin KH, Wagner-McPherson C, Layman D, Maas J, Jaeger S, Walker R *et al.* (2003): The sequence of human chromosome 7. *Nature* 424(6945): 157-164.
- Hobart HH, Morris CA, Mervis BC, Pani AM, Kistler DJ, Rios CM, Kimberley KW, Gregg RG, Bray-Ward P (2010): Inversion of the Williams syndrome region is a common polymorphism found more frequently in parents of children with Williams syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 154C(2): 220-228.
- Inoue K, Osaka H, Thurston VC, Clarke JT, Yoneyama A, Rosenbarker L, Bird TD, Hodes ME, Shaffer LG, Lupski JR (2002): Genomic rearrangements resulting in *PLP1* deletion occur by nonhomologous end joining and cause different dysmyelinating phenotypes in males and females. *Am J Hum Genet* 71(4): 838-853.
- Korenberg JR, Chen XN, Hirota H, Lai Z, Bellugi U, Burian D, Roe B, Matsuoka R (2000): VI. Genome structure and cognitive map of Williams syndrome. *J Cogn Neurosci* 12 (1): 89-107.
- Lieber MR (2008): The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem.* 283 (1): 1-5.
- Lightwood R and Stapelton T (1953): Idiopathic hypercalcaemie in infants. *Lancet* 265: 255-256.
- Lupski JR (1998): Charcot-Marie-Tooth disease: Lessons in genetic mechanisms. *Mol. Med.* 4(1): 3-11.
- Lupski (1998): Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *TIG* 14(10): 417-422.
- Lupski JR, Stankiewicz P (2005): Genomic disorders: Molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet.* 1(6): 627-633.
- Metcalfe K, Simeonov E, Beckett W, Donnai D, Tassabehji M (2005): Autosomal dominant inheritance of Williams-Beuren syndrome in a father and son haploinsufficiency for *FKBP6*. *Clin Dysmorphol.* 14(2): 61.
- Meyer-Lindenberg A, Mervis CB, Berman KF (2006): Neural mechanisms in Williams syndrome: a unique window to genetic influences on cognition and behaviour. *Nature* 7: 380-393.

-
- Morris CA, Dilts C, Dempsey SA, Leonard CO, Blackburn B (1988): The natural history of Williams syndrome: Physical characteristics. *J Pediatr.* 113(2): 318–326.
- Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E (2006): 3.2.9.1 Genomisches Imprinting, Taschenlehrbuch Humangenetik, 7. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Nobile C, Toffolatti L, Rizzi F, Simionati B, Nigro V, Cardazzo B, Patarnello T, Valle G, Danieli GA (2002): Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. *Hum Genet* 110(5): 418-421.
- Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, Costa T, Grebe T, Cox S, Tsui LC, Scherer SW (2001): A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet.* 29(3): 321-325.
- Osborne LR, Mervis CB (2007): Rearrangements of the Williams-Beuren syndrome locus: molecular basis and implications for speech and language development. *Expert Rev Mol Med.* 9(15): 1-16.
- Page SL, Hawley RS (2004): The genetics and molecular biology of the synaptomenal complex. *Ann Rev Cell Dev Biol* 20: 525-558.
- Pankau R, Partsch CJ, Winter M, Gosch A, Wessel A (1996): Incidence and Spectrum of Renal Abnormalities in Williams-Beuren Syndrome. *Am J Med Genet.* 63(1): 301-304.
- Pérez Jurado AL (2003): Williams-Beuren syndrome: a model of recurrent genomic mutation. *Horm Res.* 59(Suppl.1): 106-113.
- Potocki L, Chen KS, Park SS, Osterholm DE, Withers MA, Kimonis V, Summers AM, Meschino WS, Anyane-Yeboa K, Kashork CD, Shaffer LG, Lupski JR (2000): Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet.* 24(1): 84-87.
- Ravel C, Berthaut I, Bresson JL, Siffroi JP and the Genetics Commission of the French Federation of CECOS (2006): Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically normal and fertile adult males: large-scale survey of over 10000 sperm donor karyotypes. *Hum Reprod.* 21(6): 1484-1489.
- Robinson WP, Dutly F, Nicholls RD, Bernasconi F, Peñaherrera M, Michaelis RC, Abeliovich D, Schinzel AA (1998): The mechanisms involved in formation of deletions and duplications of 15q11-q13. *J Med Genet.* 35(2): 130-136.
- Sachs L (1997): *Angewandte Statistik*, Springer, Kap. 467.
- Santer R, Pankau R, Schaub J (1996): Williams-Beuren Syndrome and Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 23(3): 339-340.
- Scherer SW, Cheung J, MacDonald JR, Osborne LR, Nakabayashi K, Herbrick JA, Carson AR, Parker-Katirae L, Skaug J, Khaja R (2003): Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* 300(5620): 767-772.
- Scherer WS, Gripp KW, Lucena J, Nicholson L, Bonnefont JP, Pérez-Jurado LA, Osborne LR (2005): Observation of parental inversion variant in a rare Williams-Beuren syndrome family with two affected children. *Hum Genet.* 117(4): 383-388.
- Schubert C (2009): The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. Review. *Cell Mol Life Sci.* 66(7): 1178-1197.

-
- Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R (2006): Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet.* 38(9): 1038-1042.
- Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Ze, Bailey JA, Vallente RU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Se Graves R *et al.* (2005): Segmental duplications and copy-number variation in human genome. *Am J Hum Genet.* 77(1): 78-88.
- Shaw CJ, Lupski JR (2004): Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet Suppl.* 13(1): R57-64.
- Shaw CJ, Lupski JR (2005): Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Hum Genet* 116(1-2): 1-7.
- Siebert R und Weber-Matthiesen K (1997): Fluorescence in situ hybridization as a diagnostic tool in malignant lymphomas. *Histochem Cell Biol.* 108(4-5):391-402.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346(6281):240-244.
- Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Perez-Jurado LA *et al.* (2005): Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams–Beuren locus. *N Engl. J Med.* 353(16): 1694–1701.
- Stankiewicz P, Lupinski JR (2002): Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* 18(2): 74-82.
- Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K (2002): Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol.* 17(4): 269-271.
- Thomas NS, Durkie M, Potts G, Sandford R, Van Zyl B, Youings S, Dennis NR, Jacobs PA (2006): Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11. *Eur J Hum Genet.* 14(7): 831-837.
- Toffolatti L, Cardazzo B, Nobile C, Danieli GA, Gualandi F, Muntoni F, Abbs S, Zanetti P, Angelini C, Ferlini A *et al.* (2002): Investigating the mechanism of chromosomal deletion: characterization of 39 deletion breakpoints in introns 47 and 48 of the human dystrophin gene. *Genomics* 80(5): 523-530.
- Torniero C, Dalla Bernadina B, Novara F, Cerini R, Bonaglia C, Pramparo T, Ciccone R, Guerrini R, Zuffardi O (2008): Dysmorphic features, simplified gyral pattern and 7q11.23 duplication reciprocal to the Williams-Beuren deletion. *Eur J Hum Genet.* 16(8): 880-887.
- Turner D, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter N, Blayney M, Beck S, Hurles M (2008): Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat Genet* 40(1): 90-95.
- Valero MC, de Luis O, Cruces J, Perez Jurado LA (2000): Fine-scale comparative mapping of the human 7q11.23 region and the orthologous region on mouse chromosome 5G: the low-copy repeats that flank the Williams-Beuren syndrome deletion arose at breakpoint sites of an evolutionary inversion(s). *Genomics* 69(1): 1-13.

Van der Aa N, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, Romano C, Delle Chiaie B, Mortier G, Menten B *et al.* (2009): Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet.* 52(2-3): 94-100.

Wessel A, Pankau R, Kececioglu D, Ruschewski W, Bürsch JH (1994): Three decades of follow-up of aortic and pulmonary vascular lesions in the Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet.* 52(3): 297-301.

Wessel A, Motz R, Pankau R, Bürsch JH (1997): Arterielle Hypertension und Blutdruckprofil bei Patienten mit Williams-Beuren-Syndrom. *Zeitschrift für Kardiologie* 86(4): 251-257.

Westerveld GH, Repping S, Lombardi MP, Veen van der F (2005): Mutations in the chromosome pairing gene *FKBP6* are not a common cause of non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod.* 11(9): 673-675.

Williams JC, Baratt-Boyes BG, Lowe JB (1961): Supravalvular aortic stenosis. *Circulation* 24: 1311-1318.

Winter M, Pankau R, Amm M, Gosch A, Wessel A (1996): The spectrum of ocular features in the Williams-Beuren syndrome. *Clinical Genetics* 49(1): 28-31.

Zhang W, Zhang SZ, Xiao CY, Yang Y, Ma YX, Cheng L, A ZC, He GP, Shi JJ (2005): Possible association between 278C/A single nucleotide polymorphism of *FKBP6* and idiopathic azoospermia. *Chinese Journal of Medical Genetics* 22(1): 10-13.

Zhang W, Zhang S, Xiao CY, Yang Y, Zhoucun A (2007): Mutation screening of the *FKBP6* gene and its association study with spermatogenic impairment in idiopathic infertile men. *Reproduction* 133(2): 511-516.

Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish, Lupski JR (2009): The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nature Genetics* 41(7): 849-853.

7 Anhang

7.1 Komplette Ergebnislisten

7.1.1 Kontrollgruppe 1

Familie- Nr.	Geschlecht	Fallnummer	SO SG TR	SO TR SG	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	Insg.
1	w	K1.1.1	43	3	0	4	0	50
1	m	K1.1.2	48	1	0	1	0	50
2	w	K1.2.1	45	3	0	2	0	50
2	m	K1.2.2	45	2	0	3	0	50
3	w	K1.3.1	45	2	0	3	0	50
3	m	K1.3.2	44	2	0	4	0	50
4	w	K1.4.1	44	3	0	3	0	50
4	m	K1.4.2	8	39	0	3	0	50
5	w	K1.5.1	45	2	0	3	0	50
5	m	K1.5.2	46	2	0	2	0	50
6	w	K1.6.1	44	3	0	3	0	50
6	m	K1.6.2	42	4	0	4	0	50
7	w	K1.7.1	42	4	0	4	0	50
7	m	K1.7.2	12	35	0	3	0	50
8	w	K1.8.1	42	5	0	3	0	50
8	m	K1.8.2	44	3	0	3	0	50
9	w	K1.9.1	46	2	0	2	0	50
9	m	K1.9.2	42	5	0	3	0	50
10	m	K1.10.1	45	2	0	3	0	50
10	w	K1.10.2	45	3	0	2	0	50
11	w	K1.11.1	43	4	0	3	0	50
11	m	K1.11.2	45	2	0	3	0	50
12	w	K1.12.1	43	4	0	3	0	50
12	m	K1.12.2	41	6	0	3	0	50
13	w	K1.13.1	42	5	0	3	0	50
13	m	K1.13.2	44	2	0	4	0	50
14	m	K1.14.1	45	2	0	3	0	50
14	w	K1.14.2	45	2	0	3	0	50
15	w	K1.15.1	46	1	0	3	0	50
15	m	K1.15.2	45	3	0	2	0	50
16	m	K1.16.1	47	1	0	2	0	50
16	w	K1.16.2	24	23	0	3	0	50
17	m	K1.17.1	45	2	0	3	0	50
17	w	K1.17.2	44	3	0	3	0	50
18	m	K1.18.1	44	3	0	3	0	50
18	w	K1.18.2	46	2	0	2	0	50
19	w	K1.19.1	43	4	0	3	0	50
19	m	K1.19.2	44	3	0	3	0	50
20	m	K1.20.1	45	0	0	5	0	50
20	w	K1.20.2	42	6	0	2	0	50
21	w	K1.21.1	43	4	0	3	0	50
21	m	K1.21.2	45	3	0	2	0	50
22	m	K1.22.1	45	3	0	2	0	50
22	w	K1.22.2	44	1	0	5	0	50
23	w	K1.23.1	44	3	0	3	0	50

23	m	K1.23.2	45	3	0	2	0	50
24	w	K1.24.1	41	5	0	4	0	50
24	m	K1.24.2	45	3	0	2	0	50

7.1.2 Kontrollgruppe 2

Familie- Nr.	Geschlecht	Fallnummer	SO SG TR	SO TR SG	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	Insg.
1	m	K2.1.1	43	4	0	3	0	50
1	w	K2.1.2	47	1	0	2	0	50
2	w	K2.2.1	47	1	0	2	0	50
2	m	K2.2.2	12	36	0	2	0	50
3	w	K2.3.1.	48	1	0	1	0	50
3	m	K2.3.2	8	39	0	3	0	50
4	w	K2.4.1	46	1	0	3	0	50
4	m	K2.4.2	46	2	0	2	0	50
5	w	K2.5.1	47	1	0	2	0	50
5	m	K2.5.2	47	1	0	2	0	50
6	w	K2.6.1	45	2	0	3	0	50
6	m	K2.6.2	46	2	0	2	0	50
7	w	K2.7.1	46	1	0	3	0	50
7	m	K2.7.2	46	2	0	2	0	50
8	w	K2.8.1	46	1	0	3	0	50
8	m	K2.8.2	46	3	0	1	0	50
9	w	K2.9.1	48	1	0	1	0	50
9	m	K2.9.2	47	1	0	2	0	50
10	w	K2.10.1	5	44	0	1	0	50
10	m	K2.10.2	46	2	0	1	1	50
11	m	K2.11.1	12	37	0	1	0	50
11	w	K2.11.2	47	1	0	2	0	50
12	w	K2.12.1	46	2	0	2	0	50
12	m	K2.12.2	46	1	0	3	0	50
13	w	K2.13.1	46	2	0	2	0	50
13	m	K2.13.2	45	2	0	1	2	50
14	w	K2.14.1	45	2	0	3	0	50
14	m	K2.14.2	44	3	0	3	0	50
15	m	K2.15.1	46	2	0	2	0	50
15	w	K2.15.2	45	1	0	4	0	50
16	w	K2.16.1	47	2	0	1	0	50
16	m	K2.16.2	47	1	0	1	1	50

7.1.3 Kontrollgruppe 3

Familie- Nr.	Geschlecht	Fallnummer	SO SG TR	SO TR SG	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	Insg.
1	w	K3.1.1	8	38	0	3	1	50
1	m	K3.1.2	47	1	0	2	0	50
2	w	K3.2.1	45	2	0	3	0	50
2	m	K3.2.2	47	1	0	2	0	50
3	w	K3.3.1	48	1	0	1	0	50
3	m	K3.3.2	45	2	0	3	0	50
4	m	K3.4.1	46	1	0	3	0	50

4	w	K3.4.2	45	2	0	3	0	50
5	w	K3.5.1	45	2	0	3	0	50
5	m	K3.5.2	47	0	0	3	0	50
6	w	K3.6.1	46	2	0	2	0	50
6	m	K3.6.2	47	1	0	2	0	50
7	w	K3.7.1	45	1	0	4	0	50
7	m	K3.7.2	47	2	0	1	0	50
8	w	K3.8.1	42	4	0	4	0	50
8	m	K3.8.2	48	1	0	1	0	50
9	m	K3.9.1	47	1	0	3	0	51
9	w	K3.9.2	46	0	0	4	0	50
10	w	K3.10.1	44	2	0	4		50
10	m	K3.10.2	47	1	0	2	0	50
11	w	K3.11.1	48	1	0	1	0	50
11	m	K3.11.2	47	1	0	2	0	50

7.1.4 Eltern von Kindern mit WBS

Familie- Nr.	Geschlecht	Fallnummer	SO SG TR	SO TR SG	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	Insg.
1	m	E.1.1	44	1	2	3	0	50
1	w	E.1.2	46	2	2	0	0	50
2	m	E.2.1	45	1	1	2	1	50
2	w	E.2.2	46	2	1	1	0	50
3	w	E.3.1	42	3	1	3	1	50
3	m	E.3.2	42	2	1	5	0	50
4	w	E.4.1	46	1	0	3	0	50
4	m	E.4.2	46	2	0	2	0	50
5	w	E.5.1	11	37	0	2	0	50
5	m	E.5.2	9	40	0	1	0	50
6	w	E.6.1	46	1	3	0	0	50
6	m	E.6.2	47	1	0	2	0	50
7	w	E.7.1	46	1	0	3	0	50
7	m	E.7.2	14	35	1	0	0	50
8	w	E.8.1	48	2	0	0	0	50
8	m	E.8.2	42	4	0	3	1	50
9	w	E.9.1	48	1	0	1	0	50
9	m	E.9.2	45	2	0	3	0	50
10	w	E.10.1	49	1	0	0	0	50
10	m	E.10.2	46	3	0	1	0	50
11	w	E.11.1	47	2	1	0	0	50
11	m	E.11.2	44	2	0	4	0	50
12	w	E.12.1	42	4	0	4	0	50
12	m	E.12.2	10	33	0	7	0	50
13	m	E.13.1	45	2	0	3	0	50
13	w	E.13.2	47	1	0	1	1	50
14	w	E.14.1	46	2	0	2	0	50
14	m	E.14.2	42	3	1	4	0	50
15	w	E.15.1	47	1	0	1	1	50
15	m	E.15.2	46	2	0	2	0	50
16	w	E.16.1	46	2	0	2	0	50
16	m	E.16.2	45	3	0	2	0	50
17	m	E.17.1	46	2	0	2	0	50

17	w	E.17.2	46	0	0	3	1	50
18	w	E.18.1	46	2	0	2	0	50
18	m	E.18.2	46	1	0	3	0	50
19	w	E.19.1	47	1	0	2	0	50
19	m	E.19.2	47	1	0	2	0	50
20	w	E.20.1	45	3	0	2	0	50
20	m	E.20.2	47	1	0	2	0	50
21	w	E.21.1	41	6	0	3	0	50
21	m	E.21.2	8	36	0	6	0	50
22	w	E.22.1	45	3	0	2	0	50
22	m	E.22.2	44	2	0	4	0	50
23	m	E.23.1	7	40	0	3	0	50
23	w	E.23.2	45	3	0	2	0	50
24	w	E.24.1	45	2	0	3	0	50
24	m	E.24.2	42	6	0	2	0	50

7.1.5 Kinder mit WBS

Familie- Nr.	Geschlecht	Fallnummer	SO SG TR	SO TR SG	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	Insg.
5	m	P1	45	3	0	2	0	50
7	m	P2	45	2	0	3	0	50
12	w	P3	46	2	0	2	0	50
21	w	P4	10	30!	0	8	2	50
23	m	P5	48	2	0	0	0	50

7.1.6 Vorversuche

Fallnummer	Normal	Inversion	SO SG SG	SG SO TR	SG SO SO	Insg.
	SO SG TR	SO TR SG				
V1	45	2	1,5	0,5	1	50
V2	44,5	0,5	3,5	1	0,5	50
V3	46	2	0,5	1,5	0	50
V4	42,5	3	1	2,5	1	50
V5	46	0	0,5	2	1,5	50

7.2 Fluoreszenzfilter

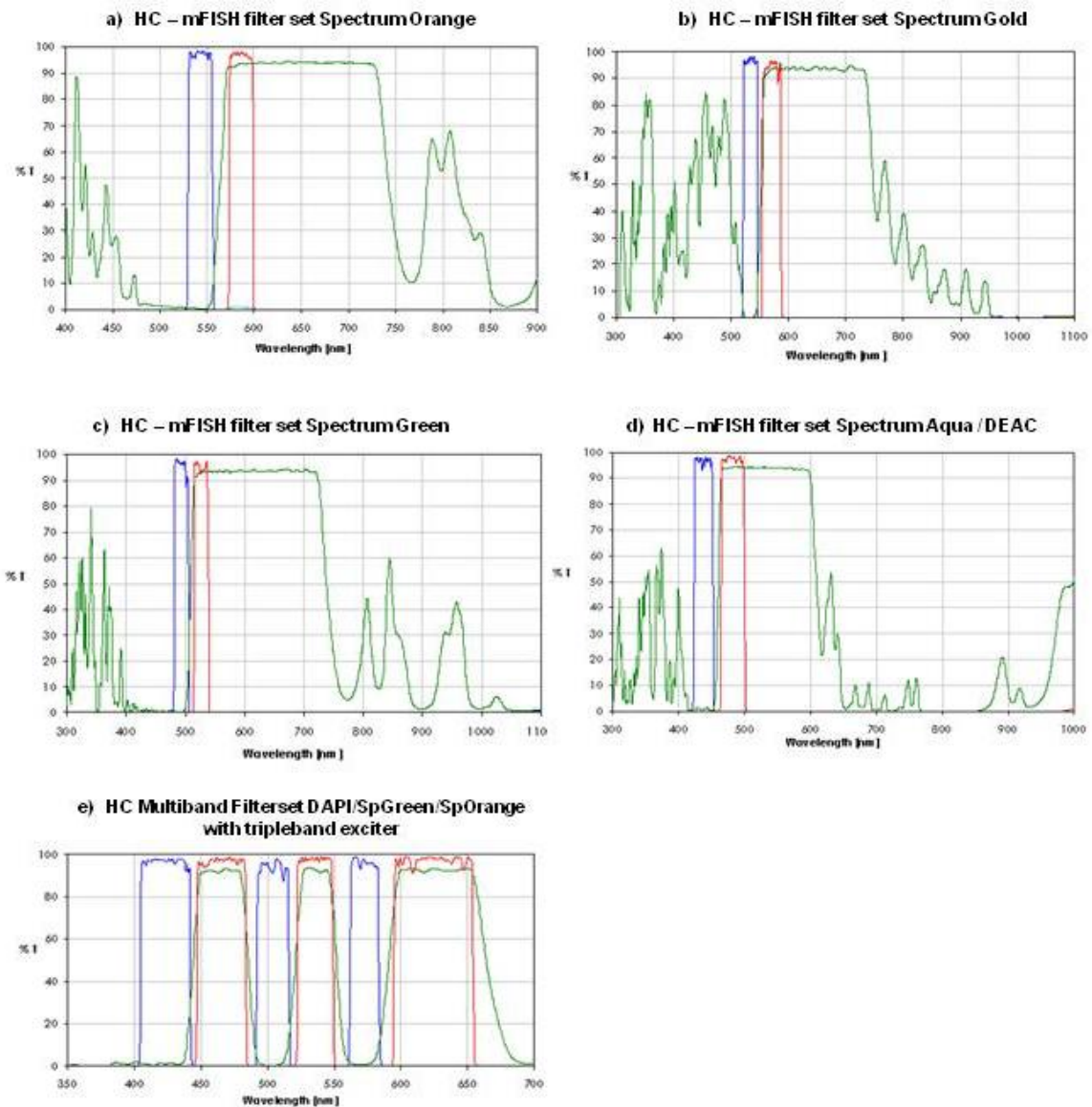


Abbildung 15: Darstellung der Frequenzbereiche der einzelnen Fluoreszenzfilter: a) „Rotfilter“ (HC – mFISH filter set Spectrum Orange), b) „Goldfilter“ (HC – mFISH filter set Spectrum Gold), c) „Grünfilter“ (HC – mFISH filter set Spectrum Green), d) „Blaufilter“ (HC – mFISH filter set Spectrum Aqua/DEAC), e) „Breitbandfilter“ (HC Multiband Filterset DAPI / SpGreen / SpOrange with tripleband exciter); Die Diagramme wurden der Homepage des Herstellers (AHF, Tübingen, Deutschland) entnommen: <http://www.ahf.de/k1-FHmFISH;1;2;mFISH.html>.

7.3 Kontrollgruppe 2: Sterilitätsursachen

		Diagnose	FISH	Fallnummer
1	w	Ohne Auffälligkeiten	ohne inv	K2.1.2
1	m	Primäre andrologische Sterilität: KAT-Syndrom (Kryptoteratoasthenozoospermie<1Mio/ml)	ohne inv	K2.1.1
2	w	Fensterung rechtes Ovar, Adhexektomie links	ohne inv	K2.2.1
2	m	Primäre andrologische Sterilität: Azoospermie	inv!	K2.2.2
3	w	Ohne Auffälligkeiten	ohne inv	K2.3.1
3	m	primäre andrologische Sterilität: Oligoasthenozoospermie <3Mio/ml	inv!	K2.3.2
4	w	Endokrinologische Sterilität	ohne inv	K2.4.1
4	m	Primäre andrologische Sterilität: Asthenozoospermie (145Mio/ml), progressive Motilität 10 %	ohne inv	K2.4.2
5	w	Ein Eileiter verklebt, anderer Eileiter erschwert durchgängig	ohne inv	K2.5.1
5	m	primäre andrologische Sterilität: Oligoasthenozoospermie	ohne inv	K2.5.2
6	w	Endometriose	ohne inv	K2.6.1
6	m	Spermienzahl unterer Normbereich, zu hohe Cholesterinwerte	ohne inv	K2.6.2
7	w	Ohne Auffälligkeiten	ohne inv	K2.7.1
7	m	Oligoasthenozoospermie (10-18 Mio/ml)	ohne inv	K2.7.2
8	w	Z.n. Tubargravidität rechts und anschließendem Funktionsverlust der rechten Tube	ohne inv	K2.8.1
8	m	Ohne Befund	ohne inv	K2.8.2
9	w	Endokrinologische Sterilität: Verdacht auf prämatüre Menopause	ohne inv	K2.9.1
9	m	Andrologische Faktoren: Asthenozoospermie 2° (42 Mio/ml)	ohne inv	K2.9.2
10	w	Eileiter fraglich durchgängig	inv!	K2.10.1
10	m	Primär andrologische Sterilität: Asthenozoospermie	ohne inv	K2.10.2
11	w	Kein Befund	ohne inv	K2.11.2
11	m	Sekundäre andrologische Sterilität: OAT 3° (4,4Mio/ml)	inv!	K2.11.1
12	w	Ohne Auffälligkeiten	ohne inv	K2.12.1
12	m	Sekundär andrologische Sterilität: OAT(1-3 Mio/ml, progressive Motilität 20 %)	ohne inv	K2.12.2
13	w	Kein Befund	ohne inv	K2.13.1
13	m	Kein Befund	ohne inv	K2.13.2
14	w	Kein Befund	ohne inv	K2.14.1
14	m	Keine Auffälligkeiten	ohne inv	K2.14.2
15	w	Hashimoto Thyreoiditis	ohne inv	K2.15.1
15	m	Primäre andrologische Sterilität: OAT 3° (0,3Mio/ml)	ohne inv	K2.15.2
16	w	Kein Befund	ohne inv	K2.16.1
16	m	Primäre andrologische Sterilität: Oligozoospermie (19 bzw. 26 Mio/ml)	ohne inv	K2.16.2

Tabelle 13: Tabellarische Auflistung der Sterilitätsursachen (soweit bekannt) der Kontrollgruppe 2. Inversionsträger sind grau markiert.

7.4 Kontrollgruppe 3: Karyotypen

Familien-Nr.	Geschlecht	Labornummer	Karyotyp
1	W	K3.1.1	46, XX, inv(7)q(11.23)
	M	K3.1.2	46, XY
	W	Kind	46, XX, dup(15)(q11.2q12)
2	w	K3.2.1	46, XX
	M	K3.2.2	46, XY
	W	Kind	46, XX, del(16)(p12.1p12.1)
3	W	K3.3.1	46, XX, dup(X)(p22.31p22.31)
	M	K3.3.2	46, XY
	M	Kind	46, XY, dup(X)(p22.31p22.31)
4	M	K3.4.1	46, XY
	W	K3.4.2	46, XX, ins(5)(q12q14q33)
	W	Kind	46, XX, dup(5)(q12q14)
5	W	K3.5.1	46, XX
	M	K3.5.2	46, XY
	W	Kind	46, XX, der(13)t(6;13)(q27;q33)
6	W	K3.6.1	46, XX, dup(1)(q12q21)
	M	K3.6.2	46, XY
	M	Kind	46, XY, dup(1)(q12q21)
7	W	K3.7.1	46, XX
	M	K3.7.2	46, XY
	W	Kind	46, XX, del(7)(q21.3q21.3)
8	W	K3.8.1	46, XX
	M	K3.8.2	46, XY
	M	Kind	46, XY, del(16)(p13.2p13.2)
9	M	K3.9.1	46, XY
	W	K3.9.2	46, XX
		Kind	46, dup(17)(p11.2p11.2)
10	W	K3.10.1	46, XX
	M	K3.10.2	46, XY
	M	Kind	46, XY, del(18)(p11.22p11.22)
11	W	K3.11.1	46, XX
	M	K3.11.2	46, XY
	W	Kind	46, XX, inv(4)(?q21q35)del(1)(q44q44)

Tabelle 14: Auflistung der Karyotypen der Kontrollgruppe 3. Keines der Kinder hat eine chromosomale Veränderung der Region 7q11.23; bei einem Elternteil (K3.1.1) wurde die Inversion von 7q11.23 gefunden.

8 Danksagung

Zuerst danke ich Frau PD Dr. Jutta Jenderny für die Überlassung der interessanten Themenstellung, sowie die Veröffentlichung der Arbeit in einer Fachzeitschrift.

Herrn Prof. Dr. med. Reiner Siebert danke ich herzlich für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Besonders bedanke ich mich für die kompetente Beratung bei der Durchführung der Arbeit, sowie der Möglichkeit, die Arbeit am Norddeutschen Humangenetikertreffen 2008 in Lübeck im Rahmen eines Kurzvortrags und als Posterbeitrag am deutschen Humangenetikertreffen 2009 in Aachen vorzustellen.

Frau Dr. med. Almuth Caliebe danke ich für die hervorragende Betreuung. Jederzeit bekam ich nette und hilfreiche Tipps, sowie konstruktive Kritik.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Rainer Pankau (Kinderklinik Kreiskrankenhaus Walsrode), dessen Initiative zur Studie und die Bereitstellung von Blutproben von betroffenen Familien sowie auch der Kontrollgruppe die Arbeit erst ermöglichte.

Dr. med. Stefan Gesk danke ich für die Hilfestellung bei der Auswertung und Kontrolle aller FISH Proben. Außerdem danke ich Herrn Dr. rer. nat. José Ignacio Martín-Subero, der zu Anfang der Arbeit entscheidend bei der Erstellung des Auswertungsschema half.

Ganz besonders danke ich auch Herrn Horst Romm (Vorsitzender des Williams-Beuren-Bundesverbandes) für die Einladung zum Williams-Beuren-Bundestreffen 2008 und die Möglichkeit, die Arbeit in einem kurzen Artikel in der Verbandszeitschrift vorzustellen. Das Zusammentreffen mit betroffenen Kindern und Erwachsenen bleibt für mich ein unvergesslicher Höhepunkt der gesamten Arbeit.

Besonderer Dank geht an Marianne Krussek, die nicht nur bei der Aufarbeitung der Blutproben half, sondern auch Ansprechpartner für Probleme aller Art war.

Außerdem danke ich allen MTAs aus dem FISH-Labor für die Einführung und Hilfe bei der Laborarbeit, insbesondere Claudia Becher, Marget Ratjen und Dorit Schuster.

Frau Dr. Amke Caliebe danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Arbeit (Institut für Medizinische Informatik und Statistik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel).

Einigen Kommilitoninnen danke ich für die moralische Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit, Annika Basner und Angela Sternkopf (ehemalige med. Doktorandinnen am Institut für Humangenetik) für deren hilfreichen Ratschläge und Weitergabe von Erfahrungen.

Zuletzt danke ich meiner Familie, ohne die das ganze Studium deutlich schwieriger gewesen wäre.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Judith Frohnauer
Geburtsdatum: 11.07.1984
Geburtsort: München
Email: judithfrohnauer@web.de
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1991-1995: Grundschule Neuried
1995-2004: Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg
25.06.04: Allgemeine Hochschulreife

Studium der Humanmedizin:

Ab Wintersemester 2004/05: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
23.08.06: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
31.08.09 – 01.08.10: Praktisches Jahr:
Chirurgie: Hôpital de Sion (Schweiz)
Pathologie: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Innere Medizin: Bad Segeberger Kliniken
Herbst 2010: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10 Veröffentlichung

Frohnauer J, Gesk S, Caliebe A, Siebert R, Pankau R (2009): FISH-analysis for the role of the inversion of the WBS-critical region in the origin of the deletion. *Medizinische Genetik* 21, Heft 1, P085: 103.

Frohnauer J, Caliebe A, Gesk S, Partsch CJ, Siebert R, Pankau R, Jenderny J (2010): No significantly increased frequency of the inversion polymorphism at the WBS-critical region 7q11.23 in German parents of patients with Williams-Beuren syndrome as compared to a population control. *Mol Cytogenet.* 21 (3).