

**Charakterisierung humaner dizentrischer Chromosomen
unter besonderer Berücksichtigung dizentrischer kleiner
überzähliger Markerchromosomen (sSMC)**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von M.Sc. Elisabeth Klein

geboren am 11. Juni 1983 in Erfurt

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. / med. habil. Thomas Liehr

Institut für Humangenetik, Friedrich-Schiller-Universität Jena

2. Prof. Dr. Wim Damen

Lehrstuhl für Genetik, Friedrich-Schiller-Universität Jena

3. PD Mag. Dr. Irmgard Verdorfer

Institut für Pathologie, Medizinische Universität Innsbruck

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.10.2013

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| AgNOR | NOR-Silberfärbung |
| A_{\max} | Absorptionsmaximum |
| <i>Aqua dest.</i> | destilliertes, steriles und pyrogenfreies Wasser (Aqua destillata) |
| <i>Aqua ad</i> | Aqua ad injectabilia |
| AK | Antikörper |
| akrocenM-FISH | Sondenmix für alle akrozentrischen Chromosomen |
| BAC | 'bacterial artificial chromosome' |
| BIO | Biotin |
| bp | Basenpaare |
| bez. | bezüglich |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| CCD | charge coupled device (gekühlter, ladungsgekoppelter Bildsensor) |
| CCAN | ,constitutive centromere-associated network' |
| Cd | ,centromeric dots' |
| CDE I-III | ,centromere DNA element' Baueinheit von Punktzentromeren |
| cenM-FISH | Zentromer-spezifische Multicolor-FISH |
| CENP | Zentromerprotein |
| CENP-A | Zentromerprotein A |
| CENP-B | Zentromerprotein B |
| CENP-C | Zentromerprotein C |
| CENP-E | Zentromerprotein E |
| CEP | kommerzielle Zentromersonde |
| CGH | comparative genomic hybridization |
| ChIP | Chromatin-Immunopräzipitation |
| Chr. | Chromosom |
| CML | Chronisch myeloische Leukämie |
| CREST | Abkürzung für: C alcinosis cutis, R aynaud-Syndrom, E sophageale Dysfunktion, S klerodaktylie, T eleangiectesia |
| Cy3 | Carbocyanin 3 |
| DAPI | 4',-6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid |
| DEAC | Diethylaminocoumarin-5-dUTP |
| der | Derivat |
| dic. | dizentrisch |
| DIC | großes dizentrisches Chromosom |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid) |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DOP | Degenerierte Oligonukleotid-Primer |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |

| | |
|------------------|--|
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid) |
| E _{max} | Emissionsmaximum |
| EtOH | Ethanol |
| exZEN | exzentrisches/randständiges Zentromersignal; kein Fusionssignal |
| FCS | „fetal calf serum“, Fötale Kälberserum |
| FISH | Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung |
| FITC | Fluorescein-5-isothiocyanat |
| FW | Fruchtwasser |
| G | Guanin |
| GTG | Giemsa Bänderung, G-bands by Trypsin using Giemsa |
| H | Histon |
| H3K4 | Lysinrest an Stelle 4 des Histonproteins 3, auch H3(Lys4) |
| HOR | „higher order repeats“ |
| i | iso |
| idic | isodizentrisch |
| IgG | Immunglobulin der Klasse G |
| inv dup | invertiert dupliziert |
| IK | Interphasekern |
| ISCN | „International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ |
| ISIS | in situ imaging software (METASYSTEMS [®]) |
| k.A. | keine Angabe |
| Kat. | Katalog |
| KB ⁻ | Waschpuffer |
| KCM | Waschpuffer |
| kDa | Kilo-Dalton |
| KMN | „KNL-1/mis12 Complex/Ndc80 Complex“ |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium („lysogeny broth“-Medium) |
| LCL | Epstein-Barr-Virus transformierte T-Lymphozyten (lymphoblastoid cell line) |
| mar | Markerchromosom |
| max. | maximal |
| Mb | Megabasenpaare |
| me2 | Dimethylierung |
| me3 | Trimethylierung |
| MDS | Myeloisch dysplastisches Syndrom |
| min | Minute |
| <i>min</i> | Minute-Chromosom |
| MPP | Metaphaseplatten |
| M-FISH | Multiplex-FISH |
| MCB | „multi-color-banding“, Multicolor-Bänderung |
| Midi | microdissection - Mikrosezierung oder Mikrosezierungsbank |
| mM | Millimolar |
| n.s. | nicht signifikant |
| n.v. | nicht verfügbar |
| NOR | Nukleolus-organisierende Region |
| Nr. | Nummer |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| OT | Objektträger (Einzahl und Mehrzahl) |
| p-Arm | kurzer („petit“) Arm eines Chromosoms |
| p-Wert | Signifikanzniveau, α |
| PBS | phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung) |
| PCP | „partial chromosome paintings“, Teilchromosomen-sonde für p- oder q-Arm eines Chromosoms |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| pter | terminales Ende des p-Arms |
| q-Arm | langer („queue“) Arm eines Chromosoms |
| <i>r</i> | Ringchromosom |
| RNA | Ribonukleinsäure (ribonucleic acid) |
| ROB | Robertsonsches Translokationschromosom |
| rpm | Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“) |
| RPMI-1640 | Wachstumsmedium |
| RT | Raumtemperatur |
| sat III | typische tandem-repeats in der Perizentromerregion |
| S-FISH | Suspensions-FISH |
| SC | den Subzentromerbereich betreffend |
| SG | SpectrumGreen |
| SO | SpectrumOrange |
| sSMC | kleines überzähliges Markerchromosom („small supernumerary marker chromosome“) |
| subcenM-FISH | Sondenmix für die Subzentromerregion |
| syn. | synonym |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TR | TexasRed |
| u.a. | und andere |
| u.Ä. | und Ähnliches |
| vgl. | vergleiche |
| WCP | „whole chromosome paintings“, Ganzchromosomen-sonde |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZEN | zentrisches Zentromersignal; Fusionssignal |
| z.T. | zum Teil |
| # | Chromosom |
| 1 ZEN | ein Zentromer |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung..... | 1 |
| 1 Einleitung..... | 3 |
| 1.1 Allgemeines | 3 |
| 1.2 Zytogenetik | 5 |
| 1.3 Molekulare Zytogenetik..... | 7 |
| 1.3.1 Sondentypen..... | 9 |
| 1.3.2 3D-FISH | 10 |
| 1.4 Immunfluoreszenz..... | 11 |
| 1.5 Aufbau von Zentromeren | 11 |
| 1.5.1 DNA-Sequenz..... | 11 |
| 1.5.2 Zentromerproteine – das Kinetochor | 12 |
| 1.5.2.1 CENP-A..... | 13 |
| 1.5.2.2 CENP-B | 13 |
| 1.5.2.3 CENP-C | 13 |
| 1.6 Kleine überzählige Markerchromosomen (sSMC) | 14 |
| 1.6.1 Erstbeschreibung..... | 14 |
| 1.6.2 Arten | 14 |
| 1.6.3 Häufigkeit..... | 15 |
| 1.6.4 Entstehung | 15 |
| 1.6.5 Charakterisierungsmöglichkeiten..... | 16 |
| 1.6.6 Dizentrische sSMC | 16 |
| 1.7 Histonmodifikationen..... | 17 |
| 1.8 Fragestellungen..... | 18 |
| 2 Material und Methoden | 19 |
| 2.1 Untersuchungsmaterialien..... | 19 |
| 2.1.1 Zellkultivierung und Chromosomenpräparation..... | 20 |
| 2.1.2 Objektträgerpräparation..... | 21 |
| 2.1.2.1 Objektträgerpräparation für Zytogenetik und FISH..... | 21 |
| 2.1.2.2 Objektträgerpräparation für Immunfluoreszenz | 21 |
| 2.2 Bänderungszytogenetik..... | 22 |
| 2.2.1 GTG-Bänderung..... | 22 |
| 2.2.2 AgNOR-Färbung..... | 22 |
| 2.3 Verwendete DNA-Sonden..... | 23 |
| 2.3.1 In der FISH verwendete Sonden | 23 |
| 2.3.1.1 BAC-Sonden | 23 |
| 2.3.1.2 Mikrosezierte Sonden | 23 |
| 2.3.2 Sondenmixe | 24 |
| 2.4 Verwendete Antikörper | 24 |
| 2.5 Mikrosezierung von Chromosomen | 25 |
| 2.6 Molekulargenetische Techniken | 25 |
| 2.6.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) | 25 |
| 2.6.2 Isolation von Plasmid-DNA | 25 |
| 2.6.3 PCR..... | 26 |
| 2.6.3.1 DOP- PCR..... | 26 |
| 2.6.3.1.1 Amplifizierung der mikrosezierten Chromosomenfragmente..... | 27 |
| 2.6.3.1.2 Amplifizierung der BAC-DNA | 29 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.6.3.1.3 | Reamplifizierungs-PCR..... | 29 |
| 2.6.3.1.4 | Markierungs-PCR..... | 30 |
| 2.6.4 | DNA-Fällung..... | 30 |
| 2.7 | Molekularzytogenetische Techniken..... | 31 |
| 2.7.1 | FISH..... | 31 |
| 2.7.2 | S-FISH..... | 31 |
| 2.8 | Immunhistologische Techniken..... | 32 |
| 2.8.1 | Immunfluoreszenz an Zentromerproteinen..... | 32 |
| 2.8.2 | Immunfluoreszenz an Histonproteinen..... | 33 |
| 2.9 | Auswertung..... | 34 |
| 3 | Ergebnisse..... | 36 |
| 3.1 | Charakterisierung des Untersuchungsmaterials..... | 37 |
| 3.2 | Immunfluoreszenz..... | 37 |
| 3.2.1 | sSMC..... | 38 |
| 3.2.1.1 | Aktivitätsmuster bei sSMC..... | 38 |
| 3.2.1.2 | Korrelationen..... | 40 |
| 3.2.1.3 | Intermediäre sSMC-Fälle..... | 42 |
| 3.2.1.3.1 | Einteilung..... | 43 |
| 3.2.1.3.2 | Korrelationen..... | 45 |
| 3.2.2 | Große dizentrische Chromosomen (DIC)..... | 48 |
| 3.2.2.1 | Korrelationen..... | 50 |
| 3.2.2.2 | Einfache DIC..... | 51 |
| 3.2.2.3 | Translokations-DIC..... | 53 |
| 3.2.2.4 | ROB..... | 54 |
| 3.2.2.5 | Große DIC mit intermediärem Aktivitätsmuster..... | 55 |
| 3.3 | 3D-Untersuchungen an sSMC..... | 56 |
| 3.4 | Histonfärbungen..... | 61 |
| 3.5 | NOR-Färbung..... | 63 |
| 3.5.1 | Einfluss der Aktivität der NOR an den sSMC im Verhältnis zur Aktivität der anderen NOR in der Zelle..... | 63 |
| 3.5.2 | Vergleich von FISH- und AgNOR-Färbung an akrozentrischen sSMC... .. | 63 |
| 4 | Diskussion..... | 66 |
| 4.1 | Einteilung der Aktivitätsmuster..... | 66 |
| 4.1.1 | Mechanismen der Inaktivierung..... | 68 |
| 4.1.1.1 | Epigenetische (funktionelle) Inaktivierung..... | 68 |
| 4.1.1.2 | Deletion eines Zentromers..... | 70 |
| 4.1.2 | Parameter mit potentiellm Einfluss auf Aktivitätsmuster..... | 72 |
| 4.1.2.1 | Größe..... | 72 |
| 4.1.2.2 | Chromosomale Herkunft..... | 74 |
| 4.1.2.3 | Andere Parameter..... | 76 |
| 4.2 | 3D-Untersuchungen: Effekt der sSMC auf die Interphasekernstruktur..... | 79 |
| 4.2.1 | Position des sSMC im Zellkern..... | 80 |
| 4.2.2 | sSMC kolokalisieren bevorzugt mit einem Homologen..... | 80 |
| 4.2.3 | sSMC verändert Lagebeziehung der zugehörigen Homologen zueinander..... | 81 |
| 4.3 | Histonfärbungen..... | 82 |
| 4.3.1 | Spezifische Bänderung von Metaphasechromosomen mittels Immunfluoreszenzfärbung von Histonmodifikationen..... | 82 |
| 4.3.2 | Färbeverhalten der sSMC..... | 83 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.4 | NOR-Färbungen..... | 85 |
| 4.4.1 | Einfluss dizentrischer akrozentrischer sSMC auf die Aktivität der NOR in der Zelle | 85 |
| 4.4.1.1 | Kontrollen bestätigen konstante Zahl aktiver NOR pro Zelle..... | 85 |
| 4.4.1.2 | Einfluss der sSMC auf Anzahl aktiver NOR..... | 85 |
| 4.4.1.3 | Interchromosomale Verteilung aktiver NOR..... | 86 |
| 4.4.1.4 | sSMC tragen zwei aktive NOR | 87 |
| 4.4.2 | Vergleich von FISH- und AgNOR-Färbung an akrozentrischen sSMC... 87 | 87 |
| 4.4.2.1 | NOR-FISH erlaubt Aussagen über möglichen Entstehungsmechanismus | 88 |
| 4.4.2.2 | Bedeutung der Satellitenregion für die Stabilität des sSMC..... | 89 |
| 4.4.2.3 | Einfluss der Größe des sSMC auf die Stabilität..... | 90 |
| 5 | Schlussfolgerung..... | 92 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 94 |
| 7 | Anhang | 111 |
| 7.1 | Publikationsliste | 111 |
| 7.2 | Danksagung..... | 115 |
| 7.3 | Ehrenwörtliche Erklärung | 116 |

Zusammenfassung

Dizentrische Chromosomen sind in vielen Organismen bekannt und werden meist im Zusammenhang mit mitotischer Instabilität beschrieben. Doch seit Mitte der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurden beim Menschen stabile dizentrische Chromosomen nachgewiesen und man vermutete einen Zusammenhang zwischen deren Stabilität und der Inaktivierung eines der beiden Zentromere. Die vorliegende Arbeit stellt die erste große systematische Studie zur Charakterisierung humaner dizentrischer Chromosomen dar. Neben großen dizentrischen Chromosomen (DIC) wurden als Modellsystem geeignete dizentrische kleine überzählige Markerchromosomen (sSMC) umfangreich analysiert. Nach Charakterisierung der dizentrischen Chromosomen auf zyto- und molekularzytogenetischer Ebene wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Zentromerproteinen zur Bestimmung der Zentromeraktivität und Immunfluoreszenzfärbungen von Histonmodifikationen zur Untersuchung epigenetischer Veränderungen vorgenommen. Mit dem Einfluss dizentrischer sSMC auf die Interphasekernarchitektur befassten sich weiterhin FISH-Untersuchungen im dreidimensionalen Raum.

Es wurden insgesamt fünf verschiedene Aktivitätsmuster bei dizentrischen sSMC und vier verschiedene Aktivitätsmuster bei großen dizentrischen Chromosomen nachgewiesen, die vornehmlich durch die chromosomale Herkunft und den Interzentromerabstand bestimmt werden, und die einen komplexen Inaktivierungs- und Stabilisierungsprozess der Zentromere nahelegen. Darüber hinaus belegen die erarbeiteten Ergebnisse erstmals sowohl eine (partielle) Deletion eines Zentromers als auch die epigenetische Inaktivierung als mögliche Mechanismen der Zentromerinaktivierung beim Menschen. Mit 3D-FISH-Untersuchungen konnte eine bevorzugte Kolo-kalisation der (dizentrischen) sSMC mit einem homologen Schwesterchromosom und eine Beeinflussung der Lagebeziehung zwischen beiden homologen Schwesterchromosomen zueinander nachgewiesen werden, was den Einfluss eines sSMC auf die Interphasekernstruktur bestätigt. Durch immunhistochemische Histonmodifikationsfärbung konnte nicht nur ein hochspezifisches Bänderungsmuster entlang der Metaphasechromosomen erzielt werden, sondern darüber hinaus ist das verschiedenartige Färbeverhalten der sSMC auch ein Hinweis auf die epigenetische Regulierung der Chromatinstruktur. Weiterhin fanden sich Belege, dass die Satellitenregionen akrozentrischer Chromosomen besondere Eigenschaften besitzen, die sich in besonderem Maße auf die Stabilität von Zentromerregionen innerhalb dizentrischer Chromosomen auswirken. Durch

funktionelle Studien zur NOR-Aktivität bei sSMC konnten Hinweise auf einen Einfluss der NOR-Aktivität auf die Zentromerregionen dizentrischer sSMC gefunden werden. Sowohl die Anzahl aktiver NOR pro Zelle als auch deren Verteilung innerhalb der akrozentrischen Chromosomen deuten auf eine positive Selektion der dizentrischen sSMC bei funktioneller Beteiligung hin.

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Im Jahre 1880 beschrieb Walter Flemming erstmals das Zentromer als „primäre Einschnürung“ der Chromosomen (Flemming 1880). Während der Mitose und Meiose wird an dieser Stelle das Kinetochor aufgebaut, um eine korrekte Anheftung der Mikrotubuli der Spindelfasern an die Chromosomen zu gewährleisten, wodurch die Schwesterchromatiden getrennt werden und zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen werden (Carroll und Straight 2006).

Es werden zwei Typen von Zentromeren unterschieden. Die Punktzentromere der Hefe *S. cerevisiae* bestehen aus drei Elementen (CDE I, II und III) innerhalb einer spezifischen 125 bp langen DNA-Sequenz (Wiens und Sorger 1998), die von einem einzelnen Nukleosom besetzt ist (Furuyama und Biggins 2007) und an die eine einzelne Spindelfaser angreift. Die Mehrheit der höheren Eukaryoten besitzt sog. regionale Zentromere (Pluta et al. 1995), die sich durch große Blöcke AT-reicher, tandemartig sich wiederholender DNA-Sequenzen von bis zu 4 Mb Größe auszeichnen, denen jedoch eine Konservierung zwischen den verschiedenen Spezies fehlt. Eine Ausnahme bilden die Holozentromere vieler Arthropoden und Pflanzen, bei denen die gesamte Länge der Chromosomen als Zentromer fungieren kann (Pimpinelli und Goday 1989).

Ein humanes Chromosom besitzt in der Regel genau ein Zentromer. Im Zuge chromosomaler Umbauten können aber auch di- und multizentrische Chromosomen entstehen (Erstbeschreibung: de la Chapelle 1966, Ockey 1966). Wären aber mehrere Zentromere an einem Chromosom funktionell aktiv und würden somit unabhängig voneinander zu den Zellpolen gezogen, so ist die Lehrmeinung die Folgende: Es wäre zwangsläufig die Bildung von Anaphasebrücken und/oder von Chromosomenbrüchen die Folge. Ein solches Szenario wurde zytogenetisch bereits 1939 in Studien an Mais demonstriert (McClintock 1939); später auch in Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) und Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) (Hill und Bloom 1987, Hill und Bloom 1989, Thrower und Bloom 2001, Thrower et al. 2003). Oftmals sind in den Tochterzellen einzelne azentrische Fragmente des ursprünglich di- bzw. multizentrischen Chromosoms nachweisbar; diese gehen jedoch in den nachfolgenden Zellteilungen mangels Ansatzstellen für Spindelfasern normalerweise verloren (Wandall et al. 1998). Unter Umständen kann sich an einem solchen Fragment ein sekundäres Zentromer, ein sog. Neozentromer, ausbilden, welches für die Weitergabe des Fragmentes sorgen kann

(Depinet et al. 1997, Choo 1997, Liehr et al. 2007). Neozentromere sind funktionelle Zentromere, die außerhalb der üblichen Zentromerdomäne liegen und funktionstüchtige Kinetochore tragen, obgleich ihnen die zentromerspezifische alpha-Satelliten-DNA fehlt (Choo 1997). Entgegen der eben dargestellten beschriebenen Theorie wurden aber stabile dizentrische Chromosomen sowohl bei Menschen als auch bei anderen Spezies nachgewiesen (Therman et al. 1974, Ault und Lyttle 1988, Earnshaw et al. 1989, Page et al. 1995, Sullivan und Schwartz 1995, Page und Shaffer 1998, Sullivan und Willard 1998).

Lange Zeit ging man davon aus, dass eines der beiden Zentromere durch einen bis dato nicht verstandenen Mechanismus „ausgeschaltet“, also in irgendeiner Form inaktiviert wird, wodurch ein „funktionell monozentrisches“ Chromosom entsteht (Page et al. 1995; Therman 1986). Anfänglich wurde bei dizentrischen Chromosomen lediglich die zytogenetische Struktur untersucht. Unter der Annahme, dass eine primäre Einschnürung mit einem aktiven Zentromer gleichzusetzen ist, galten somit Chromosomen mit einer Einschnürung als funktionell monozentrisch und solche mit zwei Einschnürungen als funktionell dizentrisch (Warburton et al. 1973, Lemyre et al. 2001, Therman et al. 1986). Lemyre und Mitarbeiter machten in ihrer Übersichtsarbeit 2001 deutlich, dass bei den meisten untersuchten dizentrischen Chromosomen nur eine Einschnürung nachweisbar war, was mit der Annahme der Inaktivierung eines Zentromers konform ist. Warburton und Mitarbeiter beschrieben 1973 zwei Einschnürungen an einem dizentrischen Chromosom, wobei eine jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war. Ein anderer Ansatz zur Überprüfung der Zentromeraktivität war die Durchführung einer modifizierten Giemsa-Färbung, der sog. „Cd-Färbung“, bei der nur die aktiven Zentromere markiert werden. Die Cd-Färbung markiert vermutlich nur die Regionen, die mit den Spindelfasern assoziiert sind (Daniel 1979, Maraschio et al. 1980, Nakagome et al. 1976, Romain et al. 1982). Mittels normaler Giemsa-Färbung und Cd-Färbung lassen sich mit gleicher Zuverlässigkeit nur die aktiven Zentromere sichtbar machen. Aussagen über die nicht-aktiven Zentromere der dizentrischen Chromosomen sind mit beiden Methoden unmöglich, da nicht unterschieden werden kann, ob das zweite Zentromer fehlt oder ob es in irgendeiner Form verändert wurde.

1980 fand man im Serum von CREST-Patienten (CREST = Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, Esophageale Dysfunktion, Sklerodaktylie, Teleangiectesia) Autoantikörper, welche aus unbekanntem Gründen die Zentromerantigene erkennen (Moroi 1980). Nachdem Earnshaw und Rothfield im Jahre 1985 die Zentromerproteine CENP-A, CENP-B, CENP-C

als ersten Antigene identifizierten, erfolgten auch Tests, ob sich diese Antigene auch an inaktiven Zentromeren dizentrischer Chromosomen nachweisen lassen (Earnshaw und Rothfield 1985). Diese Untersuchungen lieferten allerdings keine einheitlichen Ergebnisse: Während die Arbeitsgruppe um Merry ein schwaches Signal am inaktiven Zentromer eines dizentrischen X-Chromosoms fanden und schlussfolgerten, dass mindestens eines der Antigene auch am inaktiven Zentromer vorliegen muss (Merry et al. 1985), detektierten Earnshaw und Migeon keine Signale am inaktiven Zentromer und verneinten die Präsenz der drei Serumproteine an inaktiven Zentromeren (Earnshaw und Migeon 1985). Ihre Interpretation von Merrys schwachen Signalen schreibt den verschiedenen Zentromerproteinen unterschiedliche Funktionen zu. Und auch die Untersuchung von Peretti und Mitarbeitern an verschiedenen dizentrischen Chromosomen mit sowohl gefärbten als auch ungefärbten inaktiven Zentromeren macht deutlich, dass die Komponenten für die Spindelanheftung unterschiedlich wichtig zu sein scheinen (Peretti et al. 1986). Nachdem Antikörper gegen diese drei Zentromerproteine verfügbar waren, bewiesen Earnshaw und Mitarbeiter, dass CENP-B an allen, CENP-C jedoch ausschließlich an aktiven Zentromeren auftreten (Earnshaw et al. 1989). Darüber hinaus spekulierten sie über die schwachen Serumsignale am inaktiven Zentromer der oben genannten Studien, dass entweder Antigene fehlen, alle Antigene in geringerer Menge vorliegen oder weniger Antigene durch veränderte Konformation vorhanden sein könnten. Es folgte eine Reihe weiterer Untersuchungen hinsichtlich der Zentromeraktivität verschiedener dizentrischer Chromosomen (Page und Shaffer 1998, Sullivan und Schwartz 1995), später auch mit Antikörpern gegen neu identifizierte Zentromerproteine (Higgins et al. 2005). Neben der Inaktivierung überzähliger Zentromere wird auch die Abstimmung zweier funktioneller Zentromere zu Stabilitätswirken diskutiert (Sullivan und Willard 1998). Beide Mechanismen sind bisher nicht genau verstanden. Somit könnten Studien an dizentrischen humanen Chromosomen einen Beitrag zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen der Zentromere leisten. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit Verfahren der Zytogenetik (Abschnitt 1.2), der Molekularen Zytogenetik (Abschnitt 1.3) und der Immunfluoreszenz verwendet (Abschnitt 1.4).

1.2 Zytogenetik

Die Entwicklung der Zytogenetik nahm vor etwas mehr als 130 Jahren mit der Erstbeschreibung humaner Chromosomen durch Arnold im Jahre 1879 ihren Anfang (Arnold 1879). 1888 prägte der Anatom Waldeyer die Bezeichnung „Chromosom“ (chroma = Farbe

und „soma“ = Körper), in Anlehnung an den acht Jahre zuvor von Flemming formulierten Begriff „Chromatin“ als „färbbare Substanz im Zellkern“ (Waldeyer 1888, Flemming 1880). Die Annahme, Chromosomen seien die Träger der Erbanlagen, wurde 1903 durch Sutton und Boveri in der *Chromosomentheorie der Vererbung* aufgestellt (Sutton 1903, Boveri 1903). Aufgrund fehlender technischer Möglichkeiten konnte erst rund 50 Jahre später präzisiert werden, dass die DNA der Chromosomen wichtigster Bestandteil und Träger der Erbsubstanz ist (Avery et al. 1944, Watson und Crick 1953), wodurch letztlich die Grundlage der modernen Genetik geschaffen wurde.

Durch den Einsatz von hypotoner Lösung, welche eine verbesserte Chromosomenqualität bewirkt (Hsu et al. 1952) und die Möglichkeit schafft, die Chromosomen im Metaphase-stadium zu arretieren (Bayreuther 1952), gelang es Tijo und Levan 1956, die Chromosomenzahl des Menschen eindeutig auf 46 festzusetzen und damit das Ergebnis vorangegangener Zählungen zu widerlegen (Tijo und Levan 1956, Painter 1923). Mit dieser Erkenntnis gelang drei Jahre darauf die Beschreibung erster numerischer Chromosomenveränderungen: das Klinefelter-Syndrom (Jacobs und Strong 1959), das Turner-Syndrom (Ford et al. 1959) und die Trisomie 21 (Lejeune et al. 1959). 1960 folgten die Beschreibungen von Trisomie 13 (Patau et al. 1960) und Trisomie 18 (Edwards et al. 1960). Seither gilt die Zytogenetik als das wichtigste Arbeitsgebiet der Humangenetik, nicht zuletzt auch deswegen, weil nun Fehlbildungssyndrome ursächlich erklärt werden konnten.

1968 wurden erste Bänderungstechniken entwickelt (Caspersson et al. 1968), mit deren Hilfe jedes Chromosom genau identifiziert und die einzelnen Chromosomen somit voneinander unterschieden werden konnten. Dadurch gelangen erste Strukturanalysen, was die Zytogenetik revolutionierte und neue Horizonte öffnete. Die wichtigste und heute als Goldstandard in der Zytogenetik geltende GTG-Bänderung („G-bands by Trypsin using Giemsa“; Seabright 1971) erfolgt durch kontrollierten Verdau mittels des Enzyms Trypsin und anschließender Färbung mit Giemsa. Ein der GTG-Bänderung komplementäres Bänderungsmuster erreicht man mit Säuredenaturierung vor der Giemsafärbung (R-Bänderung; Duttrillaux und Lejeune 1971). Bei der Q-Bänderung wird AT-reiche DNA mittels Quinacrin/Quinacrinhydrochlorid dunkel gefärbt (Caspersson et al. 1972). Neben diesen Färbungen, bei denen ein Bandenmuster als Abfolge von hellen und dunklen Banden entlang aller Chromosomen entsteht, färbt man bei C-Bänderung und NOR-Färbung nur bestimmte chromosomale Strukturen, die somit nur Auskunft über eine begrenzte Anzahl an Banden geben. So wird mit der C-Bänderung das (meist zentromernahe) Heterochromatin dunkel gefärbt (Sumner et al. 1971). Die NOR-Färbung wird eingesetzt, um die Nukleolus-

organisierenden Regionen (NOR) in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen darzustellen (Bloom and Goodpasture 1976). Die NOR wurden 1934 definiert als morphologische Stellen, um die sich am Ende der Mitose die Nukleoli entwickeln (McClintock 1934). Sie liegen bei humanen Zellen in der sekundären Einschnürung der akrozentrischen Chromosomen und enthalten in Clustern tandemartig wiederholte Kopien von Genen, die für eine 45S rRNA kodieren (Hsu et al. 1975). Obwohl die Transkription der rDNA zwischen Pro- und Anaphase blockiert ist, können einige Proteine (z.B. Transkriptionsfaktoren, UBF, SL1) auch in der Metaphase an einigen NOR nachgewiesen werden (Babu und Verma 1985, Weisenberger und Scheer 1995, Jordan et al. 1996, Roussel et al. 1996, Prieto und McStay 2005). Diese auch „kompetent“ genannten NOR, von denen in humanen Zellen im Durchschnitt acht detektiert werden können, lassen sich über die AgNOR-Färbung (Goodpasture und Bloom 1975) sichtbar machen. Diese funktionell aktiven NOR werden transkribiert, während die „nicht-kompetenten“ NOR während der vorherigen Interphase inaktiv bleiben.

Seit der Anwendung von Bänderungsanalysen ist die Zytogenetik in der Lage, nicht nur numerische Veränderungen, sog. Aneuploidien (Zugewinn oder Verlust ganzer Chromosomen) oder Polyploidien (veränderte Chromosomensatzzahl) aufzudecken, sondern ist auch zur Darstellung von intra- und interchromosomalen Veränderungen fähig. Hierzu zählen: Deletionen, Duplikationen, Insertionen, Inversionen und Translokationen.

Um die Vielfalt an möglichen chromosomalen Veränderungen exakt beschreiben und definieren zu können, wurde eine allgemein gültige Nomenklatur festgesetzt, die auf der spezifischen Abfolge heller und dunkler Banden beruht. Aktuell ist das die „International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ (kurz: ISCN, Shaffer et al. 2013).

Obwohl mit Hilfe der Bänderungsverfahren die Chromosomen und deren mögliche Veränderungen schon sehr detailliert beschrieben werden können, stößt die Zytogenetik bei weiterführenden Fragestellungen an ihre Grenzen. Beispielsweise bleibt die Herkunft zusätzlichen Materials an einem Chromosom oder die Herkunft von Markerchromosomen verborgen. Auch ist es unmöglich das genaue Ausmaß einer Veränderung zu ermitteln. Erst die molekulare Zytogenetik als Weiterentwicklung bietet die Möglichkeit, diese Fragen zu beantworten.

1.3 Molekulare Zytogenetik

Das Hauptwerkzeug im Bereich der Molekularen Zytogenetik ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), mit deren Hilfe bestimmte Chromosomen, Chromosomenabschnitte

und einzelne Gene in der Metaphase und auch im Interphasekern spezifisch markiert werden können.

Unter Verwendung von *in situ* Hybridisierungen können DNA- oder RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen, intrazellulären Strukturen und chromosomalen Abschnitten lokalisiert werden (Pardue und Gall 1969, John et al. 1969). Zunächst wurden die Nukleinsäuren radioaktiv markiert und entsprechend detektiert. Dem Vorteil der hohen Auflösung standen hierbei entscheidende Nachteile gegenüber. Es waren nicht nur speziell ausgerüstete Labore und entsprechend geschultes Fachpersonal erforderlich; auch lag die Dauer einer Untersuchung bei 1-3 Wochen. Nachdem 1981 erstmals die radioaktive Markierung von Genen gelang (Malcom et al. 1981, Harper und Saunder 1981, Gerhard et al. 1981), entwickelte sich die Technik in den darauf folgenden Jahren rasant weiter. So wurde noch im gleichen Jahr die radioaktive Markierung von der Markierung mittels des Haptens Biotin abgelöst (Langer et al. 1981). Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz nicht radioaktiv markierter Sonden ist die Chromosomen-*in-situ*-Suppressions-Hybridisierung (CISS; Lichter et al. 1988). Hierbei werden die über das ganze Genom verteilten sich oft wiederholenden (sog. repetitiven) Sequenzen durch eine Vorhybridisierung geblockt, um unspezifische Fluoreszenz an diesen Stellen zu umgehen. Die Verwendung nicht radioaktiv markierter Sonden war mit enormen Vorteilen verbunden. So reduzierte sich die Dauer einer Anwendung auf 1-3 Tage. Darüber hinaus konnten verschiedene Markierungen gleichzeitig vorgenommen werden und diese wiederum durch eine Vielzahl an verfügbaren Detektionssystemen erkannt werden, wodurch eine erstaunliche Flexibilität erreicht werden konnte. Die erste FISH an menschlichen Chromosomen wurde im Jahre 1986 von Pinkel und Mitarbeitern durchgeführt (Pinkel et al. 1986).

Bei der FISH werden die DNA-Sonden entweder direkt mit einem Fluorochrom (direkte Markierung) oder mit Haptenen (Biotin, Disoxigenin; indirekte Markierung) über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis 1986, Saiki et al. 1985, Saiki et al. 1988) oder Nick-Translation (Rigby et al. 1977) markiert. Anschließend erfolgt deren Denaturierung, wodurch die DNA dann einzelsträngig vorliegt. Zeitgleich erfolgt die Denaturierung der chromosomalen Ziel-DNA auf dem Objektträger (OT). Während der Hybridisierung lagert sich die Sonden-DNA an homologe Sequenzen der Ziel-DNA (Abb. 1.1). Bei Anwendung der indirekten Markierung ist im Anschluss die Detektion der mit Haptenen markierten DNA nötig. Dies wird mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper erreicht. Die Auswertung der Signale erfolgt an einem Fluoreszenz-Mikroskop.

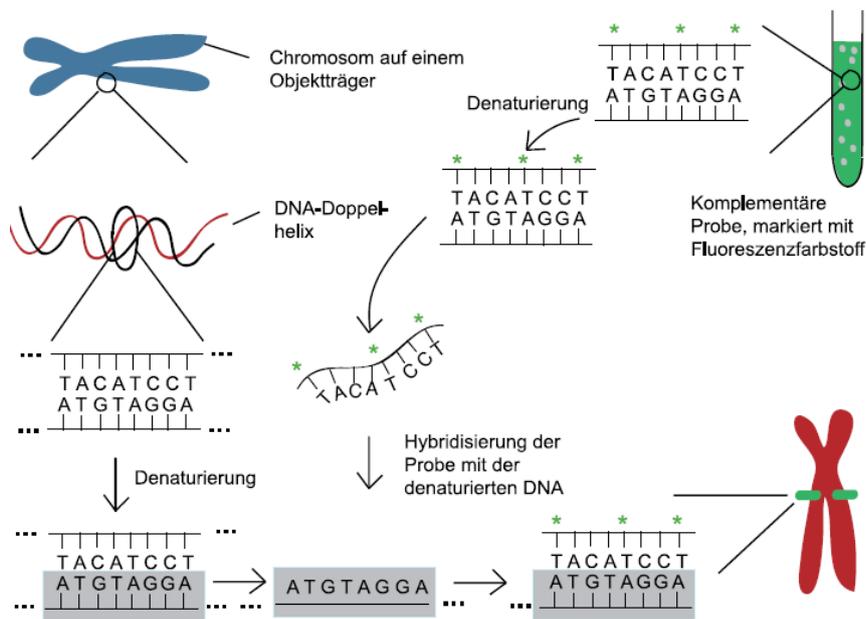


Abb. 1.1: Prinzip der FISH. Schematische Darstellung (<http://www.medizinische-genetik.de/typo3temp/pics/b7318ecceb.gif>).

Die Molekulare Zytogenetik findet vornehmlich im Bereich der Forschung und Diagnostik Anwendung und ist auch hilfreich, wenn nur wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht. Im Bereich der Humangenetik können mit dieser Technik z.B. Struktur und etwaige Veränderungen an Chromosomen mit den entsprechenden DNA-Sonden untersucht werden.

1.3.1 Sondentypen

Die DNA-Sonden, die in der Molekularen Zytogenetik zur Anwendung kommen, lassen sich in drei Gruppen unterteilen: die **repetitiven Sonden** binden an repetitive Sequenzen im menschlichen Genom. Zu diesen Bereichen zählen die Telomere, die Zentromere und das Heterochromatin. Während die menschlichen Telomere von den telomerspezifischen DNA-Sonden aufgrund ihrer Sequenzgleichheit nicht voneinander zu unterscheiden sind, sind die einzelnen Zentromere spezifisch anfärbbar. Als Ausnahme seien die Zentromere der Chromosomen 13 und 21, 14 und 22, sowie die Zentromere der Chromosomen 1, 5 und 19 genannt, die wegen ihrer hohen Ähnlichkeit nicht einzeln unterschieden werden können.

Zu den **Chromosomensonden** zählen die „whole chromosome paintings“ (WCP) und die „partial chromosome paintings“ (PCP), welche ganze Chromosomen oder Chromosomenarme anfärben. Sie werden über glasnadelbasierte Mikrosezierung (Senger et al. 1997) oder das sog. „chromosome flow sorting“ (Speicher et al. 1996) gewonnen.

Die **lokusspezifischen Sonden** stellen die dritte Gruppe von DNA-Sonden dar, die zum gezielten Anfärben bestimmter Chromosomenbanden, Gene und definierten DNA-Sequenzen verwendet werden. Sie sind durch eine genau festgelegte Basenabfolge charakterisiert. Zur Klonierung der Sequenz wird diese zuerst in einen Vektor eingebaut und in einer geeigneten Wirtszelle vervielfältigt. Die Vektoren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Einbaugröße und des Wirtsorganismus: z.B. Plasmide (*Eschericia coli*, bis 0,3 Mb), Cosmide (Lamda Phage, 0,03-0,04 Mb) und virale Vektoren (Adenoviren) (Sambrook et al. 1989). Anschließend wird die DNA isoliert und mittels DOP-PCR amplifiziert und markiert.

Zur Beantwortung unterschiedlicher Fragestellungen ist eine Kombination der verschiedenen Sonden sinnvoll. Mit hoher Effizienz können so chromosomale Umbauten und Markerchromosomen genauer untersucht werden. Es wurden spezielle SONDENSETS entwickelt (Nietzel et al. 2001, Trifonov et al. 2003, Starke et al. 2003), wodurch es gelingt, mit wenigen Hybridisierungen, Markerchromosomen und chromosomale Rearrangements umfassend zu charakterisieren (siehe Abschnitt 2.3.2)

1.3.2 3D-FISH

FISH an menschlichen Chromosomen, sowohl in Metaphase als auch in Interphase, ist eine vielfach und wirkungsvoll eingesetzte molekularzytogenetische Methode im Bereich der klinischen sowie der Tumorzytogenetik. Auch Untersuchungen bezüglich der Architektur in Interphasekernen wurden durchgeführt, sollten aber aufgrund der präparationsbedingten Zweidimensionalität des Untersuchungsgutes vorsichtig interpretiert werden.

Eine Weiterentwicklung der FISH unter Einbeziehung der dritten Dimension gelang mit Hilfe der sog. Suspensions-FISH (S-FISH; Steinhaeuser et al. 2002). Hierbei wird die gesamte FISH-Prozedur in Suspension durchgeführt, und die Zellkerne werden erst kurz vor der Auswertung auf einen OT mit konkaven Aussparungen gegeben. Dadurch entfällt die bei der herkömmlichen FISH entstehende Abplattung der Kerne. Die mikroskopische Aufnahme verschiedener Einzelbilder in unterschiedlichen Ebenen und eine anschließende Zusammenführung der einzelnen Bilder lassen mit einer spezifischen Software ein dreidimensionales Abbild des sphärischen Zellkernes entstehen (siehe Abschnitt 2.7.2). Diese Methodik wurde bereits an verschiedenen Geweben wie Lymphozyten, Fibroblasten (Bolzer et al. 2005), Knochenmark (Manvelyan et al. 2009, Dorka 2011) und Spermien (Manvelyan et al. 2008a) erfolgreich angewandt, um Lagebeziehungen und Struktur des Chromatins in Interphasekernen zu untersuchen. Es konnte bestätigt werden, dass die Chromosomengröße und die

Gendichte entscheidende Einflussfaktoren bei der Anordnung des Interphasechromatins darstellen.

1.4 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist ein immunhistochemisches Verfahren, dem die spezifische Erkennung von Antigenen durch Antikörper zugrunde liegt. Die Antikörper binden dem Schlüssel-Schloss-Prinzip folgend und somit hochspezifisch an das entsprechende Epitop des betreffenden Proteins, welches dann mit Hilfe von fluoreszierenden Substanzen (Fluorochromen) nachweisbar ist (Lexikon der Biologie 2001). Man unterscheidet zwischen direkter und indirekter Immunfluoreszenz. Im direkten Verfahren ist der Antikörper direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt. Bei der indirekten Immunfluoreszenz erkennt zunächst ein unmarkierter Antikörper spezifisch das entsprechende Epitop, welches anschließend über einen sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper, der an den primären bindet, indirekt nachgewiesen wird (Lexikon der Biologie 2001). Das Verfahren kann auch erfolgreich zum Nachweis von Proteinen an zytogenetisch aufgearbeiteten Chromosomen angewandt werden (siehe Abschnitt 2.8).

1.5 Aufbau von Zentromeren

Das Zentromer unterscheidet sich von den Chromosomenarmen sowohl hinsichtlich der DNA-Sequenz als auch der assoziierten Proteine.

1.5.1 DNA-Sequenz

Grundbaustein humaner Zentromer-DNA ist die sog. alpha-Satelliten-DNA (α -Satelliten-DNA; Manuelidis 1978). Diese komplexe repetitive α -Satelliten-DNA besteht aus tandemartig sich wiederholenden AT-reichen, 170-171 bp großen Einheiten (Monomere), die „Head-to-tail“-artig ausgerichtet sind und Größen von einigen hunderten kb bis zu mehreren Mb erreichen können (Nakaseko et al. 1986, Willard 1990, Choo 2001, Sullivan et al. 2001, Manuelidis 1978). Die einzelnen Repeats sind in größeren Bereichen organisiert, die eine Struktur höherer Ordnung aufweisen (higher order repeats (HOR)). Zwei Typen von α -Satelliten-DNA können unterschieden werden: Der Typ 1 besteht typischerweise aus sich regelhaft wiederholenden Monomeren, die eine oder mehr 17 bp lange „CENP-B-Boxen“ pro HOR enthalten (Masumoto et al. 1989). Bei einigen Zentromeren wird diese Struktur von einem anderen Typ α -Satelliten-DNA (Typ 2) flankiert, der weder HOR-Struktur aufweist

noch CENP-B-Boxen enthält. Die Länge der Zentromer-DNA variiert innerhalb der humanen Chromosomen.

1.5.2 Zentromerproteine – das Kinetochor

Zentromere sind komplexe Strukturen, die sich aus zentromerischer DNA, Histonen und anderen assoziierten Proteinen zusammensetzen. Im Allgemeinen ist DNA um Histone gewunden – es bilden sich sog. Nukleosomen, die kettenartig hintereinanderliegen und über sog. „Linker-DNA“ miteinander verbunden sind (Simpson 1978). Ein Nukleosom ist ein Oktamer aus je zwei Kopien der Histone H3, H4, H2A und H2B, worum die DNA ca. 1,67-mal linksdrehend gewunden ist, was etwa 147 bp entspricht (Luger et al. 1997). Im Chromatin der Zentromere ist das Histon H3 durch eine zentromerspezifische Variante – das CENP-A (Zentromerprotein A) – ersetzt (Palmer et al. 1987, Tachiwana et al. 2011), welches vermutlich die wichtigste epigenetische Markierung für die Kinetochorbildung darstellt (Black und Cleveland 2011).

Als Zentromer-assoziierte Proteine liegen vor: die konstitutiven Proteine, die während des gesamten Zellzyklus mit dem Zentromer verbunden sind, und im Gegensatz hierzu die sog. *passenger* Proteine (Earnshaw und Bernat 1991). Beobachtungen mit dem Elektronenmikroskop haben gezeigt, dass der aus Proteinen beider Gruppen gebildete Multiproteinkomplex des Kinetochors eine dreischichtige Struktur aufweist: eine elektronendichte innere Schicht (inneres Kinetochor) am Zentromerchromatin, eine äußere Schicht (äußeres Kinetochor), die mit den Mikrotubuli in Verbindung steht, und eine elektronendurchlässige Schicht („fibrous corona“) an der Oberfläche der Chromosomen (Brinkley und Stubblefield 1966, Jokelainen 1967). Bisher wurden in Vertebraten rund 100 Kinetochorproteine identifiziert (Cheeseman und Desai 2008, Perpulescu und Fukagawa 2011). Das äußere Kinetochor wird nur während der Mitose aufgebaut und bildet die entscheidende Bindestelle für die Mikrotubuli. Seine Bestandteile, das KMN-Netzwerk (bestehend aus dem Mis12-Komplex, dem Ndc80-Komplex und dem KNL-1/Blinkin-Komplex), streben während der Zellteilung spezifisch zum inneren Kinetochor (Cheeseman und Desai 2008). Die Bestandteile des inneren Kinetochors, auch Präkinetochor genannt (Brenner et al. 1981), sind während des gesamten Zellzyklus mit dem Chromosom assoziiert (Cheeseman und Desai 2008). Aus dieser konstitutiven Verbindung mit dem zentromerischen Chromatin leitet sich auch der Name CCAN (Constitutive centromere-associated network) ab, unter dem diese evolutionär konservierten Proteine auch zusammengefasst werden. Im Serum von CREST-Patienten wurden vor mehr als 30 Jahren die ersten drei konstitutiven Zentromerproteine

CENP-A, CENP-B und CENP-C nachgewiesen (Earnshaw und Rothfield 1985, Moroi et al. 1980). In den letzten Jahren konnten weitere Mitglieder der CENP-Familie identifiziert werden (Obuse et al. 2004, Foltz et al. 2006, Izuta et al. 2006, Okada et al. 2006): CENP-H, -I, -K bis -U, -W, -X, welche weiter klassifiziert werden können (Cheeseman und Desai 2008, Perpulescu und Fukagawa 2011).

1.5.2.1 CENP-A

CENP-A ist eine 17 kDa große zentromerspezifische Variante des Histons H3 (Palmer et al. 1987), welche in die Nukleosomen der zentromerischen DNA eingebaut ist (Tachiwana et al. 2011, Black und Cleveland 2011). Homologe Proteine konnten auch in allen gängigen eukaryotischen Modellorganismen nachgewiesen werden (Buchwitz et al. 1999, Blower und Karpen 2001, Stoler et al. 1995, Takahashi et al. 2000, Talbert et al. 2002). CENP-A ist nur an aktiven Zentromeren zu finden (Warburton et al. 1997).

1.5.2.2 CENP-B

Das 70 kDa große Zentromerprotein CENP-B ist ein DNA-bindendes Protein und bei Eukaryoten hoch konserviert. Es erkennt spezifisch ein „CENP-B-Box“ genanntes 17 bp großes Sequenzmotiv (CTTCGTTGGAAACGGGA) in der α -Satelliten-DNA und bindet daran mit dem N-terminalen Teil (Earnshaw et al. 1987, Masumoto et al. 1989, Kipling und Warburton 1997). CENP-B scheint eine Rolle beim Aufbau des Kinetochors zu spielen (Okada et al. 2007). Jedoch ist es für die Aufrechterhaltung eines Zentromers nicht erforderlich (Hudson et al. 1998, Kapoor et al. 1998, Perez-Castro et al. 1998). CENP-B bindet mit sich selbst über eine Dimerisierungsdomäne (Kitagawa et al. 1995, Yoda et al. 1992), was das Binden der Nukleosomen induziert (Tanaka et al. 2005). Dieses Protein kommt sowohl an aktiven als auch an inaktiven Zentromeren bei dizentrischen Chromosomen vor, fehlt jedoch am Y-Chromosom sowie an Neozentromeren, was auf das Fehlen von α -Satelliten-DNA vom Typ 1 beim Y-Chromosom bzw. eine von der Zentromer-DNA abweichende Sequenz bei Neozentromeren zurückzuführen ist (Earnshaw et al. 1989, Sullivan et al. 2001).

1.5.2.3 CENP-C

CENP-C, ist wie CENP-A und CENP-B ein DNA-Bindeprotein (Saitoh et al. 1992, Yang et al. 1996), das wie CENP-A nur an aktiven Zentromeren zu finden ist (Earnshaw et al. 1989). Es weist zwei Domänen auf, die sowohl die DNA-Bindung vermitteln, als auch für die

Lokalisierung ans Zentromer verantwortlich sind (Trazzi et al. 2002). Dieses Protein bildet eine Plattform für den Kinetochoraufbau zu Beginn der Mitose, indem der C-terminale Teil an die CENP-A-Nukleosomen des Zentromers bindet (Trazzi et al. 2002, Trazzi et al. 2009, Carroll et al. 2010, Song et al. 2002, Sugimoto et al. 1994, Yang et al. 1996, Lanini und McKeon 1995, Milks et al. 2009) und der N-terminale Teil an Proteine des KMN-Netzwerks (Przewloka et al. 2011), genauer direkt an den Mis12-Komplex (Screpanti et al. 2011).

1.6 Kleine überzählige Markerchromosomen (sSMC)

Unter Markerchromosomen im Allgemeinen versteht man strukturell abnorme Chromosomen unbekannter Herkunft, welche gehäuft in Karyotypen von Patienten mit konstitutionellen genetischen Erkrankungen und Krebs-Patienten vorkommen (ISCN, Shaffer et al. 2013). Diese Definition trifft auf viele Markerchromosomen unterschiedlichster Größe und Form zu. Die in dieser Arbeit untersuchten kleinen überzähligen Markerchromosomen (engl. small supernumerary marker chromosomes = sSMC) heben sich aus dieser Gruppe hervor.

sSMC werden definiert als strukturell abnorme Chromosomen, die mit konventionellen Bänderungstechniken nicht zweifelsfrei identifiziert und charakterisiert werden können und im Allgemeinen kleiner oder größengleich mit Chromosom 20 derselben Metaphase sind. sSMC treten zusätzlich zum normalen Karyotyp, in numerisch abnormen Karyotypen (z.B. Trisomie 21 u.Ä.), aber auch in strukturell abnormen, jedoch balancierten Karyotypen mit oder ohne Ringchromosomen-Bildung auf (Liehr et al. 2004a).

1.6.1 Erstbeschreibung

Bereits kurze Zeit nachdem Tijo und Levan 1956 den konstitutionellen Chromosomensatz mit 46 Chromosomen (22 Autosomenpaare und 2 Gonosomen) definiert hatten, erschienen die ersten Beschreibungen von sSMC in Australien (Ilbery et al. 1961), England (Ellis et al. 1962) und Dänemark (Froland et al. 1963).

1.6.2 Arten

Strukturell lassen sich die sSMC in drei Gruppen einteilen: invertiert duplizierte Chromosomen (inv dup), kleine zentrische Minute-Chromosomen (min) – das sind Fragmente der zentromernahen Region mit fehlenden Anteilen an p- und q-Armen – und Ringchromosomen (r) (Abb. 1.2). Darüber hinaus sind von diesen Formen wiederum verschiedene Varianten beschrieben.

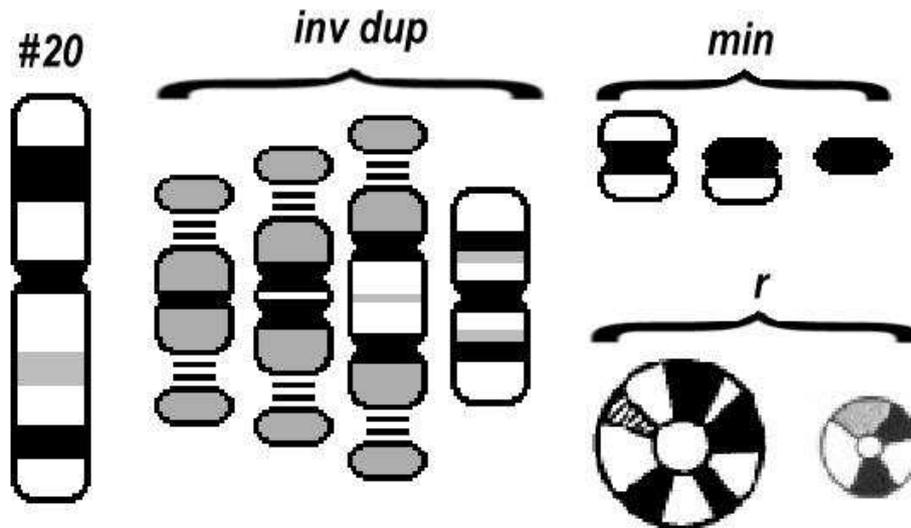


Abb. 1.2: Darstellung der verschiedenen Arten von sSMC (Modifiziert nach Liehr 2013).

1.6.3 Häufigkeit

3 Millionen Menschen weltweit sind Träger eines sSMC (Liehr und Weise 2007, Liehr 2013). Sie werden entweder von Generation zu Generation weitergegeben oder entstehen neu (*de novo*). Die Häufigkeit des Vorliegens eines sSMC beträgt bei ungeborenen Kindern 0,075%, bei Neugeborenen 0,044%, bei subfertilen Personen 0,125% und bei Menschen mit mentaler Retardierung 0,288% (Liehr 2008).

1.6.4 Entstehung

Es gibt verschiedene Theorien über den Entstehungsmechanismus von sSMC. Die favorisierte Variante ist die des sog. „Trisomic rescue“. Hierbei geht man von einer ursprünglich trisomen Eizelle aus, die eine noch weitgehend unerforschte Möglichkeit besitzt, eines der Chromosomen abzubauen. Die Entscheidung, welche der drei Kopien dabei abgebaut wird, scheint willkürlich zu erfolgen. Wird das Chromosom vollständig abgebaut, resultiert das in den gewünschten 46 Chromosomen. Bei unvollständigem Abbau bleibt der Rest als sSMC zurück (Bartels et al. 2003). „Gamete complementation“, Postfertilisationsfehler oder „monosomic rescue“ werden als weitere mögliche Erklärungen diskutiert (Liehr 2012, Liehr et al. 2011)

Die Entstehung von sSMC scheint, in Abhängigkeit von der Form, unterschiedlich zu sein. Für die im Rahmen dieser Arbeit überwiegend untersuchten invertiert duplizierten Chromosomen ist die plausibelste Erklärung die eines sog. ‚U-type exchange‘. Während des crossing overs in der Meiose, bei dem sich normalerweise ein X-type exchange vollzieht, erfolgt hier durch einen U-type exchange eine inkorrekte Rekombination. Dabei entsteht

neben dem invertiert duplizierten Chromosom ein azentrisches Fragment, welches in der folgenden Kernteilung verloren geht (Abb. 1.3).

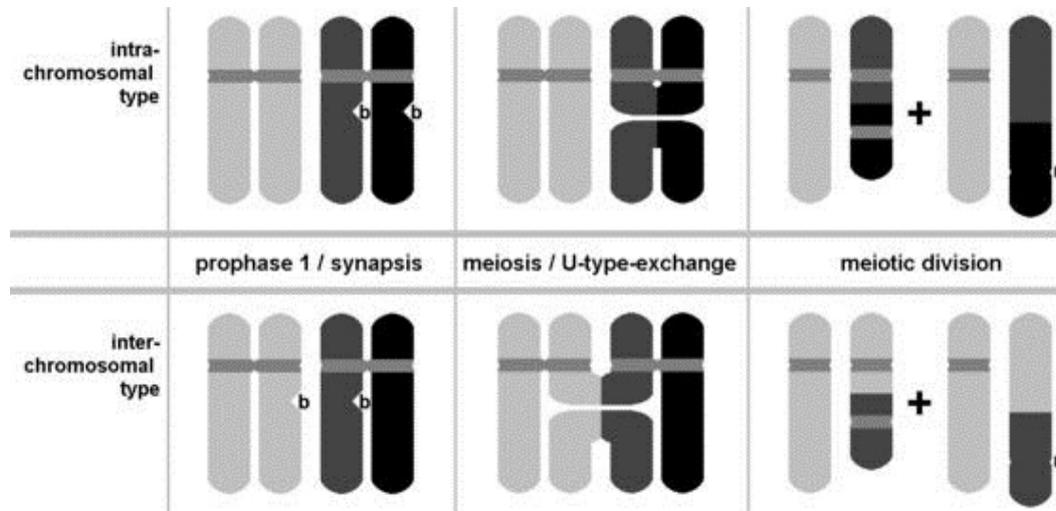


Abb. 1.3: Prinzip der sSMC-Entstehung durch ‚U-type exchange‘ (Modifiziert nach Liehr 2013).

1.6.5 Charakterisierungsmöglichkeiten

Aufgrund ihrer geringen Größe gestaltete sich die Charakterisierung der sSMC lange Zeit sehr schwierig. Mittels der Bänderungszytogenetik ließen sie sich zwar als solche identifizieren, eine genaue Charakterisierung ließ sich jedoch aufgrund der geringeren Auflösung in diesem kleinen Maßstab nicht eindeutig bewerkstelligen. Durch Anfärbung der Nukleolusorganisierenden Regionen auf den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen (NOR-Färbung) ließen sich sSMC mit akrozentrischer Herkunft von solchen, die von nicht-akrozentrischen Chromosomen abstammen, unterscheiden (Buckton et al. 1985, Hou und Wang 1998, Viersbach et al. 1998). Durch Anwendung der FISH-Technik, bei der Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte spezifisch angefärbt werden können, ist heute, unter Anwendung spezieller SONDENSSETS (siehe Abschnitt 2.3.2), eine umfassende Charakterisierung der sSMC hinsichtlich ihrer Größe, Struktur und Herkunft möglich.

1.6.6 Dizentrische sSMC

Ebenso wie in Abschnitt 1.1 für humane große Chromosomen beschrieben, können auch sSMC zwei oder mehr Zentromere aufweisen. Sie treten sowohl im Mosaik auf, können aber auch konstitutionell vorhanden und somit stabiler Teil jeder Zelle sein. Meist handelt es sich um sSMC, die dem invertiert duplizierten Typ zugeordnet werden können; der Vollständigkeit halber sollte jedoch erwähnt werden, dass auch ringförmige sSMC im Besitz

zweier Zentromere sein können (sog. Doppelringe), welche dann aber meist mit einem komplexen Karyotyp verbunden sind, d.h., neben Doppelringen treten vor allem einfache Ringe auf (oder manchmal auch zusätzlich Zellen ohne sSMC).

Dizentrische sSMC sind häufiger zu finden als große dizentrische Chromosomen, weswegen sie ein gutes Modell liefern, Funktion, Eigenschaften und Aktivität der Zentromere zu untersuchen.

1.7 Histonmodifikationen

Bestimmte posttranslationale Modifikationen an Histonen bzw. spezifische Kombinationen derer verändern die Chromatinstruktur zur Gewährleistung der Gentranskription oder die Stilllegung von Genen. Allgemein werden große Mengen an am vierten Lysinrest methylieren Histons H3 (H3K4) in den Promotorregionen aktiver Gene gefunden (Bernstein et al. 2005, Kim et al. 2005, Roh et al. 2005, Roh et al. 2006). 2002 zeigte eine Studie an Hefen (*S. cerevisiae*), dass die zweifache Methylierung (H3K4me2) sowohl an aktiven als auch an inaktiven Genen nachweisbar war, eine dreifache Methylierung (H3K4me3) jedoch ausschließlich an aktiven Genen detektiert wurde (Santos-Rosa et al. 2002). Diese Modifikation wurde somit als Indikator für Genaktivität betrachtet, da sie mit dem Transkriptionslevel korreliert und vor allem in den transkribierten Regionen angereichert ist (Liu et al. 2005, Pokholok et al. 2005). Dieses Methylierungsmuster wurde nachfolgend auch bei Taufliege, Maus und Mensch nachgewiesen (Schübeler et al. 2004, Bernstein et al. 2005, Kim et al. 2005, Roh et al. 2006). Durch ChIP-Analysen (Chromatin-Immunoprecipitation) an embryonalen Erythrozyten von Hühnern konnten fundamentale Unterschiede der H3K4-Methylierung zwischen Hefen und höheren Eukaryoten in Bezug auf ihre Funktion bei der Transkription gefunden werden. Denn bei höheren Eukaryoten scheint nicht allein die Präsenz von H3K4me3, sondern vielmehr das Verhältnis von H3K4me2 und H3K4me3 die Genaktivität zu markieren (Schneider et al. 2004). Mit Hilfe spezialisierter molekulargenetischer Methoden bzw. mit deren Kombination wie z.B. ChIP und Sequenzierung (ChIP-Seq) oder ChIP und DNA-Mikroarrays (ChIP-chip) wurde ein enormer Kenntnisstand über genomweite posttranslationale Histonmodifikationen und deren Bedeutung und Funktionen in der Zelle erlangt. Hierbei handelt es sich meist um Mittelwertanalysen, da viele Zellen, in unterschiedlichen Zellzyklusstadien und folglich mit verschiedenen Expressionsmustern, das Untersuchungsmaterial darstellen. Dieser Umstand lässt daher nur limitierte Aussagen über die Verbindung von Histonmodifikationen und Chromatinfunktion zu (Terrenoire et al. 2010).

1.8 Fragestellungen

In einer dieser Arbeit vorangegangenen eigenen Pilotstudie konnten unterschiedliche Aktivitätsmuster an einer kleinen Zahl von dizentrischen sSMC nachgewiesen werden. Die nachgewiesenen Aktivitätsmuster waren erstaunlich heterogen (nur ein Zentromer aktiv, zwei Zentromere aktiv, Zentromere fusioniert) und zwar sowohl zwischen einzelnen Fällen als auch innerhalb eines Falles (Ewers et al. 2010). Hieraus ergab sich die folgende erste Fragestellung der vorliegenden Arbeit:

- Können Unterschiede in den Aktivitätsmustern bei dizentrischen sSMC zwischen den einzelnen Fällen und innerhalb eines Falles bestätigt werden und sind diese auch bei anderen humanen dizentrischen Chromosomen zu verzeichnen?

Die zweite hier behandelte Fragestellung in Bezug auf die Zentromeraktivität lautet:

- Ergeben sich aus den Aktivitätsmustern Hinweise auf den zugrunde liegenden Mechanismus der Zentromer(in)aktivierung in dizentrischen Chromosomen und auf Zusammenhänge mit Größe, Geschlecht, Mosaikstatus (usw.) des Trägers?

Ein weiterer Teil der Arbeit befasst sich mit der Interphasekernarchitektur bei Vorliegen eines sSMC. Auf dem Gebiet der humanen Interphasekernarchitektur wurden in den letzten Jahren – nicht zuletzt durch die Entwicklung der 3D-FISH-Technik – erstaunliche Fortschritte erzielt (Steinhaeuser et al. 2002, Solovei et al. 2002, Manvelyan et al. 2008a, Manvelyan et al. 2008b, Manvelyan et al. 2009). Studien zu dizentrischen sSMC und deren Verhalten in Interphasekernen sowie deren Einfluss auf die Interphasekernstruktur lagen aber bisher noch nicht vor.

Die dritte Fragestellung lautet daher:

- Welchen Einfluss hat das Vorliegen eines dizentrischen sSMC auf die Zellkernarchitektur?

Schließlich wurden erstmals funktionelle Studien zur NOR-Aktivität bei sSMC durchgeführt mit der Fragestellung, ob es einen Einfluss der NOR-Aktivität auf die Zentromerregion gibt.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterialien

In dieser Arbeit wurden Zellsuspensionen aus Blut, Fruchtwasser und aus lymphoblastoiden Zelllinien (LCL = Epstein-Barr-Virus transformierte T-Lymphozyten) untersucht. Die verwendeten Zellsuspensionen aus Blut wurden vornehmlich in der zytogenetischen Abteilung des Instituts für Humangenetik Jena aufgearbeitet. Kultivierung und Präparation der LCL erfolgte nach Standardprotokollen (Verma und Babu 1995).

Die sSMC wurden zum Großteil in Rahmen der Diagnostik zyto- und molekularzytogenetisch untersucht und charakterisiert. Es standen 106 Zellsuspensionen mit dizentrischen sSMC und 41 Zellsuspensionen mit dizentrischen Chromosomen zur Verfügung (Tab. 2.1 und 2.2). Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Patienten-Suspensionen ist im Anhang in Tabelle 7.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Auflistung der sSMC-Fälle nach chromosomalem Ursprung. Bei nicht in der sSMC-Datenbank (Liehr 2013) aufgeführten sSMC-Fällen sind Karyotypformeln aufgelistet. Angegeben sind Fallnummer, chromosomale Herkunft, zugehörige Fallnummer nach sSMC-Datenbank bzw. Katalog-ID-Nr. und ggf. Karyotypformel.

| Fall-Nr. | Chromosom | Bezeichnung: Fallnummern nach sSMC-Datenbank/ Katalog-ID-Nr./ | Karyotypformel |
|-----------------------------------|-----------|---|------------------|
| 1 | 5 | 05-W-p15.33/2-1 | |
| 2 | 6 | 06-O-p11.1/2-1 | |
| 3 | 8 | 08-W-p11.21/3-1 | |
| 4 | 9 | | inv dup(9)(q12) |
| 5 | 13 | 13/21-O-q10/1-11 | |
| 6-17, 102 | 14 | 14-W-q10/1-1; 14-U-1b; 14-O-q11.1/1-6; 14-O-q11.1/1-15; 14-U-1c; 14-O-q11.1/1-5; 14-CO-5; 14-O-q11.1/1-10; 14-O-q11.1/1-14; 14-O-q11.1/1-31; 14-O-q11.1/1-22; 14-O-q11.2/5-1; 14-U-31 | |
| 18-46, 48-57, 59-60, 150 | 15 | 15-O-q11.1/1-5; Kind von 15-O-q11.1/1-21; 15-O-q11.1/1-21; 15-O-q11.1/1-69; 15-O-q11.1/1-49; 15-O-q11.1/1-63; 15-O-q11.1/1-48; 15-O-q11.1/1-62; 15-U-8-4; 15-O-q11.1/1-16; 15-O-q11.1/1-16; 15-U-170; 15-O-q11.1/1-22; 15-O-q11.1/1-45; 15-O-q11.1/1-13; 15-O-q11.1/1-8; 15-O-q11.1/1-54; 15-W-q11.1/3-2; 15-U-199; 15-U-202c; 15-O-q12/1-1; 15-O-q11.2/1-7; 15-O-q11.2/3-3; 15-O-q11.2/1-14; 15-O-q11.2 ~12/1-2; 15-W-q13/4-1; 15-O-q11.2/1-1; 15-W-q12/1-1; 15-CWw-199; 15-CWw-148; 15-Caw-58; 15-W-q13/1-9; 15-W-q13/2-4; 15-W-q13/1-11; 15-W-q13.1/2-1; 15-W-q13.2/3-1; 15-W-q13.2/2-1; 15-W-q13.2/2-2; 15-W-q14/1-6; 15-CWw-193; 15-W-q11.2-q13/1-1; 15-O-q11.1/1-70 | |
| 47 | 15 | GM07992 | |
| 58 | 15 | | inv dup(15)(q13) |
| 61 | 15 | | inv dup(15)(q13) |
| 62 | 15 | 15-W-q13.3+q13.2+q14/1-1 | |
| 147 | 16 | 16-O-p11.1/4-2 | |
| 63-64, 66-72 | 18 | 18-Wi-231; 18-Wi-142; 18-Wi-132; 18-Wi-143; 18-Wi-146; 18-Wi-232; 18-Wi-230; 18-Wi-229; 18-Wi-139 | |
| 65 | 18 | 18-Wi-118 | |
| 73 | 18 | 18-Wi-253 | |
| 148 | 18 | 18-Wi-143 | |
| 74-75 | 21 | 13/21-U-22; 13/21-O-q11/2-5 | |
| 76-101, 151 | 22 | 22-U-15; 22-O-q11.1/1-5; 22-O-q11.1/1-16; 22-O-q11.1/1-8; 22-U-41; 22-O-q11.1/1-15; 22-O-q11.1/1-14; 22-O-q11.1/1-27; 22-O-q11.1/1-24; 22-O-q11.1/1-9; 22-O-q11.1/1-11; 22-O-q11.1/1-21; 14/22-O-q11.1/2-5; 22-W-q11.1/1-6; 22-Wces-3-06; 22-Wces-5-163; 22-Wces-5-120; 22-Wces-3-03; 22-Wces-5-93; 22-Wces-5-166; 22-O-q11.21/1-6; 22-Wces-3-02; 22-Wces-3-04; 22-Wces-5-95; 22-Wces-5-86; 22-Wces-5; 22-W-q12.1/1-1 | |
| 103 | X | minX- p11.2/ 3-1 | |
| 149 | 8; 18 | 18-U-10 | |
| 152 | | weibliche, unauffällige Kontrollsuspension | 46,XX |

Tab. 2.2: Auflistung der Fälle mit großen dizentrischen Chromosomen. Angegeben sind Fallnummer, involvierte Chromosomen, ggf. Katalog-ID-Nr. und Karyotypformel.

| Fall-Nr. | Chromosom | Katalog-ID-Nr. | Karyotypformel |
|----------|-----------|----------------|--|
| 116 | 7 | | 46,XX,der(7)(pter->q22::p11.2->qter) |
| 141 | 9 | | 46,XX,der(9)(pter->q12::p12->qter) |
| 142 | 9 | | 46,XX,der(9) 46,XX,9qh+ and inv(var5) |
| 143 | 9 | | 46,XX,der(9) inv(9)(var5) |
| 144 | 9 | | 46,XX,inv(9)[30%]/46,XX[70%] ish dic(9)(pter->q13::q13->pter) |
| 145 | 9 | | 46,XX,der(9)(pter->p23::q22.1->q13::p11->q12~13::p12->qter) |
| 146 | 9 | | 46,XX,der(9) dic(9)(pter->q12::p11.1->qter) |
| 117 | 18 | | 46,XX,18p+.ish inv dup(18):(q10->p11.31::p11.31->qter) |
| 104 | 21 | | 46,XX,der(21)(pter->p11.1::p11.2->qter) |
| 105 | 21 | | 46,XY,der(21)(pter->q11.2::p1?2->qter) |
| 106 | 22 | | 46,XX,der(22) dic(22)(pter->q11.21::p11.2->22qter) |
| 107 | 22 | | 46,XX,der(22) dic(22)(pter->q11.21::p11.2->22qter) |
| 108 | 22 | | 46,XX,der(22) dic(22)(pter->q11.1::p11.2->qter) |
| 109 | 22 | | 46,XX,der(22) dic(22)(pter->q11.21::p11.2->qter) |
| 110 | 22 | | 46,XX,der(22) dic(22)(p11.31->q11.22or q11.23::p11.1->q11.22or q11.23) |
| 121 | X | GM15859 | 44-49,X,dic(X)(pter->q28::q28-pter) |
| 122 | X | | 45,X/46,XX,der(X) i(X)(p11.2) |
| 123 | X | | mos 45,X/46,X,der(X) i(X)(p11.2) |
| 124 | X | | mos 45,X/46,X,der(X) i(X)(p11.2?) |
| 111 | 1;akro | | 46,XX,der(1)t(1;acro)(p36.33;acro) |
| 112 | 5;18 | | 45,XY,der(5)t(5;18)(q35.3;q10) |
| 113 | 16;22 | | 46,XX,der(16)t(16;22)(q24.3;q11.1) |
| 114 | 16;22 | | 46,XX,der(16)t(16;22)(q24.3;q11.1)mat |
| 115 | 2;17 | | 46,XY,der(2)t(2;17)(p23~22;p10) |
| 118 | 18;22 | | 45,XY,der(18) dic(18;22)(p11.32;p12~13) |
| 119 | 6;17 | | 44,XY,del(5)(q?15q?34),dic(7;16)(7pter->7q11::16q12->16pter),del(7)(?q11), der(10;12)(q?25;?q14),-12 // 44,XY, del(5)(q?15q?34),del(7)(q?22q31), der(10;12)(q?25;?q14), - 12,-16 |
| 120 | 9;22 | | 47,XY,der(9)t(9/22)(q34.13;q11.23),-22,+der(22)x2 der(22)(9qter->9q34.13::22q11.23->22p1?2::22p1?2->22q11.23::9q34.13->9qter) |
| 125 | 1;3 | | 42~45,XX,dic(1;3),der(5) t(3;5)(q21~22;q12~13), t(8;15)(p2?2;q21~22)[cp18]/ 44,idem,+der(8)t(8;15)(p2?2;q21~22),-17,-20[1]/ 46,XX[1] |
| 126 | 7;17 | | 46,XY,t(7;17)(p11;p12) |
| 127 | 15;20 | | 46,XX,add15p,dic(15;20) |
| 128 | X;9 | | 46,X,t(X;9)(q13;q12) |
| 138 | 13;13 | | 46,XX,der(13;13)(q10;q10),+13 |
| 137 | 13;14 | | 45,XY,der(13;14) |
| 136 | 13;14 | | 45,XX,der(13;14) |
| 135 | 13;14 | | 45,XX,der(13;14) |
| 134 | 13;14 | | 45,XX,der(13;14) |
| 133 | 13;14 | | 46,XX,+13,der(13;14) |
| 130 | 13;14 | | 46,XX,der(13;14)(q10;q10),+14 |
| 129 | 13;15 | | 45,XX,rob(13;15)(p1?2;p1?2) |
| 131 | 14;21 | | 46,XX,der(14;21)(q10;q10),+21 |
| 132 | 14;21 | | 45,XX,der(14;21) |

2.1.1 Zellkultivierung und Chromosomenpräparation

Die Kultivierung von Zellen diente dazu, genügend Material zur Chromosomenpräparation zu gewinnen und soweit möglich zur Asservierung einzufrieren, um bei Bedarf erneut auf die

gewünschten Zellen zurückgreifen zu können. Bei der Kultivierung wurde nach Standardprotokoll verfahren (Verma und Babu 1995).

2.1.2 Objektträgerpräparation

Tab. 2.3: Verwendete Reagenzien für Objektträgerpräparation.

| Reagenzien | Hersteller | Beschreibung |
|------------|------------|---|
| Fixativ | | Methanol (Merck®) : Eisessig (Merck®) im Verhältnis 3:1 |

2.1.2.1 Objektträgerpräparation für Zytogenetik und FISH

Die Objektträger (OT, Menzel-Superfrost) wurden vor dem Auftropfen der Zellsuspension mit Seidenpapier gereinigt und anschließend in einer Küvette mit *Aqua dest.* auf 4°C im Kühlschrank gekühlt. Da die Spreitung der Metaphaseplatten entscheidend von Temperatur und Luftfeuchtigkeit abhängt (Spurbeck et al. 1996, Claussen et al. 2002), wurde eine feuchte Kammer vorbereitet und bei 60°C in einen Trockenschrank gestellt. Aus ca. 30 cm Entfernung wurden etwa 40 µl der Zellsuspension mit einer Pipette gleichmäßig auf die schräg in die feuchte Kammer gelegten OT getropft. Anschließend wurden aus geringer Entfernung wenige Tropfen frischen, kalten Fixativs zugetropft, um die Metaphaseplatten und die Zellkerne weiter zu fixieren und Plasmaresten abzuspülen. Die OT trockneten auf einem feuchten Tuch auf einer ca. 50°C warmen Heizplatte. Während der Trocknung der OT unter diesen Bedingungen evaporiert das Methanol und die Essigsäure kann ihre stark hygroskopische Wirkung entfalten. Das aus der Atmosphäre aufgenommene Wasser führt zu einer Quellung und damit zur Sichtbarmachung der Chromosomen (Claussen et al. 2002). Anschließend wurden die OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und für mindestens 24 h bei Raumtemperatur gelagert, um die Chromosomen aushärten zu lassen.

2.1.2.2 Objektträgerpräparation für Immunfluoreszenz

Zur Vorbereitung der OT für Immunfluoreszenzversuche **an Zentromerproteinen** wurde das in Abschnitt 2.1.2.1 beschriebene Verfahren geringfügig modifiziert. Um eine langsamere Trocknung ohne Schädigung der mit dem Chromosom assoziierten Proteine zu gewährleisten, erfolgte die Trocknung der OT auf einer auf 39°C eingestellten Heizplatte. Da die getropften OT nicht über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden konnten, waren sie für jeden Ansatz neu zu tropfen.

Die Objektträgerpräparation für Immunfluoreszenzversuche **an Histonproteinen** erfolgte nach Jeppesen et al. 1992. Hierbei wurden mitotische Zellen lymphoblastoider Zelllinien

durch Zentrifugation gesammelt und die Konzentration mit 75 mM KCl-Lösung auf ca. 2×10^5 Zellen eingestellt. Nach einem 10minütigen Schwellungsprozess bei 37°C wurden ca. 0,5 ml dieser hypotonen Zelllösung mit einer Zytozentrifuge (Heraeus Labofuge 400 mit Swinging Bucket Rotor 75008179) auf einen OT zentrifugiert. Nach Lufttrocknung standen die OT zur Weiterverwendung zur Verfügung.

2.2 Bänderungszytogenetik

Tab. 2.4: Verwendete Reagenzien für Bänderungszytogenetik.

| Reagenzien | Hersteller | Beschreibung |
|-----------------------------|------------|---|
| <i>Aqua dest.</i> | Millipore® | Reinstwasser deionisiert, organisch rein, partikelfrei, zusätzlich autoklaviert |
| Bacto-Trypsin | | Bacto-Trypsin-Ampulle (DIFCO Laboratories GmbH) mit 10 ml <i>Aqua ad</i> mischen (0,5 ml Aliquots herstellen), Lagerung bei -20°C; 1 Aliquot Bacto-Trypsin in 100 ml PBS-Dulbecco (Biochrom AG) geben; bei 37°C vorwärmen |
| Colloidaleentwickler | | 2 g Gelatinepulver in 100 ml <i>Aqua dest.</i> lösen dazu 1 ml konz. Ameisensäure p.a. (HCOOH) pipettieren |
| Giemsa-Lösung | | 10 % Gebrauchslösung in Phosphat-Puffer (pH 6,88; Merck®) verdünnen |
| Wässrige Silbernitratlösung | | 4 g AgNO ₃ (Merck®) in 8 ml <i>Aqua dest.</i> Lösen, in abgedunkeltem Gefäß bei RT lagern |

2.2.1 GTG-Bänderung

Die GTG-Bänderung („G-bands by Trypsin using Giemsa“) zählt zu den Standardmethoden in der Zytogenetik und wird dort routinemäßig angewendet, um Chromosomen hinsichtlich numerischer oder struktureller Veränderungen zu beurteilen. Durch kontrollierten Verdau mit Trypsin und anschließende Färbung mit Giemsa wird ein für jedes Chromosom charakteristisches Muster aus hellen und dunklen Banden erzeugt (Seabright 1971). Die OT wurden, wie in Abschnitt 2.1.2.1 beschrieben, vorbereitet.

Die zu färbenden OT wurden nach Alterung über Nacht für 10-15 sec in der Bacto-Trypsin-Lösung inkubiert und anschließend zweimal in Phosphat-Puffer (pH 6,88) gespült. Darauf folgte die Färbung in Giemsa-Lösung für 5-8 min. Nach kurzem Spülen in *Aqua dest.* und anschließender Lufttrocknung standen die OT zur lichtmikroskopischen Auswertung zur Verfügung.

2.2.2 AgNOR-Färbung

Bei dieser Färbung macht man sich den Umstand zunutze, dass verschiedene Proteine der Nukleolus-organisierenden Regionen (= NOR), z.B. das Nukleolin, besonders mit dem Silbernitrat reagieren, welches die Färbung verursacht, weshalb man hier von einer funktionellen Färbung spricht (Goodpasture und Bloom 1975). Die OT können sowohl frisch als auch gealtert verwendet werden und wurden, wie in Abschnitt 2.1.2.1 beschrieben, vorbereitet.

Es wurden 4 Tropfen wässriger Silbernitratlösung und 2 Tropfen Colloidentwickler gemischt, das Gemisch auf den OT pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach einer Inkubation von 2 min auf der Heizplatte bei 70°C wurde das Deckgläschen wieder entfernt und der OT mit *Aqua dest.* gespült. Daran schloss sich eine kurze Färbung für 3 sec in Giemsa-Lösung an.

2.3 Verwendete DNA-Sonden

2.3.1 In der FISH verwendete Sonden

Die verschiedenen DNA-Sonden wurden entsprechend der Fragestellung ausgewählt und hybridisiert. Es kamen sowohl kommerziell erworbene, über Kooperationen bereitgestellte, als auch über Mikrosezierung hergestellte DNA-Sonden zur Anwendung (siehe Tab. 2.5).

2.3.1.1 BAC-Sonden

Unter „Bacterial artificial chromosome“ (BAC) versteht man ein aus dem Bakterium *Escherichia coli* isoliertes, modifiziertes Fertilitätsplasmid (F-Plasmid), welches klonierte, humane, genomische DNA mit einer maximalen Größe von 0,3 Mb enthält (Shizuya et al. 1992). In der Zelle liegen sie als relativ große Plasmide in geringer Kopienzahl vor. Um eine Stabilisierung der Etablierung der Plasmide zu gewährleisten, ist ein durch ein Antibiotikum hervorgerufener, hoher Selektionsdruck erforderlich. Die Resistenz gegen das Antibiotikum ist auf dem entsprechenden BAC codiert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten BAC sind Bestandteil des Humanen Genomprojektes und wurden größtenteils käuflich erworben (z.B. Invitrogen; CHORI: BACPAC Resource Center im Children's Hospital Oakland Research Institute, USA; Sanger Institute: Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, England) oder standen über Kooperationen zur Verfügung (Dr. David Hardekopf, CHAMBON Inc., Laboratory for molecular diagnostics, Prag, Tschechien). Da die BAC als Bakterienstocklösungen (meist Agarstabs) vorlagen, erfolgte die Aufarbeitung der Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit Protokolls (QIAGEN, Kat.-Nr.: 27104).

2.3.1.2 Mikroseziierte Sonden

Unter Mikrosezierungssonden versteht man DNA-Sonden unterschiedlicher Größe, die über Glasnadel-basierende Mikrosezierung angefertigt werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Mikrosezierungssonden wurden am Institut für Humangenetik Jena hergestellt. Eine Auflistung aller verwendeten Mikrosezierungssonden zusammen mit den kommerziellen Sonden ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Tab. 2.5: Auflistung der verwendeten DNA-Banken.

| DNA-Banken von | Bezeichnung | Lokalisation | Sondenart | Referenz |
|--------------------------------|--|--|--|--|
| Ganze Chromosomen | wcp 1-22; X; Y | Jeweils gesamtes Chromosom 1-22;X;Y | Chromosomen-spezifisch | Senger et al. 1998 |
| p- bzw. q- Arm von Chromosomen | pcp 1p-12p; 16p-20p;Xp; Yp pcp 1q-22q; Xq; Yq | Jeweils die kurzen und langen Arme der Chromosomen 1-12;16-20;X;Y / jeweils die langen Arme von Chromosom 13-15; 21-22 | Chromosomenarm-spezifisch | Liehr und Claussen 2002 |
| Chromosomenregionen | MCB-Banken | 138 pcp verteilt über alle menschlichen Chromosomen | Chromosomenregion-spezifisch | Mrasek et al. 2001, Weise et al. 2003, Weise et al. 2008 |
| Chromosomenregionen | MiDi 54 | kurze Arme aller akrozentrischen Chromosomen | Chromosomenregion-spezifisch | Mrasek et al. 2001 |
| Chromosomenregionen | MiDi 12 | Sonde für Zentromerbereich von #5 und #6 | Mikrosezierung von G. Senger (Jena) | Nietzel et al. 2001 |
| Chromosomenregionen | CEP, LSI | Zentromere bzw. spez. Loci | kommerziell: ABBOTT [®] ; Kreatech [®] | Siehe Firmen-Katalog |
| Chromosomenregionen | Zentromer-spezifische Sonden | Zentromere | Dr. M. Rocchi (Bari, Italien) | Nietzel et al. 2001 |

2.3.2 Sondenmixe

Tab. 2.6: Verwendete Sondenmixe.

| Name | Komponenten | Referenz |
|---------------|--|----------------------|
| cenM-FISH | Zentromer-spezifische Sonden | Nietzel et al. 2001 |
| acrocenM-FISH | Zentromersonden der akrozentrischen Chromosomen, Sonde für den Bereich Yq12 (sat III-spezifische Sonde), NOR-spezifische Sonde, Sonde „midi54“ | Trifonov et al. 2003 |
| subcenM-FISH | pcp-Sonden, zwei zentromernahe BAC (je einer im p- und q-Arm) | Starke et al. 2003 |
| MCB | MCB-Sonden-Mixe für alle menschlichen Chromosomen | Mrasek et al. 2001 |

2.4 Verwendete Antikörper

Zur immunhistologischen Untersuchung der sSMC wurden die in den Tabellen 2.7 und 2.8 aufgelisteten primären und sekundären Antikörper verwendet.

Tab. 2.7: Verwendete primäre Antikörper.

| Primärer Antikörper | Hersteller | Verdünnung |
|--|--|------------|
| Anti-CENPA antibody [3-19] - ChIP Grade (mouse) | Abcam | 1:100 |
| Rabbit polyclonal to CENP-B | Abcam | 1:50 |
| Anti-CENP-C antibody guinea pig serum | Zur Verfügung gestellt von Prof. Kinya Yoda, Japan | 1:100 |
| Anti-dimethyl-Histone H3 (Lys4) (Rabbit antiserum) | Upstate Biotechnology | 1:100 |

Tab. 2.8: Verwendete sekundäre Antikörper.

| Sekundärer Antikörper | Hersteller | Verdünnung | A _{max} (nm) | E _{max} (nm) |
|---|---|---------------|-----------------------|-----------------------|
| goat anti-rabbit IgG-FITC | Santa Cruz Biotechnology, Inc. | 1:50 | 494 | 518 |
| goat anti-mouse IgG-TR | Santa Cruz Biotechnology, Inc. | 1:50 - 1:100 | 586 | 605 |
| Cy ^{TM3} -conjugated AffiniPure Goat Anti-Guinea Pig IgG (H+L) | Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. | 1:250 - 1:300 | 550 | 570 |

2.5 Mikrosezierung von Chromosomen

Eine sehr elegante Methode, sSMC umfassend zu charakterisieren, ist die Verwendung von Mikrosezierung des sSMC selbst mit anschließender reverser FISH. Die Mikrosezierung erfolgte vornehmlich durch Frau Dr. N. Kosyakova und Herrn A.B. Hamid nach Protokollen von Rubtsov et al. bzw. Senger et al. (Rubitsov et al. 1996, Senger et al. 1990).

2.6 Molekulargenetische Techniken

Tab. 2.9: Verwendete Reagenzien für molekulargenetische Untersuchungen.

| Reagenzien | Hersteller | Beschreibung |
|----------------------------------|------------|---|
| <i>Aqua ad injectabilia</i> | Braun® | 10 ml verbrauchsfertig, steril, pyrogenfrei |
| <i>Aqua dest.</i> | Millipore® | Reinstwasser deionisiert, organisch rein, partikelfrei, zusätzlich autoklaviert |
| Chloramphenicol | | 34 mg/ml (Stammkonzentration) in Ethanol bei -20°C lagern; Endkonzentration: 20 µg/ml für RP11- und RP13-Klone |
| Kanamycin | | 45 mg/ml (Stammkonzentration) in <i>Aqua dest.</i> bei -20°C lagern; Endkonzentration: 25 µg/ml für RP1-, RP4-, RP5-Klone |
| Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) | | 10 g Bacto-Trypton (oder Pepton (Merck®)), 10 g NaCl (Roth®), 5 g Bacto-Yeast-Extrakt (Merck®) in 900 ml <i>Aqua dest.</i> lösen, mit 10 M NaOH (Merck®) auf pH = 7,0 einstellen; dann Volumen auf 1 l mit <i>Aqua dest.</i> auffüllen, autoklavieren und verschlossen bei RT oder geöffnet im Kühlschrank lagern |
| Puffer P1 | QIAGEN® | Vor Gebrauch Zugabe von RNase A (QIAGEN®, 100 mg/ml) und Lagerung bei 4°C |
| Puffer P2 | QIAGEN® | Lagerung bei RT |
| Puffer N3 | QIAGEN® | Lagerung bei RT |
| Puffer PE | QIAGEN® | Vor Gebrauch Zugabe von 100%igem Ethanol, Lagerung bei RT |

2.6.1 Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Die in mit Agarose gefüllten Eppendorfgläsern versandten *Escherichia coli* (*E. coli*) K12-Klone, wurden bis zur Aufarbeitung im Kühlschrank gelagert. Damit selektiv nur Bakterien mit dem entsprechenden BAC-Plasmid vermehrt werden, erfolgte der Zusatz bestimmter Antibiotika (Chloramphenicol oder Kanamycin) zum LB-Medium. In einem S1-Labor (Sicherheitslabor der Stufe 1 für die gentechnische Arbeit mit Mikroben, die keine Gefahr für gesunde Menschen und die Umwelt darstellen) wurden die Mikroorganismen unter sterilen Bedingungen mit Hilfe steriler Holzstäbchen unter der Werkbank in 50 ml Röhren (Falcon®) mit je 5 ml LB-Medium angeimpft. Nach einer Kultivierungszeit von max. 16 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler (~200 rpm) wurden 750 µl der LB-Schüttelkultur mit 750 µl Glycerol versetzt, gut gemischt und bei -80°C gelagert und standen somit für evtl. Rekultivierung der *E. coli* zur Verfügung.

2.6.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits der Firma QIAGEN® („QIAprep Spin Miniprep-Kit“, Kat.-Nr. 27104). Dieser basiert auf der Adsorption

der DNA an Silikat-Gel-Membranen unter Hochsalzbedingungen nach vorangegangener alkalischer Lyse der Bakterien.

2.6.3 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) ist ein spezielles molekularbiologisches Verfahren, bei dem geringe DNA-Sequenzen nahezu exponentiell *in vitro* amplifiziert werden können (Saiki et al. 1988). Dabei wird eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-polymerase), welche aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde, verwendet, deren Arbeitsoptimum bei 72°C liegt und eine 5' → 3' – Aktivität aufweist. Darüber hinaus werden doppelsträngige DNA-Moleküle, MgCl₂, Puffer, *Aqua ad injectabilia* (*Aqua ad*) und Desoxynukleosidtriphosphate benötigt. Im Allgemeinen besteht eine Reaktion aus 20 bis 35 dreistufigen Zyklen:

1. **Denaturierung:** Trennung der doppelsträngigen Ausgangs-DNA („template“) in Einzelstränge bei 92-98°C
2. **Annealing:** Primeranlagerung an die komplementären Sequenzen im Bereich des 5' Phosphat-Endes der einzelsträngigen DNA bei 37-70°C
3. **DNA-Synthese:** Aufbau eines neuen, komplementären Doppelstranges bei 70-74°C durch Einbau freier dNTP durch die Taq-Polymerase („primer extension“ bzw. „elongation“).

Alle PCR-Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dies diente der Vermeidung von Kontaminationen durch Fremd-DNA und der Gewährleistung steriler und nukleasefreier Lösungen zur Verhinderung von DNA-Abbau. Alle Lösungen wurden mit sterilem und pyrogenfreiem *Aqua ad injectabilia* angesetzt. Darüber hinaus wurden alle verwendeten Lösungen vor Gebrauch aliquotiert, um das Kontaminations- und Fehlerrisiko weiter zu minimieren.

2.6.3.1 DOP- PCR

Bei der DOP-PCR (= Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotid-Primern) werden degenerierte DOP-Primer (22 bp Oligonukleotid-Primer mit 6 undefinierten, zentralen Basen, flankiert von spezifischen Basen (Bohlander et al. 1992) eingesetzt, um DNA mit unbekannter Sequenz bzw. das gesamte Genom zu vervielfältigen. Diese binden bei niedrigen „annealing-Temperaturen“ (Renaturierungstemperatur 37°C) an vielen Stellen der zu amplifizierenden DNA.

Tab. 2.10: Verwendete Reagenzien für DOP-PCR.

| Reagenzien | Hersteller | Beschreibung |
|--|--|--|
| <i>Aqua ad injectabilia</i> | Braun® | 10 ml verbrauchsfertig, steril, pyrogenfrei |
| AmpliTaQ-DNA-Polymerase | Perkin Elmer/ Applied Biosystems® | 5 U/µl; Enzym für die Markierungs-PCR |
| AmpliTaQ-DNA-Polymerase Stoffel Fragment | Perkin Elmer/ Applied Biosystems® | 10 U/µl |
| DOP-Primer | Synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. E. Birch-Hirschfeld (Institut für Virologie Jena) | Stammlösung: 40 µM; Endkonzentration: 5 µM Sequenz: 5'CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG 3' |
| dNTP's | Perkin Elmer/ Applied Biosystems® | Gebrauchslösung mit den einzelnen Nukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) im Verhältnis 1:1:1:1 → Konzentration je Nukleotid: 2,5 mM (Stammlösung) und 200 µM (Endkonzentration) |
| EDTA | Sigma® | Ethylendiamintetraessigsäuredinatriumsalz; 0,5 M, pH 8,0 |
| GeneAMP-10x-Stoffel- Puffer | Perkin Elmer/ Applied Biosystems® | 100mM Tris- HCl, 100mM KCl, pH 8,3 |
| GeneAmp-10x-PCR-Puffer-II | Perkin Elmer/ Applied Biosystems® | 100 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; pH 8,3; Verwendung in Kombination mit der AmpliTaq-DNA-Polymerase |
| Labelmix | | Gebrauchslösung aus dATP, dCTP, dGTP (2mM) und dTTP (1mM); Stammlösungen: je 10 mM; verwendete geringere Konzentration von dTTP, da an dessen Stelle in der DNA die angebotenen, modifizierten Nukleotide mit einem Hapten bzw. Fluorochrom eingebaut werden sollten |
| MgCl ₂ Solution | Perkin Elmer/ Applied Biosystems® | 25 mM MgCl ₂ |
| T7- Sequenase | | Mischung T7-Sequenase-2.0-DNA-Polymerase (usb®; 13 U/µl) zu Sequenase-Enzyme-Dilution-Puffer 1:8 (usb®) |
| Sequenase-Reaction-Buffer | usb® | 5x konzentriert: 200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM MgCl ₂ , 250 mM NaCl |
| Sequenase-Dilution-Buffer | usb® | 10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 5 mM DTT, 0,1 mM EDTA |

2.6.3.1.1 Amplifizierung der mikrosezierten Chromosomenfragmente

Da zur Vervielfältigung der mikrosezierten Chromosomenfragmente nur eine geringe Ausgangsmenge zur Verfügung stand, wurden die ersten 8 Zyklen der DOP-PCR bei niedrigeren Temperaturen und unter Einsatz von Sequenase durchgeführt, was eine unspezifischere und damit häufigere Bindung der DOP-Primer an die Ziel-DNA und damit eine größere Amplifizierungsausbeute zur Folge hat. Daran schlossen sich Zyklen höherer Temperatur an, in denen die DOP-Primer dann gezielter und spezifischer an die Ziel-DNA banden. Da es sich um einen sehr sensiblen Schritt in der Herstellung von DNA-Sonden handelt, wurde zur weiteren Kontaminationsvermeidung der PCR-Thermocycler (PTC-200, MJ Research®) unter die Sterilwerkbank gestellt.

Tab. 2.11: Zusammensetzung von Lösung A.

| Reagenzien | Konzentration der Stammlösung | Endkonzentration | Einzelansatz pro Sonde [µl] | Bemerkungen |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------------------|--|
| <i>Aqua ad</i> bzw. Plasmid-DNA | | | 3,37 | 5 µl der Lösung A in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß, Zugabe der mikrosezierten DNA (Sammeltropfen) |
| Sequenase-Puffer | 5x | 0,6x | 0,60 | |
| DOP-Primer | 40,0 µM | 5,0 µM | 0,63 | |
| dNTPs | 2,5µM | 200 µM | 0,40 | |

Tab. 2.12: Zusammensetzung von Lösung B.

| Reagenzien | Konzentration der Stammlösung | Endkonzentration | Einzelansatz pro Sonde [μl] | Bemerkungen |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------|--|--|
| Sequenase | 13 U/ μl | 1,6 U/ μl | 0,25 | Sequenase ist thermolabil, daher war in jedem der 8 Zyklen nach der Denaturierung die Zugabe von 0,25 μl Lösung B erforderlich |
| Sequenase Dilution Buffer | | | 1,75 | |

Tab. 2.13: Zusammensetzung von Lösung C.

| Reagenzien | Konzentration der Stammlösung | Endkonzentration | Einzelansatz pro Sonde [μl] | Bemerkungen |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------|--|--|
| <i>Aqua ad</i> | | | 34,22 | Zugabe von 45 μl Lösung C zur Volumenvergrößerung |
| Stoffel Fragment Puffer | 1x | 0,1x | 5,00 | |
| dNTPs | Je 2,5 mM | 220,0 μM | 4,40 | |
| DOP-Primer | 40,0 μM | 1,1 μM | 1,38 | |
| MgCl ₂ | 25,0 mM | 2,5 mM | 5,00 | |

Tab. 2.14: Zusammensetzung von Lösung D.

| Reagenzien | Konzentration der Stammlösung | Endkonzentration | Einzelansatz pro Sonde [μl] | Bemerkungen |
|--|-------------------------------|--------------------|--|---|
| <i>Aqua ad</i> | | | 3,50 | Vor Zugabe von 5 μl der Lösung D wurden die Primer denaturiert, um deren Dimerisierung zu verhindern |
| Stoffel Fragment Puffer | 1x | 0,1x | 0,50 | |
| MgCl ₂ | 25 mM | 2,5 mM | 0,50 | |
| AmpliQ [®] DNA Polymerase, Stoffel Fragment | 10 U/ μl | 1 U/ μl | 0,50 | |

Nach der Vorlage von je 5 μl Lösung A in ein 0,5 ml Eppendorfgefäße und Zugabe des die mikrosequenzierten Fragmente enthaltenden Sammeltropfens, wurden die Eppendorfgefäße in den Thermocycler gestellt und nach unten stehendem Protokoll behandelt (modifiziert nach Rubtsov et al. 1996):

Tab. 2.15: PCR-Protokoll für DOP-PCR.

| Schritt | Temperatur | Zeit | Beschreibung |
|---|------------------|-------|---|
| 1. | 92°C | 5' | Initialer Denaturierungsschritt |
| 2. | 25°C | 2,20' | Zugabe von 0,25 μl Lösung B → Primeranlagerung an die Ziel-DNA |
| 3. | 34°C | 2' | DNA-Synthese durch Enzym Sequenase |
| 4. | 90°C | 1' | Denaturierung |
| → Schritte 2-4 wurde 8x wiederholt, Lösung B wurde nach jedem Zyklus erneut zugesetzt, wegen Temperaturempfindlichkeit des Enzyms | | | |
| 5. | 30°C | 2,20' | Zugabe von 45 μl Lösung C → Primeranlagerung an die Ziel-DNA |
| 6. | 92°C | 1' | Denaturierung, verhindert die Bindung der Primer untereinander |
| 7. | 56°C | 2,20' | Zugabe von 5 μl Lösung D → Primeranlagerung an die Ziel-DNA |
| 8. | 70°C | 2' | DNA-Synthese durch AmpliQ [®] DNA Polymerase, Stoffel Fragment |
| 9. | 0,1°C/s bis 74°C | | |
| 10. | 92°C | 1' | Denaturierung |
| 11. | 56°C | 1' | Primeranlagerung an die Ziel-DNA |
| 12. | 70°C | 2' | DNA-Synthese durch AmpliQ [®] DNA Polymerase, Stoffel Fragment |
| 13. | 0,1°C/s bis 74°C | | |
| → Schritte 10-12 werden 31x wiederholt | | | |
| 14. | 72°C | 10' | DNA-Synthese durch AmpliQ [®] DNA Polymerase, Stoffel Fragment |
| 15. | 4°C | ∞ | Endtemperatur, wurde bis zur Beendigung des Programms beibehalten |

Nach der DOP-PCR wurde zu jedem Ansatz 1 μl EDTA zugefügt, um die Stabilität der DNA gegenüber Nukleasen zu erhöhen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.6.3.1.2 Amplifizierung der BAC-DNA

Die Amplifizierung der BAC-DNA erfolgte analog zur im Abschnitt 2.6.3.1.1 beschriebenen Vervielfältigung der mikrosezierten Sonden. Abweichend ist die Zahl der Sequenase-Zyklen, die sich hier auf drei beschränkt, wobei eine Ausgangskonzentration von 200 ng/μl DNA vorlag. Der Anteil an eingesetztem *Aqua ad injectabilia* in Lösung A wurde entsprechend der DNA-Konzentration angepasst.

2.6.3.1.3 Reamplifizierungs-PCR

An jede DOP-PCR schloss sich eine Reamplifizierungs-PCR an. Sie diente dazu, die in der DOP-PCR aus den mikrosezierten Chromosomenfragmenten bzw. der BAC-DNA gewonnene DNA-Menge zu vervielfältigen. Die Reamplifizierungs-PCR bot den Vorteil, dass nach Aufbrauchen der DOP-PCR-Produkte nicht erneut eine DOP-PCR vorgenommen werden musste. Auch in dieser PCR kamen DOP-Primer zur Anwendung. Der Ansatz erfolgte steril unter der Werkbank. Die PCR wurde anschließend im PCR-Thermocycler durchgeführt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in nachstehender Tabelle aufgezeigt:

Tab. 2.16: Verwendete Reagenzien für Reamplifizierungs-PCR.

| Reagenzien | Konz. d. Stammlösung | Endkonzentration | Einzelansatz pro Sonde [μl] |
|---|----------------------|------------------|-----------------------------|
| <i>Aqua ad</i> | | | 34,25 |
| Stoffel Fragment Puffer | 10x | 1x | 5,0 |
| MgCl ₂ | 25,0 mM | 2,5 mM | 5,0 |
| dNTPs | 2,5 mM | 0,2 mM | 5,0 |
| DOP-Primer | 40,0 μM | 1,0 μM | 1,25 |
| AmpliTa [®] DNA Polymerase, Stoffel Fragment | 1U/μl | 0,1 U/μl | 0,5 |

Zu diesem Ansatz wurde 1 μl der zu amplifizierenden DNA pipettiert und anschließend nach nachfolgendem Protokoll verfahren:

Tab. 2.17: PCR-Protokoll für Reamplifizierung von DNA.

| Schritt | Temperatur | Zeit | Beschreibung |
|--------------------------------------|------------|------|--|
| 1. | 92°C | 3' | Anfänglicher Denaturierungsschritt |
| 2. | 91°C | 1' | Denaturierung |
| 3. | 56°C | 1' | Primer-Anlagerung an die Ziel-DNA |
| 4. | 70°C | 2' | DNA-Synthese durch AmpliTa [®] DNA Polymerase, Stoffel Fragment |
| → Schritte 2-4 wurden 29x wiederholt | | | |
| 5. | 72°C | 5' | Denaturierung |
| 6. | 4°C | ∞ | Endtemperatur, wurde bis zur Beendigung des Programms beibehalten |

Auch nach dieser PCR erfolgte die Lagerung nach Zugabe von 1 μl EDTA pro Ansatz bei -20°C.

2.6.3.1.4 Markierungs-PCR

Die in Reamplifizierungs-PCR vervielfältigten PCR-Produkte wurden mit einer Markierungs-PCR mit Fluoreszenzfarbstoff bzw. Haptenen versehen. Dabei wurden modifizierte Nukleotide in die DNA eingebaut. Man unterscheidet zwei Arten von Markierung: Bei der direkten Markierung werden Fluoreszenz-gekoppelte Nukleotide verwendet. Bei der indirekten Markierung erfolgt der Einbau von Haptenen in die DNA, die dann im Endwaschschritt mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper detektiert werden.

Tab. 2.18: Verwendete Fluorochrome und Haptene.

| Name | Hersteller | Absorptionsmaximum (nm) | Emissionsmaximum (nm) |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| ChromaTide- TexasRed-12-dUTP (TR) | Molecular Probes® | 587 | 612 |
| Diethylamino-Cumarin (DEAC) | NEN®, Life Science Products, Inc. | 426 | 480 |
| SpectrumGreen-dUTP (SG) | Abbott® | 497 | 524 |
| SpectrumOrange-dUTP (SO) | Abbott® | 559 | 588 |
| Biotin-16-dUTP (Bio) | Roche® | Abhängig vom verwendeten AK | Abhängig vom verwendeten AK |
| Digoxigenin-11-dUTP (Dig) | Roche® | Abhängig vom verwendeten AK | Abhängig vom verwendeten AK |

Der Ansatz erfolgte steril unter der Werkbank. Die PCR wurde anschließend im PCR-Thermocycler durchgeführt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in nachstehender Tabelle aufgezeigt:

Tab. 2.19: Verwendete Reagenzien für Markierungs-PCR.

| Reagenzien | Konzentration d. Stammlösung | Endkonzentration | Einzelansatz pro Sonde [µl] |
|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| <i>Aqua ad</i> | | | 12,08 |
| 10x PCR-Puffer | 10x | 2x | 2 |
| DOP-Primer | 40 µM | 2,00 µM | 1 |
| dNTPs-Labelmix | 10x | 2x | 2 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 2,5 M | 2 |
| Modifizierte Nukleotide | Entsprechend der Herstellerangabe | Entsprechend der Herstellerangabe | 0,5-2,0 |
| AmpliTa ^q ® DNA-Polymerase | 5 U/µl | 0,03 U/µl | 0,12 |

Zum Reaktionsansatz werden pro Sonde 2 µl DNA zugegeben und jeweils ein Hapten bzw. Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt. Der Ablauf der PCR war der Reamplifizierungs-PCR analog. Bei Sondenmischen wurden die Komponenten zunächst als Einzelansätze markiert und erst während der DNA-Fällung zusammengeführt.

2.6.4 DNA-Fällung

Tab. 2.20: Verwendete Reagenzien für DNA-Fällung.

| Reagenzien | Hersteller | Beschreibung |
|-----------------------------|-------------|---|
| <i>Aqua ad injectabilia</i> | Braun® | 10 ml verbrauchsfertig, steril, pyrogenfrei |
| Dextransulfat (DS) | | MM: 2 g Dextransulfat (Sigma®) + 2 ml 20xSSC (Invitrogen™) + 2 ml 0,5 M Natriumphosphat (Merck®) + 5 ml deionisiertes Formamid (Sigma®); auf 10 ml mit <i>Aqua ad</i> auffüllen; bei 70°C lösen (ca. 3 h) |
| Ethanol _{lab} | ROTH® | 100% Ethanol |
| Natriumacetat 3 M, pH 5,2 | | 24,6 g Natriumacetat (Sigma®) und 100 ml <i>Aqua ad</i> mischen; pH 5,2 mit Eisessig (Merck®) einstellen |
| t-RNA aus <i>E. coli</i> | Boehringer® | Stocklösung 10 µg/µl; dient als Träger-DNA |

Nach der Markierungs-PCR wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt, um die markierte DNA zu konzentrieren und von überflüssigen PCR-Komponenten zu reinigen. Pro Einzelsonde kamen 5 µl Natriumacetat, 10 µl t-RNA und das 2,5 fache Volumen an Ethanol zum Einsatz. Durch die Zugabe der t-RNA kann die Ausbeute an DNA um ca. 10% erhöht werden. Nach einer Inkubation über Nacht bei -20°C oder für 30 min bei -80°C wurde das Gemisch bei 15 300 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Sevant[®]) vollständig getrocknet. Anschließend wurde das Pellet je nach Sonden-Art in unterschiedlicher Menge Dextransulfat (DS) gelöst.

Bei Mixen wurde die DNA vor der Fällung zusammengeführt und gemeinsam gefällt, wobei die eingesetzten Volumina der Fällungsreagenzien entsprechend angepasst wurden. Die Sonden konnten nun nach vollständigem Lösen, bei -20°C, möglichst lichtgeschützt (da markierte Proben lichtempfindlich sind), bis zur Weiterverwendung gelagert werden.

2.7 Molekularzytogenetische Techniken

2.7.1 FISH

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) erfolgte nach dem in „Liehr: Fluorescence in situ Hybridization (FISH)“ beschriebenen Protokoll (Liehr 2009).

2.7.2 S-FISH

Die S-FISH (Suspensions-FISH) findet Anwendung in der Untersuchung der Lage von Chromosomen im Kern und deren Orientierung zueinander in Interphasekernen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden (zuvor zyto- und molekularzytogenetisch charakterisierte) sSMC in ihrer Lage im Interphasekern untersucht. Zur Analyse wurden WCP, PCP und Zentromer-Sonden verwendet und nach dem von Steinhäuser und Mitarbeitern beschriebenen Protokoll behandelt (Steinhäuser et al. 2002). Dabei gleicht die Aufarbeitung derjenigen einer Standard-FISH, jedoch erfolgen alle Schritte (Pepsinvorbehandlung, DNA-Denaturierung der Interphasekerne, Auftragen der Sonden-DNA, Hybridisierung, Posthybridisierungswaschung) in Suspension. Die Interphasekerne wurden erst zum Schluss auf einen OT mit konkaver Vertiefung gegeben und standen daraufhin zur Auswertung zur Verfügung. Somit war es möglich, eine 3D-Analyse von sphärischen Interphasekernen vorzunehmen.

2.8 Immunhistologische Techniken

Tab. 2.21: Verwendete Reagenzien für immunhistochemische Untersuchungen.

| Reagenzien | Hersteller | Beschreibung |
|--|------------------------|---|
| 1xKB ⁻ | | 10 mM Tris:HCl (pH 7,7) + 0,15 M NaCl (Roth [®]) in <i>Aqua dest.</i> |
| 1xPBS-azid | | 10 mM NaPO ₄ + 0,15 M NaCl (Roth [®]) + 1 mM EGTA (Roth [®]) + 0,01 % NaN ₃ (Sigma [®]) in <i>Aqua dest.</i> |
| 1xTEEN | | 1 mM Triethanolamin:HCl + 0,2 mM NaEDTA (Sigma [®] ; pH 9,0) + 25 mM NaCl + 0,1% Triton X-100 (NeoLab [®]) in <i>Aqua dest.</i> |
| <i>Aqua ad injectabilia</i> | Braun [®] | 10 ml verbrauchsfertig, steril, pyrogenfrei |
| <i>Aqua dest.</i> | Millipore [®] | Reinstwasser deionisiert, organisch rein, partikelfrei, zusätzlich autoklaviert |
| DAPI/ Antifade | | 0,4 % DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol; Sigma [®] ; Stocklösung: 50 µg/ml) mit VECTASHIELD [®] Mounting Medium (Vector Laboratories [®]) 0,5:1000 bis 3:1000 ansetzen und im Kühlschrank lagern |
| KCM-Puffer | | 10 mM TRIS:HCl (pH 8,0) + 20 mM NaCl (Roth [®]) + 120 mM KCl (Roth [®]) + 0,5 mM NaEDTA (Sigma [®] ;) + 0,1% TritonX-100 (NeoLab [®]) |
| 4% Paraformaldehyd/KCM | | KCM-Puffer mit 4% Paraformaldehyd (Roth [®]) |
| NaPO ₄ | | Stammlösung mit 100 mM; pH 7,4; 1,282 g Na ₂ HPO ₄ (Merck [®]) + 0,386 g NaH ₂ PO ₄ (Merck [®]) in 100 ml <i>Aqua dest.</i> |
| Triethanolamin:HCl | Fluka [®] | Stammlösung mit 500 mM; 1,49 g mit <i>Aqua dest.</i> auf 20 ml auffüllen; pH 8,5 (mit HCl einstellen) |
| Tris((hydroxymethyl)-aminomethan) (Tris) | Roth [®] | |
| Tris:HCl | | Stammlösung mit 500 mM; 6,057g Tris mit <i>Aqua dest.</i> auf 100 ml auffüllen (pH mit HCl einstellen) |

2.8.1 Immunfluoreszenz an Zentromerproteinen

Die Durchführung der Immunfluoreszenzexperimente erfolgte in Anlehnung an das 1989 von Earnshaw und Kollegen beschriebene Protokoll (Earnshaw et al. 1989). Es wurden Antikörper gegen CENP-B und CENP-C als primäre Antikörper verwendet und mit entsprechenden sekundären Antikörpern detektiert (siehe Tab. 2.8). Sobald die Objektträger nach dem Auftropfen der Suspension vollständig getrocknet waren, wurden sie in 1x PBS-azid überführt und 5 min inkubiert. Dies dient vornehmlich der Rehydrierung der OT. Darüber hinaus hat das darin enthaltene NaN₃ eine antibakterielle Wirkung und schützt somit vor Verunreinigungen. Einer weiteren Komponente, dem EGTA (Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure), kommt besondere Bedeutung zu. Oft führen die Aufbereitung von Geweben oder Zellen und die damit verbundene Fixierung zu einer Maskierung der Epitope von Antigenen. Sie sind in der Folge nicht mehr von den Antikörpern erkennbar. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, Methoden zu entwickeln, um die maskierten Epitope wieder für die Antikörper zugänglich zu machen. Die verschiedenen Methoden, mit denen man die Verfügbarkeit von Antigenen für die Interaktion mit spezifischen Antikörpern erhöhen kann, werden als „Antigen Retrieval“ bezeichnet. Zur Demaskierung stehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung: entweder ein enzymatischer Verdau oder die Verwendung von Hitze. Auch ist die Zusammensetzung der Retrieval-Lösung von Bedeutung. Ca²⁺-Ionen scheinen während der Fixierung mit Proteinen Komplexe zu bilden, woraus die Maskierung der Epitope resultiert. Daher dient EGTA hier als Chelatbildner von Ca²⁺ und wird neben EDTA erfolgreich im „Antigen Retrieval“ eingesetzt. Daten zeigen, dass die Chelatbildung

bzw. das Ausfällen von gewebsgebundenem Ca^{2+} ein kritischer Schritt beim „Antigen Retrieval“ ist (Morgan et al. 1997), der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Nach einer 5minütigen Inkubationszeit wurden die OT dreimal für je 1 min in 1xTEEN bei Raumtemperatur gewaschen. Daran schloss sich die Überschichtung der OT mit 100 μl der primären Antikörperlösung (Verdünnung lt. Tab. 2.7 mit 1xTEEN) an und nach vorsichtigem Überdecken mit einem auf 24x60 mm zurechtgeschnittenen Parafilmstreifen wurden die OT zur Inkubation in einer feuchten Kammer für 40 min in einen Brutschrank (37°C) gestellt. Die Verwendung eines elastischen Parafilmstreifens anstelle eines herkömmlichen starren Deckglases verhinderte eine Schädigung der Chromosomenstruktur und eine damit verbundene Qualitätsminderung. Zur Entfernung überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpers wurden die OT für je 2, 5, und 3 min bei Raumtemperatur in 1x KB⁻ gewaschen. Auf die OT wurden 100 μl der sekundären Antikörperlösung (Verdünnung lt. Tab. 2.8 mit 1xKB⁻) pipettiert, abermals mit einem zugeschnittenen Parafilmstreifen abgedeckt und für 40 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dieser Antikörper, an den ein Fluorochrom gekoppelt ist, dient zur Detektion des primären Antikörpers und erbringt somit den indirekten Nachweis des Proteins unter dem Fluoreszenzmikroskop.

In den folgenden zwei Waschschritten für je 2 min in 1xKB⁻ wurden die OT von überschüssigem Antikörper befreit. Schließlich erfolgt eine Gegenfärbung der Chromosomen mit 20 μl DAPI/Antifade. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der bevorzugt an AT-Bindungen bindet und bei Anregung durch Licht der Wellenlänge 360-390 nm blau fluoresziert, erzeugt bei der computergestützter DAPI-Invertierung ein dem G-Banding ähnliches Bandenmuster, welches die Identifizierung der Chromosomen ermöglicht. Das Vectashield Mounting Medium dient hierbei der Stabilisierung der Fluoreszenz.

2.8.2 Immunfluoreszenz an Histonproteinen

Diesen Versuchen lag das Protokoll von Jeppesen und Mitarbeitern zugrunde (Jeppesen et al. 1992). Es wurden Antikörper gegen H3K4me2 und CENP-A als primäre Antikörper verwendet und mit entsprechenden sekundären Antikörpern detektiert (siehe Tab. 2.8). Nach Lufttrocknung der OT wurden sie bei RT für 10 min in KCM-Puffer inkubiert, wodurch die Zellmembran durchlässiger für die Antikörper wird. Anschließend wurde die primäre Antikörperlösung (Verdünnung lt. Tab. 2.7 mit KCM-Puffer und 10% Serum) auf den OT aufgetragen, dieser vorsichtig mit einem Parafilmstreifen überschichtet und zur Inkubation für 1 h bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Es schlossen sich drei 5minütige Waschschrritte in

KCM-Puffer an, um überschüssigen, ungebundenen Antikörper zu entfernen. Nun folgte die Zugabe der sekundären Antikörperlösung (Verdünnung lt. Tab. 2.8 mit KCM-Puffer und 10% Serum wie für die primäre Antikörperlösung beschrieben) und abermals eine Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Nach wiederum drei Waschschritten für je 5 min wurden die OT für 10 min in 4% Paraformaldehyd/KCM fixiert und die Chromosomen schließlich mit 20 µl DAPI/Antifade gegengefärbt. Zur Kontrolle wurde bei jedem Ansatz ein Antikörper gegen CENP-A zugegeben.

2.9 Auswertung

Für die Auswertung wurde ein Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop mit Fünffachrad (Zeiss, Jena) verwendet, welches die Aufnahme der Fluorochrome FITC und Cy3 ermöglichte. Die Bildaufnahme erfolgte mit Hilfe einer Standard-CCD-Videokamera (IMAC). Die Verarbeitung und Dokumentation der Bilder wurde mittels der ISIS 3-Software (Metasystems GmbH, Altlussheim) und der Paint Shop Pro4-Software realisiert.

Zur Analyse der Interphasekerne stand die Software „CellP“ (Olympus) zur Verfügung. Diese Software erzeugt dreidimensionale Bilder, die frei rotiert und animiert werden können.

- FISH: 20-30 Bilder
- Immunfluoreszenz an Zentromerproteinen: ~50 Bilder
- Immunfluoreszenz an Histonproteinen: ~30 Bilder
- S-FISH: ~ 30 IK
- AgNOR-Färbung: ~20 Bilder

Um die Ergebnisse miteinander besser vergleichen zu können, wurden pro Fall etwa 50 möglichst uniform gefärbte Metaphaseplatten untersucht.

Zur Auswertung der S-FISH Daten hinsichtlich der Position im Zellkern und zur Lagebeziehung der Chromosomen zueinander wurden die von Manvelyan und Mitarbeitern 2008 beschriebenen Kriterien angesetzt (Manvelyan et al. 2008b).

Flussdiagramm sSMC-Charakterisierung

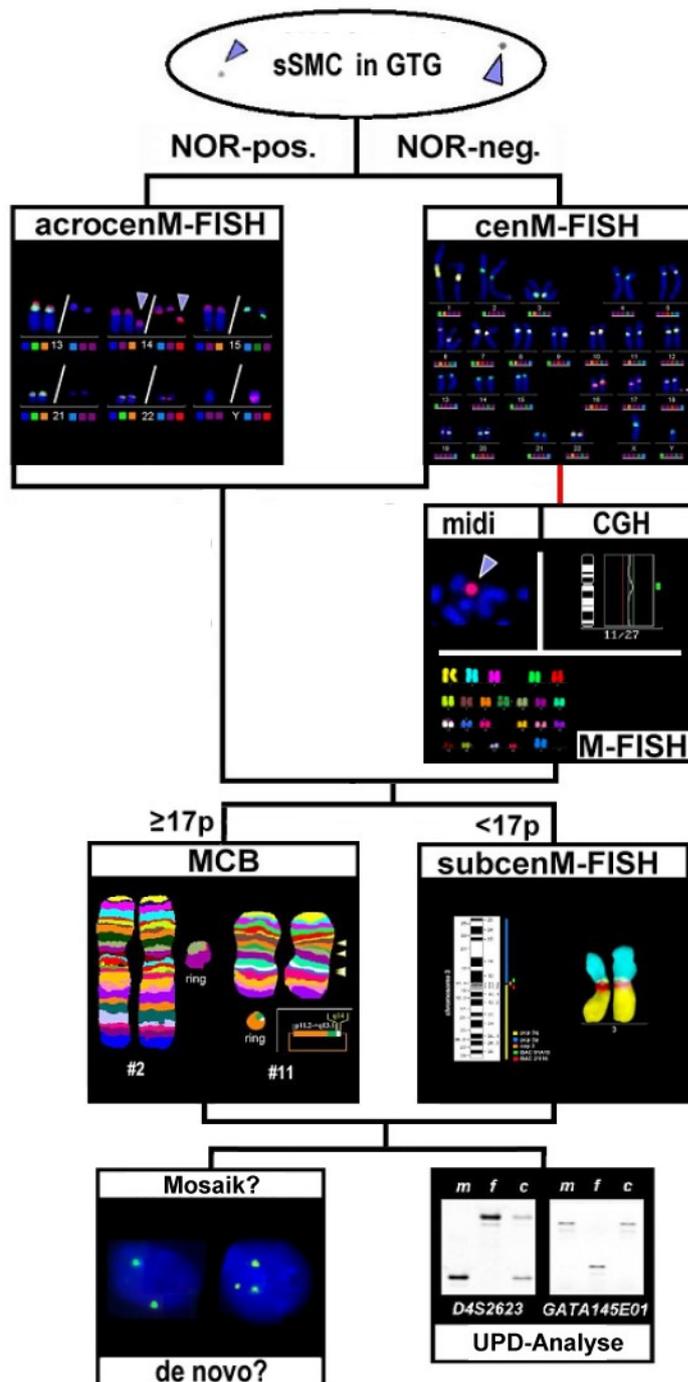


Abb. 2.1: Flussdiagramm zur sSMC-Charakterisierung. Nach Feststellung des sSMC durch GTG-Bänderung werden je nach NOR-Status acrocentric M-FISH oder cenM-FISH durchgeführt, um die Herkunft des sSMC zu ermitteln. Führt keine der beiden Hybridisierungen zum Erfolg, kann das neozentrische sSMC über Mikrosequenzierung, CGH oder M-FISH charakterisiert werden. Zur Bestimmung des Gehaltes an Euchromatin kommt bei größeren sSMC ($\geq 17p$) das MCB und bei kleineren sSMC ($< 17p$) die subcentromeric M-FISH zur Anwendung. Unter Umständen schließen sich noch Untersuchungen bez. des familiären Hintergrundes, des Mosaik- oder des UPD-Status an (Liehr et al. 2004b).

3 Ergebnisse

Als primäres Modellsystem der vorliegenden Arbeit dienten kleine überzählige Markerchromosomen (sSMC), deren prinzipielle Eignung hierfür in einer eigenen kleineren Pilotstudie (Ewers et al. 2010) zuvor nachgewiesen worden war. Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem große humane dizentrische Chromosomen (DIC) in die umfangreiche Untersuchung mit einbezogen. Primär ging es um den „Aktivitätszustand“ von Zentromeren dizentrischer Chromosomen.

Grundsätzlich konnten mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen anhand der entsprechenden Signalkonstellationen fünf verschiedene Aktivitätszustände bzw. -muster nachgewiesen werden, welche exemplarisch in Abbildung 3.1 zusammengestellt sind. In dieser und allen folgenden Abbildungen stammt das grüne Signal vom CENP-B-Antikörper (zeigt sowohl aktive als auch inaktive Zentromere) und das rote Signal vom gegen CENP-C gerichteten Antikörper (zeigt nur aktive Zentromere). War lediglich jeweils ein Signal beider Antikörper auf dem sSMC zu verzeichnen („1 ZEN“), wurde das Muster entsprechend der Lage des Signals auf dem Chromosom weiterführend als „ZEN“ (= Signal zentrisch; Fusionssignal) bzw. „exZEN“ (= Signal exzentrisch/randständig; erscheint nicht wie ein Fusionssignal) klassifiziert bzw. eingestuft. Bei zwei Zentromersignalen – jeweils sowohl ein rotes als auch ein grünes – waren beide Zentromere aktiv und wurden somit der Gruppe „2x aktiv“ zugeordnet. Fehlte ein zweites rotes Signal, war nur ein Zentromere aktiv („1x aktiv“). Einen Sonderfall stellte das Aktivitätsmuster „intermediär“ dar. In diese Gruppe fielen all jene Fälle, in denen die einzelnen Zellen verschiedene Signalkonstellationen aufwiesen, obgleich alle Zellen vom selben Individuum und demselben Gewebe stammten. Auf die letzte Gruppe wird in Abschnitt 3.2.1.3 ausführlicher eingegangen werden.

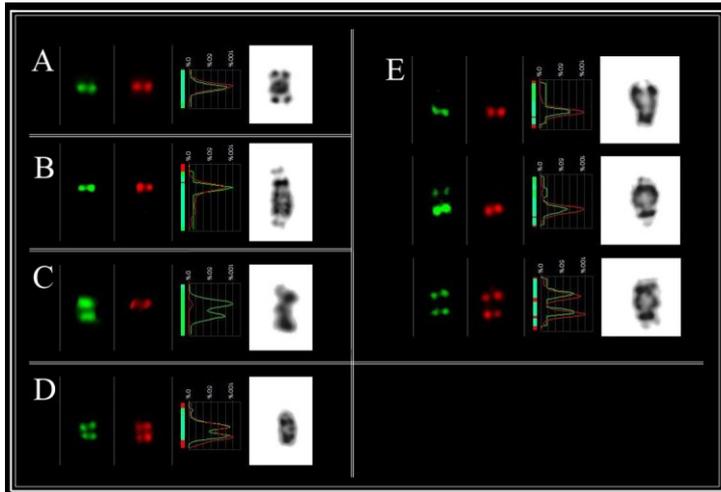


Abb. 3.1: Darstellung der verschiedenen Aktivitätsmuster bei dizentrischen sSMC. Von links nach rechts sind jeweils der FITC-Kanal (Signal für CENP-B), der Cy3-Kanal (Signal für CENP-C), das Fluoreszenzprofil und das invertierte DAPI-Bild dargestellt. A: sSMC mit zentralem Fusionssignal („ZEN“; Fall-Nr. 77). B: sSMC mit exzentrischem Zentromersignal („exZEN“; Fall-Nr. 55). C: sSMC mit nur einem aktiven Zentromer („1x aktiv“; Fall-Nr. 38). D: sSMC mit 2 aktiven Zentromeren („2x aktiv“; Fall-Nr. 40). E: sSMC mit intermediärem Aktivitätsmuster („intermediär“: „exZEN“ + „1x aktiv“ + „2x aktiv“; Fall-Nr. 52).

3.1 Charakterisierung des Untersuchungsmaterials

Die chromosomale Herkunft und Zusammensetzung der untersuchten dizentrischen Chromosomen wurde mittels Zytogenetik und einfachen FISH-Untersuchungen geklärt. Diese Daten wurden von den Einsendern im Rahmen von routinediagnostischen Untersuchungen ermittelt. Alle weiterführenden Untersuchungen erfolgten in der Abteilung Molekulare Zytogenetik bzw. in selbst durchgeführten eigenen Analysen. Die FISH-Ergebnisse sind ausführlich im Anhang in Tabelle 7.1 aufgeführt. Außerdem wurden die Größen einiger sSMC mittels array-CGH Analysen durch die parallel laufende Promotion von Herrn Ahmed Hamid bestimmt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.2 Immunfluoreszenz

Die Anwendung immunhistochemischer Techniken unter Verwendung spezifischer Antikörper, die gegen spezielle Zentromerproteine gerichtet sind, ermöglicht Aussagen über den Aktivitätszustand der Zentromere von di- bzw. multizentrischen Chromosomen. Die untersuchten Fälle wurden zunächst anhand ihrer zytogenetischen Eigenschaften in zwei Untergruppen aufgeteilt: Eine Gruppe umfasst alle Fälle mit sSMC (siehe Abschnitt 3.2.1), in der zweiten Gruppe sind alle großen dizentrischen Chromosomen zusammengefasst (siehe Abschnitt 3.2.2).

3.2.1 sSMC

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 103 Fälle mit dizentrischem sSMC untersucht und pro Fall durchschnittlich 50 Metaphaseplatten (MPP) analysiert. Der Großteil der untersuchten sSMC stammte von akrozentrischen Chromosomen, also 13-15 oder 21-22. Hierbei waren von Chromosom 15 stammende sSMC mit 45 Fällen (44%) besonders häufig, gefolgt von sSMC von Chromosom 22 mit 27 Fällen (26%), womit diese Fälle bereits rund 72% des gesamten Untersuchungsmaterials ausmachten. Die Abbildung 3.2 zeigt die Häufigkeiten der verschiedenen sSMC nach ihrer chromosomalen Herkunft.

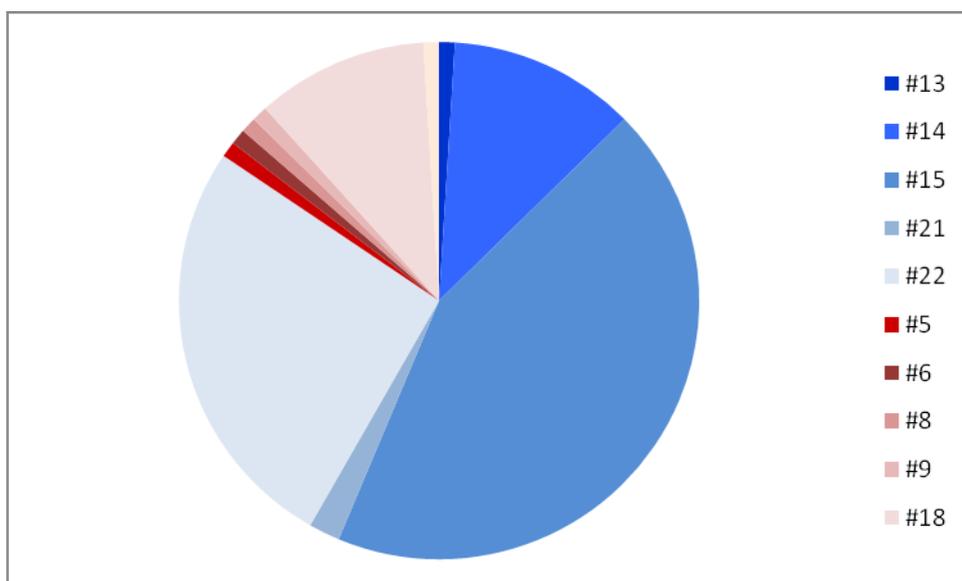


Abb. 3.2: Häufigkeit der dizentrischen sSMC nach ihrem chromosomalen Ursprung. Blau: akrozentrische sSMC. Rot: nicht-akrozentrische sSMC.

3.2.1.1 Aktivitätsmuster bei sSMC

Die mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen nachgewiesenen fünf verschiedenen Aktivitätsmuster sind in Abbildung 3.3 zusammengestellt.

Hinsichtlich der Fluoreszenzintensität deckten sich die Signalstärken beider Antikörper auf dem sSMC mit denen auf den entsprechenden Homologen weitestgehend. Ebenso waren, sofern vorhanden, beide Signale auf dem sSMC zumeist gleich groß. Das grüne CENP-B-Signal der inaktiven Zentromere wies jedoch naturgemäß Unterschiede auf. Bezogen auf alle untersuchten sSMC-Fälle war in knapp 50% das Signal am inaktiven Zentromer deutlich kleiner. Waren beide Zentromere aktiv, glichen sich auch deren Signalstärken.

Anhand der o.g. Aktivitätszustände wurden die sSMC-Fälle verschiedenen Gruppen zugeordnet, welche in der folgenden Grafik veranschaulicht sind. Zu beachten ist, dass

„1 ZEN“ auch beinhalten kann, dass mittels FISH zwei alphanoiden Regionen nachgewiesen wurden.

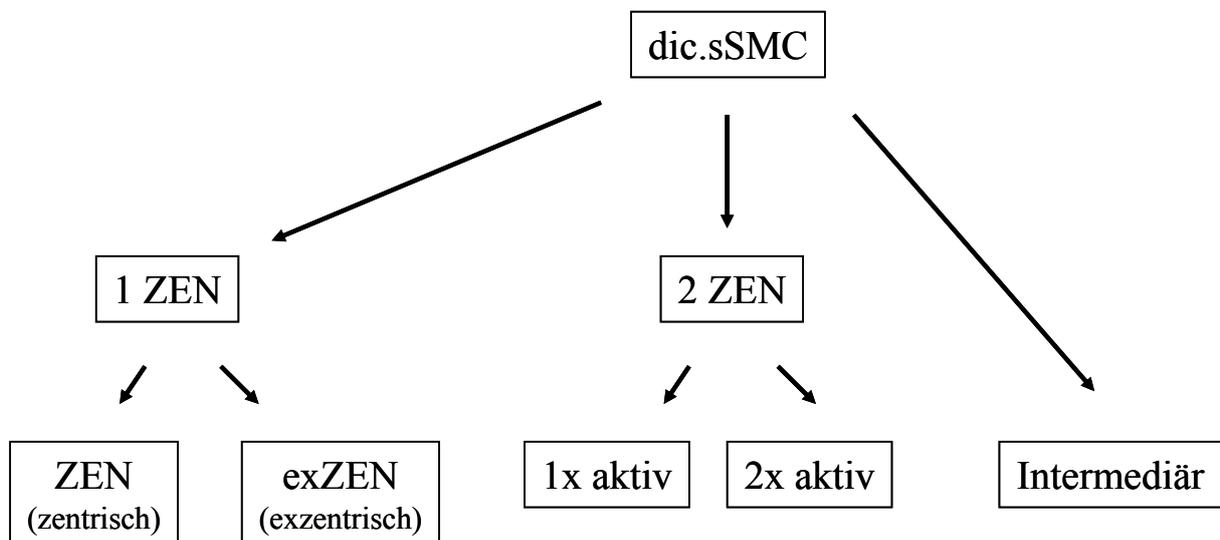


Abb. 3.3: Darstellung des Unterteilungsschema der sSMC-Fälle hinsichtlich der Musterausprägung.

Die Häufigkeit der verschiedenen Aktivitätsmuster ist in der nachfolgenden Grafik (Abb. 3.4) dargestellt. Erwartungsgemäß traten zwei aktive Zentromere mit knapp 5% am seltensten auf. Etwa ein Drittel der Fälle zeigte ein Fusionsignal. Bei dem mit Abstand größten Teil des Untersuchungsmaterials war ein intermediäres Aktivitätsmuster zu beobachten, weswegen diese Gruppe in einem separaten Abschnitt eingehender analysiert wurde (siehe Abschnitt 3.2.1.3).

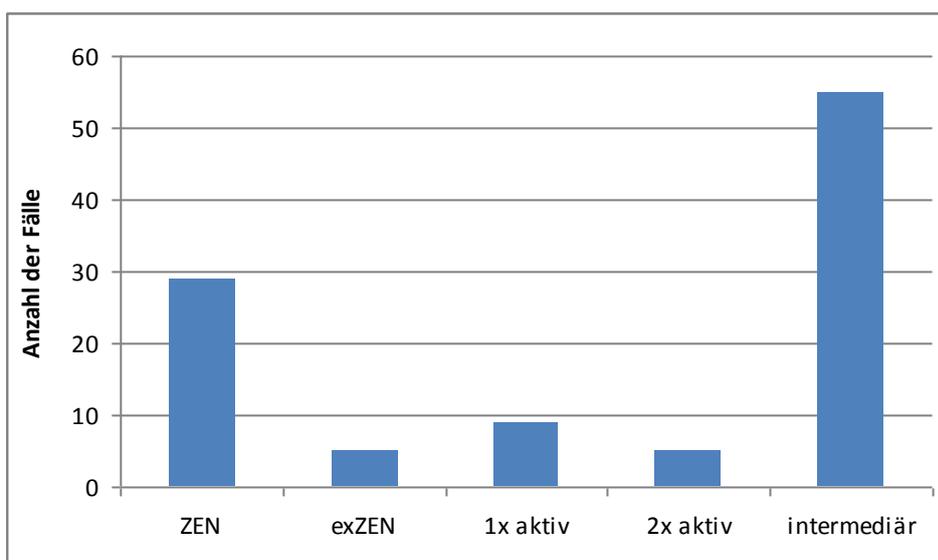


Abb. 3.4: Musterverteilung bei dizentrischen sSMC.

Der Vergleich von Fällen mit (molekular)zytogenetisch identischem Karyotyp ergab überraschenderweise zum Teil unterschiedliche Aktivitätszustände. Besonders die sSMC akrozentrischer Herkunft (genauer von den Chromosomen 14, 15 und 22) und gleicher Größe wiesen untereinander heterogene Musterausprägung auf. Demgegenüber wurde bei Fällen mit i(18) ausschließlich ein Aktivitätsmuster, nämlich ein Fusionsignal nachgewiesen. Einzige Ausnahme bildet das sSMC der Fall-Nr. 73, bei dem allerdings neben dem gesamten p-Arm auch euchromatisches Material vom q-Arm in die Inversions- und Duplikationsereignisse involviert war, und der sich somit auch strukturell von den anderen i(18) unterscheidet.

3.2.1.2 Korrelationen

Die gefundenen Aktivitätsmuster wurden im Folgenden näher untersucht. Parameter wie die chromosomale Herkunft, Art der Vererbung, Größe des sSMC (und somit der Abstand der Zentromere), sowie Geschlecht und Alter des sSMC-Trägers sollten hier mit den Aktivitätsmustern korreliert werden.

Chromosomale Herkunft des sSMC

Beim Vergleich von sSMC akrozentrischer Herkunft mit solchen, die von nicht-akrozentrischen Chromosomen stammen, zeigten letztere weit weniger Variabilität und meist nur ein Zentromer („ZEN“ oder „exZEN“), das Muster „2x aktiv“ war nicht nachzuweisen. Demgegenüber fanden sich unter den akrozentrischen sSMC alle Musterarten und mit rund 60% war hier das Muster „intermediär“ am häufigsten, gefolgt von sSMC mit nur einem Zentromer („ZEN“ oder „exZEN“; Abb. 3.5). Der Exakte Test nach Fisher ergab einen p-Wert von 0,001. Somit liegt ein signifikanter Zusammenhang in der Musterausprägung zwischen sSMC akrozentrischer Herkunft und solchen nicht-akrozentrischer Herkunft vor. Der entscheidende Unterschied ist hierbei zwischen den Mustern „ZEN“ und „intermediär“ zu finden.

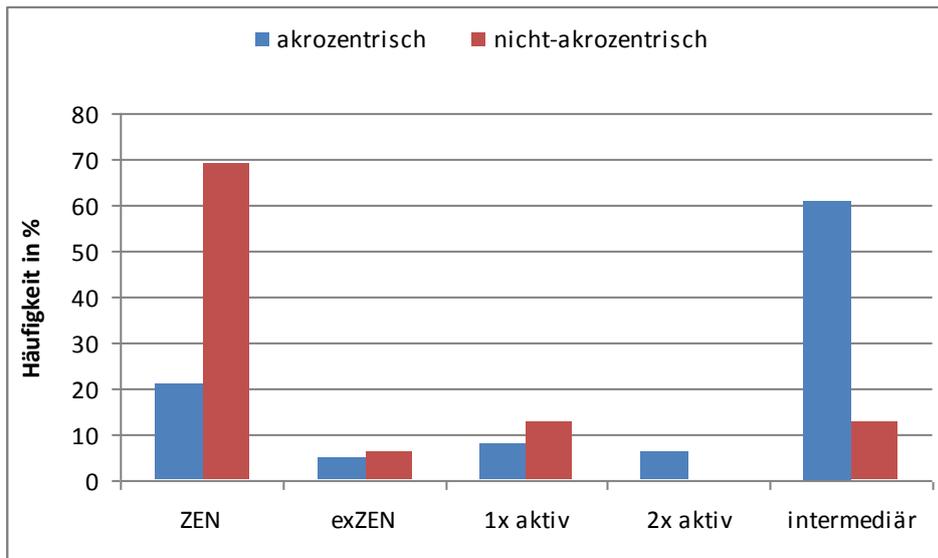


Abb. 3.5: Musterverteilung bei dizentrischen sSMC mit akrozentrischer bzw. nicht-akrozentrischer Herkunft.

Größe des sSMC bzw. Abstand der Zentromere voneinander

Um Aussagen über einen möglichen Zusammenhang von Zentromeraktivität und Distanz der Zentromere zueinander treffen zu können, wurden vorliegende arrayCGH-Daten ausgewertet. Waren keine arrayCGH-Daten verfügbar, ließ sich durch Kenntnis über exakte Lage und Größe der eingesetzten FISH-Sonden ebenfalls die Entfernung zwischen beiden Zentromeren ermitteln. Grundlage für diese Berechnungen war die Datenbank UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>) in der Version NCBI36/hg18.

Mit Hilfe dieser Informationen konnte z.B. an den untersuchten sSMC von Chromosom 15 exemplarisch folgendes nachgewiesen werden: sSMC, deren Zentromere 5 Mb oder weiter voneinander entfernt waren, wiesen nur ein aktives Zentromer auf. Bei allen sSMC mit einem kleineren Abstand als 5 Mb waren verschiedene Muster zu beobachten. Außerdem zeigt die nachfolgende Grafik (Abb. 3.6), dass umso mehr Fälle ein inaktives Zentromer aufwiesen, je größer der Abstand zwischen den Zentromeren war. Abweichend zu den übrigen Korrelationen wurden bei dieser Betrachtung die sSMC mit intermediärem Muster mit einbezogen, da auch hier nur ein Zentromer aktiv war (auch wenn das Muster in den einzelnen Zellen variiert). Der Exakte Test nach Fisher ergab einen p-Wert von 0,031. Somit besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Abstand der Zentromere und der Musterausprägung.

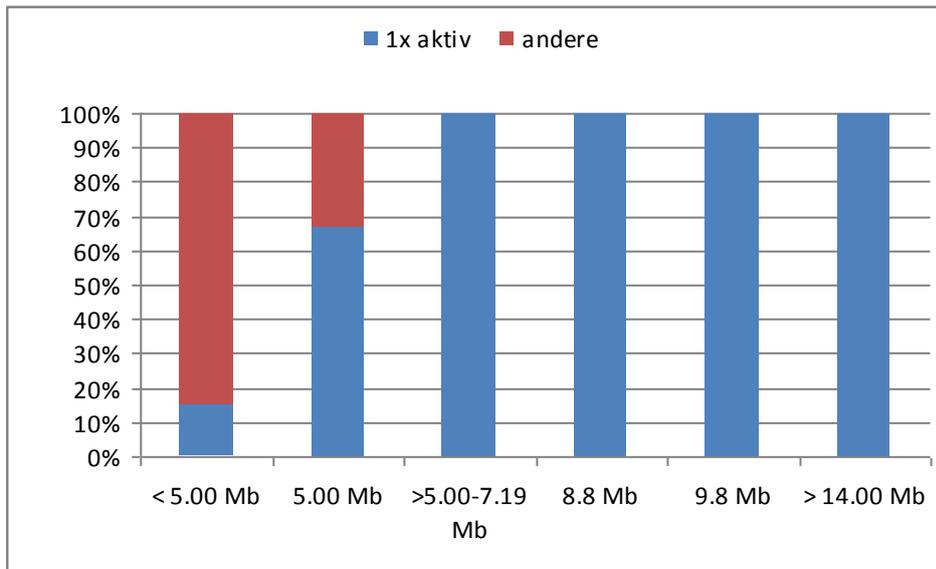


Abb. 3.6: Darstellung der Abhängigkeit von Zentromerininaktivierung und Größe der dizentrischen sSMC bzw. Abstand der zwei Zentromere zueinander (Interzentromerabstand).

Weitere Parameter

Vergleiche bezüglich des klinischen Hintergrundes (Exakter Test nach Fisher: $p=0,667$), des Mosaikstatus (Exakter Test nach Fisher: $p=0,242$), des Untersuchungsalters (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,669$), des Bandenstadiums (Exakter Test nach Fisher: $p=0,472$), des Geschlechts (Exakter Test nach Fisher: $p=0,916$) oder der Vererbung (Exakter Test nach Fisher: $p=1,000$), sowie der Vergleich zwischen prä- und postnatalen Fällen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,795$) ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Aktivitätsmuster.

3.2.1.3 Intermediäre sSMC-Fälle

Aufgrund des Umfangs und der Heterogenität der Gruppe der sSMC-Fälle mit intermediärem Aktivitätsmuster wurde diese hier extra aufgeschlüsselt. Es handelt sich bei dieser Gruppe um Fälle, deren Zellen eine Kombination aus zwei bis drei, in seltenen Fällen auch vier Aktivitätsmustern enthalten. Die intermediären sSMC-Fälle umfassen vor allem sSMC der akrozentrischen Chromosomen 14, 15 und 22, aber es lag auch jeweils ein sSMC von Chromosom 6 und 8 vor. Insgesamt wurden 55 sSMC-Fälle mit intermediärem Muster näher analysiert.

3.2.1.3.1 Einteilung

Innerhalb der sSMC mit intermediärem Aktivitätsmuster konnten wiederum vier bzw. fünf Subgruppen definiert werden (Abb. 3.8). Zur ersten Gruppe gehören Fälle, bei denen ein Teil der Zellen nur ein Zentromersignal auf dem sSMC aufwies, wohingegen die übrigen Zellen ein inaktiviertes zweites Zentromer besaßen („1 exZEN + 1x aktiv“; Abb. 3.7A). Je nachdem, welcher Mustertyp häufiger exprimiert war, wurden die Fälle wiederum zwei Untergruppen zugeordnet. Das Verhältnis beider Musterarten variierte zwischen den verschiedenen Fällen, aber es ließen sich zwei Typen unterscheiden („1 exZEN < 1x aktiv“ (1 exZEN seltener) und „1 exZEN > 1x aktiv“ (1 exZEN häufiger)).

sSMC-Fälle mit einer Kombination von Zellen mit nur einem Zentromersignal oder zwei aktiven Zentromeren wurden der Gruppe „1 exZEN + 2x aktiv“ zugeordnet (Abb. 3.7B). Die Gruppe „1x aktiv + 2x aktiv“ umfasst solche Fälle, in denen in allen Zellen zwei Zentromere nachgewiesen wurden, jedoch mit verschiedenen Aktivitätszuständen zwischen den Zellen (Abb. 3.7C). In der letzten Gruppe sind all jene Fälle zusammengefasst, die Zellen mit allen möglichen Aktivitätsmustern besitzen (Abb. 3.7D).

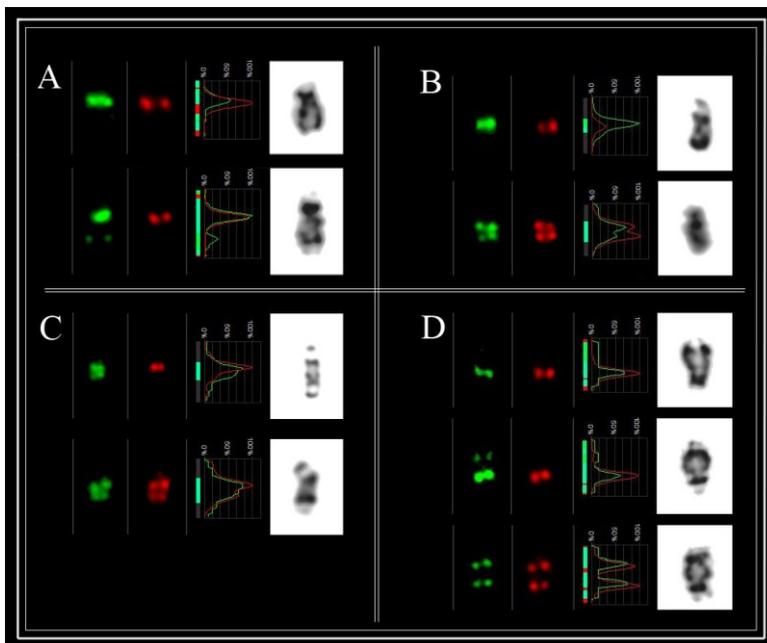


Abb. 3.7: Darstellung der verschiedenen Aktivitätsmuster bei dizentrischen sSMC mit intermediärem Aktivitätsmuster. Aufbau entspricht Abb. 3.1. A: Musterkombination „1 exZEN“ und „1x aktiv“ (Fall-Nr. 47). B: Musterkombination „1 exZEN“ und „2x aktiv“ (Fall-Nr. 97). C: Musterkombination „1x aktiv“ und „2x aktiv“ (Fall-Nr. 37). D: Musterkombination „1 exZEN“ und „1x aktiv“ und „2x aktiv“ (Fall-Nr. 52).

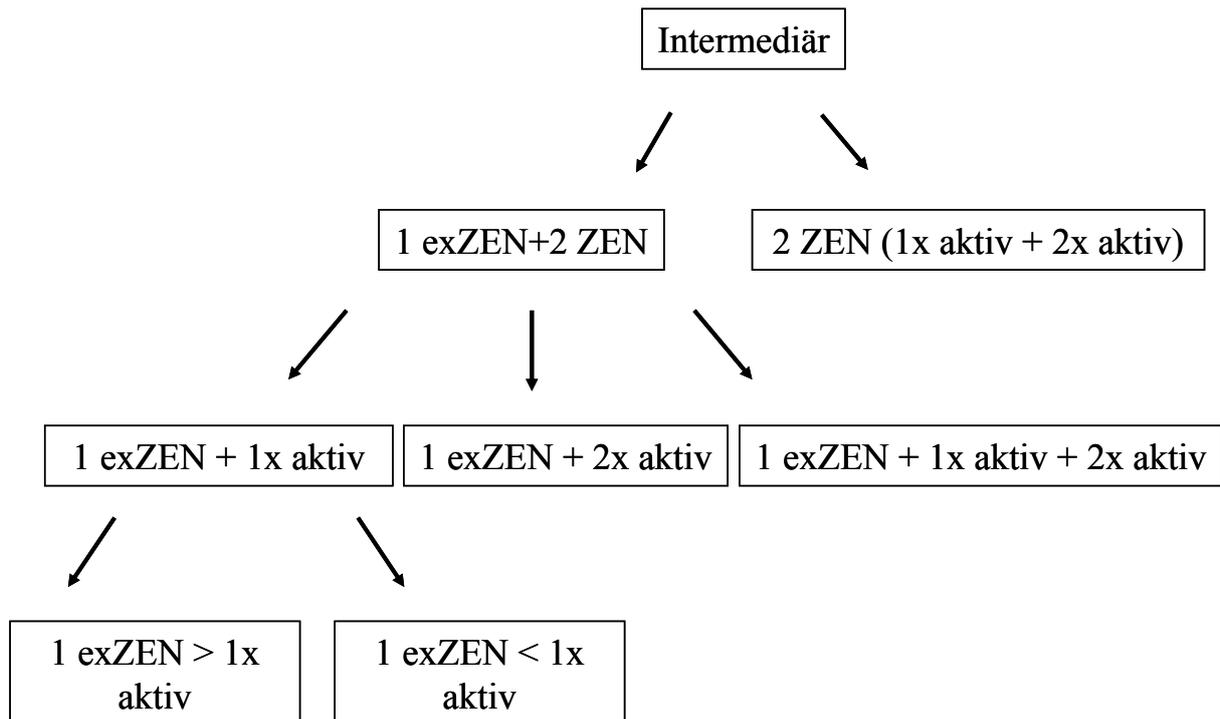


Abb. 3.8: Darstellung des Unterteilungsschemas der intermediären sSMC-Fälle hinsichtlich der Musterausprägung. Darstellung entspricht Abb. 3.3.

Die Häufigkeit der einzelnen Aktivitätsmuster in der intermediären Gruppe der sSMC-Fälle ist in der nachfolgenden Grafik dargestellt (Abb. 3.9). Während sich die Häufigkeiten des Auftretens der Fälle in den Gruppen „1 exZEN + 2x aktiv“, „1 exZEN + 1x aktiv + 2x aktiv“ sowie „2 ZEN: 1x aktiv + 2x aktiv“ annähernd ähnelten, war die Kombination aus Zellen mit einem Zentromer und Zellen mit einem inaktiven Zentromer (Gruppe: „1 exZEN + 1x aktiv“) mit 78% mit deutlichem Abstand das häufigste Aktivitätsmuster. Hierbei besaßen 68% der Fälle mehr Zellen mit dem Muster „exZEN“ und 32% mehr Zellen mit „1x aktiv“.

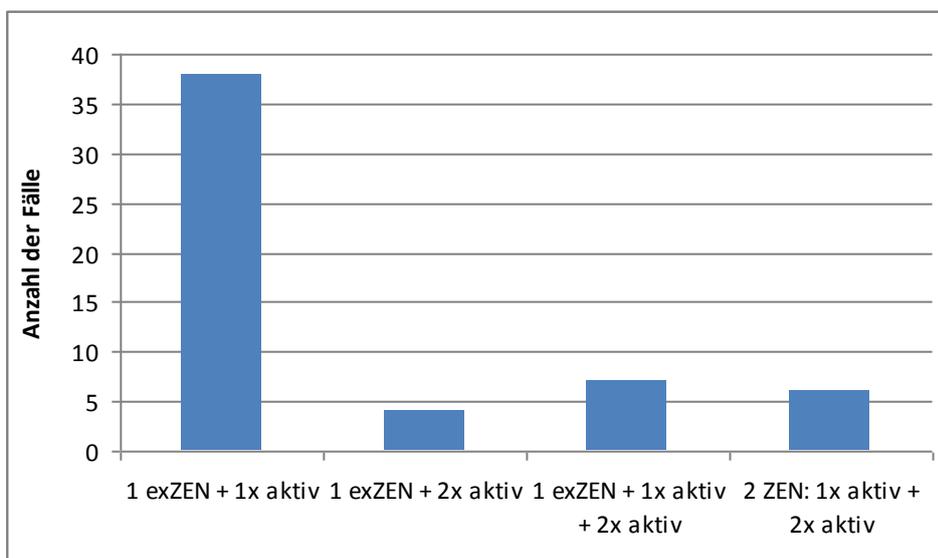


Abb. 3.9: Musterverteilung innerhalb der intermediären sSMC.

3.2.1.3.2 Korrelationen

Auch in dieser Untergruppe wurden die Daten unter verschiedenen Blickwinkeln (wie im Abschnitt 3.2.1.2) vergleichend analysiert und im Folgenden diejenigen dargestellt, deren Musterverteilung Zusammenhänge vermuten ließen.

Geschlecht

Ein Vergleich der Geschlechterverteilung innerhalb der Gruppe der intermediären sSMC-Fälle ergab keine signifikanten Unterschiede (Exakter Test nach Fisher: $p=0,462$). Jedoch fiel auf, dass vier von fünf Fällen mit dem Muster „2 ZEN: 1x aktiv und 2x aktiv“ männlich waren, während sich die Verteilung innerhalb der anderen Gruppen nicht unterschied (+/- 1 Fall; Abb. 3.10)

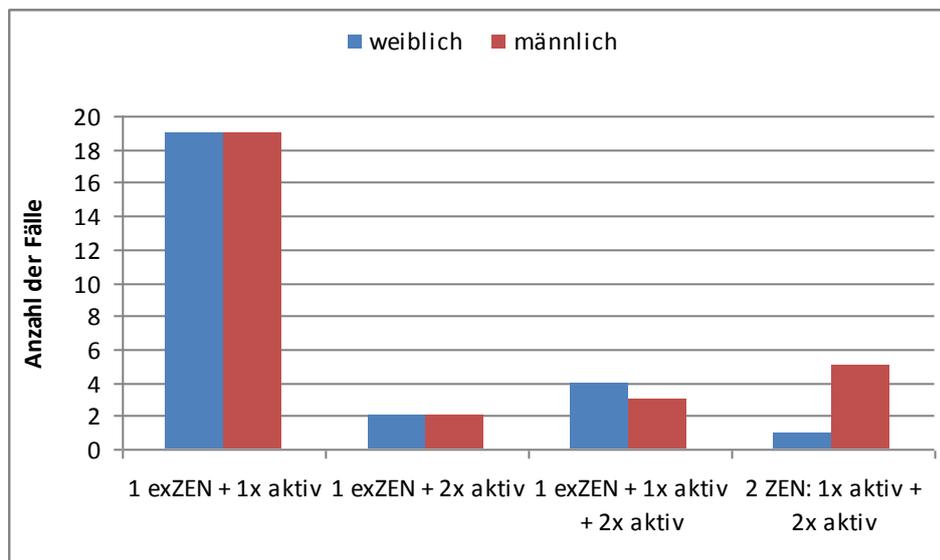


Abb. 3.10: Musterverteilung bei intermediären sSMC in Bezug auf die Geschlechterverteilung.

Chromosomale Herkunft

Da nur zwei Fälle (Fall-Nr. 2, Fall-Nr. 3) nicht-akrozentrischer Herkunft ein intermediäres Muster aufwiesen, konnte aufgrund dieser geringen Stichprobengröße keine vergleichende Analyse vorgenommen werden (Abb. 3.11).

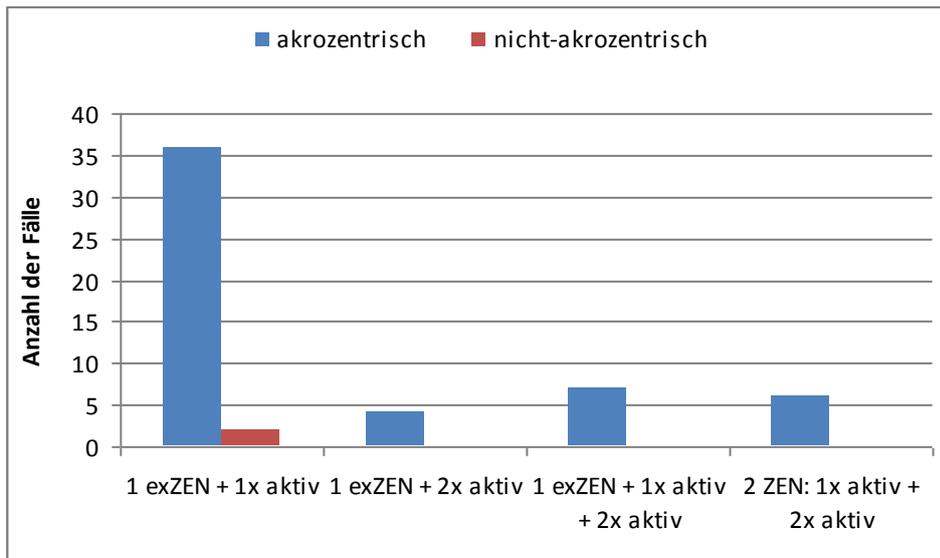


Abb. 3.11: Musterverteilung bei sSMC mit intermediärem Aktivitätsmuster in Bezug auf die akrozentrische bzw. nicht-akrozentrische Herkunft.

Mosaikstatus bei intermediären Fällen

75% der Fälle, in denen das sSMC durchgehend vorlag, wiesen das Muster „1 ZEN + 1x aktiv“ auf und machten mit 31 von 38 Fällen rund 80% der Fälle mit diesem Muster aus. Auch bei den Mosaikfällen war die Hälfte der Gruppe diesem Mustertyp zuzuordnen (Abb. 3.12). Mit dem Exakten Test nach Fisher wurde ein p-Wert von 0,150 ermittelt. Dieser Wert lag oberhalb des Signifikanzniveaus von 5%, so dass kein Zusammenhang zwischen dem Mosaikstatus und der Musterausprägung festgestellt werden konnte.

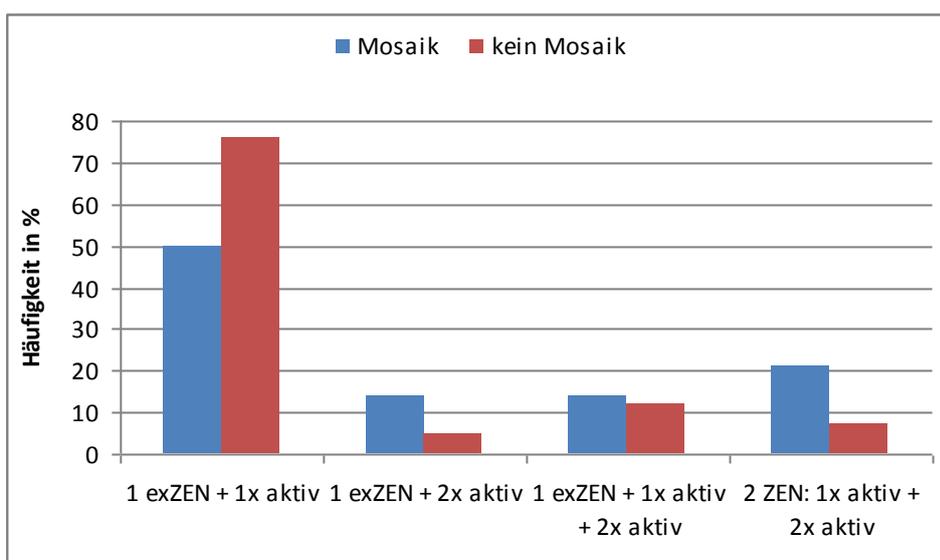


Abb. 3.12: Musterverteilung bei intermediären sSMC in Bezug auf den Mosaikstatus.

Geschlecht bei Mosaikfällen

Vergleicht man nur innerhalb der Mosaikfälle wiederum die Verteilung der Muster zwischen den Geschlechtern, so fällt auf, dass alle drei sSMC mit der Signalkonstellation „2 ZEN: 1x aktiv + 2x aktiv“ von männlichen Trägern stammen (Abb. 3.13). Jedoch konnten hier ebenfalls aufgrund der geringen in diese Betrachtung eingehenden Fallzahl keine statistischen Tests zur Signifikanzprüfung angewendet werden.

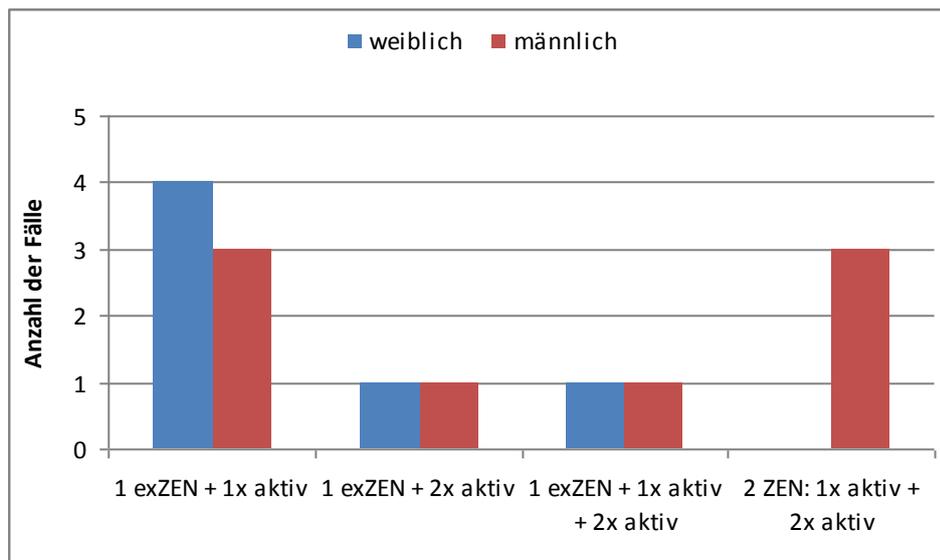


Abb. 3.13: Musterverteilung bei intermediären sSMC im Mosaik in Bezug auf die Geschlechterverteilung.

Klinik

Wie aus dem Diagramm (Abb. 3.14) ersichtlich ist, war die Mehrheit der intermediären Fälle klinisch auffällig. 80% der klinisch auffälligen sSMC zeigten eine Kombination der Aktivitätsmuster „1exZEN“ und „1x aktiv“. Die anderen Aktivitätsmuster waren nur selten zu verzeichnen. Die klinisch unauffälligen Fälle waren gleichmäßiger auf die verschiedenen Aktivitätsmuster verteilt. Diese Beobachtung ließ sich auch statistisch nachvollziehen. Nach Anwendung des Exakten Tests nach Fisher wurde ein p-Wert von 0,011 ermittelt. Nach Adjustierung des p-Wertes (α -Adjustierung) nach Bonferroni-Holm konnte der signifikante Zusammenhang auf die Muster „1 exZEN+1x aktiv“ und „2 ZEN: 1x aktiv + 2x aktiv“ eingegrenzt werden.

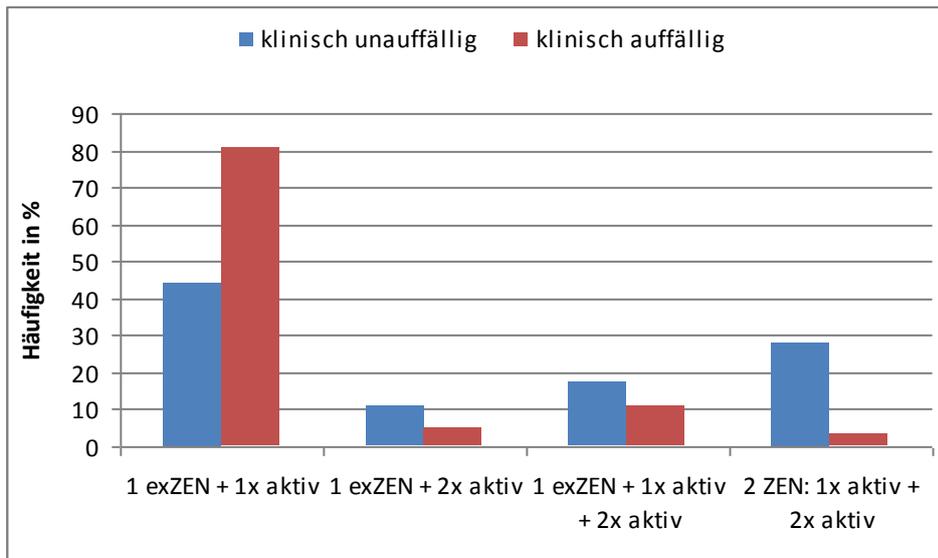


Abb. 3.14: Musterverteilung bei intermediären sSMC in Bezug auf das klinische Erscheinungsbild.

Weitere untersuchte Parameter

Über die Art der Vererbung waren nur bei 16 von 55 Fällen Informationen verfügbar, somit entfiel eine entsprechende vergleichende Analyse (Exakter Test nach Fisher: $p=1,000$). Ein Einfluss des Bandenstadiums konnte hier nicht nachgewiesen werden (Exakter Test nach Fisher: $p=0,587$). Auch waren keine Unterschiede in der Musterausprägung zwischen prä- und postnatalen Fällen zu verzeichnen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,268$).

3.2.2 Große dizentrische Chromosomen (DIC)

Die Gruppe der großen dizentrischen Chromosomen (DIC) umfasste 41 Fälle. Diese konnten wiederum anhand ihrer Struktur in drei verschiedene Subgruppen unterteilt werden: einfache dizentrische Chromosomen (einfache DIC) dizentrische Translokationschromosomen (Translokations-DIC) und Robertsonsche Translokationschromosomen (ROB). In der nachfolgenden Abbildung sind die verschiedenen, bei den großen dizentrischen Chromosomen vorkommenden, Muster exemplarisch zusammengestellt (Abb. 3.15).

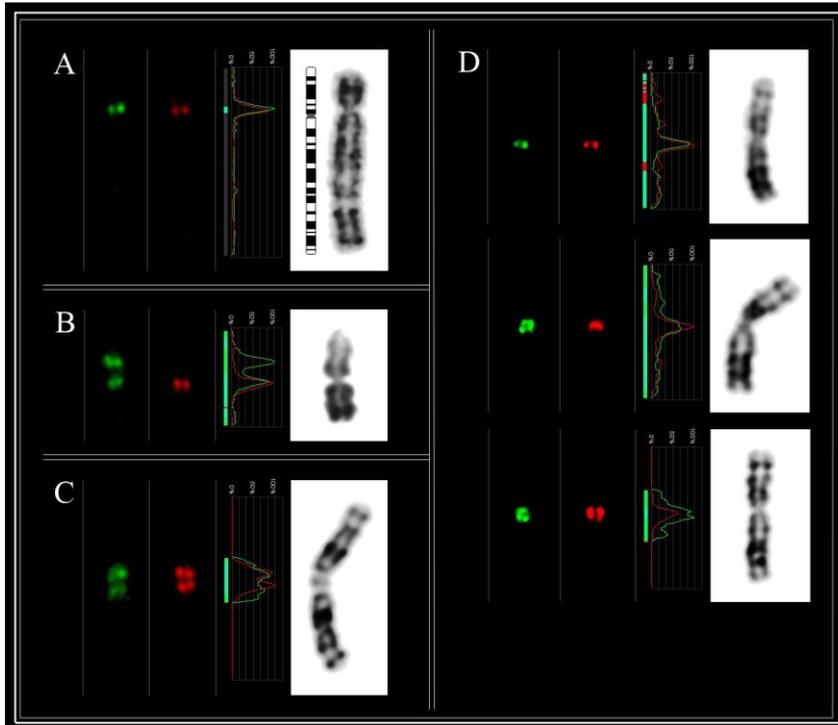


Abb. 3.15: Darstellung der verschiedenen Aktivitätsmuster bei großen DIC. Aufbau entspricht Abb. 3.1. A: DIC mit exzentrischem Zentromersignal („exZEN“; Fall-Nr. 112). B: DIC mit einem inaktivierten Zentromer („1x aktiv“; Fall-Nr. 118). C: DIC mit 2 aktiven Zentromeren („2x aktiv“; Fall-Nr. 123). D: DIC mit intermediärem Aktivitätsmuster („intermediär“, „exZEN“ + „1x aktiv“ + „2x aktiv“; Fall-Nr. 135).

Mit Ausnahme des Musters „ZEN“ konnten in diesem Untersuchungskollektiv alle anderen von sSMC bereits bekannten Signalkonstellationen gefunden werden. Dabei wurden die Muster „exZEN“ und „intermediär“ mit jeweils 37% und 42% der Fälle am häufigsten beobachtet (Abb. 3.16).

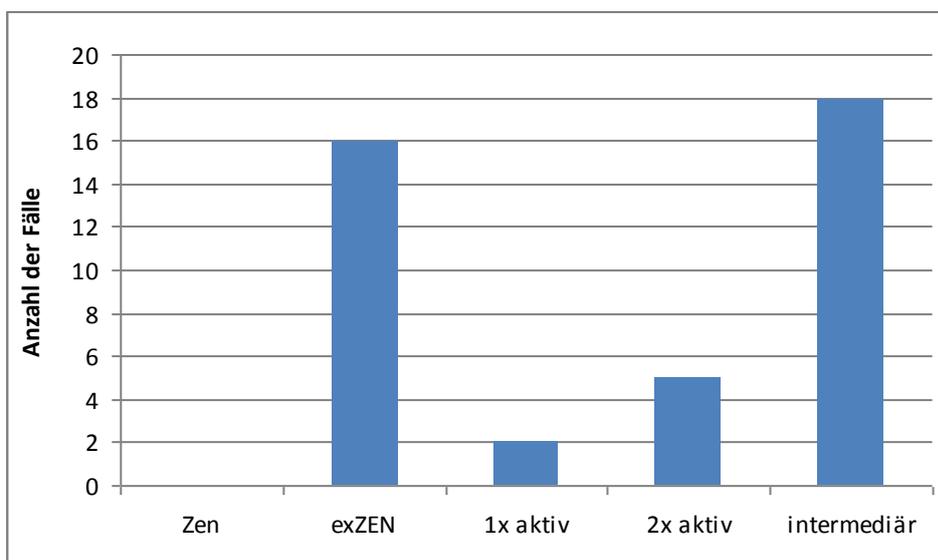


Abb. 3.16: Musterverteilung bei großen DICs.

Insgesamt zeigen einfache DIC eine geringere Mustervielfalt als Translokations-DIC und ROB. Während nur 5% das Muster „2x aktiv“ aufweisen und alle anderen Fälle entweder ein randständiges Zentromer oder eine intermediäre Signalkonstellation zeigen, konnten in den beiden anderen Gruppen alle Aktivitätsmuster beobachtet werden. Jedoch waren auch hier, wie bei den sSMC die Muster „exZEN“ und „intermediär“ am häufigsten anzutreffen (Abb. 3.17). Zur statistischen Auswertung der Musterverteilung zwischen den drei Gruppen wurde der Exakte Test nach Fisher angewendet und ein statistisch nicht signifikanter p-Wert von 0,114 ermittelt. Somit konnte kein Zusammenhang zwischen der Struktur der DIC und der Musterausprägung verzeichnet werden.

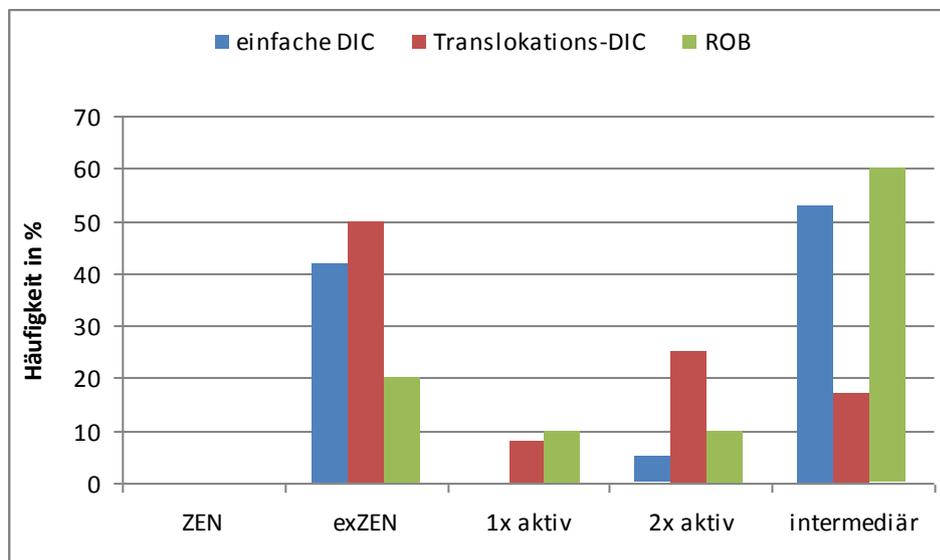


Abb. 3.17: Musterverteilung innerhalb der drei Untergruppen der großen DIC.

3.2.2.1 Korrelationen

Klinik

Für die großen DIC wurde ein Zusammenhang zwischen dem klinischen Bild und der Musterausprägung festgestellt. Die unterschiedliche Musterverteilung ist in Abbildung 3.18 grafisch veranschaulicht. Der p-Wert von 0,023, ermittelt anhand des Exakten Tests nach Fisher, erbrachte den statistischen Beleg für diese Korrelation. Die genaue Lage des Zusammenhangs ließ sich jedoch anhand von Einzelanalysen der Aktivitätsmuster zwischen klinisch auffälligen und unauffälligen Fällen nicht weiter eingrenzen.

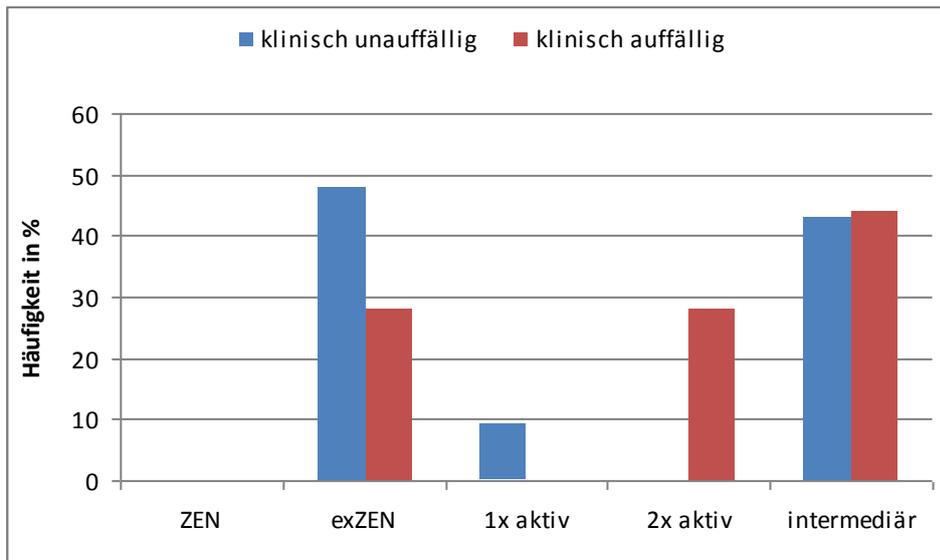


Abb. 3.18: Musterverteilung bei großen DIC in Bezug auf das klinische Erscheinungsbild.

Größe der DIC bzw. Abstand der Zentromere

Anhand des Karyotyps beziehungsweise aufgrund der Kenntnis über die Lage und Größe der zur Charakterisierung der DIC eingesetzten FISH-Sonden konnte auch für die großen dizentrischen Chromosomen der Abstand zwischen beiden Zentromeren bestimmt werden. Der Vergleich der ermittelten Abstandsdaten mit der jeweiligen Musterausprägung ließ einen Zusammenhang erkennen: Ab einem Interzentromerabstand größer als 10 Mb wiesen die DIC nur ein aktives Zentromer auf, während bei kleineren Abständen verschiedene Muster beobachtet wurden. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs war jedoch keine statistische Auswertung möglich.

Weitere untersuchte Parameter

Die Analyse der Daten nach weiteren Korrelationen ergab keine Hinweise auf Zusammenhänge der Musterausprägung mit anderen Parametern wie Mosaikstatus oder Herkunft der DIC. In der Geschlechterverteilung fielen überdurchschnittlich viele weibliche Fälle auf, da die Stichprobe jedoch mit 20 Fällen recht klein ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Verteilung auf Zufälligkeit beruht. Auch konnte kein Alterseinfluss nachgewiesen werden.

3.2.2.2 Einfache DIC

In dieser Arbeit wurden einfache DIC definiert als dizentrische Chromosomen, denen kein Translokationsereignis zugrunde liegt. Eine Duplikation eines Chromosomenabschnittes, der das Zentromer enthält, eventuell gekoppelt mit einer anschließenden Inversion, führte zur Bildung eines Chromosoms mit zwei Zentromeren. In den hier untersuchten Fällen waren die

dizentrischen Chromosomen unterschiedlichen chromosomalen Ursprungs: Es handelte sich dabei um Derivative der Chromosomen 7, 9, 18, 21, 22 und X. Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht exemplarisch die Struktur eines einfachen DIC (Abb. 3.19). Auf der linken Seite ist ein FISH-Ergebnis nach Hybridisierung eines SubcenM-FISH-Sondenmixes dargestellt (Abb. 3.19A). Die zwei grünen Signale der spezifischen Zentromersonde für Chromosom 22 beweisen den dizentrischen Charakter des Chromosoms. Alle anderen FISH-Sonden des Mixes färben das Chromosom vollständig durch. Somit ist die Existenz anderen chromosomalen Materials auf diesem Derivativen ausgeschlossen. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die beobachtete Musterausprägung mittels Immunfluoreszenz dargestellt (Abb. 3.19B).

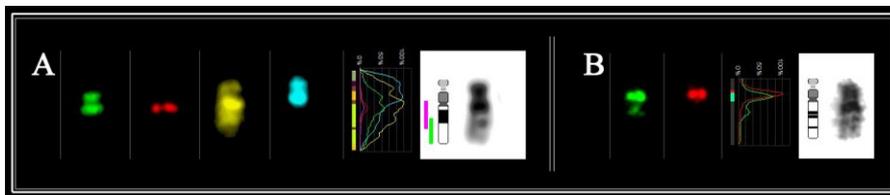


Abb. 3.19: FISH- und Immunfluoreszenzergebnis zum Nachweis der Struktur von einfachen DIC (Fall-Nr. 108). A: FISH mit SubcenM-FISH-Mix für Chr. 22: CEP14/22 SG, SC-BAC in 22q RP11-172D7 SO, PCP 22q BIO, PCP 22p DEAC. B: Immunfluoreszenz mit AK gegen CENP-B (FITC) und CENP-C (Cy3), Bildaufbau entspricht Abb. 3.1.

Sowohl die Häufigkeitsverteilung als auch die Art der Aktivitätsmuster der einfachen DIC waren bereits in Abbildung 3.17 abzulesen. Innerhalb der Gruppe „intermediär“ wiesen neun Fälle eine Mischung von Zellen mit einem randständigen Zentromer und Zellen mit einem inaktiven Zentromer auf. Hierbei überwog bei sechs Fällen der Anteil an Zellen mit dem Muster „exZEN“ (Fall-Nr. 106, 108, 109, 110, 117, 143, 146) und bei drei Fällen der Anteil an Zellen mit dem Muster „1x aktiv“ (Fall-Nr. 109, 121, 124). Bei einem Fall konnten alle Signalkonstellation gefunden werden (Fall-Nr. 110). Auffallend war zudem, dass in der Gruppe der einfachen DIC mit intermediärem Muster die von Chromosom 22 abstammenden DIC verschiedene intermediäre Musterarten zeigten. Im Gegensatz dazu war bei solchen mit einer anderen chromosomalen Herkunft nur eine Musterart zu sehen.

Es zeigte sich zudem mit nur einem männlichen Fall in den 19 Fällen eine starke Ungleichverteilung im Geschlechterverhältnis. Patienten mit einfachem DIC, an dem nur ein exzentrisches Zentromer nachgewiesen werden konnte, zeigten meist keine klinischen Auffälligkeiten. Ausgenommen von dieser Beobachtung waren Fall-Nr. 142, bei dem Lernschwierigkeiten beschrieben wurden und Fall-Nr. 122, der Turner-Syndrom-typische Auffälligkeiten aufwies. Eine Korrelation mit einem Mosaikstatus wurde nicht nachgewiesen.

3.2.2.3 Translokations-DIC

Translokations-DIC sind große dizentrische Chromosomen, die aufgrund eines Translokationsereignisses entstanden sind, aber nicht auf eine Robertsonsche Translokation zurückzuführen sind. Sie bestehen somit in der Regel aus zwei verschiedenen Chromosomenteilen mit jeweils einem Zentromer. In der Abbildung 3.20 ist beispielhaft ein solches dizentrisches Translokationschromosom dargestellt: auf der linken Seite ein repräsentatives FISH-Bild und auf der rechten Seite ein Immunfluoreszenz-Bild. Es standen insgesamt 12 Translokations-DIC für Untersuchungen zur Verfügung.

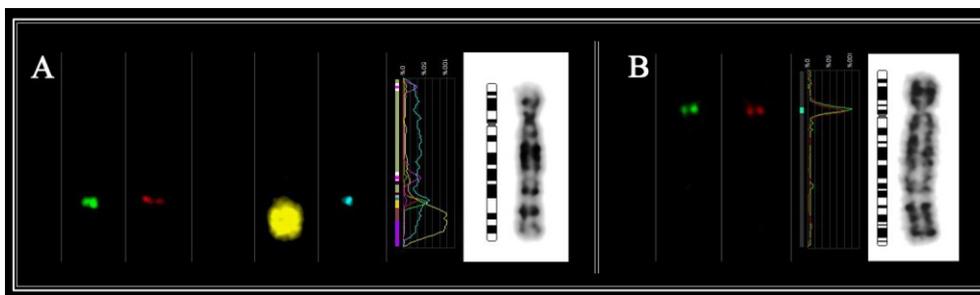


Abb. 3.20: FISH- und Immunfluoreszenzerggebnis zum Nachweis der Struktur von Translokations-DIC (Fall-Nr. 112). A: FISH mit SubcenM-FISH-Mix für Chr. 18: CEP18 SG, SC-BAC in 18p RP11-411B10, SC-BAC in 18q RP11-10G8 SO, PCP 18q BIO, PCP 18p DEAC. B: Immunfluoreszenz mit AK gegen CENP-B (FITC) und CENP-C (Cy3), Bildaufbau entspricht Abb. 3.1.

Anhand der initialen FISH-Untersuchungen konnten auf molekularzytogenetischer Ebene bei allen Translokations-DIC zwei Zentromere nachgewiesen werden, wobei zwischen beiden immer ein deutlicher Abstand sichtbar war. Mit Ausnahme des Musters „ZEN“ wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung alle anderen Musterarten nachgewiesen, deren Häufigkeitsverteilung bereits in Abbildung 3.17 visualisiert ist. In 50% der Fälle (6/12 Fälle) mit Translokations-DIC war einer der Translokationspartner ein akrozentrisches Chromosom. In vier Fällen war das Zentromer des akrozentrischen Chromosoms inaktiv (Fall-Nr. 111, 113, 114, 118). Bei den anderen zwei Fällen waren beide Zentromere aktiv. Somit war bei keinem dieser Fälle das jeweils nicht-akrozentrische Zentromer inaktiviert. Drei von 12 Fällen zeigten das Aktivitätsmuster „2x aktiv“. Bei zwei dieser Fälle handelte es sich um Patienten mit CML bzw. MDS (Fall-Nr. 119, Fall-Nr. 120). In diesen Fällen ist das dizentrische Chromosom demnach nicht ererbt oder spontan entstanden, sondern wurde im Zuge einer Erkrankung erworben. Beim dritten Fall lag eine unbalancierte Translokation vor, wodurch mit Auffälligkeiten zu rechnen ist (Fall-Nr. 127). Hierbei zeigten sich zudem unterschiedliche Signalintensitäten. Das Immunfluoreszenzsignal des Zentromers von Chromosom 15 auf dem

dizentrischen Chromosom konnte zwar eindeutig nachgewiesen werden, jedoch war das Signal viel schwächer als bei den entsprechenden homologen Chromosomen.

3.2.2.4 ROB

Unter Robertsonschen Translokationen (ROB) versteht man eine Spezialform von Translokationen bei denen akrozentrische Chromosomen beteiligt sind. Die Bruchpunkte liegen dabei zumeist im kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen, wodurch dizentrische Chromosomen entstehen. Selten kann auch einer der Bruchpunkte im langen Arm eines akrozentrischen Chromosoms auftreten. In diesem Fall entsteht ein monozentrisches Chromosom und der verbleibende kurze Arm geht verloren. Strukturbedingt liegen die Zentromere eng beieinander. Die 11 untersuchten ROB konnten molekularzytogenetisch eindeutig dem dizentrischen Typ zugeordnet werden und zeigten mit Immunfluoreszenzfärbung alle beschriebenen Aktivitätsmuster (Abb. 3.21) mit entsprechender Verteilung (siehe Abb. 3.17).

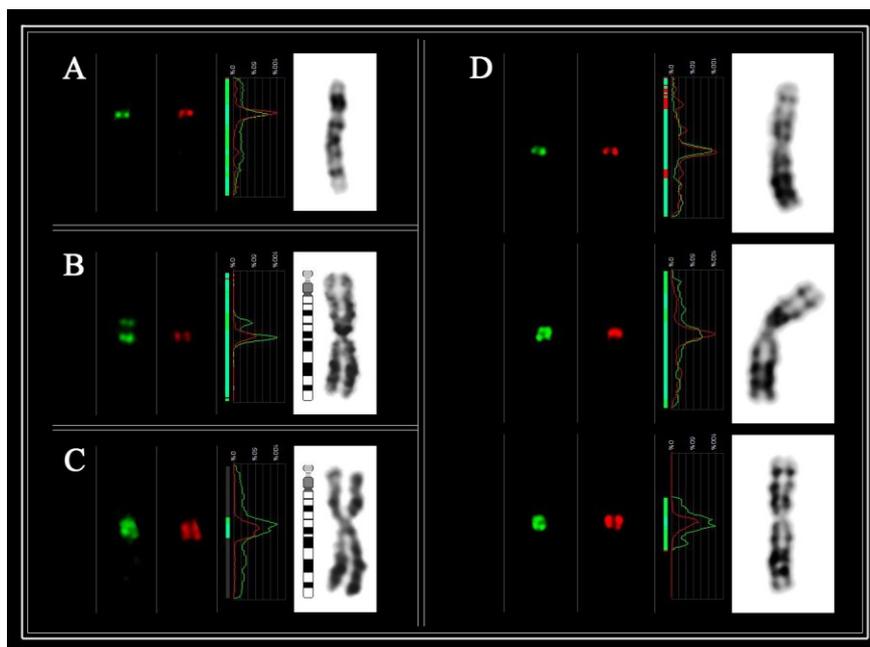


Abb. 3.21: Darstellung der verschiedenen Aktivitätsmuster bei ROB. Aufbau entspricht Abb. 3.1. A: ROB mit einem exzentrischen Zentromersignal („exZEN“, Fall-Nr. 132). B: ROB mit einem inaktivierten Zentromer („1x aktiv“, Fall-Nr. 129). C: ROB mit zwei aktiven Zentromeren („2x aktiv“, Fall-Nr. 130). D: ROB mit intermediärem Aktivitätsmuster („1 exZEN“ + „1x aktiv“ + „2x aktiv“, Fall-Nr. 135).

Es standen 6 Fälle mit einer *rob(13;14)*, zwei Fälle mit einer *rob(14;21)*, ein Fall mit einer *rob(13;15)* und ein Fall mit einer *rob(13;13)* zur Analyse zur Verfügung. In fünf der sechs Fälle mit einer Translokation der Chromosomen 13 und 14 wurde ein intermediäres Muster

beobachtet, und ein Fall hatte 2 aktive Zentromere. In allen sechs rob(13;14)-Fällen (Fall-Nr. 130, 133, 134, 135, 136, 137) war jeweils zumindest das Chromosom 14 aktiv. Bei 23% der Zellen von Fall-Nr. 133 war ebenfalls das Zentromer von Chromosom 14 aktiv, in den übrigen 77% waren beide Zentromere aktiv, und bei Fall-Nr. 130 waren in allen Zellen beide Zentromere aktiv. Beide Fälle mit einer rob(14;21) zeigten verschiedene Muster: Bei einem Fall war nur ein Zentromer mit Immunfluoreszenz nachzuweisen, wobei nicht weiter spezifiziert werden konnte, da das Zentromersignal direkt an der Translokationsstelle lag (Fall-Nr. 131). Der zweite Fall stellte wieder eine Mischform dar, bei dem in etwa 50% der Zellen nur ein Zentromersignal detektiert werden konnte (Fall-Nr. 132). Im Fall der Robertsonschen Translokation der Chromosomen 13 und 15 war das Zentromer von Chromosom 15 inaktiviert (Fall-Nr. 129) und bei der Translokation von zwei Chromosomen 13 war wiederum nur ein Zentromer nachweisbar (Fall-Nr. 138).

3.2.2.5 Große DIC mit intermediärem Aktivitätsmuster

Betrachtet man die 18 Fälle mit großem dizentrischen Chromosom und intermediärem Aktivitätsmuster separat, so fällt auf, dass nur drei der fünf bei den sSMC definierten Varianten nachweisbar waren. 12 große DIC wiesen eine Mischung der Muster „1 ZEN“ und „1x aktiv“ auf („1 exZEN + 1x aktiv“), in acht Fällen überwog dabei mengenmäßig das Muster „1x aktiv“ und in den anderen vier Fällen das Muster „1 exZEN“. Bei den verbleibenden sechs Fällen wurde das Muster „1 exZEN + 1x aktiv + 2x aktiv“ gefunden.

Aussagen über mögliche Korrelationen sind aufgrund der geringen Stichprobenzahl schwierig. Vergleich man die Musterausprägung zwischen den Geschlechtern, so zeigen Frauen alle drei Mustervarianten während keiner der drei männlichen Fälle die Kombination „1 exZEN + 1x aktiv + 2x aktiv“ aufwiesen. Der mit dem Exakten Test nach Fisher ermittelte p-Wert von 0,515 deutet jedoch auf eine eher zufällige und somit statistisch nicht signifikante Musterverteilung.

Fälle, die mindestens ein Zentromer akrozentrischer Herkunft besaßen, wurden von Fällen ohne akrozentrischen Chromosomenanteil unterschieden, wodurch sich alle Fälle auf zwei Gruppen aufteilen ließen. In dieser Betrachtung zeigt sich, dass die zuvor in Vergleichen bez. der chromosomalen Herkunft nachgewiesenen Korrelationen auch auf große DIC mit intermediärem Muster zutreffen. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Musterausprägung von großen DIC mit und ohne Beteiligung akrozentrischen Materials. Der mit dem Exakten Test nach Fisher ermittelte p-Wert betrug dabei 0,018. Über Zusammenhänge hinsichtlich des Mosaikstatus war wiederum keine Aussage möglich, da nur zwei Fälle mit Mosaik untersucht

werden konnten. Zwischen den Mustern von prä- und postnatalen Fällen konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden (Exakter Test nach Fisher: p-Wert 0,559).

3.3 3D-Untersuchungen an sSMC

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der molekularzytogenetischen Analyse von sSMC mittels Suspensions-FISH (S-FISH). Derartige Untersuchungen zur Interphasekernarchitektur wurden bisher noch nicht an sSMC-Fällen durchgeführt. Um einen ersten Einblick in das Verhalten der sSMC im Interphasekern bzw. dessen Einfluss auf die Chromatinstruktur und -verteilung zu erhalten, wurden initial fünf sSMC-Fälle untersucht: drei Fälle mit dizentrischen sSMC, mit deren Charakterisierung sich die vorliegende Arbeit befasst, und darüber hinaus zwei Fälle mit monozentrischem sSMC, wovon ein komplexes sSMC aus Material von #8 und #18 besteht. Da der Einfluss von Größe und Gendichte für die Architektur der Interphasekerne bereits beschrieben ist, stand hier besonders der Vergleich von Lage und Orientierung der di- und monozentrischen sSMC sowie deren möglicher Einfluss auf die Lagebeziehungen zu ihren homologen Schwesterchromosomen und den restlichen Chromosomen im Mittelpunkt der Untersuchung.

Die angewendeten zu bewertenden Parameter sind in der Studie von Manvelyan und Mitarbeitern 2008 beschrieben (Manvelyan et al. 2008b). Es wurden WCP, PCP und kommerzielle Zentromersonden eingesetzt und auf fünf sSMC-Fällen unterschiedlicher geweblicher Herkunft (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Hautfibroblasten) hybridisiert. Dabei stammten die sSMC von den Chromosomen 15 (Fall-Nr. 150, Fall-Nr. 47), Chromosom 16 (Fall-Nr. 147) und Chromosom 18 (Fall-Nr. 148) her. Eine Sonderstellung nimmt Fall 149 ein, der ein komplexes sSMC besitzt, welches aus Teilen von Chromosom 8 und 18 besteht (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Auflistung der mit S-FISH untersuchten Fälle.

| Fall-Nr. | Karyotyp | Gewebeart |
|----------|---------------------------------------|------------------|
| 150 | 47,XX,+inv dup(15)(q11.1) | T-Lymphozyten |
| 47 | 47,XX,+inv dup(15)(q12) | Hautfibroblasten |
| 147 | 47,XY,+min(16)(:p11.1->q12.1) | B-Lymphozyten |
| 148 | 47,XY,+inv dup(18)(q11.1) | B-Lymphozyten |
| 149 | 47,XY,+der(8;18)(8p23.2~23.1;18q11.1) | B-Lymphozyten |
| 152 | 46,XX | T-Lymphozyten |

Alle eingesetzten Sonden wurden im Vorfeld an unauffälligen Metaphasen getestet, jede Probenkombination am Kontrollfall (Fall-Nr. 152) evaluiert. Bei allen Experimenten und Betrachtungen diente WCP 19 als interne Kontrollsonde (Abb. 3.22).

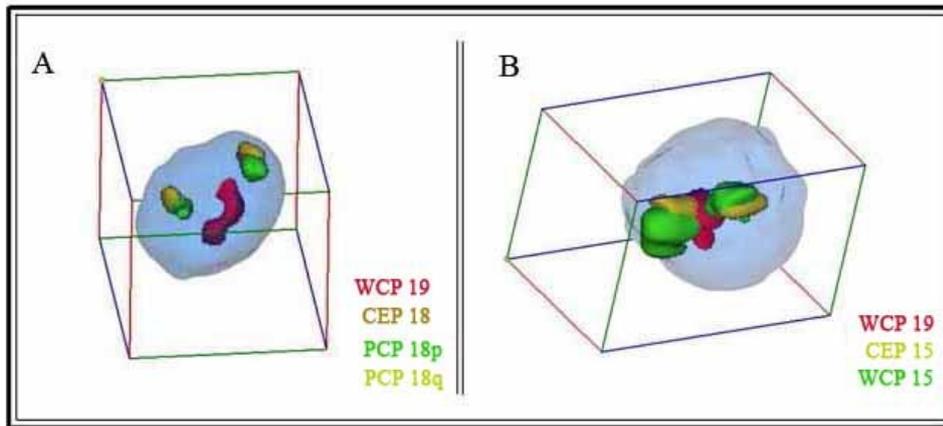


Abb. 3.22: Darstellung eines Interphasekerns von Fall-Nr. 152 (Kontrolle). Beispielhaft sind Lage und Orientierung ausgewählter Chromosomen dargestellt. A: von #18 und #19. B: von #15 und #19. Farben und dargestellte Sonden sind in der Abbildung erklärt.

Zu Anfang erfolgte die Untersuchung der Position der sSMC innerhalb des Zellkerns. Bei den Fällen 150, 47 und 148 waren die sSMC mehr zentral bis intermediär positioniert. Dem gegenüber lagen die sSMC bei Fall-Nr. 147 und Fall-Nr. 149 mehr peripher bis intermediär. Die von den Chromosomen 15 und 18 stammenden sSMC waren also eher zentral lokalisiert, das vom Chromosom 16 stammende und das komplexe sSMC eher peripher (Tab. 3.2; Abb. 3.23).

Tab. 3.2: Position der sSMC innerhalb der Zellkerne. Vergleich der Fälle 1 und 2 bzw. 4 und 5 mittels t-Test. n.v. = nicht verfügbar

| Fall-Nr. | Position „peripher“ in % | Position „intermediär“ in % | Position „zentral“ in % | Anzahl untersuchter Zellkerne |
|----------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 150 | 17 | 48 | 35 | 40 |
| 47 | 4 | 26 | 70 | 23 |
| t-Test | p < 0.002 | p < 0.003 | p = 0.001 | n.v. |
| 147 | 46 | 27 | 27 | 15 |
| 148 | 21 | 28 | 51 | 69 |
| 149 | 47 | 45 | 8 | 36 |
| t-Test | p < 0.002 | p = 0.001 | p < 0.001 | n.v. |

Weder die Chromosomen 19, die in dieser Untersuchung zu Kontrollzwecken mit in die Betrachtung einbezogen wurden, noch die Chromosomen 8, 15 und 18 zeigten bezüglich ihrer Lage bzw. Position im Zellkern bei Vorhandensein eines sSMC Veränderungen. Erwartungsgemäß wurden die Chromosomen 8 und 18 überwiegend in der Peripherie der Zellkerne gefunden während die Chromosomen 15 eine intermediäre und die Chromosomen 19 eine zentrale Position aufwiesen. Jedoch konnten bei den Chromosomen 16 Veränderungen nachgewiesen werden. Während sie in normalen Zellkernen größtenteils intermediär auftreten, verlagerten sie ihre Position bei Vorhandensein eines sSMC deutlich in die Peripherie (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Position der homologen Chromosomen 8, 15, 16, 18 und 19 in Zellkernen mit und ohne sSMC. n.v. = nicht verfügbar. n.s. = nicht signifikant

| Fall-Nr. | Position „peripher“ in % | | | Position „intermediär“ in % | | | Position „zentral“ in % | | | Anzahl untersuchter Zellkerne | |
|-------------|--------------------------|----------|-----------|-----------------------------|----------|-----------|-------------------------|----------|-----------|-------------------------------|----------|
| | ohne sSMC | mit sSMC | t-Test | ohne sSMC | mit sSMC | t-Test | ohne sSMC | mit sSMC | t-Test | ohne sSMC | mit sSMC |
| 150 | 21 | 32 | n.s. | 45 | 42 | n.s. | 34 | 26 | n.s. | 42 | 84 |
| 47 | 0 | 44 | n.v. | 0 | 31 | n.v. | 0 | 40 | n.v. | 0 | 36 |
| 147 | 28 | 53 | p < 0.001 | 42 | 24 | p < 0.002 | 30 | 23 | p < 0.007 | 40 | 52 |
| 149 | 63 | 55 | n.s. | 25 | 39 | p < 0.002 | 12 | 6 | n.s. | 52 | 69 |
| 148 und 149 | 65 | 61 | n.s. | 27 | 31 | n.s. | 8 | 8 | n.s. | 52 | 108 |
| 150 bis 149 | 12 | 13 | n.s. | 38 | 39 | n.s. | 50 | 48 | n.s. | 113 | 274 |

Im Hinblick auf die jeweiligen homologen Schwesterchromosomen stellten sich bei Vorliegen eines sSMC veränderte Orientierungs- und Abstandsbeziehungen dar (Tab. 3.4). Es zeichnete sich eine deutliche Tendenz ab, dass die homologen Schwesterchromosomen in Zellkernen mit sSMC weiter voneinander entfernt liegen als in Kontrollzellkernen. Besonders deutlich war dieses Phänomen bei Fall-Nr. 47 zu beobachten. In normalen Zellkernen liegen beide Chromosomen 15 sehr nah beieinander. In Zellkernen mit sSMC ist das Gegenteil der Fall: die homologen Schwesterchromosomen liegen sich entgegengesetzt oder zumindest in signifikant größerer Entfernung zueinander. Bemerkenswert war hier die unveränderte Orientierung der Chromosomen 19 (Kontrolle) zueinander.

Tab. 3.4: Orientierung der homologen Chromosomen 8, 15, 16, 18 und 19 zueinander in Zellkernen mit und ohne sSMC. n.v. = nicht verfügbar. n.s. = nicht signifikant

| Fall-Nr. | Position zusammen in % | | | Position nah in % | | | Position gegenüber in % | | | Anzahl untersuchter Zellkerne | |
|-------------|------------------------|----------|-----------|-------------------|----------|-----------|-------------------------|----------|-----------|-------------------------------|----------|
| | ohne sSMC | mit sSMC | t-Test | ohne sSMC | mit sSMC | t-Test | ohne sSMC | mit sSMC | t-Test | ohne sSMC | mit sSMC |
| 150 | 43 | 56 | p < 0.003 | 57 | 36 | n.s. | 0 | 8 | p < 0.001 | 42 | 78 |
| 47 | 0 | 4 | n.v. | 0 | 82 | n.v. | 0 | 4 | n.v. | 0 | 23 |
| 147 | 42 | 40 | n.s. | 58 | 51 | n.s. | 0 | 9 | p < 0.001 | 26 | 79 |
| 149 | 28 | 30 | n.s. | 66 | 17 | p < 0.001 | 6 | 53 | p < 0.001 | 100 | 41 |
| 148 und 149 | 36 | 28 | p < 0.006 | 52 | 36 | p < 0.002 | 12 | 36 | p < 0.002 | 50 | 71 |
| 150 bis 149 | 28 | 12 | p < 0.002 | 66 | 62 | n.s. | 6 | 26 | p < 0.001 | 100 | 69 |
| | 67 | 73 | n.s. | 31 | 25 | n.s. | 2 | 2 | n.s. | 174 | 259 |

Die Untersuchung der Orientierung der sSMC in Bezug zu den jeweils zugehörigen homologen Schwesterchromosomen war der dritte Schwerpunkt in dieser 3D-Analyse (Tab. 3.5). Auch hierbei dienten die Chromosomen 19 als Kontrolle. In 6-30% der Zellkerne war hier eine zufällige Kolokalisation des sSMC mit einem der Chromosomen zu verzeichnen. Bei den von Chromosom 15 stammenden sSMC wurde diese Kolokalisation mit einem homologen Schwesterchromosom in 58% (T-Lymphozyten) und 87% (Fibroblasten) der Zellkerne nachgewiesen. Ebenso verhielt es sich bei den Fällen 147 und 148. Die sSMC lagen in 52% bzw. 53% der Zellkerne bevorzugt mit einem homologen Schwesterchromosom zusammen. Von besonderem Interesse war die Orientierung des komplexen sSMC zu den homologen Chromosomen 8 und 18, aus deren Material es sich zusammensetzt. Es zeigte sich eine zufällige Kolokalisation mit einem Chromosom 18 in 27%, mit 56% jedoch eine nicht zufällige Orientierung zu einem Chromosom 8. Da die Chromosomen 8 bezüglich der Zellkernarchitektur deutlich peripher liegen und die Kontrollchromosomen 19 eher zentral, kolokalisierten auch nur 6% der sSMC mit einem Chromosom 19. Zwischen den Zellen mit dizentrischem sSMC und monozentrischem sSMC waren keine Unterschiede zu beobachten. Die veränderte Lagebeziehung der homologen Schwesterchromosomen und die bevorzugte Kolokalisation mit einem homologen Schwesterchromosom zeigten sich bei beiden sSMC-Arten (Abb. 3.23).

Tab. 3.5: Kolokalisation der sSMC und den jeweiligen homologen Schwesterchromosomen. n.v. = nicht verfügbar. n.s. = nicht signifikant

| Fall-nr. | Kolokalisation mit SC in % | keine Kolokalisation mit SC in % | Kolokalisation m. #8 | Kolokalisation m. #19 | Anzahl d. Zellkerne |
|----------|----------------------------|----------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| 150 | 58 | 18 | nicht getestet | 24 | 43 |
| 47 | 87 | 13 | nicht getestet | nicht getestet | 23 |
| t-Test | $P < 0.001$ | n.s. | n.v. | n.v. | n.v. |
| 148 | 53 | 17 | nicht getestet | 30 | 36 |
| 149 | 27 | 11 | 56 | 6 | 35 |
| t-Test | $p < 0.001$ | no | n.v. | $p < 0.001$ | n.v. |

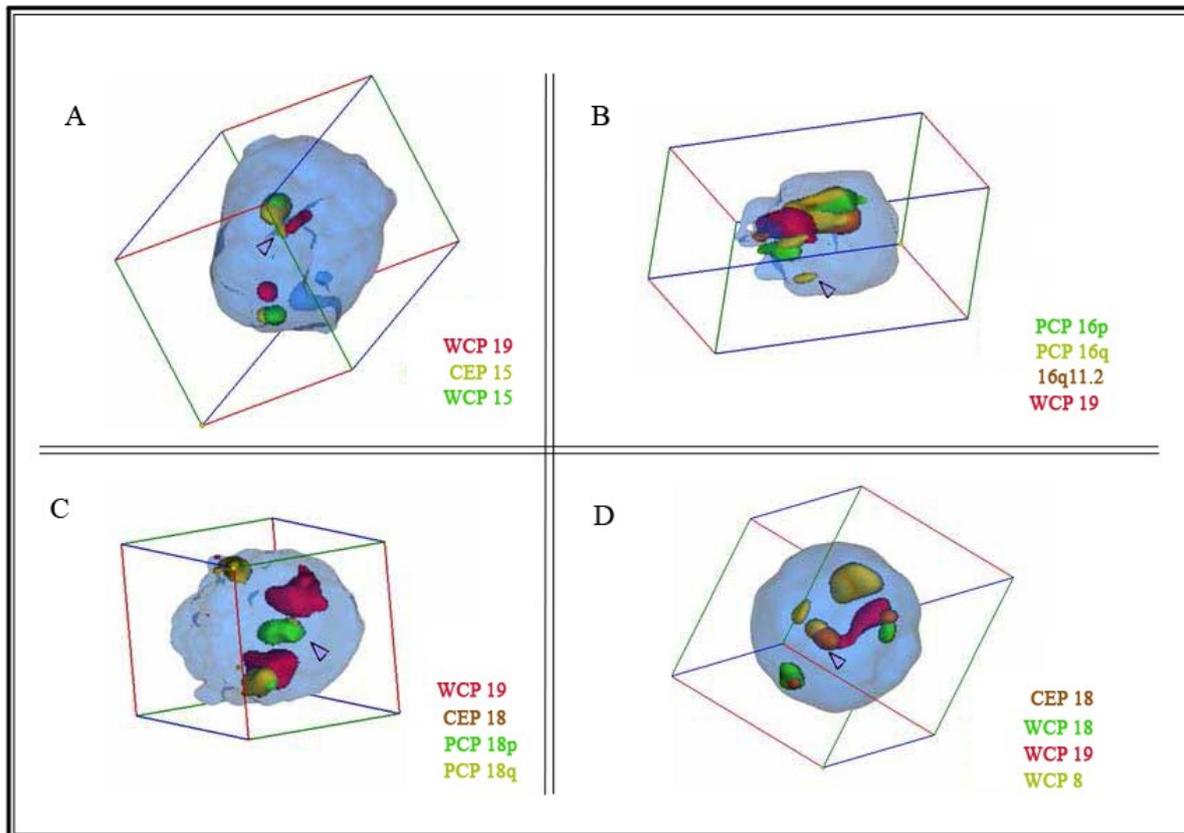


Abb. 3.23: Darstellung der dreidimensionalen Lage der sSMC im Zellkern. sSMC sind mit Pfeilspitze markiert, Farben und dargestellte Sonden sind in der Abbildung erklärt. A: Fall-Nr. 150. Das sSMC liegt eher zentral bis intermediär. Die #15 liegen eher intermediär. Das sSMC kolokalisiert mit einem #15. Ein #19 liegt zentral, eins peripher. B: Fall-Nr. 147. Das sSMC liegt intermediär bis peripher, ebenfalls das #16. Die #19 liegen eng zusammen und intermediär. Das sSMC kolokalisiert nicht mit einem #16. C: Fall-Nr. 148. Das sSMC liegt zentral. Die #19 liegen peripher bis intermediär. Die #18 liegen peripher und sich gegenüber. D: Fall-Nr. 149. Das sSMC liegt eher peripher bis intermediär. #8 und #18 liegen ebenfalls eher peripher. sSMC kolokalisiert mit einem #8. Die #19 liegen zusammen und zentral.

3.4 Histonfärbungen

Es ist bekannt, dass Histonmodifikationen einen Einfluss auf die Chromatinstruktur und auf die Genaktivität haben. Um zu untersuchen, ob epigenetische Veränderungen bez. der Histonmodifikationen die Zentromeraktivität beeinflussen, wurden die nachfolgend beschriebenen Färbungen durchgeführt. Von Interesse war dabei, ob sich spezifische Muster entlang der Chromosomen erzeugen lassen und wie sich dieses Muster auf den sSMC verhält. Es konnte mit dem verwendeten unfixierten Material morphologisch eine dem fixierten Material annähernd vergleichbare Chromosomenqualität erreicht werden. Somit ließen sich die Chromosomen mit DAPI-vermittelter Färbung identifizieren. Als Kontrolle für den Erfolg des Experimentes wurde ein CENP-A-Antikörper (TR) eingesetzt. Wie in Abbildung 3.24 zu sehen, konnte ein spezifisches Bandenmuster nach Färbung mit einem Antikörper gegen H3K4me2 (FITC) nachgewiesen werden. Die GTG-positiven Bereiche waren angefärbt, während bei GTG-negativen Bereichen keine Färbung beobachtet wurde. Einzelne Chromosomenabschnitte wiesen unterschiedliche Signalintensitäten auf. Unter den auffallend stark gefärbten chromosomalen Bereichen müssen hier das distale Ende des p-Arms von Chromosom 1, der p-Arm von Chromosom 6, sowie die Chromosomen 17 und 19 hervorgehoben werden. Mit dem verwendeten Antikörper konnte darüber hinaus die X-Inaktivierung bei weiblichen Zellen nachgewiesen und visualisiert werden – womit gleichzeitig der Beweis für die Spezifität des Antikörpers erbracht war.

Nach erfolgreicher Etablierung der Methode und Evaluierung der Antikörper an unauffälligen humanen Chromosomen wurden die Antikörper an sSMC-Fällen (Fall-Nr. 101, Fall-Nr. 151) angewandt und bei den sSMC, die beide aus Material von Chromosom 22 bestehen, sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Es konnte bei beiden Fällen entlang der Chromosomen dasselbe spezifische Bänderungsmuster des Antikörpers gegen H3K4me2 nachgewiesen werden. Beide Chromosomen 22 zeigten das für diese Chromosomen charakteristische Muster: Diese beiden kleinen hellen Chromosomen zeigten die typische intensive Färbung der GTG-positiven Abschnitte. Die Signalkonstellation am sSMC von Fall-Nr. 101 (inv dup(22)(q11.23)) unterschied sich jedoch im Vergleich zu den homologen Schwesterchromosomen 22 enorm. Obwohl das sSMC ebenfalls aus hetero- und euchromatischen Bereichen besteht, fehlten Signale für H3K4me2 völlig (Abb. 3.25A).

Im Gegensatz zu dieser Beobachtung wurde beim sSMC der Fall-Nr. 151 (min(22)(pter->q12.1)) ein – wenn auch im Vergleich zu den homologen Schwesterchromosomen deutlich schwächeres – Signal für H3K4me2 detektiert (Abb. 3.25B). Beide sSMC zeigten somit kein einheitliches Färbeverhalten.

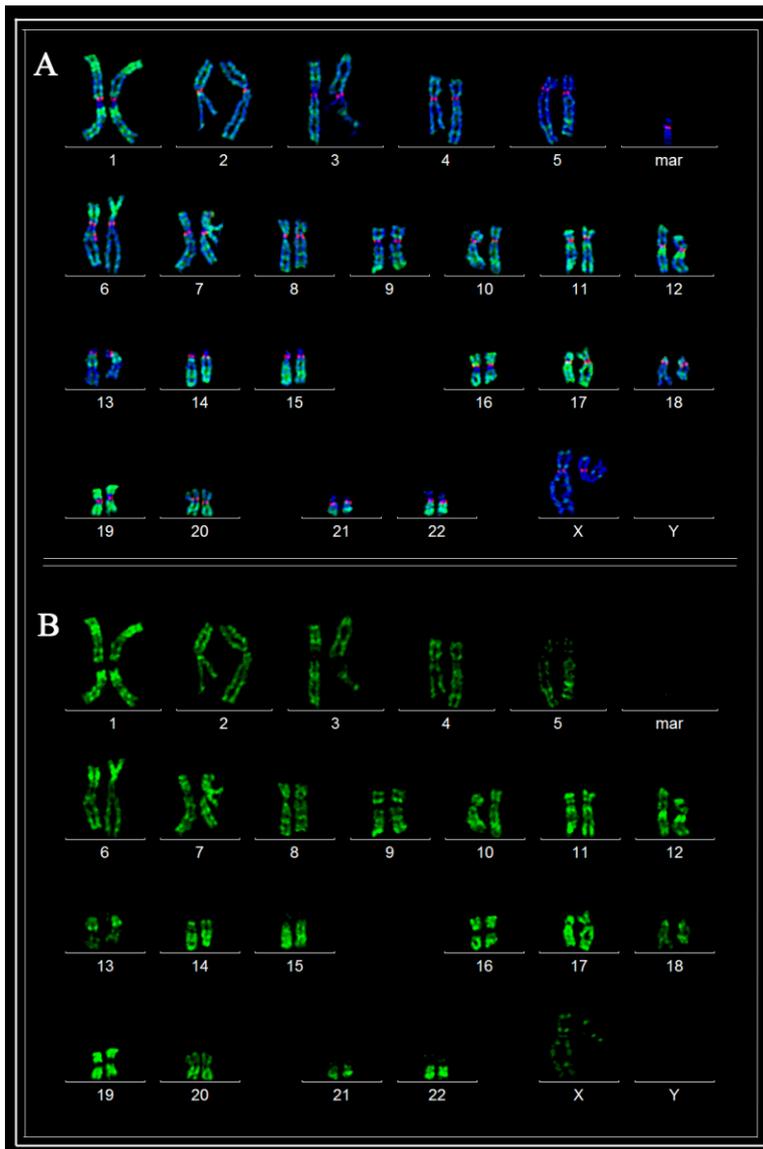


Abb. 3.24: Beispielhaftes Karyogramm nach Immunfluoreszenzfärbung mit dem AK H3K4me2 (Fall-Nr. 101). A: Originalbild. Blau: DAPI. Rot: Kontroll-AK CENP-A. Grün: H3K4me2-Signal. B: Nur das sich aus den Signalen des AK H3K4me2 ergebende Bandenmuster.

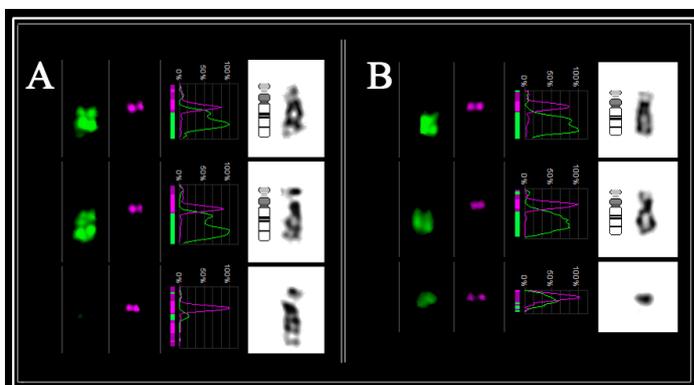


Abb. 3.25: Detailansicht der mit Histonfärbung untersuchten sSMC. Dargestellt sind oben und mittig beide homologe Chromosomen 22; unten das sSMC. A: sSMC aus Fall-Nr. 101. Beide #22 besitzen Signale für CENP-A und H3K4me2; bei inv dup(22) fehlt das Signal für H3K4me2. B: sSMC aus Fall-Nr. 151. Beide #22 besitzen Signale für CENP-A und H3K4me2; bei min(22) ebenfalls Signal für H3K4me2 vorhanden.

3.5 NOR-Färbung

3.5.1 Einfluss der Aktivität der NOR an den sSMC im Verhältnis zur Aktivität der anderen NOR in der Zelle

Zur Charakterisierung der sSMC auf zytogenetischer Ebene wurden AgNOR-Färbungen durchgeführt. Mit dieser Technik werden die funktionellen NOR (Nukleolus-organisierende Regionen) an den kurzen Armen akrozentrischer Chromosomen sichtbar gemacht. Die in dieser Arbeit untersuchten akrozentrischen sSMC besitzen strukturell bedingt zwei kurze Arme und somit auch zwei NOR. Für eine quantitative Untersuchung wurden die AgNOR-Signale in jeder Zelle von 12 untersuchten akrozentrischen sSMC-Fällen gezählt (je Fall ca. 20-40 MPP analysiert) und die daraus errechneten Mittelwerte mit den Mittelwerten aus Kontrollzählungen verglichen. Die Kontrollen stammten von MPP von 43 Fällen (je 4-8 MPP analysiert), an denen Routinefärbungen am Institut durchgeführt wurden. In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3.6) ist die Anzahl der gesehenen AgNOR-Signale pro Zelle (Mittelwert) aufgelistet. Der Mittelwert der sSMC-Fälle lag bei 5,94. Im Gegensatz dazu lag der Mittelwert in der Kontrollgruppe bei 7,59, wodurch sich ein Unterschied von 1,65 ergibt. Der Unterschied konnte nach T-Test mit einem p-Wert von 0,00004 statistisch untermauert werden. Somit unterschied sich die Anzahl der AgNOR-Signale und damit der aktiven NOR zwischen sSMC-Fällen und Kontrollen um 1-2 Signale. Es besteht demnach ein Zusammenhang zwischen der Menge an aktiven NOR und dem Vorhandensein eines sSMC.

Tab. 3.6: Anzahl AgNOR-positiv gefärbter Satellitenstiele pro Zelle.

| Fall-Nr. | Karyotyp | Anzahl gefärbter NOR (arithmetrischer Mittelwert) |
|----------|-------------------------|--|
| 45 | idic(15)(q12) | 5,8 |
| 50 | inv dup(15)(q13) | 6,42 |
| 94 | inv dup(22)(q11.21) | 4,69 |
| 32 | inv dup(15)(p11.1) | 7,5 |
| 28 | inv dup(15)(q11.1) | 6,14 |
| 27 | inv dup(15)(q11.1) | 5 |
| 12 | inv dup(14)(q11.1) | 4,18 |
| 14 | inv dup(14)(q11.1) | 6,8 |
| 48 | inv dup(15)(q12~13) | 7,8 |
| 88 | inv dup(14or 22)(q11.1) | 6,36 |
| 87 | inv dup(22)(q11.1) | 5,69 |
| 15 | inv dup(14)(q11.1) | 4,9 |
| | Summe | 5,94 |

3.5.2 Vergleich von FISH- und AgNOR-Färbung an akrozentrischen sSMC

Neben der AgNOR-Färbung können auf molekularzytogenetischer Ebene FISH-Sonden eingesetzt werden, um die Satellitenstiele, und damit ebenfalls die NOR (unabhängig von

ihrer Funktionalität im vorangegangenen Zellzyklus), spezifisch anzufärben. In einer vergleichenden Analyse wurden beide Färbungen an 15 akrozentrischen sSMC-Fällen durchgeführt und die Ergebnisse anschließend gegenübergestellt. Es gingen jeweils 20-40 MPP pro Fall in die Analyse ein. Insgesamt konnten sowohl mittels FISH als auch mit der Ag-NOR-Färbung drei verschiedene Signalkonstellationen beobachtet werden (Tab. 3.7). Entweder waren beide NOR-Signale am sSMC gleich groß oder ein Signal war deutlicher schwächer ausgeprägt. Darüber hinaus wurden sSMC gefunden, bei denen nur ein FISH-, bzw. ein AgNOR-Signal nachweisbar war. Bei beiden Färbungen zeigten nicht alle Zellen eines Falles die gleiche Signalkonstellation, sondern in der Regel eine Kombination von zwei, in seltenen Fällen auch drei Mustern in bestimmtem Verhältnis.

Tab. 3.7: Auflistung der Signalmuster und deren Intensität bei sSMC mit NOR-FISH und AgNOR-Färbung. n.v. = nicht verfügbar.

| Fall-Nr. | Karyotyp | NOR-FISH-Ergebnis in % | | | Ag-NOR-Ergebnis in % | | |
|----------|-----------------------------|------------------------|-----------------|------------|----------------------|-----------------|------------|
| | | 1x NOR | unterschiedlich | gleich | 1x NOR | unterschiedlich | gleich |
| 45 | idic(15)(q12) | 0 | 37 | 63 | 0 | 23 | 77 |
| 26 | idic(15)(q11) | 0 | 18 | 82 | n.v. | n.v. | n.v. |
| 50 | inv dup(15)(q13) | 0 | 77 | 23 | 8 | 77 | 15 |
| 94 | inv dup (22)(q11.21) | 0 | 100 | 0 | 0 | 35 | 65 |
| 32 | inv dup (15)(p11.1) | 0 | 0 | 100 | 0 | 50 | 50 |
| 28 | inv dup (15)(q11.1) | 0 | 21 | 79 | 20 | 80 | 0 |
| 27 | inv dup (15)(q11.1) | 0 | 64 | 36 | 0 | 64 | 36 |
| 12 | inv dup (14)(q11.1) | 0 | 15 | 85 | 0 | 16 | 84 |
| 13 | inv dup (14)(q11.1) | 0 | 92 | 8 | 0 | 16 | 84 |
| 85 | inv dup (22)(q11.1) | 0 | 50 | 50 | n.v. | n.v. | n.v. |
| 31 | inv dup (15)(q11.1) | 0 | 58 | 42 | 0 | 17 | 83 |
| 86 | inv dup (22)(q11.1) | 0 | 10 | 90 | n.v. | n.v. | n.v. |
| 14 | inv dup (14)(q11.1) | 4 | 89 | 7 | 0 | 7 | 93 |
| 48 | inv dup (15)(q12~13) | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 |
| 53 | inv dup (15)(q13.1) | 30 | 70 | 0 | n.v. | n.v. | n.v. |
| 88 | inv dup (14or 22)(q11.1) | 0 | 48 | 52 | 0 | 68 | 32 |
| 87 | inv dup (22)(q11.1) | 24 | 72 | 4 | 0 | 28 | 72 |
| 17 | inv dup (14)(q11.2) | 0 | 13 | 87 | n.v. | n.v. | n.v. |

Fortsetzung Tab. 3.7: Auflistung der Signalmuster und deren Intensität bei sSMC mit NOR-FISH und AgNOR-Färbung. n.v. = nicht verfügbar.

| Fall-Nr. | Karyotyp | NOR-FISH-Ergebnis in % | | | Ag-NOR-Ergebnis in % | | |
|----------|-------------------------|------------------------|-----------------|-----------|----------------------|-----------------|-----------|
| | | 1x NOR | unterschiedlich | gleich | 1x NOR | unterschiedlich | gleich |
| 93 | inv dup (22)(q11.21) | 0 | 26 | 74 | n.v. | n.v. | n.v. |
| 52 | inv dup (15)(q13) | 3 | 11 | 98 | 0 | 17 | 83 |
| 58 | inv dup (15)(q13) | 0 | 71 | 29 | n.v. | n.v. | n.v. |
| 15 | inv dup (14)(q11.1) | 0 | 50 | 50 | 0 | 93 | 7 |

In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse beider Färbungen für jeden Fall aufgelistet. In zehn der 22 mit NOR-FISH untersuchten Fälle wies die Mehrheit der Zellen zwei Signale vergleichbarer Intensität auf den sSMC auf. In neun Fällen unterschieden sich die Intensitäten der beiden Signale auf den sSMC deutlich voneinander. In den restlichen drei Fällen (Fall-Nr. 85, 88, 15) zeigte die Hälfte der Zellen zwei gleiche Signale, während bei der andere Hälfte je ein schwaches und ein starkes Signal verzeichnet wurde. Bei drei Fällen (Fall-Nr. 14, 53, 87) zeigte sich in einem Anteil von 4-30% eine dritte Signalkonstellation: Auf dem sSMC war nur ein Signal für die NOR nachweisbar. Mit der AgNOR-Färbung wurden bei neun Fällen überwiegend sSMC mit Signalen gleicher Intensität beobachtet. Fünf Fälle wiesen deutliche Unterschiede auf und bei einem Fall lagen beide Signalkonstellationen in gleichem Verhältnis vor. Mit dieser Färbung wurde darüber hinaus bei zwei Fällen (Fall-Nr.50, Fall-Nr. 28) anteilig nur ein NOR-Signal gefunden (8-20%).

Der Vergleich der 15 Fälle, bei denen beide Färbungen durchgeführt wurden, zeigte, dass sechs Fälle (Fall-Nr. 45, 50, 27, 12, 48, 52) bei beiden Färbungen die gleiche Musterverteilung bzw. deren Anteile innerhalb eines Falles aufwiesen. Interessanterweise sind unter diesen sechs Fällen vor allem die zytogenetisch größeren sSMC zu finden. Fünf sSMC stammten dabei von #15, wobei in vier Fällen der Bruchpunkt in 15(q12) bzw. 15(q13) lag. Bei zwei Fällen (Fall-Nr. 13, Fall-Nr. 14), welche zytogenetisch den gleichen Karyotyp inv dup(14)(q11.1) aufwiesen, stellte sich genau gegenteiliges heraus. Bei weiteren sieben Fällen (Fall-Nr. 26, 85, 86, 17, 93, 58), deren Bruchpunkte innerhalb der Bande q11.1 bzw. q11.21 und somit innerhalb bzw. kurz unterhalb des Zentromers lagen, konnte kein Zusammenhang gefunden werden. Zusammenfassend weisen Zellen mit dizentrischem sSMC weniger Ag-positive NOR auf als Zellen ohne sSMC. Ferner zeigen alle dizentrischen sSMC sowohl zwei AgNOR-Signale als auch zwei NOR-FISH-Signale, deren Intensität vor allem bei den größeren dizentrischen sSMC vergleichbar ist.

4 Diskussion

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit besteht in der ersten systematischen Analyse des Aktivitätszustandes der zwei Zentromere von dizentrischen Chromosomen. Das untersuchte Kollektiv bestand aus insgesamt 41 Fällen mit großen dizentrischen Chromosomen (DIC) und 103 Fällen mit dizentrischen kleinen überzähligen Markerchromosomen (sSMC). Neben zyto- und molekularzytogenetischen Techniken zur Charakterisierung von deren strukturellen Eigenschaften war hier mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung der Zentromerproteine CENP-B und CENP-C die Analyse der Zentromeraktivität möglich. Humane dizentrische Chromosomen zeigen, im Gegensatz zu dizentrischen Chromosomen anderer Spezies (McClintock 1939, Hill und Bloom 1978, Hill und Bloom 1989, Thrower und Bloom 2001, Thrower et al. 2003), mitotische Stabilität, die nach vorherrschender Ansicht durch Inaktivierung eines der beiden Zentromere zustande kommt (Page et al. 1995, Therman 1986). Nachdem durch frühere Untersuchungen mit Giemsa- und Cd-Färbung die Identifizierung bzw. Markierung der aktiven Zentromere möglich war (Lemyre et al. 2001, Maraschio et al. 1980), folgten ab Ende der achtziger Jahre Immunfluoreszenzuntersuchungen, die neben dem erwarteten Muster bereits auf eine größere Variationsbreite der Aktivitätsmuster hindeuteten (Merry et al. 1985, Peretti et al. 1986, Earnshaw und Migeon 1985).

4.1 Einteilung der Aktivitätsmuster

Auf der Grundlage von insgesamt 103 Fällen mit dizentrischen sSMC und 41 Fällen mit anderen dizentrischen Chromosomen konnten insgesamt fünf verschiedene Aktivitätsmuster klassifiziert werden (siehe Abb. 3.3). Neben den drei erstmals in 2010 beschriebenen Aktivitätsmustern (Ewers et al. 2010) wurde in dieser Arbeit zum einen ein neues Aktivitätsmuster beschrieben, zum anderen wurde dem Muster „fusion“ (hier als „ZEN“ bezeichnet) ein zweites Muster mit nur einem detektierbaren exzentrischen Zentromersignal gegenübergestellt („exZEN“). Dass bei keinem der DIC das Aktivitätsmuster „ZEN“, also nur ein zentrisches Zentromersignal, gefunden wurde, lässt sich am ehesten mit deren Struktur erklären. Die Zentromere sind hier so weit voneinander entfernt, dass eine funktionelle Fusion unmöglich erscheint. Möglicherweise könnten die in der Literatur beschriebenen Isochromosomen des X-Chromosoms mit Bruchpunkten in Xq10 und Xp10 (Demirhan et al. 2009, Adeyinka et al. 2007) als derartige Varianten angesehen werden. Das Aktivitätsmuster „intermediär“ bei dem innerhalb eines Falles die sSMC unterschiedlicher Zellen verschiedene

Muster aufweisen, und welches fast 50% der untersuchten Fälle besaßen, wurde prinzipiell schon von Ewers und Mitarbeitern 2010 beschrieben, allerdings bei geringerem Stichprobenumfang (Ewers et al. 2010). Eine Studie an Robertsonschen Translokationschromosomen (Page und Shaffer 1998) und eine weitere Studie an künstlichen generierten Isochromosomen X (Higgins et al. 2005) zeigten ebenfalls verschiedene Mustervarianten. Higgins und Mitarbeiter verwendeten zwar andere Zentromerproteine als Aktivitätsanzeiger, jedoch wiesen auch sie Fälle mit gemischten Aktivitätsmustern nach (Higgins et al. 2005). Dies deutet an, dass die Zentromeraktivität bestimmten Einflüssen unterliegt und die Zentromeraktivierung einen komplexen Vorgang darstellt, der von vielen Faktoren abzuhängen scheint und nicht zwangsläufig nach dem gleichen Prinzip ablaufen muss. Im Folgenden werden verschiedene mögliche Mechanismen diskutiert.

Das Aktivitätsmuster „intermediär“ wurde solchen Fällen zugeordnet, in denen kein uniformes Aktivitätsmuster in allen untersuchten Zellen, sondern verschiedene Aktivitätsmuster innerhalb eines Falles beobachtet wurden. Meist handelte es sich um eine Mischung zweier Muster, in selteneren Fällen auch aus drei oder noch mehr. Für deren Entstehung sind verschiedene Mechanismen denkbar. Eine Möglichkeit wäre, dass dieses Muster durch Vorliegen mehrerer unterschiedlicher Zelllinien innerhalb einer Person zustande kommt, was eine Art Mosaikstatus für die jeweiligen Zelllinien bedeuten würde. Mehrere nebeneinander vorkommende Zelllinien wurden bereits für nicht-Robertsonsche dizentrische Translokationschromosomen beschrieben (Dewald et al. 1979, Vianna-Morgante und Rosenberg 1986, Daniel et al. 1985). Lemyre und Mitarbeiter vermuten dagegen einen zeitlichen Hintergrund, der diese Aktivitätsmuster bedingt. Sie meinen, dass die Inaktivierung nahe beieinander liegender Zentromere in verschiedenen Zellen nicht zwangsläufig zum gleichen Zeitpunkt stattfinden muss und daher Mosaik aus Zelllinien verschiedener Aktivitätsmuster auftreten könnten (Lemyre et al. 2001). Schließlich könnte möglicherweise auch die Vererbung diese Muster erklären: Aus Einzelzellanalysen geht hervor, dass die verschiedenen Zelllinien innerhalb einer Person auch durch klonale Weitergabe der Zentromeraktivität entstehen könnten (Wandall 1995, Higgins et al. 2005). Es wäre auch denkbar, dass sich (über einen bisher nicht näher charakterisierten Mechanismus) der Aktivitätsstatus einer Population von Zellen verändern könnte, wie bereits in Hefe (*S. pombe*; Steiner und Clarke 1994) und auch in transfizierten humanen Zellen (Nakano et al. 2003) nachgewiesen wurde. Eine epigenetische Veränderung, die zu dieser Zentromerplastizität und damit zum Vorliegen unterschiedlicher Zellen mit verschiedenen Aktivitätsmustern führen könnte, ist der Zeitpunkt der Zentromer-

DNA-Replikation, die normalerweise zu Mitte bzw. Ende der S-Phase passiert (O'Keefe et al. 1992, Haaf & Ward 1994, Shelby et al. 2000). Es konnte jedoch hierfür bisher keine Korrelation nachgewiesen werden. Für den Aufbau eines funktionellen Zentromers scheinen daher wahrscheinlich die spezifische Abfolge von Modifikationen und deren zeitliche Regulierung entscheidend zu sein.

Fazit: Die beschriebenen fünf verschiedenen Aktivitätsmuster der Zentromere bei dizentrischen Chromosomen beweisen zum einen, dass es sich bei der Inaktivierung eines Zentromers um einen sehr komplexen Vorgang handelt, der nicht immer nach einem Standardprinzip abläuft, und zum anderen lassen die unterschiedlichen Muster auf vielfältige, überwiegend epigenetische Einflüsse schließen, die den Aktivitätszustand bedingen. Besonders der überraschend häufige Fund der intermediären Aktivitätsmuster verspricht vielfältige Analysemöglichkeiten z.B. durch Studien an synchronisierten Zelllinien mit sSMC.

4.1.1 Mechanismen der Inaktivierung

Es gibt verschiedene Vorstellungen darüber, welche Mechanismen für die Inaktivierung und somit für die Stabilisierung dizentrischer Chromosomen verantwortlich sein könnten. Diese reichen von der Idee einer temporären Unterdrückung (Suppression), welche durch Reaktivierung aufgehoben werden kann (Niebuhr 1972, Dewald et al. 1979, Daniel et al. 1985, Schwartz et al. 1983, Ing und Smith 1983, Rivera et al. 1989), über unspezifische Inaktivierung (Nakagome et al. 1976, Roberts et al. 1977, Merry et al. 1985, Haaf und Schmid 1990 – siehe Abschnitt 4.1.1.1) bis hin zur kompletten Deletion einer der zwei Zentromerregionen (Vianna-Morgante und Rosenberg 1986 – siehe Abschnitt 4.1.1.2).

4.1.1.1 Epigenetische (funktionelle) Inaktivierung

Die zentromerische α -Satelliten-DNA wird mit der Zentromeraktivität in Zusammenhang gebracht bzw. durch die Inaktivierung eines Zentromers beeinflusst (Page und Shaffer 1998, Higgins et al. 2005). Eines der wichtigsten Charakteristika inaktiver Zentromere jedoch ist die veränderte Proteinzusammensetzung. Die essentiellen Kinetochorproteine, die für die Interaktion von Spindelfasern und Zentromer notwendig sind, fehlen an den inaktiven Zentromeren (Sullivan und Schwartz 1995, Page et al. 1995, Okamoto et al. 2007, Howman et al. 2000, Saffery et al. 2000, Amor et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden aktive Zentromere über das Antigen CENP-C nachgewiesen, inaktive durch dessen Fehlen, was den unterschiedlichen Proteingehalt der Zentromere in Abhängigkeit ihres Aktivitätsstatus

untermauert. Die unterschiedliche Proteinzusammensetzung an aktiven und inaktiven Zentromeren scheint auch für die Einschnürung der aktiven Zentromere verantwortlich zu sein und somit einen Einfluss auf die Struktur zu haben und nicht umgekehrt (Sullivan und Schwartz 1995). Obgleich die vorliegende Arbeit keinen Beitrag zur Klärung dieser Frage leisten konnte, so gelang jedoch die Bestätigung des Zusammenhangs zwischen primärer Einschnürung und aktivem Zentromer.

Modifizierungsstudien von Stimpson und Sullivan zeigten, dass das Einbringen von Transkriptionsaktivatoren die bevorzugte Bildung von Euchromatin begünstigt und das Einbringen von Silencern eine Heterochromatisierung der Zentromerregion bewirkt (Stimpson und Sullivan 2010). In jedem Fall war die Zentromerfunktion gestört. Damit brachten sie den Beweis, dass die Chromatiumgebung bzw. die Chromatinstruktur einen Einfluss auf die Zentromere ausübt (Nakano et al. 2008). Studien an künstlichen dizentrischen Chromosomen (Human artificial chromosomes = HAC) ergaben einen stufenweisen Verlust der Zentromerproteine (CENP) an den inaktivierten Zentromeren, wobei CENP-A als letztes Protein entfernt wurde (Cardinale et al. 2009). Zur Klärung, ob Chromatinveränderungen für den Verlust der Proteine sorgen oder ob das Fehlen der Proteine die Heterochromatisierung bewirkt, wären weitere Studien notwendig. Für die zweite Variante spricht, dass das Histon H3 den Platz von CENP-A einnimmt, wenn CENP-A experimentell entfernt wird und sich dieser Prozess bei Überexpression von CENP-A umkehrt (Blower et al. 2002). Dass auch Histonmodifikationen einen Einfluss auf die Aktivität der Zentromere haben können, wurde 2010 bei Weizen bewiesen (Zhang et al. 2010) und könnte, wie Higgins und Mitarbeiter in einer Studie 2005 diskutieren, auch bei humanen dizentrischen Chromosomen von Bedeutung sein (Higgins et al. 2005; siehe Abschnitt 4.3). Verschiedene Arbeitsgruppen sehen auch eine zeitliche Komponente als Einflussfaktor. Stimpson und Mitarbeiter wiesen bei künstlich hergestellten dizentrischen Chromosomen (HAC) eine zunehmende Inaktivierung eines Zentromers mit dem Verlauf der Zeit nach (Stimpson et al. 2010), und auch andere zeigten, dass die Stabilisierung dizentrischer Chromosomen zeitnah geschehen muss, um Verluste zu vermeiden (Sullivan und Willard 1998, Schwartz et al. 1983, Lemyre et al. 2001).

Fazit: Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten dizentrischen sSMC und DIC zeigen vornehmlich am aktiven Zentromer die Ausbildung der primären Einschnürung, was dafür spricht, dass die Proteinzusammensetzung der Zentromere deren Struktur beeinflusst. Dass eine epigenetische Inaktivierung vorkommt wird auch dadurch angedeutet, dass bei einem Teil der untersuchten dizentrischen Chromosomen keine Unterschiede der Signalstärken auf

DNA-Ebene vorlagen, wohl aber unterschiedliche Signalintensitäten bei der Immunfärbung der Zentromerproteine nachgewiesen wurden. Auch das Vorliegen von intermediären Aktivitätsmustern, wobei mehrere Zelllinien mit unterschiedlichen Aktivitätsmustern nebeneinander vorkommen, könnte auf unterschiedliche Zeitpunkte der Inaktivierung und damit auf einen epigenetisch regulierten Prozess hindeuten. Mit weiterführenden Untersuchungen zum zeitlichen Ablauf der Inaktivierung und der Proteinzusammensetzung könnte ein besseres Verständnis der funktionellen Inaktivierung erlangt werden.

4.1.1.2 Deletion eines Zentromers

Untersuchungen bei Hefen (*S. cerevisiae*) bewiesen, dass zur Stabilisierung dizentrischer Chromosomen eines der beiden Zentromere deletiert werden kann (Jaeger und Philippsen 1989, Pennaneach und Kolodner 2009, Hill und Bloom 1989). Die Deletion erfolgt durch auf Rekombination und Reparatur basierenden Signalwegen, die mit der Mikrotubulibewegung zusammenhängen (Thrower et al. 2003). Diese Form der Inaktivierung wurde auch bei Menschen beobachtet, vornehmlich bei Isochromosomen Y (Tyler-Smith et al. 1993, Rivera et al. 1993, Rivera et al. 2003, Maraschio et al. 1990) aber auch bei anderen dizentrischen Chromosomen (Tung et al. 2001, Vianna-Morgante und Rosenberg 1986). Ein bedeutender Unterschied zwischen den beiden Deletionsereignissen ist jedoch, dass bei Menschen nur ein Teil der α -Satelliten-DNA entfernt wird, bei der Hefe der gesamte entsprechende Abschnitt (Tyler-Smith et al. 1993, Stimpson et al. 2010). Interessanterweise wurde bei einigen Fällen in Zellen mit teilweise deletierter α -Satelliten-DNA am dizentrischen Chromosom zusätzliches α -Satelliten-Material in Form eines Markerchromosoms gefunden, das der deletierten Region entspricht (Rivera et al. 2003, Rivera et al. 1993, Tung et al. 2001, Vianna-Morgante und Rosenberg 1986). MacKinnon und Campbell beschrieben kürzlich auch die Deletion eines Zentromers bei dizentrischen Chromosomen von Tumorpatienten (MacKinnon und Campbell 2011). Für diese partielle Deletion als Inaktivierungsmechanismus sprechen auch diejenigen sSMC-Fälle und Translokationschromosomen, deren inaktive Zentromere nur ein sehr schwaches CENP-B-Signal aufwiesen (siehe Tabelle 7.1 im Anhang). Da es sich bei CENP-B um ein DNA-bindendes Protein handelt, kann somit aus dem abgeschwächten Signal auf eine Reduzierung der α -Satelliten-DNA-Menge geschlossen werden. Auch war das FISH-Zentromersignal am inaktiven Zentromer zum Teil kleiner bzw. wies geringere Intensität auf. Ebenso beobachteten Sullivan und Schwartz in ihrer Untersuchung von Robertsonschen Translokationschromosomen zumeist ein schwächeres Signal der CENP-B-Antikörper und argumentierten, dass möglicherweise ein Verlust von CENP-B-Boxen, und somit der

Bindestelle für CENP-B, aufgetreten sein könnte (Sullivan und Schwartz 1995). Des Weiteren wiesen genau solche Fälle mit schwachem CENP-B-Signal am inaktiven Zentromer auch Zellen auf, deren zweites Zentromer nicht mit Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden konnte. Diese dizentrischen Chromosomen mit einem exzentrischen Zentromer bildeten sogar die Mehrheit der Zellen.

All diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass während der Inaktivierung eines Zentromers ein Teil der α -Satelliten-DNA deletiert wird, und da zwar α -Satelliten-DNA, nicht aber CENP-A, CENP-C oder CENP-E am inaktivierten Zentromer nachweisbar sind, scheint die Deletion nur die Regionen zu betreffen, in denen die Histon-H3-Variante CENP-A in die Nukleosomen eingebaut ist. Die unterschiedlichen Muster innerhalb eines Falles lassen auf einen graduellen Abbauprozess schließen, bei dem sich mit der Zeit der Zellanteil mit dem ein schwaches Signal tragenden sSMC zugunsten der sSMC mit nur einem Zentromersignal verringern könnte.

Der zugrunde liegende Mechanismus der Deletion könnte von einfachen Rekombinationen bis hin zum Zerfall der Zentromere reichen und beide Prozesse konnten an Zentromeren bereits nachgewiesen werden (Zeitlin et al. 2009, Guerrero et al. 2010, Jaco et al. 2008, Shi et al. 2010). Studien an Mäusen lassen darüber hinaus vermuten, dass ein fehlerhaftes Anheften von Spindeln zum Zerfall der Zentromere und somit zu deren Verlust führt (Guerrero et al. 2010, Rojas et al. 2005).

Es ist wichtig an dieser Stelle noch einmal zu erwähnen, dass es sich bei der (partiellen) Deletion eines Zentromers nur um eine von mehreren Möglichkeiten der Inaktivierung handelt, da viele Beispiele dizentrischer Chromosomen beweisen, dass die Größe der zugrunde liegenden α -Satelliten-Array keine Veränderungen aufweist (Higgins et al. 2005, Stimpson et al. 2010, Han et al. 2009, Fisher et al. 1997). In diesen Fällen ist die Inaktivierung eher auf epigenetische Veränderungen zurückzuführen.

Fazit: Die (partielle) Deletion eines Zentromers bei dizentrischen Chromosomen als Mechanismus für deren Stabilisierung wird einerseits durch die in dieser Arbeit nachgewiesenen schwächeren FISH-Signale und andererseits durch die schwächeren und z.T. fehlenden CENP-B-Signale, die auf geringere Mengen des DNA-bindenden Zentromerproteins CENP-B an einem der beiden Zentromere hinweisen, gestützt bzw. bestätigt. Dizentrische sSMC-Fälle, in denen sowohl Zellen vorkommen, die ein sSMC mit einem zweiten abgeschwächten CENP-B-Signal aufweisen, als auch Zellen mit sSMC ohne zweites

CENP-B-Signal, lassen auf einen mechanistisch ungeklärten graduellen Abbauprozess schließen.

4.1.2 Parameter mit potentielltem Einfluss auf Aktivitätsmuster

4.1.2.1 Größe

Die Vermutung, dass der Aktivitätsstatus der Zentromere bei dizentrischen Chromosomen vom Interzentromerabstand abhängig sein könnte, wird in der Literatur diskutiert (Koshland et al. 1987, Page und Shaffer 1998, Sullivan und Willard 1998, Ewers et al. 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen ebenfalls einen direkten Einfluss des Abstandes beider Zentromere auf deren Aktivitätsmuster. Am Beispiel der sSMC von #15 konnte bei 44 Fällen der Einfluss des Abstandes beider Zentromere auf die Aktivität der Zentromere nachgewiesen werden. Sobald die Zentromere weiter als 5 Mb voneinander entfernt lagen, war nur ein Zentromer aktiv. In der Untersuchung von Ewers und Mitarbeitern wurden bei kleinen Abständen von 1,4 bis 4,5 Mb zwei aktive Zentromere beobachtet. Lagen zwischen beiden Zentromeren mehr als 15,4 Mb, war nur ein Zentromer aktiv (Ewers et al. 2010). Abstände zwischen 4,5 und 15,4 Mb wurden mangels Material nicht untersucht. Diese Daten bestätigen sehr gut die Ergebnisse dieser Arbeit, in der sich ein Interzentromerabstand von 5 Mb als richtungsweisender Grenzwert ergab. Die inaktiven Zentromere der großen dizentrischen sSMC zeigten unterschiedliche Signalintensitäten für CENP-B. Bei einigen unterschied sich die Signalstärke nicht von dem des aktiven Zentromers, bei anderen war die Intensität deutlich verringert, und bei einigen Fällen fehlte ein Signal am inaktiven Zentromer völlig. Dass Zellen innerhalb eines Falles alle genannten Signalstärken aufwiesen, lässt zusätzlich vermuten, dass die Inaktivierung nicht nur über verschiedene Mechanismen ablaufen kann, sondern dass darüber hinaus der Zeitraum der Inaktivierung unterschiedlich lang sein kann und sich einige Zentromere noch im Abbauprozess befinden könnten. Frühere Studien an großen dizentrischen X-Chromosomen (dic(X)) zeigten ebenfalls, dass das Aktivitätsmuster der Zentromere mit dem Interzentromerabstand in Zusammenhang steht. Hierbei führten Abstände zwischen 4 und 12 Mb zu funktionell dizentrischen Chromosomen, und erst der Abstand von 34 Mb zeigte ein funktionell monozentrisches Verhalten (Sullivan und Willard 1998). Neben diesen von Patienten mit Turner-Syndrom stammenden dic(X) wurden auch an künstlich erzeugten dic(X) Zentromerabstände gemessen und mit dem Aktivitätsmuster verglichen. Hierbei ließ sich jedoch kein Zusammenhang von Größe und Aktivität feststellen, was möglicherweise auf verschiedene Grade von Inaktivierung hindeutet, die neben dem Abstand auch durch Zentromerart und/oder durch Zellzyklus-regulierende Mechanismen

festgelegt werden (Higgins et al. 2005). Die 41 hier untersuchten DIC ließen ebenfalls eine Korrelation zwischen Aktivitätsmuster und Interzentromerabstand erkennen: Alle DIC, deren Zentromere weiter als 10 Mb auseinander lagen, waren funktionell monozentrisch. Bei funktionell monozentrischen Chromosomen wurden bereits häufig größere Interzentromerabstände beobachtet (Merry et al. 1985, Earnshaw und Migeon 1985, Peretti et al. 1986, Earnshaw et al. 1989, Rivera et al. 1989, Maraschio et al. 1990, Page et al. 1995). Da es sich bei all diesen Fällen, ebenso wie in der Untersuchung von Sullivan und Willard, um natürlich vorkommende dizentrische Chromosomen handelt und die Daten vergleichbar sind, könnten die Abweichungen zu den Ergebnissen von Higgins und Mitarbeitern in den verschiedenen Entstehungsmechanismen begründet sein. Möglicherweise unterliegen die natürlich vorkommenden dizentrischen Chromosomen einem stärkeren Selektionsdruck als die künstlich erzeugten dizentrischen Chromosomen, wodurch die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar wären. Die Ergebnisse unterstreichen in jedem Falle die komplexe Natur der Zentromeraktivierung. Viele Studien an dizentrischen Chromosomen wurden an den recht häufig auftretenden Robertsonschen Translokationschromosomen durchgeführt. Diese Translokationen zwischen akrozentrischen Chromosomen weist immer einen geringen Zentromerabstand und verschiedene Aktivitätsmuster auf (Subrt et al. 1971, Niebuhr 1972, Dewald et al. 1979, Haaf und Schmid 1990). Auch in dieser Arbeit wurden alle verschiedenen Aktivitätsmuster nachgewiesen und damit gezeigt, dass sowohl funktionell monozentrische als auch funktionell dizentrische Robertsonsche Translokationschromosomen auftreten können. Es ist sehr naheliegend, die Stabilität der Robertsonschen Translokationschromosomen mit dem geringen Interzentromerabstand zu erklären (Page und Shaffer 1998). Damit ließe sich auch das gehäufte Vorkommen kleiner dizentrischer sSMC erklären, die genauso wie die Robertsonschen Translokationschromosomen alle möglichen Aktivitätsmuster und einen geringen Interzentromerabstand aufweisen. Es gibt mehrere Erklärungsmöglichkeiten, auf welche Art der geringe Interzentromerabstand stabilisierend wirkt. Schon sehr früh postulierten John und Freeman, dass beide Zentromere miteinander kooperieren bzw. miteinander kommunizieren können (John und Freeman 1975, Sullivan und Willard 1998, Page und Shaffer 1998). Jedoch scheint es wahrscheinlicher zu sein, dass physikalische Eigenschaften den dizentrischen Chromosomen erlauben, stabil zu bleiben. Und obwohl keine physikalische Interaktion zwischen den Zentromeren bei stabilen dizentrischen Chromosomen nachgewiesen werden konnte (Wandall 1989, Wandall 1994, Sullivan und Schwartz 1995, Page und Shaffer 1998), könnte sich deren Stabilität eher dadurch erklären, dass sich die dizentrischen Chromosomen nicht um ihre Längsachse zwischen den Zentromeren drehen

können, wodurch beide Schwesterchromatiden ohne Störung jeweils zu einem Pol gezogen werden (Nicklas 1997). Diese Bewegungseinschränkungen der Chromatiden untereinander würden mit zunehmendem Abstand schwächer, was ebenfalls eine Erklärung für die bevorzugte Inaktivierung bei steigendem Abstand darstellt (Page und Shaffer 1998).

Fazit: Die Ergebnisse dieser Betrachtung liefern einen eindeutigen Beweis für den Zusammenhang zwischen Interzentromerabstand und Aktivitätsmuster und grenzen sogar den kritischen Abstand zumindest für sSMC ein. Die Vielfalt an möglichen exprimierten Aktivitätszuständen deutet auf eine gewisse Plastizität der Zentromere hin. Der ermittelte Abstand bei DIC und der damit einhergehende Unterschied zwischen den kritischen Abständen zwischen dizentrischen sSMC und DIC bedürfen weiterführender Untersuchungen um zu testen, worin dieser Unterschied begründet ist.

4.1.2.2 Chromosomale Herkunft

Die große Mehrheit aller untersuchten sSMC stammt von den akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 ab. Innerhalb dieser Gruppierung konnten auch alle verschiedenen Aktivitätsmuster nachgewiesen werden. Bekanntermaßen sind die p-Arme akrozentrischer Chromosomen sehr heteromorphe Regionen, bei denen schon seit geraumer Zeit chromosomale Umbauten nachgewiesen wurden (Lau et al. 1979, Schmid et al. 1994, Friedrich et al. 1996, Verma et al. 1996, Reddy und Sulcova 1998). Für einen entscheidenden Einfluss der chromosomalen Herkunft der sSMC auf die Ausprägung der Aktivitätsmuster spricht, dass sSMC akrozentrischer Herkunft, deren heterochromatische p-Arme aus einer Vielzahl repetitiver Elemente bestehen, eine viel größere Mustervariation aufweisen als sSMC nicht-akrozentrischen Ursprungs. Sie zeigten nicht nur alle Varianten an Aktivitätsmustern, sondern auch besonders häufig das Muster „intermediär“, bei dem es sich bereits um eine Mischform und somit ein komplexeres Muster handelt. Die sSMC 18, die nicht nur vom gleichen Chromosom abstammen, sondern darüber hinaus den gleichen Karyotyp aufweisen, haben hingegen auch alle das gleiche Aktivitätsmuster. Möglicherweise könnte bei dizentrischen sSMC nicht-akrozentrischer Herkunft eine zügige Inaktivierung für deren Stabilisierung wichtig sein, während dizentrische akrozentrische sSMC robuster zu sein scheinen. Darüber hinaus weisen die p-Arme und die Zentromerregionen akrozentrischer Chromosomen besonders viel repetitive DNA und damit heterochromatische Bereiche auf, wodurch sie als relativ genarm gelten. Dizentrische sSMC nicht-akrozentrischer Herkunft

können jedoch einen im Verhältnis großen Gehalt an Euchromatin aufweisen und somit von der Zelle negativ selektiert werden.

Der mögliche Einfluss epigenetischer Faktoren auf die Musterausprägung wird besonders deutlich wenn man innerhalb der dizentrischen sSMC nur diejenigen betrachtet, die den gleichen Karyotyp aufweisen. Diese zeigen auf DNA-Ebene bei molekularzytogenetischer Untersuchung den gleichen Aufbau, auf Proteinebene unterscheiden sie sich jedoch zum Teil erheblich voneinander (erkennbar am Aktivitätsmuster; siehe Anhang: Tabelle 7.1: Fall-Nr. 8-16 (inv dup(14)(q11.1)), Fall-Nr. 19-37 (inv dup(15)(q11.1)), Fall-Nr. 77-87 (inv dup(22)(q11.1)), Fall-Nr. 92-100 (inv dup(22)(q11.21))). Higgins und Mitarbeiter haben in ihrer Analyse dizentrischer X-Chromosomen auch einen Einfluss von Histonmodifikationen auf die Zentromeraktivität diskutiert (Higgins et al. 2005). Die Inhibierung einer Histondeacetylase in Zellen mit funktionell dizentrischem Chromosom bewirkte in 50% der Zellen eine Inaktivierung eines Zentromers. Eine weiterführende Untersuchung hinsichtlich der Histonmodifikationen im Zentromerbereich dizentrischer Chromosomen und vor allem der als Modellsystem geeigneten sSMC könnte das Verständnis über die Inaktivierungsmechanismen erweitern (siehe Abschnitt 4.3).

Auch innerhalb der DIC stechen die Chromosomen mit akrozentrischem Anteil deutlich hervor. Bei der Hälfte (6/12 Fälle) aller großen dizentrischen Translokationschromosomen war ein Translokationspartner ein akrozentrisches Chromosom, und somit bevorzugt in Translokationsereignisse mit dizentrischem Ausgang involviert. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass bei keinem dieser Fälle das jeweils nicht-akrozentrische Zentromer inaktiviert war. Diese Beobachtung passt zu einer Studie von Lemyre und Mitarbeitern, deren Translokationschromosomen das gleiche Verhalten zeigten (Lemyre et al. 2001). Wie auch bei den untersuchten dizentrischen Chromosomen der vorliegenden Arbeit war auch in der Untersuchung von Lemyre und Mitarbeitern meist nur eine Einschnürung zu sehen, welche meist im nicht-akrozentrischen Chromosomenanteil lag und, bestätigt durch die Immunfluoreszenzfärbung der Zentromerproteine, auch das aktive Zentromer darstellte. Die bevorzugte Inaktivierung akrozentrischer Chromosomen könnte in ihrer repetitiven Natur begründet sein.

Innerhalb der akrozentrischen Chromosomen wurde bereits eine nicht zufällige Verteilung aktiver und inaktiver Zentromere bei Robertsonschen Translokationschromosomen bzw. eine Hierarchie beschrieben, welche Zentromere bevorzugt inaktiviert werden (Sullivan et al. 1994, Therman et al. 1989, Sullivan und Schwartz 1995). Acht der zehn in dieser Arbeit

untersuchten Robertsonischen Translokationschromosomen hatten #14 als Translokationspartner, und in allen Fällen war deren Zentromer aktiv. Diese bevorzugte Aktivität des Zentromers von #14 wurde auch von Sullivan und Mitarbeitern bei Patientenfällen mit Robertsonischen Translokationschromosomen beschrieben, die darüber hinaus das Zentromer von #15 als das am häufigsten inaktivierte Zentromer deklarierten. Sie vermuteten, dass die verschiedenen Zentromere unterschiedlich zugänglich sein könnten oder unterschiedlich „stark“ sein könnten. Während jedoch Sullivan und Mitarbeiter die Aktivität auf zytogenetischer Ebene definierten und Sullivan und Schwartz darüber hinaus die chromosomale Herkunft mit FISH überprüften, konnten deren Aussagen im Rahmen dieser Arbeit mit der weitaus spezifischeren Methode der Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden.

Fazit: Der Vergleich akro- und nicht-akrozentrischer sSMC macht deutlich, dass die Ausprägung der Muster entscheidend davon abhängt, um welches chromosomale Material es sich handelt. Die epigenetische Regulierung der Inaktivierung von Zentromeren wird durch Vergleiche von dizentrischen sSMC mit gleichem Karyotyp, aber unterschiedlicher Musterausprägung untermauert. Darüber hinaus wurde hier die Sonderstellung der akrozentrischen Zentromerregion durch die bevorzugte Inaktivierung der akrozentrischen Zentromere bei DIC bekräftigt und die bereits bekannte Hierarchie unter den akrozentrischen Chromosomen bei der Bildung von Robertsonischen Translokationschromosomen durch eine weitere Methode nachgewiesen. Diese Sonderstellung wird auch durch die Studien zur NOR-Aktivität bekräftigt, deren funktionelle Beteiligung auf deren positive Selektion hinweist (siehe Abschnitt 4.4)

4.1.2.3 Andere Parameter

Zur hier durchgeführten systematischen Analyse gehörte auch die Untersuchung verschiedener anderer Parameter hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Ausprägung des Aktivitätsmusters an dizentrischen Chromosomen.

Klinik

Ein Zusammenhang zwischen sSMC und klinischen Auffälligkeiten ist bereits für etwa 1/3 aller sSMC-Fälle beschrieben (z.B. i(18p)-Syndrom, Cat-Eye-Syndrom; Liehr et al. 2004a). Eine Vorstudie aus dem Jahr 2010 (Ewers et al. 2010) ließ keinen Hinweis auf einen Einfluss speziell von dizentrischen sSMC mit den jeweiligen Aktivitätsmustern auf das klinische

Erscheinungsbild vermuten. Auch die vorliegende Arbeit lieferte dahingehend keine neuen Erkenntnisse. Jedoch fiel in der statistischen Analyse der Daten für DIC nach Anwendung des Exakten Tests nach Fisher ein statistisch signifikanter p-Wert von 0,023 auf, der auf einen Zusammenhang von klinischem Bild und Aktivitätsmuster der Zentromere hindeutet. Dieser Zusammenhang ließ sich allerdings mit Einzelanalysen nicht weiter spezifizieren, sodass keine Aussage darüber möglich ist, wo genau sich der Zusammenhang finden lässt. Ein solches Phänomen wird in der Statistik als „Simpson-Paradoxon“ bezeichnet und könnte mit einem zu geringen Stichprobenumfang oder einer geringen Power des gewählten statistischen Tests erklärt werden (Simpson 1951). Der nachgewiesene Zusammenhang könnte auch hinter anderen Daten versteckt sein, die hier nicht mit erfasst und/oder berücksichtigt wurden. Die hier angenommene Null-Hypothese, dass das klinische Bild keinen Einfluss auf die Musterausprägung hat, konnte zweifelsfrei widerlegt werden. Eine Ausweitung der Stichprobe und weiterführende Analysen könnten genauere Daten ergeben. Unter den einfachen großen dizentrischen Chromosomen waren alle Fälle mit nur einem immunhistochemisch nachweisbaren Zentromer klinisch unauffällig. Das könnte darauf hindeuten, dass diese sSMC, da sie keinen klinischen Einfluss zu haben scheinen, einheitlich durch Inaktivierung eines Zentromers von der Zelle toleriert wurden und somit Stabilität erlangten.

Mosaik

Hinsichtlich der Verteilung der Aktivitätsmuster bei im Mosaik vorliegenden dizentrischen Chromosomen und solchen, die in 100% der Zellen auftreten wurde kein Unterschied in der Musterverteilung beobachtet. Es wäre denkbar gewesen, dass Mosaikfälle von dizentrischen Chromosomen mit zwei aktiven Zentromeren auf die daraus resultierende Instabilität und bevorzugte Missegregation und Bruchereignisse und deren anschließenden Verlust hingedeutet hätten (McClintock 1939, Hill und Bloom 1987, Thrower und Bloom 2001, Thrower et al. 2003).

Alter

Dass ein Einfluss einer zeitlichen Komponente auf die Inaktivierung von Zentromeren bestehen könnte, wurde bereits in früheren Studien spekuliert (Stimpson et al. 2010). Auch ist bekannt, dass die Anzahl aktiver NOR der akrozentrischen Chromosomen mit zunehmendem Alter abnimmt. In Bezug auf das Aktivitätsmuster dizentrischer Chromosomen stellte sich

kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Alter der untersuchten Patienten heraus. Somit beeinflusst das Alter das Aktivitätsmuster dizentrischer Chromosomen nicht.

Bandenstadium

Ein besonders bei dizentrischen Chromosomen mit geringem Interzentromerabstand interessanter Ansatz war die Überprüfung der Ergebnisse unter besonderer Berücksichtigung des Bandenstadiums, also dem Grad der Auflösung. Je niedriger das Bandenstadium liegt, desto kürzer sind die Chromosomen und umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, zwei nebeneinander liegende Signale aufgrund der geringen Auflösung fälschlicherweise als einzelnes Zentromersignal zu deuten. Diese Limitierung und die daraus resultierenden Verfälschungen der Daten konnten jedoch mit Überprüfung des Bandenstadiums sowohl für die dizentrischen sSMC als auch für die großen dizentrischen Chromosomen ausgeschlossen werden.

Geschlecht

Während in der vorangegangenen Studie von Ewers und Mitarbeitern Frauen tendenziell häufiger eine inaktivierte Zentromere aufwiesen und Männer bevorzugt zwei aktive Zentromere oder ein Fusionsignal zeigten (Ewers et al. 2010), konnte im Rahmen dieser Studie keine geschlechtsspezifische Musterverteilung nachgewiesen werden. Somit bestätigt sich die in der Vorstudie genannte Vermutung dass es sich aufgrund des geringen Stichprobenumfangs um eine verzerrte Ergebnisverteilung handelt (= ascertainment bias). Das gleiche scheint auch für die einfachen DIC zuzutreffen, bei denen 19 von 20 Fällen weiblich waren. Somit liefern diese Daten auch keine Erklärung für die beschriebene überwiegend maternale Weitergabe der sSMC (Liehr 2006).

Vererbung

Aufgrund unzureichender Informationen über die Vererbung der hier untersuchten dizentrischen Chromosomen und des noch seltener verfügbaren Materials beider Generationen lassen Aussagen über die Weitergabe des Aktivitätsmusters an die Folgegenerationen nur eine sehr vorsichtige Interpretation zu. Page und Shaffer bestätigten die Weitergabe des Aktivitätsmusters von Eltern auf ihre Nachkommen bzw. zeigten, dass es bei Vererbung funktionell dizentrischer Chromosomen in der nachfolgenden Generation zu einer graduellen Inaktivierung eines Zentromers kommen kann. Dies äußert sich in einem Mix aus Zellen mit zwei unterschiedlichen Aktivitätsmustern, bei dem der Anteil an Zellen mit einem

inaktivierten Zentromer zunimmt (Page und Shaffer 1998). Ein ähnliches Phänomen ließ sich bei einem Mutter-Kind-Paar auch in der vorliegenden Arbeit feststellen. Während bei der Mutter (Fall-Nr. 27) 8% der Zellen das Muster „exZEN“ trugen und 92% das Muster „1x aktiv“, zeigte sich bei der Tochter (Fall-Nr. 28) ein Verhältnis von 72% „exZEN“ und 28% „1x aktiv“. Somit wird also hier nicht eins von zwei Zentromeren zunehmend inaktiviert, sondern ein bereits inaktives Zentromer zunehmend deletiert. Bei einem weiteren Mutter-Kind-Paar (Fall-Nr. 19, Fall-Nr. 20) wiesen alle Zellen ein funktionell monozentrisches sSMC auf. Wahrscheinlich besteht bei diesem Paar kein Selektionsdruck, weil dieses Muster bereits stabil vorlag. Diese Beobachtungen lassen sich so erklären, dass möglicherweise die Aktivitätsmuster auch in den Keimzellen konserviert sind und daher an die Folgegeneration weitergegeben werden können. Zur besseren Vergleichbarkeit wäre eine Untersuchung der Mustervererbung an Robertsonschen Translokationschromosomen sinnvoll, leider standen für diese Fälle keine Informationen zur Verfügung. Die vergleichende Analyse von prä- und postnatalem Material, mit deren Ergebnissen sich Rückschlüsse auf Vererbung oder Gewebespezifität ziehen ließen, besaß keine Aussagekraft. Es wurden keine Unterschiede oder Gemeinsamkeiten der Aktivitätsmuster verzeichnet.

Fazit: Während die Parameter Mosaikstatus, Untersuchungsalter, Geschlecht und Bandenstadium als Einflussfaktoren auf das Aktivitätsmuster dizentrischer Chromosomen ausgeschlossen werden konnten, muss eine mögliche Abhängigkeit der Musterausprägung vom klinischen Bild (bzw. umgekehrt) mit weiteren Studien überprüft werden, um evtl. bisher vernachlässigte Einflussgrößen mit einzubeziehen. Hinsichtlich der Vererbung scheint Selektionsdruck dahingehend zu bestehen, einen Optimalzustand anzustreben, welcher, falls ein gemischter Zustand vorherrscht (Muster: „intermediär“), in den Folgegenerationen für die beobachteten Verschiebungen der Aktivitätsmusteranteile verantwortlich sein könnte. Diese Vermutung erfordert weiterführende Familienuntersuchungen.

4.2 3D-Untersuchungen: Effekt der sSMC auf die Interphasekernstruktur

Die Anwendung des S-FISH-Verfahrens zur dreidimensionalen Untersuchung von Interphasekernen gewährte neue Einblicke in die Interphasekernarchitektur wenn sich ein zusätzliches sSMC im Erbgut befindet (Klein et al. 2012). Zwei maßgeblich zur Verteilung der Chromosomen im dreidimensionalen Zellkern beitragende Einflussfaktoren sind die Größe der jeweiligen Chromosomen auf der einen Seite (Sun et al. 2000) und die Gendichte auf der

anderen Seite (Manvelyan et al. 2008b). Die Beobachtung, dass es bei Vorliegen eines sSMC zu deutlichen Veränderungen kommt, ist vor allem deswegen von Bedeutung, weil die Architektur des Interphasekerns grundlegende genetische Prozesse wie DNA-Transkription, Genregulierung und Genexpression beeinflusst (Strickfaden et al. 2010). Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich die Lage der homologen Schwesterchromosomen und die Position des sSMC im Kern gegenseitig beeinflussen.

4.2.1 Position des sSMC im Zellkern

Die sSMC der Fälle 150 und 47 enthalten Material von #15 und liegen ebenso wie ihre homologen Schwesterchromosomen eher zentral. Das komplexe sSMC von Fall-Nr. 149 wurde genauso wie #8 eher in der Peripherie gefunden. Im Gegensatz dazu entspricht die Lage des sSMC der Fälle 147 und 148 nicht der Position der homologen Schwesterchromosomen: Während das sSMC des erstgenannten Falles eher zentral bis intermediär und die homologen Chromosomen eher in der Peripherie liegen, befinden sich die homologen Chromosomen bei Fall-Nr. 148 eher zentral bis intermediär und das sSMC liegt eher peripher (siehe Tab. 3.2, Tab. 3.3). Das sSMC von #18 enthält im Verhältnis zu seiner geringen Größe sehr viele Gene, wohingegen das sSMC von #16 zum Großteil aus heterochromatischem und somit genarmem Material besteht. Der bereits beschriebene Zusammenhang zwischen Gendichte und Interphasekernorganisation (Manvelyan et al. 2008b) könnte hinsichtlich der Lage der sSMC den entscheidenden Einflussfaktor auf die Lageveränderung darstellen.

4.2.2 sSMC kolokalisieren bevorzugt mit einem Homologen

In einer indirekten Studie zur Lage von sSMC im Zellkern, wurde ihre Lage in Metaphaseplatten untersucht und eine bevorzugte Assoziation mit einem anderen Chromosom nachgewiesen (Felbor et al. 2002). Darüber hinaus konnte diese Assoziation in 27-41% auf die Zentromerregion spezifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit deutete sich im dreidimensionalen Interphasekern für die Lagebeziehung der sSMC zu ihren homologen Schwesterchromosomen eine bevorzugte Kolokalisation der sSMC mit jeweils einem der homologen Schwesterchromosomen an, was die Ergebnisse von Felbor und Mitarbeitern bestätigt und konkretisiert. Mit 87% wurde die Kolokalisation des sSMC in Zellen von Fall-Nr. 47 besonders häufig beobachtet, während das ebenfalls von #15 stammende sSMC aus Fall-Nr. 150 weniger häufig mit einem Homologen kolokalisierte (siehe Tab. 3.5). Da beide Fälle unterschiedlicher geweblicher Herkunft sind, könnte über eine gewebsspezifische Interphasekernarchitektur spekuliert werden. Der relative Anteil euchromatischen Materials

am Aufbau des sSMC könnte eine alternative Erklärung liefern. Der Euchromatingehalt des sSMC von Fall-Nr. 47 ist strukturbedingt höher als der des sSMC von Fall-Nr. 150. Zur ursächlichen Klärung der beschriebenen Beobachtungen sind weiterführende Studien erforderlich. Die These, dass die Größe des euchromatischen Anteils bedingend wirkt, wird durch die Daten des komplexen sSMC gestützt. Hierbei wurde eine bevorzugte Kolokalisation mit dem homologen Schwesterchromosom aufgezeigt, das mehr euchromatisches Material zum sSMC beigesteuert hat. In dieser Untersuchung wiesen sowohl die dizentrischen sSMC als auch die sSMC mit nur einem Zentromer eine Tendenz zur Kolokalisation mit einem homologen Schwesterchromosom auf. Auch hinsichtlich der Position der sSMC im Interphasekern ließen sich, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, keine Unterschiede zwischen di- und monozentrischen sSMC feststellen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass sich die dizentrischen sSMC bei der Positionierung innerhalb des Zellkerns funktionell monozentrisch verhalten haben bzw. dass beide Zentromere miteinander in einer Form kooperiert haben könnten. Somit scheinen zwei Zentromere auf einem Chromosom überraschenderweise keinen Einfluss auf die Interphasekernarchitektur zu haben.

4.2.3 sSMC verändert Lagebeziehung der zugehörigen Homologen zueinander

Wie aus Tabelle 3.3 ersichtlich, bleibt bei Vorliegen eines sSMC die Position der homologen Schwesterchromosomen innerhalb des Zellkerns (zentral, intermediär oder peripher) unverändert. Fall-Nr. 147 stellt hierbei eine Ausnahme dar, da sich hier, statt der normalen zentralen bzw. intermediären Position, sowohl das sSMC als auch die homologen Schwesterchromosomen häufiger in der Peripherie befanden.

Die Lagebeziehung der homologen Schwesterchromosomen zueinander wird jedoch von einem sSMC beeinflusst (siehe Tab. 3.4). Die homologen Schwesterchromosomen liegen in Kernen mit sSMC deutlich weiter auseinander als in Kernen ohne sSMC. Der veränderte Abstand der Homologen, verbunden mit der bevorzugten Kolokalisation der sSMC mit einem homologen Schwesterchromosom lässt darauf schließen, dass das sSMC die Position eines homologen Schwesterchromosoms einnehmen will und daher das Entsprechende auf eine andere Position verdrängt, woraus der größere Abstand beider homologen Schwesterchromosomen resultiert.

Fazit: Diese Untersuchung zur Interphasekernarchitektur liefert den ersten direkten Beweis für die gegenseitige Beeinflussung der sSMC und ihrer homologen Schwesterchromosomen in Bezug auf die Lage im dreidimensionalen Raum. Darüber hinaus scheinen diese Beobach-

tungen von der Zentromeranzahl der sSMC unabhängig zu sein, was auf ein funktionell monozentrisches Verhalten der sSMC hindeutet. Weiterführende 3D-FISH-Studien an Fällen mit chromosomalen Rearrangements oder Chromosomenzugewinnen wie Trisomien (z.B. Manvelyan et al. 2009) könnten unser Verständnis der Auswirkungen zytogenetischer Veränderungen für die zelluläre Expression erweitern.

4.3 Histonfärbungen

4.3.1 Spezifische Bänderung von Metaphasechromosomen mittels Immunfluoreszenzfärbung von Histonmodifikationen

Die erste Verbindung der Verteilung von Histonmodifikationen mit dem chromosomalen Bandenmuster stellten Barski und Mitarbeiter her (Barski et al. 2007). Sie entwickelten 2007 hochauflösende Karten für die Verteilung der Histonmodifikationen durch direkte Sequenzierung von ChIP-DNA. Sie verglichen ihre Daten über die Histonmethylierung mit der Abfolge an hellen und dunklen Chromosomenbanden und fanden H3K4me3 in CG-reichen, euchromatischen R-Banden, während die AT-reichen, heterochromatischen Q-Banden überwiegend das für inaktive Gene charakteristische H3K9me3 und H4K20me3 aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung ebenfalls auf chromosomaler Ebene ein spezifisches Bandenmuster für H3K4me2 erzeugt werden, das Ähnlichkeit zu den zytogenetischen Banden aufwies. Khalil und Driscoll haben bereits 2005 Antikörper gegen H3K4me2 und H3K4me3 zur Visualisierung an Metaphasechromosomen verwendet und der dreifachen Methylierung größere Spezifität attestiert bzw. die Färbung der Chromosomen mit H3K4me2 gar nicht erst als Bänderung bezeichnet (Khalil und Driscoll 2006). Die Immunfluoreszenzfärbung der vorliegenden Arbeit generierte jedoch eine Bänderung, die hinsichtlich der Auflösung dem Muster von H3K4me3 entsprach. Denn im Gegensatz zu den Daten von Khalil und Driscoll erwies sich das reproduzierbare Bandenmuster als hochspezifisch und sehr differenziert. Auch war die Unterscheidung von aktivem und inaktivem X-Chromosom möglich, was bereits beschrieben ist und darüber hinaus die Spezifität des verwendeten Antikörpers unterstreicht. Am inaktiven X-Chromosom konnte, wie 2009 bereits von Chadwick beschrieben (Chadwick 2009), auch bei dieser Färbung im Bereich Xq23-24 ein spezifisches Signal nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um einen sog. Makrosatellit (DXZ4; Giacone et al. 1992), ein Tandemarray aus 50-100 Repeats, das in Interphaseuntersuchungen als kleiner Punkt im Territorium des inaktiven X-Chromosoms zu finden ist (siehe Abb. 3.24). Obwohl das Signal in der Region von DXZ4 die größte Intensität aufweist, sind lokal noch weitere Signale sichtbar, welche für die Beibehaltung der

Chromatinstruktur von Bedeutung sein könnten (Chadwick 2009). In der bisher größten systematischen Studie zur Verteilung von Histonmodifikationen auf Einzelzellniveau wurden Bänderungsmuster nach Immunfärbung mit verschiedenen Antikörpern gegen Modifikationen charakteristisch für aktive Transkription erstellt (Terrenoire et al. 2010). Sie wiesen in lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten für H3K9ac, H3K27ac und H3K4me3 ähnliche Bänderungsmuster nach, deren Banden 10-50 Mb großen gen- und CpG-Insel-reichen genomischen Segmenten zugeordnet werden können. Das durch diese Histonmodifikationen (vor allem durch H3K4me3) erzeugte Bandenmuster korreliert mit dem Muster für H3K4me2 der vorliegenden Arbeit. Die Bänderungen glichen sich sogar in dem Maße, dass keine Unterschiede bez. der Spezifität der beiden Modifikationen festzustellen waren. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen von Khalil und Driscoll, deren Untersuchungen deutliche Unterschiede im Färbeverhalten zwischen H3K4me2 und H3K4me3 ergaben (Khalil und Driscoll 2006). Obwohl dieser Vergleich, mangels eigener Färbung gegen H3K4me3, vorsichtig interpretiert werden muss, so scheint die vorliegende Untersuchung eine größere Spezifität von H3K4me2 nachzuweisen. Sie unterstreicht damit die Vermutung, dass nicht H3K4me3 allein, sondern vielmehr das Verhältnis von zwei- und dreifacher Methylierung an H3K4 maßgeblich für den aktiven Transkriptionsstatus des Chromatins verantwortlich ist.

4.3.2 Färbeverhalten der sSMC

Die hier durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung ging über das schlichte Erstellen eines Bandenmusters hinaus. Durch Anwendung dieser Technik an sSMC-Fällen wurden die sSMC hinsichtlich der Färbereigenschaften analysiert. Die Chromosomen wiesen hierbei das gleiche Bänderungsmuster auf wie in Fällen ohne sSMC. Überraschenderweise waren verschiedene Signalmuster zu beobachten. Das sSMC von Fall-Nr. 101 wies keine Färbung durch den Antikörper gegen H3K4me2 auf. Der an den homologen Schwesterchromosomen stark gefärbte Bereich unterhalb des Zentromers blieb am sSMC ohne Signal. Das deutet darauf hin, dass das Chromatin des sSMC so verändert worden ist, dass es entweder die zweifache Methylierung am H3K4 nicht mehr aufweist oder dass der Antikörper keine Bindestelle mehr findet. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung konnte an dem sSMC von Fall-Nr. 151 eine Färbung durch den Antikörper gegen H3K4me2 nachgewiesen werden.

Bei Taufliege (*D. melanogaster*) und Hefe ist bekannt, dass das perizentrische Heterochromatin die Expression benachbarter Gene unterdrücken kann (Kusch und Workman 2007). Dieses als ‚position effect variegation‘ (PEV) bezeichnete Phänomen ist neben Hefen und

Taufliegen auch bei Pflanzen und Menschen bekannt und beschreibt einen Einfluss von Heterochromatin auf benachbarte euchromatische Bereiche, in denen es durch Geninaktivierung zu Expressionsveränderungen kommt (Dorer und Henikoff 1994, Avramova 2002, Grewal und Elgin 2007, Hahn et al. 2010). 1999 wurde Heterochromatisierung bei euchromatischen Duplikationen beschrieben (Stephane und Genevieve 1999). Dieses Stilllegen könnte ebenfalls eine Rolle bei sSMC in Bezug auf deren klinische Auswirkungen spielen. Beide hier analysierten sSMC enthielten neben dem dicht gepackten und transkriptionsarmen Heterochromatin auch euchromatische Anteile, deren Genexpression stillgelegt werden könnte, um somit einen entscheidenden Gendosis-relevanten Effekt zu erzielen. Charakteristisch für sSMC ist ihr verschobenes Verhältnis von Euchromatin zu Heterochromatin zugunsten des Heterochromatins und daher könnte genau hier das Stilllegen euchromatischer Nachbarbereiche eine Rolle spielen, was jedoch bisher in keiner Studie bestätigt werden konnte.

Die vorliegende Arbeit liefert auf chromosomaler Ebene den ersten Beweis für eine epigenetische Verschiedenartigkeit des Chromatins von sSMC im Vergleich zu den homologen Schwesterchromosomen. Beim sSMC der Fall-Nr. 101 liegt der Bruchpunkt in q11.23, und das sSMC enthält somit euchromatische Regionen, die vermutlich heterochromatisiert wurden. Das sSMC von Fall-Nr. 151 besitzt den Bruchpunkt in q12.1 und verfügt somit ebenfalls über euchromatische Anteile. Das verschobene Verhältnis von Euchromatin zu Heterochromatin liefert für die Interpretation der Ergebnisse für beide sSMC die plausibelste Erklärung: Das mengenmäßig überwiegende Heterochromatin des sSMC von Fall-Nr. 101 wäre demnach in der Lage, den verhältnismäßig geringen euchromatischen Anteil zu heterochromatisieren. Das sSMC von Fall-Nr. 151 enthält im Vergleich mehr Euchromatin, welches durch das Heterochromatin nicht mehr zu kompensieren ist. Die Ausweitung solcher Untersuchungen könnte zu einem tieferen Verständnis der epigenetischen Einflüsse, denen die sSMC unterliegen, beitragen.

Fazit: Das erfolgreich erzeugte hochspezifische Bandenmuster bei Immunfärbung der Histonmodifikation H3K4me2 könnte die Sonderstellung der Histonmodifikation H3K4me3 als überzeugendster Anzeiger aktiver Transkription in Frage stellen und eher das Verhältnis beider Modifikationen als Hauptkriterium hervorheben. Die Färbung der sSMC beweist außerdem die epigenetischen Veränderungen der Histonmodifikationen und unterstreicht die dynamischen Eigenschaften des Chromatins. Zum Nachweis der jeweils spezifischen Veränderungen der Histonmodifikationen an sSMC sind weitere Studien an einer größeren

Stichprobe von sSMC erforderlich und sinnvoll. Vor allem die Verwendung von Antikörpern gegen Histonmodifikationen, die aktive oder inaktive Transkription anzeigen, bzw. deren Kombination kann die epigenetischen Veränderungen von beiden Seiten beleuchten.

4.4 NOR-Färbungen

4.4.1 Einfluss dizentrischer akrozentrischer sSMC auf die Aktivität der NOR in der Zelle

4.4.1.1 Kontrollen bestätigen konstante Zahl aktiver NOR pro Zelle

Nicht alle NOR humaner Zellen sind in der vorangegangenen Interphase aktiv an der Bildung der Nukleoli beteiligt. Die AgNOR-Färbung ist eine proteinvermittelte Färbung, bei der Silbernitrat mit den NOR-assoziierten Proteinen, aufgrund ihrer argyrophilen Eigenschaften interkaliert und somit speziell die funktionellen NOR (= aktive NOR) sichtbar macht. In Übereinstimmung mit zahlreichen früheren Untersuchungen ergab sich bei der quantitativen Untersuchung der AgNOR-Signale (d.h. die Anzahl Ag-positiver NOR) pro Zelle ein Mittelwert von 7,59. Somit waren ca. 7-8 NOR in der vorangegangenen Interphase an der Nukleolusbildung beteiligt. Bereits 1976 zeigten Bloom und Goodpasture, dass die durchschnittliche Anzahl Ag-gefärbter NOR zwischen verschiedenen Individuen variiert (Bloom und Goodpasture 1976, Goodpasture et al. 1976). Sie zählten zwischen sechs und neun NOR-Signale pro Zelle. Ein Jahr später ermittelten Mikelsaar und Mitarbeiter einen vergleichbaren Modalwert von 8-10 und auch die Arbeitsgruppe um Heliot wies 2000 überwiegend acht NOR-Signale nach (Mikelsaar et al. 1977, Heliot et al. 2000). Obwohl verschiedene Gewebe keine Unterschiede in der Anzahl aktiver NOR aufweisen (de Capoa et al. 1988) und auch in Zelllinien konstante Werte bestätigt wurden (Smirnov et al. 2006), so berichten Mikelsaar und Ilus im Jahre 1979 von populationsspezifischen Mittelwertsdifferenzen von 7,8 bei einem kaukasischen Untersuchungskollektiv und 8,7 bei Personen aus der Region Wien-Ulm (Mikelsaar und Ilus 1979).

4.4.1.2 Einfluss der sSMC auf Anzahl aktiver NOR

Durch das Vorliegen eines invertiert duplizierten sSMC akrozentrischer Herkunft befinden sich zwei zusätzliche NOR in einer Zelle, was eine Erhöhung um 20% in der Zelle bedeutet. Da sowohl die in den oben genannten Untersuchungen als auch die in dieser Arbeit ermittelten Mengen an aktiven NOR keine Unterschiede aufwiesen, war grundsätzlich eher von einer veränderten Verteilung innerhalb der akrozentrischen Chromosomen auszugehen als von einer veränderten Anzahl. Überraschenderweise waren jedoch in sSMC-tragenden Zellen

durchschnittlich eine bis zwei NOR weniger angefärbt. Der Mittelwert der AgNOR-Signale pro Zelle der untersuchten sSMC-Fälle unterscheidet sich mit 5,9 signifikant vom Kontrollwert dieser Arbeit und damit auch von den bisherigen Literaturdaten an normalen Karyotypen. Besonders bemerkenswert ist dieser Unterschied vor allem, weil in den Zellen der sSMC-Fälle 20% zusätzliche NOR-spezifische rDNA vorliegt.

Auf jedem kurzen Arm der zehn akrozentrischen Chromosomen befinden sich geclustert etwa 70 Kopien von rRNA-Genen (Sakai et al. 1995). Besitzt die Zelle ein bisatellitisches sSMC, dann befinden sich somit auch 20% mehr rRNA-Clusterregionen in der Zelle. Von den 200-400 rRNA-Genkopien in einer Zelle sind meist nicht mehr als 50% aktiv. Untersuchungen mit Psoralen – eine Substanz, die sich mit DNA quervernetzt, und die aufgrund der unterschiedlichen Chromatinstruktur aktive rDNA-Repeats von inaktiven unterscheiden kann – zeigen, dass nicht mehr als 50% der ~200-400 rDNA-Genkopien aktiv sind (Conconi et al. 1989, Dammann et al. 1993, Sanij et al. 2008). Die Regulierung der rDNA-Synthese kann theoretisch auf zwei Ebenen geschehen: entweder durch Veränderung der Transkriptionsrate oder durch Veränderung der Anzahl aktiver rRNA-Gene (McStay und Grummt 2008, Grummt und Pikaard 2003). Die epigenetische Aktivierung bzw. Stilllegung der rDNA hängt vor allem mit CpG-Methylierung und Histonmodifikationen zusammen (Santoro et al. 2002, Santoro und Grummt 2001, Santoro und Grummt 2005, Yuan et al. 2007). Da mehr als 50% der NOR aktiv sind, assoziieren aktive und inaktive rRNA-Genkopien wahrscheinlich miteinander, auch wenn sie zufällig in den rDNA-enthaltenden Regionen verteilt sind, um eine dreidimensionale Struktur höherer Ordnung innerhalb der Nukleoli zu bilden (McStay und Grummt 2008). Die Tatsache, dass komplette NOR inaktiv sind, weist darauf hin, dass es Regulationsmechanismen gibt, die in einem Umfang arbeiten, der viel größer ist als eine einzelne rRNA-Genregulation. Bisher hat man jedoch noch keine Erklärung dafür, nach welchen Kriterien die Zellen bestimmte NOR aktivieren oder stilllegen.

4.4.1.3 Interchromosomale Verteilung aktiver NOR

In früheren AgNOR-Studien deutete sich an, dass es eine nicht zufällige Verteilung der aktiven NOR auf die akrozentrischen Chromosomen gibt. Schon in der Untersuchung von Mikelsaar und Mitarbeitern 1977 wurde eine geringere Häufigkeit einer positiven AgNOR-Färbung bei #22 festgestellt (Mikelsaar et al. 1977). Eine russische Studie erfasste die NOR von #21 am häufigsten in aktiver Form und die von #15 am seltensten (Zakharov et al. 1982). 1995 wagte die Arbeitsgruppe um Ozen, die Chromosomen 14, 13, 15, und 21 bez. ihrer qualitativen und quantitativen Silberfärbung in beschriebener Reihenfolge zu klassifizieren

(Ozen et al. 1995). Neuere Daten zweier Studien zeigen, dass die Chromosomen 13, 14 und 21 bei unauffälligen Individuen zu 97% AgNOR-Färbung und somit aktive NOR zeigen, während der Anteil aktiver NOR bei den Chromosomen 15 und 22 mit 53-60% deutlich geringer ausfällt (Héliot et al. 1997, Héliot et al. 2000). Zusammenfassend zeigen die Daten der beschriebenen Studien eine klare nicht-zufällige Verteilung der aktiven NOR zwischen den akrozentrischen Chromosomen, die populationsbedingte Unterschiede aufweisen und demnach einen Selektionsvorteil zu haben scheinen. Diese Verteilung könnte somit auch aus evolutionärer Sicht für die Stabilität eines sSMC von Bedeutung sein. Eine zweifelsfreie Erklärung der numerischen Unterschiede in der AgNOR-Färbung zwischen den Kontrollgruppen und den sSMC-tragenden Zellen ist mit dem aktuellen Kenntnisstand noch nicht möglich.

4.4.1.4 sSMC tragen zwei aktive NOR

Ein interessanter Aspekt dieser Untersuchung war die Feststellung, dass immer beide NOR eines sSMC Ag-Signale trugen, also aktiv waren. Zwar wiesen sie zum Teil unterschiedliche Signalstärken auf, doch ließ sich bei beiden NOR des sSMC ihre Aktivität in der vorangegangenen Interphase, und damit ihr aktiver Status, zweifelsfrei nachweisen. In diesem Phänomen könnte auch die Erklärung der quantitativ abweichenden Signalkonstellationen liegen. Die sSMC könnten somit unter der Voraussetzung, dass sie sich an der Bildung des Nukleolus beteiligen, positiv selektiert sein, was deren Stabilität erklären würde. Diese These stützt sich auf einige bereits bekannte Daten: In der Interphase sind die akrozentrischen Chromosomen, die aktive NOR besitzen, näher am Nukleolus lokalisiert (Kalmarova et al. 2007). Zudem zeigen Satellitenassoziationen, dass die räumliche Nähe ein entscheidendes Kriterium ist (Patil und Lubs 1971, Denton et al. 1976, Babu und Verma 1985). Die strukturbedingte Nähe beider NOR auf dem sSMC könnte für das sSMC ebenfalls hinsichtlich der räumlichen Verteilung während der Transkription von Vorteil sein. Zusammenfassend lässt sich eine gewisse Dominanz aktiver NOR an dizentrischen sSMC nachweisen, deren biologische Bedeutung in Verbindung mit der gleichzeitig geringeren Anzahl aktiver NOR in der Zelle noch zu klären ist.

4.4.2 Vergleich von FISH- und AgNOR-Färbung an akrozentrischen sSMC

Sowohl durch die molekularzytogenetische Visualisierung der NOR als auch durch die Anfärbung der NOR mit Silbernitrat (Ag-Färbung) zeigten sich bei den sSMC vornehmlich zwei Mustervarianten: Ein Teil der sSMC besaß zwei Signale gleicher Intensität und Größe,

beim anderen Teil waren deutliche Unterschiede zwischen beiden NOR des sSMC zu verzeichnen. Diese beiden Mustervarianten könnten damit erklärt werden, dass sich die Signalintensitäten bei den homologen Schwesterchromosomen unterscheiden können (Heliot et al. 2000, Smirnov et al. 2006). Die Signalkonstellation auf dem sSMC ist demnach davon abhängig, ob das sSMC nur aus Material eines Homologen besteht, was auf eine intra-chromosomale Entstehung hinweisen kann oder anteilig Material von beiden homologen Schwesterchromosomen besitzt und somit einen Rückschluss auf die Entstehung und die Zusammensetzung zulässt.

4.4.2.1 NOR-FISH erlaubt Aussagen über möglichen Entstehungsmechanismus

Die über Klonierung der Satellitenstiele hergestellte FISH-NOR-Sonde färbt alle rDNA-enhaltenden Regionen und somit alle NOR, unabhängig ihrer Funktionalität, DNA-Sequenzspezifisch an. Die genauere Analyse der FISH-NOR-Signale von de novo entstandenen sSMC könnte Rückschlüsse auf die Entstehung und Zusammensetzung des sSMC zulassen. Solche neu entstandenen sSMC bieten den Vorteil, dass nur hier die intra- bzw. interchromosomale Entstehung aus den entsprechenden homologen Schwesterchromosomen untersucht werden kann; bei vererbten sSMC müsste der entsprechende Elternteil für weitere Untersuchungen herangezogen werden. Vier adäquate Fälle konnten für diese Fragestellung analysiert werden. Tatsächlich entsprechen das sehr intensive und das sehr schwache Signal des sSMC von Fall-Nr. 53 den Signalen der homologen Schwesterchromosomen. Auch das zytogenetisch asymmetrische Erscheinungsbild des sSMC passt zu den jeweiligen kurzen Armen der homologen Schwesterchromosomen. Beide Ergebnisse bestätigen die Entstehung des sSMC durch interchromosomale homologe Rekombination und somit den für die Entstehung von sSMC bekannten interchromosomal „U-type-exchange“ (Liehr 2013). Eine vergleichbare Beobachtung bekräftigt den beschriebenen Entstehungsmechanismus. Liehr und Mitarbeiter präsentierten 1992 einen Fall mit bisatellitischen sSMC von Chromosom 22. Die Autoren vermuteten einen analogen Entstehungsmechanismus, da das sSMC, genau wie eines der homologen Schwesterchromosomen, einen Polymorphismus im p-Arm aufwies (Liehr et al. 1992). Die restlichen drei Fälle (Fall-Nr. 26, 45, 48) besaßen sowohl Zellen mit gleicher NOR-FISH-Intensität am sSMC als auch Zellen, in denen sich die Signalstärken unterschieden. In den erstgenannten Zellen glichen sich nicht nur die Signalstärken des sSMC, auch zeigten die Signale der homologen Schwesterchromosomen keine Unterschiede. Aus diesem Grund ist für diese Zellen keine Aussage bez. des Entstehungsmechanismus möglich.

In den Zellen, in denen das sSMC zwei unterschiedliche Signale besaß, unterschieden sich auch die Signalintensitäten der homologen Schwesterchromosomen. Somit erscheint auch in diesen Fällen der interchromosomale Austausch als Bildungsmechanismus plausibel. Darüber hinaus lassen die NOR-FISH-Signale gleicher Intensität an sSMC und homologen Schwesterchromosomen mögliche Abbauprozesse der Zelle, zur Selektion gegen das sSMC, eher unwahrscheinlich erscheinen.

4.4.2.2 Bedeutung der Satellitenregion für die Stabilität des sSMC

Der mögliche Einfluss der Satellitenregion der akrozentrischen Chromosomen für die Stabilisierung der bisatellitischen sSMC wird in der nachfolgenden Überlegung besonders deutlich: 70% aller sSMC sind akrozentrischen Ursprungs (Liehr und Weise 2007) und gelten als besonders stabil bzw. als die von der Zelle am besten tolerierten sSMC. Die Mehrheit der akrozentrischen sSMC gehört zum Typ der invertiert duplizierten sSMC und besitzt folglich zwei Satelliten (Daten entstammen Liehr 2013: 59% inv dup bei akrozentrischer Herkunft). Vergleich man die Häufigkeiten aller sSMC, ohne Einbeziehung der akrozentrischen sSMC des Types inv dup, dann ist der Anteil akrozentrischer sSMC nicht mehr signifikant erhöht (Abb. 4.1). Die Satellitenregionen scheinen also eine bedeutende Rolle für die Stabilisierung von sSMC zu spielen.

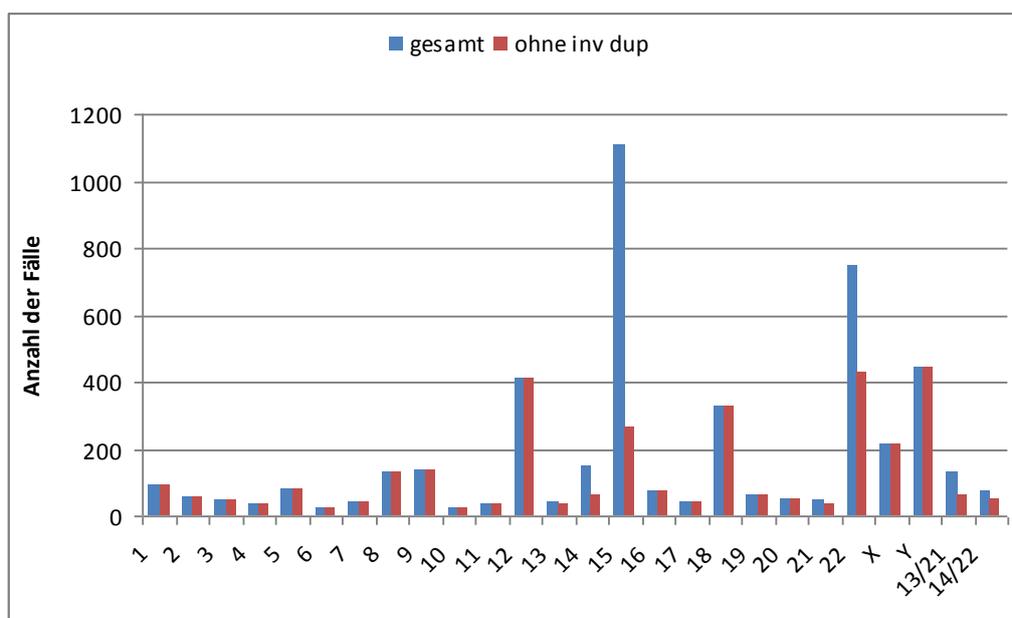


Abb. 4.1: Gegenüberstellung der Häufigkeit aller sSMC-Fälle und Häufigkeit aller sSMC-Fälle ohne Einbeziehung der akrozentrischen sSMC-Fälle des Types „inv dup“.

4.4.2.3 Einfluss der Größe des sSMC auf die Stabilität

Die Beobachtung, dass die großen sSMC sowohl bei Ag-NOR-Färbung als auch bei NOR-FISH die gleichen Signalkonstellationen aufwiesen, deutet auf einen direkten Zusammenhang zwischen den mit AgNOR-gefärbten Proteinen wie UBF und SL1 und der rDNA-Menge hin. Daten aus Untersuchungen an einigen Säugetieren (Warburton und Henderson 1979), aber auch Patientendaten (Wachtler et al. 1986, Zurita et al. 1998, Zurita et al. 1999) zeigten, dass die Imprägnierung mit AgNOR der kompetenten NOR mit dem Gehalt an rDNA korreliert. Diese Korrelation konnte für die größeren sSMC ebenfalls beobachtet werden. Der Zusammenhang zwischen der Gendichte und deren Aktivität trifft jedoch weder bei den übrigen in der vorliegenden Arbeit untersuchten kleinen akrozentrischen sSMC zu, noch passten Daten anderer Untersuchungen zu dieser Korrelation (z.B. de Capoa et al. 1988, French et al. 2003). Somit scheint die Aktivität nicht allein vom Gengehalt abzuhängen, vielmehr müssen weitere Einflussfaktoren eine Rolle bei der Transkription der rRNA-Gene spielen.

Da alle untersuchten großen sSMC aus Material von Chromosom 15 bestehen, ist auch ein Einfluss der chromosomalen Herkunft denkbar. Wie bereits in Abschnitt 4.4.2 erwähnt, wurden chromosomenspezifische Unterschiede der Signalintensität und -verteilung von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Heliot et al. 1997, Zakharov et al. 1982, Ozen et al. 1995). Heliot und Mitarbeiter zeigten 2000 eine unterschiedliche Morphologie der AgNOR-Signale in Abhängigkeit von der Chromosomenidentität auf (Heliot et al. 2000). Die Chromosomen 13, 14 und 21 wiesen überwiegend stabförmige Signale auf, während die Chromosomen 15 und 22 bevorzugt Doppelpunkte oder keine Färbung zeigten. Sie vermuteten hinter diesen Strukturen die qualitative Ausprägung der verschiedenen Genzahlen pro Cluster und sahen darin das Merkmal für den maximalen Zustand an potentieller Genaktivität. Darüber hinaus wurden aber auch unterschiedliche Signale bei homologen Chromosomen beschrieben. Smirnov und Mitarbeiter zeigten 2006 bei der Analyse zweier Zelllinien (HeLa und LEP) ebenfalls Unterschiede der Signalintensität zwischen homologen Chromosomen (Smirnov et al. 2006).

Somit könnte das AgNOR-Muster der sSMC also davon abhängen, ob es aus Material eines homologen Schwesterchromosoms besteht oder jeweils eine Hälfte vom anderen Homologen stammt. Dies konnte bereits in Abschnitt 4.4.2.1 für vier de novo entstandene sSMC gezeigt werden. Auf der anderen Seite wäre eine Abhängigkeit der Signalkonstellation auf den sSMC vom chromosomalen Ursprung der sSMC denkbar. In dieser Studie konnte abgesehen vom Verhalten der großen sSMC kein Zusammenhang diesbezüglich nachgewiesen werden.

Fazit: Die vorliegende Arbeit belegt erstmals den Einfluss eines bisatellitischen sSMC auf die Gesamtanzahl aktiver NOR in der Zelle, was für eine veränderte Regulierung der rDNA-Synthese spricht. Anschließende Expressionsstudien könnten diese Theorie stützen. Der Umstand, dass beide NOR der sSMC aktiv sind, legt deren positive Selektion bei funktioneller Beteiligung in der vorangegangenen Interphase nahe. Darüber hinaus lässt der Vergleich der Signalintensitäten von FISH- und AgNOR-Untersuchungen der sSMC und der jeweiligen homologen Schwesterchromosomen auf interchromosomale Rekombination als Entstehungsmechanismus schließen.

5 Schlussfolgerung

Die deutlich über den Erwartungen liegende Vielfalt der Aktivitätsmuster, die bei dizentrischen Chromosomen mittels Immunfärbung spezifischer Zentromerproteine beobachtet wurde, weist auf die Existenz mehrerer Inaktivierungsmechanismen nebeneinander hin. Obwohl die vorliegende Arbeit sowohl Hinweise für eine epigenetische Inaktivierung, als auch für eine (partielle) Deletion eines Zentromers als Inaktivierungsprozess liefert, bleibt unklar, wie und ob eine Entscheidung für einen Mechanismus fällt, ob beide Mechanismen zusammenwirken und wie sie gesteuert werden. Die vorliegende Arbeit grenzt die potentiellen Einflussfaktoren auf den Interzentromerabstand und die chromosomale Herkunft des involvierten Materials ein. Die beobachtete gegenseitige Beeinflussung von dizentrischen sSMC und den jeweiligen homologen Schwesterchromosomen weist auf direkte Auswirkungen auf die Interphasekernarchitektur durch das Vorliegen eines sSMC hin. Die bevorzugte Kolo-kalisation mit einem homologen Schwesterchromosom wurde nicht nur bei dizentrischen sondern auch bei monozentrischen sSMC beobachtet und scheint somit unabhängig von der Zentromeranzahl zu sein. Für ein tieferes Verständnis der Zusammenhänge von chromosomalen Veränderungen hinsichtlich der Interphasekernarchitektur, der damit verbundenen zellulären Expression und der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen sind weitere 3D-Studien Erfolg versprechend. Die Bedeutung epigenetischer Veränderungen, die auch auf transkriptioneller Ebene eine entscheidende Rolle spielen dürften, zeigte sich in der unterschiedlichen Färbung der untersuchten sSMC mittels Immunfluoreszenz an Histonmodifikationen. In diesem Zusammenhang sind dringend weiterführende Immunfärbungen mit Antikörpern speziell gegen sowohl aktiv transkribiertes Chromatin als auch nicht transkribiertes Chromatin notwendig und müssten in der Folge mittels Expressionsstudien bestätigt werden.

Dem recht einheitlichen Bild für die Stabilität der großen dizentrischen Chromosomen steht eine große Mustervielfalt vor allem bei kleinen dizentrischen bisatellitischen sSMC gegenüber. Letztere zeigen eine höhere Variabilität bez. der Musterausprägungen nicht nur bei NOR-FISH und bei AgNOR-Färbung, sondern auch bei den Immunfluoreszenzfärbungen zur Zentromeraktivität. Sie scheinen somit grundsätzlich instabiler zu sein als größere dizentrische sSMC. Es scheint Mechanismen in humanen Zellen zu geben, die bei chromosomalen Fehlverteilungen den Ursprungszustand von 46 Chromosomen wieder herstellen. Solche Szenarien sind vor allem für Fehlverteilungen während der Meiose und im Zusammenhang mit uniparentalen Disomien (UPD) beschrieben (Kotzot 2002). Diese schwer

nachweisbaren Kontrollmechanismen scheinen jedoch nicht in jedem einzelnen Fall bzw. nicht zwingend vollständig abzulaufen, da immer wieder stabile Trisomien oder zusätzliche Markerchromosomen beobachtet werden. Obwohl in dieser Arbeit kein Nachweis von Abbauprozessen im Sinne eines ‚Trisomic rescue‘ bei kleinen sSMC untersucht und erbracht wurde, fiel dennoch die größere Variabilität auf, die sich mit einer gewissen Instabilität erklären ließe. Vielmehr scheinen, aufgrund der einheitlichen Daten der größeren sSMC, diese großen sSMC von den Zellen eher toleriert zu werden, obwohl sich häufig Euchromatin auf diesen sSMC befindet. Die Entscheidung, ob und unter welchen Bedingungen das Vorliegen eines sSMC in der Zelle toleriert wird, unterliegt wohl offenbar einer Vielzahl an verschiedenartigen Kontrollmechanismen.

6 Literaturverzeichnis

- Adeyinka A**, Smoley S, Fink S, Sanchez J, Van Dyke DL, Dewald G. 2007. Isochromosome (X)(p10) in hematologic disorders: FISH study of 14 new cases show three types of centromere signal patterns. *Cancer Genet Cytogenet*, 179(1):25-30.
- Amor DJ**, Bentley K, Ryan J, Perry J, Wong L, Slater H, Choo KH. 2004. Human centromere repositioning “in progress”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17):6542-6547.
- Arnold J**. 1879. Über feinere Strukturen der Zelle unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Virchows Arch Path Anat*, 77:181-206.
- Ault JG**, **Lyttle TW**. 1988. A transmissible dicentric chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 97:71–79.
- Avery OT**, MacLeod CM, McCarty M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med*, 79(2):137-158.
- Avramova ZV**. 2002. Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differences. *Plant Physiol*, 129(1):40-49.
- Babu KA**, **Verma RS**. 1985. Structural and functional aspect of nucleolar organizer regions (NORs) of human chromosomes. *Int Rev Cytol*, 94:151-176.
- Barski A**, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4):823-837.
- Bartels I**, Schlueter G, Liehr T, von Eggeling F, Starke H, Glaubitz R, Burfeind P. 2003. Supernumerary small marker chromosome (SMC) and uniparental disomy 22 in a child with confined placental mosaicism of trisomy 22: trisomy rescue due to marker chromosome formation. *Cytogenet Genome Res*, 101(2):103-105.
- Bayreuther Kl**. 1952: Der Chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus. *Naturforsch*, 7b:554–557.
- Bernstein BE**, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ 3rd, Gingeras TR, Schreiber SL, Lander ES. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, 120(2):169-181.
- Black BE**, **Cleveland DW**. 2011. Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-a nucleosomes. *Cell*, 144(4):471-479.
- Bloom SE**, **Goodpasture C**. 1976. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum Genet*, 34(2):199-206.
- Blower MD**, **Karpen GH**. 2001. The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol*, 3(8):730-739.
- Blower MD**, Sullivan BA, Karpen GH. 2002. Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell*, 2(3):319-330.
- Bohlander SK**, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Rowley JD, Diaz MO. 1992. A method for the rapid sequence-independent amplification of microdissected chromosomal material. *Genomics*, 13(4):1322-1324.

- Bolzer A**, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Muller S, Cremer C, Eils R, Speicher MR, Cremer T. 2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol*, 3(5):e157.
- Boveri T**. 1903. Über die Konstitution der chromatischen Kernsubstanz. In: Verhandlungen der deutschen ZOOlogischen Gesellschaft, 13. Jahresversammlung zu Würzburg. Korschelt E, Hrsg. Leipzig: Wilhelm Engelmann. S. 10-33.
- Brenner S**, Pepper D, Berns MW, Tan E, Brinkley BR. 1981. Kinetochore structure, duplication, and distribution in mammalian cells: analysis by human autoantibodies from scleroderma patients. *J Cell Biol*, 91(1):95-102.
- Brinkley BR, Stubblefield E**. 1966. The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro. *Chromosoma*, 19(1):28-43.
- Buchwitz BJ**, Ahmad K, Moore LL, Roth MB, Henikoff S. 1999. A histone-H3-like protein in *C. elegans*. *Nature*, 401(6753):547-548.
- Buckton KE**, Spowart G, Newton MS, Evans HJ. 1985. Forty four probands with an additional "marker" chromosome. *Hum Genet*, 69(4):353-370.
- Cardinale S**, Bergmann JH, Kelly D, Nakano M, Valdivia MM, Kimura H, Masumoto H, Larionov V, Earnshaw WC. 2009. Hierarchical inactivation of a synthetic human kinetochore by a chromatin modifier. *Mol Biol Cell*, 20(19):4194-4204.
- Carroll CW, Straight AF**. 2006. Centromere formation: from epigenetics to self-assembly. *Trends Cell Biol*, 16(2):70-78.
- Carroll CW**, Milks KJ, Straight AF. 2010. Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J Cell Biol*, 189(7):1143-1155.
- Caspersson T**, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res*, 49(1):219-222.
- Caspersson T**, De La Chapelle A, Schröder J, Zech L. 1972. Quinacrin fluorescence of metaphase chromosomes. Identical pattern in different tissues. *Exp Cell Res*, 72(1):56-59.
- Chadwick BP**. 2009. Macrosatellite epigenetics: the two faces of DXZ4 and D4Z4. *Chromosoma*, 118(6):675-681.
- Cheeseman IM, Desai A**. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1):33-46.
- Choo KH**. 1997. Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet*, 61(6):1225-1233.
- Choo KH**. 2001. Domain organization at the centromere and neocentromere. *Dev Cell*, 1(2):165-177.
- Claussen U**, Michel S, Mühlig P, Westermann M, Grummt UW, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T. 2002. Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet Genome Res*, 98(2-3):136-146.
- Conconi A**, Widmer RM, Koller T, Sogo JM. 1989. Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell*, 57(5):753-761.
- Dammann R**, Lucchini R, Koller T, Sogo JM. 1993. Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 21(10):2331-2338.

- Daniel A.** 1979. Single Cd band in dicentric translocations with one suppressed centromere. *Hum Genet*, 48(1):85-92.
- Daniel A**, Ekblom L, Phillips S, FitzGerald JM, Opitz JM. 1985. NOR activity and centromere suppression related in a de novo fusion tdic(9;13)(p22;p13) chromosome in a child with del(9p) syndrome. *Am J Med Genet*, 22(3):577-584.
- de Capoa A**, Felli MP, Baldini A, Rocchi M, Archidiacono N, Aleixandre C, Miller OJ, Miller DA. 1988. Relationship between the number and function of human ribosomal genes. *Hum Genet*, 79(4):301-304.
- De la Chapelle A**, Wennström J, Hortling H, Ockey CH. 1966. Isochromosome-X in man. I. *Hereditas*, 54(3):260-276.
- Demirhan O**, Pazarbaşı A, Tanriverdi N, Aridoğan A, Karahan D. 2009. The clinical effects of isochromosome Xq in Klinefelter syndrome: report of a case and review of literature. *Genet Couns*, 20(3):235-242.
- Denton TE**, Howell WM, Barrett JV. 1976. Human nucleolar organizer chromosomes: satellite associations. *Chromosoma*, 55(1):81-84.
- Depinet TW**, Zackowski JL, Earnshaw WC, Kaffe S, Sekhon GS, Stallard R, Sullivan BA, Vance GH, Van Dyke DL, Willard HF, Zinn AB, Schwartz S. 1997. Characterisation of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet*, 6(8):1195-1204.
- Dewald GW**, Boros SJ, Conroy MM, Dahl RJ, Spurbeck JL, Vitek HA. 1979. A tdic(5;15)(p31;p11) chromosome showing variation for constriction in the centromeric regions in a patient with the cri du chat syndrome. *Cytogenet Cell Genet*, 24(1):15-26.
- Dorer DR**, Henikoff S. 1994. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell*, 77(7):993-1002.
- Dorka F.** 2011. Studien zur Kolokalisation der Transkriptionspartner bcr und abl in dreidimensional erhaltenen Interphasezellkernen in Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie [Diplomarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Dutrillaux B**, Lejeune J. 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C R Acad Sci*, 272:2638-2640.
- Edwards JH.** 1960. A new trisomic syndrome. *Lancet*, 1(7128):787-790.
- Earnshaw WC**, Migeon BR. 1985. Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma*, 92(4):290-296.
- Earnshaw WC**, Rothfield N. 1985. Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma*, 91(3-4):313-321.
- Earnshaw WC**, Bernat RL. 1991. Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma*, 100(3):139-146.
- Earnshaw WC**, Sullivan KF, Machlin PS, Cooke CA, Kaiser DA, Pollard TD, Rothfield NF, Cleveland DW. 1987. Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J. Cell Biol*, 104(4):817-829.
- Earnshaw WC**, Ratrie H 3rd, Stetten G. 1989. Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytological spreads. *Chromosoma*, 98(1):1-12.

- Ellis JR**, Marshall R, Penrose LS. 1962. An aberrant small acrocentric chromosome. *Ann Hum Genet*, 26:77-83.
- Ewers E**, Yoda K, Hamid AB, Weise A, Manvelyan M, Liehr T. 2010. Centromere activity in dicentric small supernumerary marker chromosomes. *Chromosome Res*, 18(5):555-562.
- Felbor U**, Rutschow D, Haaf T, Schmid M. 2002. Centromeric association of chromosome 16- and 18-derived microchromosomes. *Hum Genet*, 111(1):16-25.
- Fisher AM**, Al-Gazali L, Pramathan T, Quaife R, Cockwell AE, Barber JC, Earnshaw WC, Axelman J, Migeon BR, Tyler-Smith C. 1997. Centromeric inactivation in a dicentric human Y;21 translocation chromosome. *Chromosoma*, 106(4):199-206.
- Flemming W**. 1880. Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. *Arch mikr Anat*, 18:151-259.
- Foltz DR**, Jansen LE, Black BE, Bailey AO, Yates JR 3rd, Cleveland DW. 2006. The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol*, 8(5):458-469.
- Ford CE**, Miller OJ, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH. 1959. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis Turner Syndrome. *Lancet*, 1(7075):711-713.
- French SL**, Osheim YN, Cioci F, Nomura M, Beyer AL. 2003. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol*, 23(5):1558-1568.
- Friedrich U**, Caprani M, Niebuhr E, Therkelsen AJ, Jørgensen AL. 1996. Extreme variant of the short arm of chromosome 15. *Hum Genet*, 97(6):710-713.
- Froland A**, Holst G, Terslev E. 1963. Multiple anomalies associated with an extra small autosome. *Cytogenetics*, 85:99-106.
- Furuyama S**, **Biggins S**. 2007. Centromere identity is specified by a single centromeric nucleosome in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(37):14706-14711.
- Gerhard DS**, Kawasaki ES, Bancroft FC, Szabo P. 1981. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(6):3755-3759.
- Giacalone J**, Friedes J, Francke U. 1992. A novel GC-rich human macrosatellite VNTR in Xq24 is differentially methylated on active and inactive X chromosomes. *Nat Genet*, 1(2):137-143.
- Goodpasture C**, **Bloom SE**. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53(1):37-50.
- Goodpasture C**, Bloom SE, Hsu TC, Arrighi FE. 1976. Human nucleolus organizers: the satellites or the stalks? *Am J Hum Genet*, 28(6):559-566.
- Grewal SI**, **Elgin SC**. 2007. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, 447(7143):399-406.
- Grumt I**, **Pikaard CS**. 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(8):641-649.
- Guerrero AA**, Gamero MC, Trachana V, Fütterer A, Pacios-Bras C, Díaz-Concha NP, Cigudosa JC, Martínez-A C, van Wely KH. 2010. Centromere-localized breaks indicate the generation of DNA damage by the mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9):4159-4164.

- Haaf T, Schmid M.** 1990. Y isochromosome associated with a mosaic karyotype and inactivation of the centromere. *Hum Genet*, 85(5):486-490.
- Haaf T, Ward DC.** 1994. Structural analysis of alpha-satellite DNA and centromere proteins using extended chromatin and chromosomes. *Hum Mol Genet*, 3(5):697-709.
- Hahn M, Dambacher S, Schotta G.** 2010. Heterochromatin dysregulation in human diseases. *J Appl Physiol*, 109(1):232-242.
- Han F, Gao Z, Birchler JA.** 2009. Reactivation of an inactive centromere reveals epigenetic and structural components for centromere specification in maize. *Plant Cell*, 21(7):1929-1939.
- Harper ME, Saunders GF.** 1981. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*, 83(3):431-439.
- Héliot L, Kaplan H, Lucas L, Klein C, Beorchia A, Doco-Fenzy M, Menager M, Thiry M, O'Donohue MF, Ploton D.** 1997. Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. *Mol Biol Cell*, 8(11):2199-2216.
- Héliot L, Mongelard F, Klein C, O'Donohue MF, Chassery JM, Robert-Nicoud M, Usson Y.** 2000. Nonrandom Distribution of Metaphase AgNOR Staining Patterns on Human Acrocentric Chromosomes. *J Histochem Cytochem*, 48(1):13-20.
- Higgins AW, Gustashaw KM, Willard HF.** 2005. Engineered human dicentric chromosomes show centromere plasticity. *Chromosome Res*, 13(8):745-762.
- Hill A, Bloom K.** 1987. Genetic manipulation of centromere function. *Mol Cell Biol*, 7(7):2397-2405.
- Hill A, Bloom K.** 1989. Acquisition and processing of a conditional dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 9(3):1368-1370.
- Hou JW, Wang TR.** 1998. Unusual features in children with inv dup(15) supernumerary marker: a study of genotype-phenotype correlation in Taiwan. *Eur J Pediatr*, 157(2):122-127.
- Howman EV, Fowler KJ, Newson AJ, Redward S, MacDonald AC, Kalitsis P, Choo KH.** 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(3):1148-1153.
- Hsu TC.** 1952. Mammalian chromosomes in vitro. 1. karyotype of man. *J Hered*, 43:167-172.
- Hsu TC, Spirito SE, Pardue ML.** 1975. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*, 53(1):25-36.
- Hudson D, Fowler K, Earle E, Saffery R, Kalitsis P, Trowell H, Hill J, Wreford N, de Kretser D, Cancilla M, Howman E, Hii L, Cutts S, Irvine D, Choo K.** 1998. Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights. *J Cell Biol*, 141(2):309-319.
- Ilberry PLT, Lee CWG, Winn SM.** 1961. Incomplete trisomy in a mongoloid child exhibiting minimal stigmata. *Med J Aust*, 48(2):182-184.
- Ing PS, Smith SD.** 1983. Cytogenetic studies of a patient with mosaicism of isochromosome 13q and a dicentric (Y;13) translocation showing differential centromeric activity. *Clin Genet*, 24(3):194-199.
- ISCN 2013.** Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, Ed. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013. Basel: S Karger

- Izuta H**, Ikeno M, Suzuki N, Tomonaga T, Nozaki N, Obuse C, Kisu Y, Goshima N, Nomura F, Nomura N, Yoda K. 2006. Comprehensive analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells. *Genes Cells*, 11(6):673-684.
- Jaco I**, Canela A, Vera E, Blasco MA. 2008. Centromere mitotic recombination in mammalian cells. *J Cell Biol*, 181(6):885-892.
- Jacobs PA, Strong JA**. 1959. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*, 183(4657):302-303.
- Jaeger D, Philippsen P**. 1989. Stabilization of dicentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae* by telomere addition to broken ends or by centromere deletion. *EMBO J*, 8(1):247-254.
- Jeppesen P**, Mitchell A, Turner B, Perry P. 1992. Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes. *Chromosoma*, 101(5-6):322-332.
- John B, Freeman M**. 1975. Causes and consequences of Robertsonian exchange. *Chromosoma*, 52(2):123-136.
- John HL**, Birnstiel ML, Jones KW. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223(5206):582-587.
- Jokelainen PT**. 1967. The ultrastructure and spatial organization of the metaphase kinetochore in mitotic rat cells. *J Ultrastruct Res*, 19(1):19-44.
- Jordan P**, Mannervik M, Tora L, Carmo-Fonseca M. 1996. In vivo evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive. *J. Cell Biol*, 133(2):225-234.
- Kalmárová M**, Smirnov E, Mašata M, Koberna K, Ligasová A, Popov A, Raška I. 2007. Positioning of NORs and NOR-bearing chromosomes in relation to nucleoli. *J Struct Biol*, 160(1-3): 49–56.
- Kapoor M**, de Oca M, Luna R, Liu G, Lozano G, Cummings C, Mancini M, Ouspenski I, Brinkley B, May G. 1998. The cenpB gene is not essential in mice. *Chromosoma*, 107(8):570-576.
- Khalil AM, Driscoll DJ**. 2006. Histone H3 lysine 4 dimethylation is enriched on the inactive sex chromosomes in male meiosis but absent on the inactive X in female somatic cells. *Cytogenet Genome Res*, 112(1-2):11-15.
- Kim TH**, Barrera LO, Zheng M, Qu C, Singer MA, Richmond TA, Wu Y, Green RD, Ren B. 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature*, 436(7052):876-880.
- Kipling D, Warburton PE**. 1997. Centromeres, CENP-B and Tigger too. *Trends Genet*, 13(4):141-145.
- Kitagawa K**, Masumoto H, Ikeda M, Okazaki T. 1995. Analysis of protein-DNA and protein-protein interactions of centromere protein B (CENP-B) and properties of the DNA-CENP-B complex in the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 15(3):1602-1612.
- Klein E**, Manvelyan M, Simonyan I, Hamid AB, Guilherme RS, Liehr T, Karamysheva T. Centromeric association of small supernumerary marker chromosomes with their sister-chromosomes detected by three dimensional molecular cytogenetics. *Mol Cytogenet*, 5:15.

- Koshland D**, Rutledge L, Fitzgerald-Hayes M, Hartwell LH. 1987. A genetic analysis of dicentric minichromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 48(5):801-812.
- Kotzot D. 2002.** Supernumerary marker chromosomes (SMC) and uniparental disomy (UPD): coincidence or consequence? *J Med Genet*, 39(10): 775–778.
- Kusch T, Workman JL.** 2007. Histone variants and complexes involved in their exchange. *Subcell Biochem*, 41:91-109.
- Langer PR**, Waldrop AA, Ward DC. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(11):6633-6637.
- Lanini L, McKeon F.** 1995. Domains required for CENP-C assembly at the kinetochore. *Mol Biol Cell*, 6(8):1049-1059.
- Lau YF**, Wertelecki W, Pfeiffer RA, Arrighi FE. 1979. Cytological analyses of 14p+ variant by means of N-banding and combinations of silver staining and chromosome bandings. *Hum Genet*, 46(1):75-82.
- Lejeune J.** 1959. Le Mongolisme: Premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann Genet* 1:41-49.
- Lemyre E**, der Kaloustian VM, Duncan AM. 2001. Stable non-Robertsonian dicentric chromosomes: four new cases and a review. *J Med Genet*, 38(1):76-79.
- Lexikon der Biologie.** 2001. Band 7:337, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lichter P**, Cremer T, Borden J, Mannelidis L, Ward DC. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet*, 80(3):224-234.
- Liehr T.** 2006. Familial small supernumerary marker chromosomes are predominantly inherited via the maternal line. *Genet Med*, 8(7):459-462.
- Liehr T.** 2008. Characterization of prenatally assessed de novo small supernumerary marker chromosomes by molecular cytogenetics. *Methods Mol Biol*, 444:27-38.
- Liehr T**, Ed. 2009. Fluorescence in situ Hybridization (FISH) – Application Guide. Berlin: Springer Verlag.
- Liehr T.** 2012. Small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC). A guide for Human Geneticists and Clinicians. Berlin: Springer-Verlag.
- Liehr T.** 2013. sSMC-Datenbank: <http://www.fish.uniklinikum-jena.de/sSMC.html>.
- Liehr T, Claussen U.** 2002. Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr Mol Med*, 2(3):283-297.
- Liehr T, Weise A.** 2007. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med*, 19(5):719-731.
- Liehr T**, Pfeiffer RA, Trautmann U. 1992. Typical and partial cat eye syndrome: identification of the marker chromosome by FISH. *Clin Genet*, 42(2):91-96.
- Liehr T**, Claussen U, Starke H. 2004a. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res*, 107(1-2):55-67.

- Liehr T**, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Eggeling F.v., Claussen U, Starke H. 2004b. Characterisation of Small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC) in Human. *Curr Genomics*, (5):279-286.
- Liehr T**, Utine GE, Trautmann U, Rauch A, Kuechler A, Pietrzak J, Bocian E, Kosyakova N, Mrasek K, Boduroglu K, Weise A, Aktas D. 2007. Neocentric small supernumerary marker chromosomes (sSMC)--three more cases and review of the literature. *Cytogenet Genome Res*, 118(1):31-37.
- Liehr T**, Ewers E, Hamid AB, Kosyakova N, Voigt M, Weise A, Manvelyan M. 2011. Small supernumerary marker chromosomes and uniparental disomy have a story to tell. *J Histochem Cytochem*, 59(9):842-848.
- Liu CL**, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL, Friedman N, Rando OJ. 2005. Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol*, 3(10):e328.
- Luger K**, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648):251-260.
- MacKinnon RN**, **Campbell LJ**. 2011. The role of dicentric chromosome formation and secondary centromere deletion in the evolution of myeloid malignancy. *Genet Res Int*, 2011:643628.
- Malcolm S**, Barton P, Murphy C, Ferguson-Smith MA. 1981. Chromosomal localization of a single copy gene by in situ hybridization: human beta globin genes on the short arm of chromosome 11. *Ann Hum Genet*, 45(Pt 2):135-141.
- Manuelidis L**. 1978. Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma*, 66(1):23-32.
- Manvelyan M**, Hunstig F, Bhatt S, Mrasek K, Pellestor F, Weise A, Simonyan I, Aroutiounian R, Liehr T. 2008a. Chromosome distribution in human sperm - a 3D multicolor banding-study. *Mol Cytogenet*, 1:25.
- Manvelyan M**, Hunstig F, Mrasek K, Bhatt S, Pellestor F, Weise A, Liehr T. 2008b. Position of chromosomes 18, 19, 21 and 22 in 3D-preserved interphase nuclei of human and gorilla and white hand gibbon. *Mol Cytogenet*, 1:9.
- Manvelyan M**, Kempf P, Weise A, Mrasek K, Heller A, Lier A, Höffken K, Fricke HJ, Sayer HG, Liehr T, Mkrtchyan H. 2009. Preferred co-localization of chromosome 8 and 21 in myeloid bone marrow cells detected by three dimensional molecular cytogenetics. *Int J Mol Med*, 24(3):335-341.
- Maraschio P**, Zuffardi O, Lo Curto F. 1980. Cd bands and centromeric function in dicentric chromosomes. *Hum Genet*, 54(2):265-267.
- Maraschio P**, Zuffardi O, Caiulo A, Dainotti E, Piantanida M, Rivera H, Tupler R. 1990. Deletion of specific sequences or modification of centromeric chromatin are responsible for Y chromosome centromere inactivation. *Hum Genet*, 85(5):491-494.
- Masumoto H**, Masukata H, Muro Y, Nozaki N, Okazaki T. 1989. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol*, 109(5):1963-1973.
- Mc Clintock B**. 1934. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 21(2):294-326.

- McClintock B.** 1939. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 25(8):405-416.
- McStay B, Grummt I.** 2008. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24:131-157.
- Merry DE, Pathak S, Hsu TC, Brinkley BR.** 1985. Anti-kinetochore antibodies: use as probes for inactive centromeres. *Am J Hum Genet*, 37(2):425-430.
- Mikelsaar AV, Ilus T.** 1979. Populational polymorphisms in silver staining of nucleolus organizer regions (NORs) in human acrocentric chromosomes. *Hum Genet*, 51(3):281-285.
- Mikelsaar AV, Schmid M, Krone W, Schwarzacher HG, Schnedl W.** 1977. Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes of man. *Hum Genet*, 37(1):73-77.
- Milks KJ, Moree B, Straight AF.** 2009. Dissection of CENP-C-directed centromere and kinetochore assembly. *Mol Biol Cell*, 20(19):4246-4255.
- Morgan JM, Navabi H, Jasani B.** 1997. Role of calcium chelation in high-temperature antigen retrieval at different pH values. *J Pathol*, 182(2):233-237.
- Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J, Tan EM.** 1980. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(3):1627-1631.
- Mrasek K, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, Starke H, Rocchi M, Claussen U, Liehr T.** 2001. Reconstruction of the female Gorilla gorilla karyotype by Zoo-FISH using 25-color FISH and multicolor banding (MCB). *Cytogenet Cell Genet*, 93(3-4):242-248.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263-273.
- Nakagome Y, Teramura F, Katoaka K, Hosono F.** 1976. Mental retardation, malformation syndrome and partial 7p monosomy [45, XX, t(7;15)(p21;p11)]. *Clin Genet*, 9(6):621-624.
- Nakano M, Okamoto Y, Ohzeki J, Masumoto H.** 2003. Epigenetic assembly of centromeric chromatin at ectopic alpha-satellite sites on human chromosomes. *J Cell Sci*, 116(Pt 19):4021-4034.
- Nakano M, Cardinale S, Noskov VN, Gassmann R, Vagnarelli P, Kandels-Lewis S, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H.** 2008. Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Dev Cell*, 14(4):507-522.
- Nakaseko Y, Adachi Y, Funahashi S, Niwa O, Yanagida M.** 1986. Chromosome walking shows a highly homologous repetitive sequence present in all the centromere regions of fission yeast. *EMBO J*, 5(5):1011-1021.
- Nicklas RB.** 1997. How cells get the right chromosomes. *Science*, 275(5300):632-637.
- Niebuhr E.** 1972. A 45,XX,5-,13-,dic+ karyotype in a case of cri-du-chat syndrome. *Cytogenetics*, 11(3):165-177.
- Nietzel A, Rocchi M, Heller A, Starke H, Wlodarska I, Beensen V, Claussen U, Liehr T.** 2001. A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: Centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet*, 108(3):199-204.

- Obuse C**, Yang H, Nozaki N, Goto S, Okazaki T, Yoda K. 2004. Proteomics analysis of the centromere complex from HeLa interphase cells: UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB-1) is a component of the CEN-complex, while BMI-1 is transiently co-localized with the centromeric region in interphase. *Genes Cells*, 9(2):105-120.
- Ockey CH**, Wennström J, De la Chapelle A. 1966. Isochromosome-X in man. II. *Hereditas*, 54(3):277-292.
- Okada M**, Cheeseman IM, Hori T, Okawa K, McLeod IX, Yates JR 3rd, Desai A, Fukagawa T. 2006. The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat Cell Biol*, 8(5):446-457.
- Okada T**, Ohzeki J, Nakano M, Yoda K, Brinkley WR, Larionov V, Masumoto H. 2007. CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell*, 131(7):1287-1300.
- Okamoto Y**, Nakano M, Ohzeki J, Larionov V, Masumoto H. 2007. A minimal CENP-A core is required for nucleation and maintenance of a functional human centromere. *EMBO J*, 26(5):1279-1291.
- O'Keefe RT**, Henderson SC, Spector DL. 1992. Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J Cell Biol*, 116(5):1095-1110.
- Ozen M**, Hopwood VL, Pathak S. 1995. Ag-NOR studies in a human lymphocyte culture: are variants localized to specific chromosomes? *Am J Med Genet*, 59(2):225-228.
- Page SL, Shaffer LG**. 1998. Chromosome stability is maintained by short intercentromeric distance in functionally dicentric human Robertsonian translocations. *Chromosome Res*, 6(2):115-122.
- Page SL**, Earnshaw WC, Choo KHA, Schaffer LG. 1995. Further evidence that CENP-C is a necessary component of active centromeres: studies of a dic(X;15) with simultaneous immunofluorescence and FISH. *Hum Mol Genet*, 4(2):289-294.
- Painter TS**. 1923. Studies in mammalian spermatogenesis II: The spermatogenesis of man. *J. Exp. Zool*, 37:291-336.
- Palmer DK**, O'Day K, Wener MH, Andrews BS, Margolis RL. 1987. A 17-kDa centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol*, 104(4):805-815.
- Pardue ML, Gall JG**. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 64(2):600-604.
- Patau K**, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP. 1960. Multiple congenital anomalies caused by an extra autosome. *Lancet*, 1(7128):790-793.
- Patil SR, Lubs HA**. 1971. Non-random association of human acrocentric chromosomes. *Humangenetik*, 13(2):157-159.
- Pennaneach V, Kolodner RD**. 2009. Stabilization of dicentric translocations through secondary rearrangements mediated by multiple mechanisms in *S. cerevisiae*. *PLoS One*, 4(7):e6389.
- Peretti D**, Maraschio P, Lambiase S, Lo Curto F, Zuffardi O. 1986. Indirect immunofluorescence of inactive centromeres as indicator of centromeric function. *Hum Genet*, 73(1):12-16.

- Perez-Castro AV**, Shamanski FL, Meneses JJ, Lovato TL, Vogel KG, Moyzis RK, Pedersen R. 1998. Centromeric protein B null mice are viable with no apparent abnormalities. *Dev Biol*, 201(2):135-143.
- Perpelescu M, Fukagawa T**. 2011. The ABCs of CENPs. *Chromosoma*, 120(5):425-446.
- Pimpinelli S, Goday C**. 1989. Unusual kinetochores and chromatin diminution in *Parascaris*. *Trends Genet*, 5(9):310-315.
- Pinkel D**, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(9):2934-2938.
- Pluta AF**, Mackay AM, Ainsztein AM, Goldberg IG, Earnshaw WC. 1995. The centromere: hub of chromosomal activities. *Science*, 270(5242):1591-1594.
- Pokholok DK**, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E, Zeitlinger J, Lewitter F, Gifford DK, Young RA. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, 122(4):517-527.
- Prieto JL, McStay B**. 2005. Nucleolar biogenesis: the first small steps. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 6):1441-1443.
- Przewlaka MR**, Venkei Z, Bolanos-Garcia VM, Debski J, Dadlez M, Glover DM. 2011. CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. *Curr Biol*, 21(5):399-405.
- Reddy KS, Sulcova V**. 1998. The mobile nature of acrocentric elements illustrated by three unusual chromosome variants. *Hum Genet*, 102(6):653-662.
- Rigby PW**, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high activity in vitro by nick translation with DNA polymerase. *ibJ Mol Biol*, 113(1):237-251.
- Rivera H**, Zuffardi O, Maraschio P, Caiulo A, Anichini C, Scarinci R, Vivarelli R. 1989. Alternate centromere inactivation in a pseudodicentric (15;20)(pter;pter) associated with a progressive neurological disorder. *J Med Genet*, 26(10):626-630.
- Rivera H**, Domínguez MG, Vásquez AI, Ramos AL, Fragoso R. 1993. Centromeric association of a microchromosome in a Turner syndrome patient with a pseudodicentric Y. *Hum Genet*, 92(5):522-524.
- Rivera H**, Ayala-Madrigal LM, Gutiérrez-Angulo M, Vasquez AI, Ramos AL. 2003. Isodicentric Y chromosomes and secondary microchromosomes. *Genet Couns*, 14(2):227-231.
- Roberts SH**, Howell RT, Laurence KM, Heathcote ME. 1977. Stable dicentric autosome, t(8:22)(p23;p13), in a mentally retarded girl. *J Med Genet*, 14(1):66-68.
- Roh TY**, Cuddapah S, Zhao K. 2005. Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes Dev*, 19(5):542-552.
- Roh TY**, Cuddapah S, Cui K, Zhao K. 2006. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(43):15782-15787.
- Rojas AM**, Sanchez-Pulido L, Fütterer A, van Wely KH, Martinez-A C, Valencia A. 2005. Death inducer obliterator protein 1 in the context of DNA regulation. Sequence analyses of distant homologues point to a novel functional role. *FEBS J*, 272(14):3505-3511.
- Romain DR**, Columbano-Green L, Sullivan J, Smythe RH, Gebbie O, Parfitt R, Chapman C. 1982. Cd branding studies in a homologous Robertsonian 13;13 translocation. *J Med Genet*, 19(4):306-310.

- Roussel P**, Andre C, Comai L, Hernandez-Verdun D. 1996. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol*, 133(2):235-246.
- Rubtsov N**, Senger G, Kuzcera H, Neumann A, Kelbova C, Junker K, Beensen V, Claussen U. 1996. Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection, DNA amplification, and reverse painting. *Hum Genet*, 97(6):705-709.
- Saffery R**, Irvine DV, Griffiths B, Kalitsis P, Choo KH. 2000. Components of the human spindle checkpoint control mechanism localize specifically to the active centromere on dicentric chromosomes. *Hum Genet*, 107(4):376-384.
- Saiki RK**, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350-1354.
- Saiki RK**, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487-491.
- Sakai K**, Ohta T, Minoshima S, Kudoh J, Wang Y, de Jong PJ, Shimizu N. 1995. Human ribosomal RNA gene cluster: identification of the proximal end containing a novel tandem repeat sequence. *Genomics*, 26(3):521-526.
- Saitoh H**, Tomkiel J, Cooke CA, Ratrie H 3rd, Maurer M, Rothfield NF, Earnshaw WC. 1992. CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell*, 70(1):115-125.
- Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*. 2. Auflage. Band 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanij E**, Poortinga G, Sharkey K, Hung S, Holloway TP, Quin J, Robb E, Wong LH, Thomas WG, Stefanovsky V, Moss T, Rothblum L, Hannan KM, McArthur GA, Pearson RB, Hannan RD. 2008. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J Cell Biol*, 183(7):1259-1274.
- Santoro R, Grummt I**. 2001. Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Mol Cell*, 8(3):719-725.
- Santoro R, Grummt I**. 2005. Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Mol Cell Biol*, 25(7):2539-2546.
- Santoro R**, Li J, Grummt I. 2002. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet*, 32(3):393-396.
- Santos-Rosa H**, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419(6905):407-411.
- Schmid M**, Nanda I, Steinlein C, Epplen JT. 1994. Amplification of (GACA)_n simple repeats in an exceptional 14p+ marker chromosome. *Hum Genet*, 93(4):375-382.
- Schneider R**, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol*, 6(1):73-77.

- Schübeler D**, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP, Groudine M. 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev*, 18(11):1263-1271.
- Schwartz S**, Palmer CG, Weaver DD, Priest J. 1983. Dicentric chromosome 13 and centromere inactivation. *Hum Genet*, 63(4):332-337.
- Screpanti E**, De Antoni A, Alushin GM, Petrovic A, Melis T, Nogales E, Musacchio A. 2011. Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr Biol*, 21(5):391-398.
- Seabright M**. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2(7731):971-972.
- Senger G**, Chudoba I, Friedrich U, Tommerup N, Claussen U, Brøndum-Nielsen K. 1997. Prenatal diagnosis of a half-cryptic translocation using chromosome microdissection. *Prenat Diagn*, 17(4):369-374.
- Senger G**, Chudoba I, Plesch A. 1998. Multicolor-FISH - the identification of chromosome aberrations by 24 colors. *BIOforum*, 9:499-503.
- Senger G**, Lüdecke H-J, Horsthemke B, Claussen U. 1990. Microdissection of banded human chromosomes. *Hum Genet*, 84:507-511.
- Shelby RD**, Monier K, Sullivan KF. 2000. Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J Cell Biol*, 151(5):1113-1118.
- Shaffer LG**, McGowan-Jordan J, Schmid M, Ed. *ISCN An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013*. Basel: S Karger
- Shi J**, Wolf SE, Burke JM, Presting GG, Ross-Ibarra J, Dawe RK. 2010. Widespread gene conversion in centromere cores. *PLoS Biol*, 8(3):e1000327.
- Shizuya H**, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(18):8794-8797.
- Simpson RT**. 1978. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry*, 17(25): 5524-5531.
- Simpson EH**. 1951. The Interpretation of Interaction in Contingency Tables. *J R Stat Soc*, 13:238-241.
- Smirnov E**, Kalmárová M, Koberna K, Zemanová Z, Malínský J, Mašata M, Cvačková Z, Michalová K, Raška I. 2006. NORs and Their Transcription Competence during Cell Cycle. *Folia Biol (Praha)*, 52(3):59-70.
- Solovei I**, Cavallo A, Schermelleh L, Jaunin F, Scasselati C, Cmarko D, Cremer C, Fakan S, Cremer T. 2002. Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Exp Cell Res*, 276(1):10-23.
- Song K**, Gronemeyer B, Lu W, Eugster E, Tomkiel JE. 2002. Mutational analysis of the central centromere targeting domain of human centromere protein C, (CENP-C). *Exp. Cell Res*, 275(1):81-91.
- Speicher MR**, Ballard SG, Ward DC. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet*. 1996 Apr;12(4):368-375.

- Spurbeck JL**, Zinsmeister AR, Meyer KJ, Jalal SM. 1996. Dynamics of chromosome spreading. *Am J Med Genet*, 61(4):387-393.
- Starke H**, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Kuechler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T. 2003. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet*, 114(1):51-67.
- Steiner NC**, **Clarke L**. 1994. A novel epigenetic effect can alter centromere function in fission yeast. *Cell*, 79(5):865-874.
- Steinhauser U**, Starke H, Nietzel A, Lindenau J, Ullmann P, Claussen U, Liehr T. 2002. Suspension (S)-FISH, a new technique for interphase nuclei. *J Histochem Cytochem*, 50(12):1697-1698.
- Stéphane P**, **Geneviève L**. 1999. Prenatal supernumerary r(16) chromosome characterized by multiprobe FISH with normal pregnancy outcome. *Prenat Diagn*, 19(2):181-182.
- Stimpson KM**, **Sullivan BA**. 2010. Epigenomics of centromere assembly and function. *Curr Opin Cell Biol*, 22(6):772-780.
- Stimpson KM**, Song IY, Jauch A, Holtgreve-Grez H, Hayden KE, Bridger JM, Sullivan BA. 2010. Telomere disruption results in non-random formation of de novo dicentric chromosomes involving acrocentric human chromosomes. *PLoS Genet*, 12;6(8). pii: e1001061.
- Stoler S**, Keith KC, Curnick KE, Fitzgerald-Hayes M. 1995. A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev*, 9(5):573-586.
- Strickfaden H**, Zunhammer A, van Koningsbruggen S, Köhler D, Cremer T. 2010. 4D chromatin dynamics in cycling cells: Theodor Boveri's hypotheses revisited. *Nucleus*, 1(3):284-297.
- Subrt I**, Blehová B, Táborský O. 1971. Dicentric chromosome due to an unusual fusion. *Humangenetik*, 12(2):136-141.
- Sugimoto K**, Yata H, Muro Y, Himeno M. 1994. Human centromere protein C (CENP-C) is a DNA-binding protein which possesses a novel DNA-binding motif. *J Biochem*, 116(4):877-881.
- Sullivan BA**, **Schwartz S**. 1995. Identification of centromeric antigens in dicentric Robertsonian translocations: CENP-C and CENP-E are necessary components of functional centromeres. *Hum Mol Genet*, 4(12):2189-2197.
- Sullivan BA**, **Willard HF**. 1998. Stable dicentric X chromosomes with two functional centromeres. *Nat Genet*, 20(3):227-228.
- Sullivan BA**, Wolff DJ, Schwartz S. 1994. Analysis of centromeric activity in Robertsonian translocations: implications for a functional acrocentric hierarchy. *Chromosoma*, 103(7):459-467.
- Sullivan BA**, Blower MD, Karpen GH. 2001. Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nat Rev Genet*, 2(8):584-596.
- Sumner AT**, Evans HJ, Buckland RA. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nat New Biol*, 232(27):31-32.

- Sun HB**, Shen J, Yokota H. 2000. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J*, 79(1):184-190.
- Sutton WS**. 1903. The chromosomes in heredity. *Biol Bull*, 4:231-251.
- Tachiwana H**, Kagawa W, Shiga T, Osakabe A, Miya Y, Saito K, Hayashi-Takanaka Y, Oda T, Sato M, Park SY, Kimura H, Kurumizaka H. 2011. Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature*, 476(7359):232-235.
- Takahashi K**, Chen ES, Yanagida M. 2000. Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science*, 288(5474):2215-2219.
- Talbert PB**, Masuelli R, Tyagi AP, Comai L, Henikoff S. 2002. Centromeric localization and adaptive evolution of an Arabidopsis histone H3 variant. *Plant Cell*, 14(5):1053-1066.
- Tanaka Y**, Tachiwana H, Yoda K, Masumoto H, Ohazaki T, Kurumizaka H, Yokoyama S. 2005. Human centromere protein B induces translational positioning of nucleosomes on alpha-satellite sequences. *J Biol Chem*, 280(50):41609-41618.
- Terrenoire E**, McRonald F, Halsall JA, Page P, Illingworth RS, Taylor AM, Davison V, O'Neill LP, Turner BM. 2010. Immunostaining of modified histones defines high-level features of the human metaphase epigenome. *Genome Biol*, 11(11):R110.
- Therman E**, Sarto GE, Patau K. 1974. Apparently isodicentric but functionally monocentric X chromosome in man. *Am J Hum Genet*, 26:83-92.
- Therman E**, Trunca C, Kuhn EM, Sarto GE. 1986. Dicentric chromosomes and the inactivation of the centromere. *Hum Genet*, 72(3):191-195.
- Therman E**, Susman B, Denniston C. 1989. The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations. *Ann Hum Genet*, 53(Pt 1):49-65.
- Thrower DA**, Bloom K. 2001. Dicentric chromosome stretching during anaphase reveals roles of Sir2/Ku in chromatin compaction in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 12(9):2800-2812.
- Thrower DA**, Stemple J, Yeh E, Bloom K. 2003. Nuclear oscillations and nuclear filament formation accompany single-strand annealing repair of a dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 116(Pt 3):561-569.
- Tijio JH**, Levan A. 1956. The chromosome number in man. *Hereditas*, 42:1-6.
- Trazzi S**, Bernardoni R, Diolaiti D, Politi V, Earnshaw WC, Perini G, Della Valle G. 2002. In vivo functional dissection of human inner kinetochore protein CENP-C. *J Struct Biol*, 140(1-3):39-48.
- Trazzi S**, Perini G, Bernardoni R, Zoli M, Reese JC, Musacchio A, Della Valle G. 2009. The C-terminal domain of CENP-C displays multiple and critical functions for mammalian centromere formation. *PLoS One*, 4(6):e5832.
- Trifonov V**, Seidel J, Starke H, Martina P, Beensen V, Ziegler M, Hartmann I, Heller A, Nietzel A, Claussen U, Liehr T. 2003. Enlarged chromosome 13 p-arm hiding a cryptic partial trisomy 6p22.2-pter. *Prenat Diagn*, 23(5):427-430.
- Tung G**, Covert SM, Malabed KL, Wohlferd MM, Beckerman KP, Goldberg JD, Cotter PD. 2001. Minute supernumerary marker chromosomes identified in two patients with a related, larger pseudodicentric chromosome. *Am J Med Genet*, 103(3):193-197.

- Tyler-Smith C**, Oakey RJ, Larin Z, Fisher RB, Crocker M, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Muenke M, Zuffardi O, Jobling MA. 1993. Localization of DNA sequences required for human centromere function through an analysis of rearranged Y chromosomes. *Nat Genet*, 5(4):368-375.
- Verma RS, Babu A.** 1995. Human chromosomes. Principles and techniques. McGraw-Hill, New York: 72–127.
- Verma RS**, Kleyman SM, Conte RA. 1996. Molecular characterization of an unusual variant of the short arm of chromosome 15 by FISH-technique. *Jpn J Hum Genet*, 41(3):307-311.
- Vianna-Morgante AM, Rosenberg C.** 1986. Deletion of the centromere as a mechanism for achieving stability of a dicentric chromosome. *Cytogenet Cell Genet*, 42(3):119-122.
- Viersbach R**, Engels H, Gamerding U, Hansmann M. 1998. Delineation of supernumerary marker chromosomes in 38 patients. *Am J Med Genet*, 76(4):351-358.
- Wachtler F**, Hopman AH, Wiegant J, Schwarzacher HG. 1986. On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. Studies with a new, non-autoradiographic in situ hybridization method. *Exp Cell Res*, 167(1):227-240.
- Waldeyer W.** 1888. Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikrosk Anat*, 32:1-22.
- Wandall A.** 1989. Kinetochore development in two dicentric chromosomes in man. A light and electron microscopic study. *Hum Genet*, 82(2):137-141.
- Wandall A.** 1994. A stable dicentric chromosome: both centromeres develop kinetochores and attach to the spindle in monocentric and dicentric configuration. *Chromosoma*, 103(1):56-62.
- Wandall A.** 1995. Clonal origin of partially inactivated centromeres in a stable dicentric chromosome. *Cytogenet Cell Genet*, 69(3-4):193-195.
- Wandall A**, Tranebjaerg L, Tommerup N. 1998. A neocentromere on human chromosome 3 without detectable alpha-satellite DNA forms morphologically normal kinetochores. *Chromosoma*, 107(6-7):359-365.
- Warburton D, Henderson AS.** 1979. Sequential silver staining and hybridization in situ on nucleolus organizing regions in human cells. *Cytogenet Cell Genet*, 24(3):168-175.
- Warburton D**, Henderson AS, Shapiro LR, Hsu LY. 1973. A stable human dicentric chromosome, t dic (12;14)(p13;p13) including an intercalary satellite region between centromeres. *Am J Hum Genet*, 25(4):439-445.
- Warburton PE**, Cooke CA, Bourassa S, Vafa O, Sullivan BA, Stetten G, Gimelli G, Warburton D, Tyler-Smith C, Sullivan KF, Poirier GG, Earnshaw WC. 1997. Immunolocalisation of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol*, 7(11):901-904.
- Watson JD, Crick FH.** 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737-738.
- Weise A**, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T. 2003. Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet Genome Res*, 103(1-2):34-39.
- Weise A**, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, Liehr T, Kosyakova N. 2008. Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: first within

- the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. *J Histochem Cytochem*, 56(5):487-493.
- Weisenberger D, Scheer U.** 1995. A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J Cell Biol*, 129(3):561-575.
- Wiens GR, Sorger PK.** 1998. Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell*, 93(3):313-316.
- Willard HF.** 1990. Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet*, 6(12):410-416.
- Yang CH, Tomkiel J, Saitoh H, Johnson DH, Earnshaw WC.** 1996. Identification of overlapping DNA-binding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C. *Mol Cell Biol*, 16(7):3576-3586.
- Yoda K, Kitagawa K, Masumoto H, Muro Y, Okazaki T.** 1992. A human centromere protein, CENP-B, has a DNA binding domain containing four potential alpha helices at the NH2 terminus, which is separable from dimerizing g activity. *J Cell Biol*, 119(6):1413-1427.
- Yuan X, Feng W, Imhof A, Grummt I, Zhou Y.** 2007. Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell*, 27(4):585-595.
- Zakharov AF, Davudov AZ, Benjush VA, Egolina NA.** 1982. Polymorphisms of Ag-stained nucleolar organizer regions in man. *Hum Genet*, 60(4):334-339.
- Zeitlin SG, Baker NM, Chapados BR, Soutoglou E, Wang JY, Berns MW, Cleveland DW.** 2009. Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(37):15762-15767.
- Zhang W, Friebe B, Gill BS, Jiang J.** 2010. Centromere inactivation and epigenetic modifications of a plant chromosome with three functional centromeres. *Chromosoma*, 119(5):553-563.
- Zurita F, Jiménez R, Burgos M, de la Guardia RD.** 1998. Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolar organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. *J Cell Sci*, 111(Pt 10):1433-1439.
- Zurita F, Jiménez R, Diaz de la Guardia R, Burgos M.** 1999. The relative rDNA content of a NOR determines its level of expression and its probability of becoming active. A sequential silver staining and in-situ hybridization study. *Chromosome Res*, 7(7):563-570.

7 Anhang

7.1 Publikationsliste

- Liehr T, Trifonov V, Polityko A, Brecevic L, Mrasek K, Weise A, **Ewers E**, Reich D, Iourov I, Mkrtchyan H, Manvelyan M, Kosyakova N. Characterization of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) by a simple molecular and molecular cytogenetics approach. *Balkan J Med Gen* 2007, Vol 10, pp 33-37.
- Liehr T, Mrasek K, Hinreiner S, Reich D, **Ewers E**, Bartels I, Seidel J, Emmanuil N, Petesen M, Polityko A, Dufke A, Iourov I, Trifonov V, Vermeesch J, Weise A. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in patients with a 45,X/46,X,+mar karyotype - 17 new cases and a review of the literature. *Sex Dev.* 2007;1(6):353-362.
- Trifonov V, Fluri S, Binkert F, Nandini A, Anderson J, Rodriguez L, Gross M, Kosyakova N, Mkrtchyan H, **Ewers E**, Reich D, Weise A, Liehr T. Complex rearranged small supernumerary marker chromosomes (sSMC), three new cases; evidence for an underestimated entity? *Mol Cytogenet.* 2008 Apr 15;1(1):6.
- Manvelyan M, Riegel M, Santos M, Fuster C, Pellestor F, Mazaurik ML, Schulze B, Polityko A, Tittelbach H, Reising-Ackermann G, Belitz B, Hehr U, Kelbova C, Volleth M, Gödde E, Anderson J, K pferling P, K hler S, Duba HC, Dufke A, Aktas D, Martin T, Schreyer I, **Ewers E**, Reich D, Mrasek K, Weise A, Liehr T. Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems: detailed molecular cytogenetic characterization and review of the literature. *Int J Mol Med.* 2008 Jun;21(6):705-714.
- Kitsiou-Tzeli S, Manolakos E, Lagou M, Kontodiou M, Kosyakova N, **Ewers E**, Weise A, Garas A, Orru S, Liehr T, Metaxotou A. Characterization of a prenatally assessed de novo supernumerary minute ring chromosome 20 in a phenotypically normal male. *Mol Cytogenet.* 2009 Jan 7;2:1.
- Liehr T, Stumm M, Wegner RD, Bhatt S, Hickmann P, Patsalis PC, Meins M, Morlot S, Klaschka V, **Ewers E**, Hinreiner S, Mrasek K, Kosyakova N, Cai WW, Cheung SW, Weise A. 10p11.2 to 10q11.2 is a yet unreported region leading to unbalanced chromosomal abnormalities without phenotypic consequences. *Cytogenet Genome Res.* 2009;124(1):102-105.
- Liehr T, **Ewers E**, Kosyakova N, Klaschka V, Rietz F, Wagner R, Weise A. Handling small supernumerary marker chromosomes in prenatal diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009 May;9(4):317-324.
- Melo JB, Matoso E, Polityko A, Saraiva J, Backx L, Vermeesch JR, Kosyakova N, **Ewers E**, Liehr T, Carreira IM. Molecular cytogenetic characterization of two cases with de novo small mosaic supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 16: towards a genotype/phenotype correlation. *Cytogenet Genome Res.* 2009;125(2):109-114.
- Sheth F, **Ewers E**, Kosyakova N, Weise A, Sheth J, Desai M, Andrieux J, Vermeesch J, Hamid AB, Ziegler M, Liehr T. A small supernumerary marker chromosome present in a Turner syndrome patient not derived from X- or Y-chromosome: a case report. *Mol Cytogenet.* 2009 Nov 12;2:22.
- Sheth F, **Ewers E**, Kosyakova N, Weise A, Sheth J, Patil S, Ziegler M, Liehr T. A neocentric isochromosome Yp present as additional small supernumerary marker chromosome--

- evidence against U-type exchange mechanism?. *Cytogenet Genome Res.* 2009;125(2):115-116.
- Soysal Y, Balci S, Hekimler K, Liehr T, **Ewers E**, Schoumans J, Bui TH, İçduygu FM, Kosyakova N, Imirzalioglu N. Characterization of double ring chromosome 4 mosaicism associated with bilateral hip dislocation, cortical dysgenesis, and epilepsy. *Am J Med Genet A.* 2009 Dec;149A(12):2782-2787.
- Weise A, Mrasek K, **Ewers E**, Mkrtychyan H, Kosyakova N, Liehr T. Diagnostic applications of fluorescence in situ hybridization. *Expert Opin. Med. Diagn.* (2009) 3(4):453-460.
- Ewers E**, Yoda K, Hamid AB, Weise A, Manvelyan M, Liehr T. Centromere activity in dicentric small supernumerary marker chromosomes. *Chromosome Res.* 2010 Jul;18(5):555-562.
- Fernández-Toral J, Rodríguez L, Plasencia A, Martínez-Frías ML, **Ewers E**, Hamid AB, Ziegler M, Liehr T. Four small supernumerary marker chromosomes derived from chromosomes 6, 8, 11 and 12 in a patient with minimal clinical abnormalities: a case report. *J Med Case Reports.* 2010 Aug 3;4:239.
- Karaer K, Ergun MA, Weise A, **Ewers E**, Liehr T, Kosyakova N, Mkrtychyan H. The case of an infertile male with an uncommon reciprocal X-autosomal translocation: how does this affect male fertility?. *Genet Couns.* 2010;21(4):397-404.
- Liehr T, Wegner RD, Stumm M, Martin T, Gillessen-Kaesbach G, Kosyakova N, **Ewers E**, Hamid AB, von Eggeling F, Hentschel J, Ziegler M, Weise A. Small supernumerary marker chromosomes 1 with a normal phenotype. *J Chin Med Assoc* 2010;73(4):205–207.
- Liehr T, Karamysheva T, Merkas M, Brecevic L, Hamid AB, **Ewers E**, Mrasek K, Kosyakova N, Weise A. Somatic mosaicism in cases with small supernumerary marker chromosomes. *Curr Genomics.* 2010 Sep;11(6):432-439.
- Mkrtychyan H, Gross M, Hinreiner S, Polytiko A, Manvelyan M, Mrasek K, Kosyakova N, **Ewers E**, Nelle H, Liehr T, Volleth M, Weise A. Early embryonic chromosome instability results in stable mosaic pattern in human tissues. *PLoS One.* 2010 Mar 9;5(3):e9591.
- Mkrtychyan H, Gross M, Hinreiner S, Polytiko A, Manvelyan M, Mrasek K, Kosyakova N, **Ewers E**, Nelle H, Liehr T, Bhatt S, Thoma K, Gebhart E, Wilhelm S, Fahsold R, Volleth M, Weise A. The human genome puzzle - the role of copy number variation in somatic mosaicism. *Curr Genomics.* 2010 Sep;11(6):426-431.
- Manolakos E, Kefalas K, Neroutsou R, Lagou M, Kosyakova N, **Ewers E**, Ziegler M, Weise A, Tsoplou P, Rapti SM, Papoulidis I, Anastasakis E, Garas A, Sotiriou S, Eleftheriades M, Peitsidis P, Malathrakis D, Thomaidis L, Kitsos G, Orru S, Liehr T, Petersen MB, Kitsiou-Tzeli S. Characterization of 23 small supernumerary marker chromosomes detected at pre-natal diagnosis: The value of fluorescence in situ hybridization. *Mol Med Report.* 2010 Nov-Dec;3(6):1015-1022.
- Nelle H, Schreyer I, **Ewers E**, Mrasek K, Kosyakova N, Merkas M, Hamid AB, Fahsold R, Ujfalusi A, Anderson J, Rubtsov N, Kuchler A, von Eggeling F, Hentschel J, Weise A, Liehr T. Presence of harmless small supernumerary marker chromosomes hampers molecular genetic diagnosis: a case report. *Mol Med Report.* 2010 Jul-Aug;3(4):571-574.
- Niksic SB; Deretic VI; Pilic GR; **Ewers E**; Merkas M; Ziegler M; Liehr T. Trisomy 21 with a small supernumerary marker chromosome derived from chromosome 13/21 and 18. *BJMG* 2010, 13(1).

- Kraoua L, Chaabouni M, **Ewers E**, Chelly I, Ouertani I, Ben Jemaa L, Maazoul F, Liehr T, Chaabouni H. Hexasomy of the Prader-Willi/Angelman critical region, including the OCA2 gene, in a patient with pigmentary dysplasia: case report. *Eur J Med Genet*. 2011 Jul-Aug;54(4):e446-450.
- Liehr T, Bartels I, Zoll B, **Ewers E**, Mrasek K, Kosyakova N, Merkas M, Hamid AB, von Eggeling F, Posorski N, Weise A. Is there a yet unreported unbalanced chromosomal abnormality without phenotypic consequences in proximal 4p?. *Cytogenet Genome Res*. 2011;132(1-2):121-123.
- Liehr T, **Ewers E**, Hamid AB, Kosyakova N, Voigt M, Weise A, Manvelyan M. Small supernumerary marker chromosomes and uniparental disomy have a story to tell. *J Histochem Cytochem*. 2011 Sep;59(9):842-848.
- Manvelyan M, Cremer FW, Lancé J, Kläs R, Kelbova C, Ramel C, Reichenbach H, Schmidt C, **Ewers E**, Kreskowski K, Ziegler M, Kosyakova N, Liehr T. New cytogenetically visible copy number variant in region 8q21.2. *Mol Cytogenet*. 2011 Jan 5;4(1):1.
- Sheth F, Andrieux J, **Ewers E**, Kosyakova N, Weise A, Sheth H, Romana SP, LeLorc'h M, Delobel B, Theisen O, Liehr T, Nampoothiri S, Sheth J. Characterization of sSMC by FISH and molecular techniques. *Eur J Med Genet*. 2011 May-Jun;54(3):247-255.
- Al-Achkar W, Wafa A, **Klein E**, Aljapawe A. Biclinal myelodysplastic syndrome involving six chromosomes and monoallelic loss of RB1 - A rare case. *Mol Cytogenet*. 2011 Aug 18;4:16.
- Weise A, Mrasek K, **Klein E**, Mulatinho M, Llerena JC Jr, Hardekopf D, Pekova S, Bhatt S, Kosyakova N, Liehr T. Microdeletion and Microduplication Syndromes. *J Histochem Cytochem*. 2012 May;60(5):346-358.
- Klein E**, Manvelyan M, Simonyan I, Hamid AB, Guilherme RS, Liehr T, Karamysheva T. Centromeric association of small supernumerary marker chromosomes with their sister-chromosomes detected by three dimensional molecular cytogenetics. *Mol Cytogenet*. 2012 Mar 14;5:15.
- Klein E**, Rocchi M, Ovens-Raeder A, Kosyakova N, Weise A, Ziegler M, Meins M, Morlot S, Fischer W, Volleth M, Polityko A, Ogilvie CM, Kraus C, Liehr T. Five novel locations of Neocentromeres in human: 18q22.1, Xq27.1~27.2, Acro p13, Acro p12, and heterochromatin of unknown origin. *Cytogenet Genome Res*. 2012;136(3):163-166.
- Papoulidis I, Kontodiou M, Tzimina M, Saitis I, Hamid AB, **Klein E**, Kosyakova N, Kordaß U, Kunz J, Siomou E, Nicolaides P, Orru S, Thomaidis L, Liehr T, Petersen MB, Manolakos E. Tetrasomy 9p Mosaicism Associated with a Normal Phenotype in Two Cases. *Cytogenet Genome Res*. 2012 Apr 5.
- Hamid AB, Kreskowski K, Weise A, Kosyakova N, Mrasek K, Voigt M, Guilherme RS, Wagner R, Hardekopf D, Pekova S, Karamysheva T, Liehr T, **Klein E**. How to narrow down chromosomal breakpoints in small and large derivative chromosomes - a new probe set. *J Appl Genet*. 2012 Apr 29.
- Al-Achkar W, Wafa A, Liehr T, **Klein E**, Moassass F. Detailed analysis of an idic(Y)(q11.21) in a mosaic karyotype. *Mol Med Report*. 2012 May 29. doi: 10.3892/mmr.2012.930.
- Ou J, Wang W, Liehr T, **Klein E**, Hamid AB, Wang F, Duan C, Li H. (2013) Characterization of three small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013 Jan;26(1):106-108.

- Guilherme RS, **Klein E**, Venner C, Hamid AB, Bhatt S, Melaragno MI, Volleth M, Polityko A, Kulpanovich A, Kosyakova N, Liehr T. (2012) Human ring chromosomes and small supernumerary marker chromosomes-do they have telomeres? *Chromosome Res.* 2012 Oct;20(7):825-835.
- Hamid AB, Weise A, Voigt M, Bucksch M, Kosyakova N, Liehr T, **Klein E**. (2012) Clinical impact of proximal autosomal imbalances. *Balkan J Med Gen* 15(2).
- Liehr T, **Klein E**, Mrasek K, Kosyakova N, Guilherme RS, Aust N, Venner C, Weise A, Hamid AB. (2012) Clinical Impact of Somatic Mosaicism in Cases with Small Supernumerary Marker Chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, in press.
- Liehr T, Weise A, Hamid AB, Fan X, **Klein E**, Aust N, Othman MAK, Mrasek K, Kosyakova N. Multicolor fluorescence in situ hybridization methods in nowadays clinical diagnostics. *Exp Rev Mol Diag*
- Guilherme RS, Dutra ARN, Perez ABA, Takeno SS, Oliveira MM, Kulikowski LD, **Klein E**, Hamid AB, Liehr T, Melaragno MI. First report of a small supernumerary der(8;14) marker chromosome. *Cytogenet Genome Res*, in press.
- Guilherme RS, **Klein E**, Hamid AB, Bhatt S, Volleth M, Polityko A, Kulpanovich A, Dufke A, Albrecht B, Morlot S, Brecevic L, Petersen MB, Manolakos E, Kosyakova N, Liehr T. Human ring chromosomes – new insights for their clinical significance. *Balk J Med Genet*, in press.

7.2 Danksagung

Den Institutsdirektoren (bzw. komm. Leitern) Prof. Uwe Claussen †, Prof. Aria Baniahad und Prof. Christian Hübner danke ich für die Ermöglichung meiner Promotion am Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Jena.

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater PD Dr. rer. nat./med. habil. Thomas Liehr für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung und Förderung, für die hilfsbereite Unterstützung, für die vielen praktischen Anregungen und für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An dieser Stelle möchte ich mich bei alle Menschen bedanken, die mir die Durchführung diese Arbeit ermöglicht und erleichtert haben.

Frau Dr. Anja Weise und Frau Dr. Kristin Mrasek danke ich besonders für die fachliche Beratung in praktischen Angelegenheiten, sowie für die vielen Anregungen und für ihre moralische Unterstützung.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Zytogenetik danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und insbesondere Frau Monika Ziegler für die praktischen Hilfestellungen. Der Abteilung Zytogenetik danke ich für die Aufarbeitung der Lymphozyten-suspensionen.

Prof. Kinya Yoda (Nagoya University, Japan) danke ich für die Bereitstellung des anti-guinea-pig-CENP-C-Antikörpers.

Weiterhin danke ich Dr. Birch-Hirschfeld (Institut für Virologie, FSU Jena) für die Bereitstellung des verwendeten DOP-Primers.

Dr. D. Hardekopf danke ich für die Bereitstellung der BAC-Sonden.

Frau Dr. Marianne Volleth danke ich für die Generierung der sSMC-Zelllinien.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann, der immer für mich da ist und mir den nötigen Halt gibt, und ohne dessen stetige und liebevolle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich herzlich für deren immerwährende moralische und liebevolle Unterstützung danken, und besonders meinen Eltern für das geduldige und ausführliche Korrekturlesen des Manuskripts. Vielen Dank!

7.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hier mit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgenden Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. rer. nat./med. habil. Thomas Liehr und Dr. Anja Weise,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere Wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 25.03.2013

Elisabeth Klein