

**Charakterisierung der chromosomalen Bandenaufspaltung an
den humanen Chromosomen 5, 6, 18, 19, 20 und X**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

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

von Heike Maria Nelle, geb. Lehrer
geboren am 14.06.1980
in Neumarkt

Gutachter

1. PD Dr. rer. nat./ med. habil Thomas Liehr
2. Prof. Dr. Stephan Diekmann
3. Prof. Dr. Günter Theißen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.07.2006

„Wer mit dem Strom schwimmt,
erreicht die Quelle nie.“

Peter Tille,
dt. Schriftsteller

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Entdeckung der Chromosomen	2
1.2 Bedeutung der Chromosomen	2
1.3 Struktur der Chromosomen	3
1.4 Charakterisierung der Chromosomen und Nomenklatur	4
1.5 Methoden der Chromosomendiagnostik	
1.5.1 Chromosomendiagnostik in der Zytogenetik	8
1.5.2 Chromosomendiagnostik mit Hilfe der molekularen Zytogenetik	9
1.6 Aktueller Forschungsstand zur Chromosomenarchitektur	13
1.7 Zielstellung der Arbeit	15

2. Material und Methoden

2.1 Lymphozytenanzucht und Chromosomenpräparation	17
2.1.1 Konventionelle Chromosomenpräparation (400-500 Banden)	17
2.1.2 Präparation kurzer Chromosomen (300-400 Banden)	19
2.1.3 Präparation langer Chromosomen (550-800 Banden)	20
2.1.3.1 Methotrexat-Thymidin-Methode	20
2.1.3.2 BrdU-Methode (nach Scheres et al., 1982)	21
2.2 MCB-Sondenherstellung	22
2.2.1 Mikrosezierung	22
2.2.2 Markierungs-PCR	22
2.2.3 DNA-Fällung	24
2.3 Hybridisierung	24
2.3.1 Behandlung der Objektträger	24
2.3.1.1 Pepsinverdau	25
2.3.1.2 Denaturierung	26
2.3.2 Behandlung der Sonden-DNA	27
2.3.3 Auftragen der Sonden-DNA	28
2.4 Detektion	28
2.5 Auswertung	30

3. Ergebnisse	
3.1 Auswahl der geeigneten Pseudofarben	31
3.2 Verifizierung der Aufspaltungsverhältnisse	32
3.3 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom 5	34
3.4 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom 6	40
3.5 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom X	44
3.6 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom 18	48
3.7 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom 19	51
3.8 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom 20	54
4. Diskussion	
4.1 Neue Erkenntnisse zur Subbandenaufspaltung	57
4.2 Verifizierung der Aufspaltungsverhältnisse	62
4.3 Notwendigkeit einer neuen Nomenklatur	64
4.4 Bedeutung für die physikalische Kartierung von Genen	66
4.5 Grenzen des MCB	66
5. Ausblick	68
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis	71
8. Publikationen	79
Anhang	
- Markierungsschemata	81
- Original MCB-Bilder	83
- Pseudofarbdateien	86

Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes, deionisiertes Reinstwasser
BAC	künstliches, bakterielles Chromosom (bacterial artificial chromosome)
CCD-Kamera	gekühlter, ladungsgekoppelter Bildsensor (charge coupled device-Kamera)
chr	Chromosom
DAPI	4'-6'-Diamino-2-Phenylindol
dATP	2'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-cytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat
DOP-PCR	PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern
dUTP	2'-Desoxy-uridin-5'-triphosphat
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GTG	G-Bänderung mit Trypsin und Giemsa
max	maximal
MCB	hochauflösendes Vielbänderungsverfahren
Midi-MCB	ein auf Mikrosezierung basierendes MCB
o.g.	oben genannte
OT	Objektträger
p-Arm	kurzer (petite) Arm eines Chromosoms
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pcp	Teilchromosomsonde (partial chromosome painting)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration
PHA	Phytohämagglutinin

q-Arm	langer (quene) Arm eines Chromosoms
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAR	Scaffold attachment region
SG	Spectrum Green
SO	Spectrum Orange
SSC	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat (standars saline citrate)
SSCT	SSC mit Tween (Detergenz)
SSCTM	SSCT mit Marvel (Trockenmilch)
Tab.	Tabelle
TR	Texas Red
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
wcp	Ganzchromosomensonde (whole chromosome painting)
YAC	künstliches Hefechromosom (yeast artificial chromosom)
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Die Humanzytogenetik, die sich als eigenständige Forschungsrichtung innerhalb der Humangenetik etabliert hat, befasst sich mit der Darstellung und Analyse der menschlichen Chromosomen. Zytogenetische Aufarbeitungsmethoden, sowie eine Vielzahl von Bänderungsmethoden prägten das heutige Verständnis vom Verhalten der Chromosomen sowohl während der Präparation, als auch im Verlauf des Zellzyklus.

Die Beschreibung der zellzyklus-gebundenen Aufspaltung chromosomaler Banden in ihre Subbanden ist in der human-zytogenetischen Diagnostik und Forschung von grundlegender Bedeutung. Die Reihenfolge dieser Aufspaltung – im Folgenden Hierarchie der Bandenaufspaltung genannt – ist für die menschlichen Chromosomen im *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN 1995) dokumentiert. Jedoch basiert diese Auflistung lediglich auf rein morphologischen Vergleichen der chromosomalen Bänderung auf 3 unterschiedlich hohen Auflösungsstufen (400, 550 und 850 Banden pro haploiden Chromosomensatz) und deren daraufhin weitgehend willkürlich festgelegten Nomenklatur, nicht jedoch auf systematischen Untersuchungen, welche zeigen würden, wie sich die einzelnen Banden in ihre Subbanden in Relation zur chromosomalen Länge aufspalten.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass diese allgemein akzeptierte und angewandte Nomenklatur zu einigen missverstandenen Schiefagen im Bezug auf unsere Vorstellung vom Verhalten der Chromosomen führte, wie etwa der Tatsache, dass entgegen der, in der ISCN veröffentlichten Angaben, aus Giemsa-hellen Banden keine Subbanden hervorgehen können, bestehen berechtigte Zweifel an der biologischen Korrektheit dieser Daten.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Hierarchie der Aufspaltung von chromosomalen Banden an ausgewählten menschlichen lymphozytären Chromosomen, den Chromosomen 5, 6, 18, 19, 20 und X, systematisch untersucht. Durch die Kombination aus Multicolor-banding- und GTG-Bänderungs-Analysen auf den, der ISCN 1995 entsprechenden Bandenniveaus, konnte für die genannten Chromosomen erstmals die tatsächliche Herkunft der Subbanden nachvollziehbar wiedergegeben werden. Die Ergebnisse führten zu einem besseren Verständnis der Aufspaltung chromosomaler Banden und zu einer wesentlichen Korrektur, der in der ISCN 1995 angegebenen Nomenklatur.

1.1 Entdeckung der Chromosomen

Die Grundlagen der klassischen Zytogenetik, welche sich mit der Darstellung und Analyse von Chromosomen beschäftigt, wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts durch die beiden deutschen Forscher Arnold (1879) und Flemming (1880) geschaffen, die jeweils unabhängig voneinander menschliche Chromosomen erstmals beschrieben. Den Begriff Chromosom, aus dem Griechischen chromos = Farbe und soma = Körper, prägte Waldeyer 1888 aus der Beobachtung, dass es sich hierbei um „anfärbbare Körperchen“ handelt. Ein Jahr darauf war es wiederum Flemming, der die Trennung von Schwesterchromatiden während der Mitose beschrieb und als Erster die Begriffe Mitose, Chromatin, Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase einführte. Die Zahl der menschlichen Chromosomen wurde ursprünglich auf 48 festgelegt und konnte erst durch Verbesserungen auf dem Gebiet der Chromosomenpräparation, wie etwa der Verwendung hypotoner KCl-Lösung (Hsu, 1952) im Jahre 1956 von Tijo und Levan mit der korrekten Anzahl von 46 Chromosomen ($2n = 46$ mit 44 Autosomen und 2 Gonosomen, XX im weiblichen oder XY im männlichen Geschlecht) bestimmt werden.

1.2 Bedeutung der Chromosomen

1904 postulierte Sutton die Lokalisation von Mendels Vererbungs-faktoren auf den Chromosomen, und charakterisierte damit selbige in seiner „Chromosomentheorie der Vererbung“ als Träger der Erbanlagen. Dass Veränderungen der Chromosomenzahl und / oder –struktur pathologische Auswirkungen nach sich ziehen, konnte im Jahre 1959 durch die Beschreibung dreier unterschiedlicher numerischer Chromosomenaberrationen, nämlich der Trisomie 21 (Lejeune et al., 1959), dem Klinefelter-Syndrom (Jacobs und Strong et al., 1959) und dem Turner-Syndrom (Ford et al., 1959) gezeigt werden. Mit dieser Erkenntnis konnte nun eine Erklärung für zahlreiche weitere Fehlbildungssyndrome gefunden werden.

1.3 Struktur der Chromosomen

Chromosomen bestehen zu einem Drittel aus dem DNA - Doppelstrang und zu zwei Dritteln aus sauren und basischen Proteinen, die sich wiederum zu einem Drittel in Histone und zu zwei Dritteln in Nicht-Histon-Proteine unterteilen. Je 8 basische Histone bilden ein sog. Nukleosom, worum sich 146 Basenpaare des DNA-Doppelstrangs winden. Die einzelnen Nukleosomen sind über Spacer, (kurze DNA-Stücke) miteinander verbunden und bilden somit den Chromatinfaden (Claussen J. et al., 2001). Dieser Chromatinfaden ist nach bisherigem Forschungsstand (Saitoh und Laemmli, 1994) in Schlaufen (loops) gelegt, wobei jede Schlaufe an ein weiteres Grundgerüst (scaffold) aus Nicht-Histon-Proteinen angegliedert ist. Weitere, nicht näher bezeichnete Verwindungen dieses Gerüst-Schlaufen-Komplexes bilden dann die eigentliche Chromatide, von denen jedes Chromosom 2 identische, sog. Schwesterchromatiden enthält, die am Zentromer miteinander verbunden sind (siehe Abb.1)

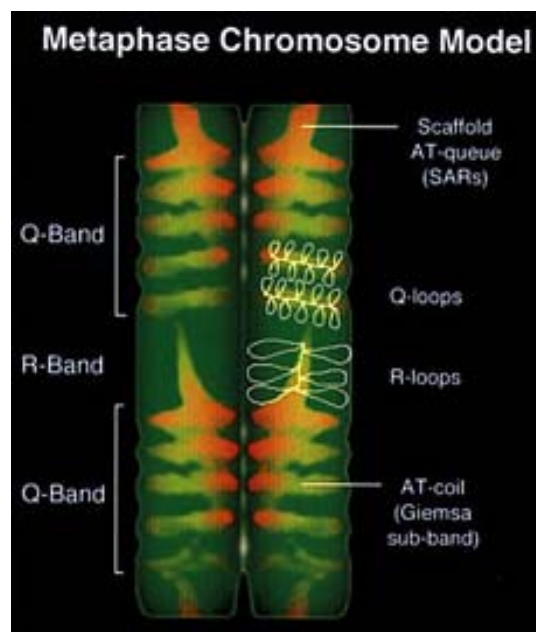


Abb. 1: „loop-scaffold-Modell“ von Saitoh und Laemmli, 1994, zeigt den Aufbau der Chromatiden aus dem in Schlaufen (loops) gelegten Chromatinfaden, wobei jede Schlaufe an ein Grundgerüst (scaffold) aus Nicht-Histon-Proteinen gekoppelt ist.

Dieses Modell wird auch für die Entstehung von GTG-Banden verantwortlich gemacht. Demnach befinden sich Bereiche mit dichtgepackten SAR's in den G- positiven Banden, während die mehr entfaltenen SAR's in den G – negativen Banden vorliegen (Saitoh und Laemmli, 1994, siehe Abb. 1).

1.4 Charakterisierung der Chromosomen und deren Nomenklatur

Die Einführung der Bänderungsmethoden Ende der Siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts (Caspersson et al., 1970) erlaubte erstmals eine genaue Identifizierung jedes einzelnen Chromosoms und machte einen differenzierteren Einblick in die Chromosomenfeinstruktur, sowie in strukturelle Chromosomenanomalien möglich. Zu nennen ist hierbei vor allem die GTG-Bänderungstechnik (G - bands by Trypsin using Giemsa, Seabright, 1971), die bis heute als eine Standardmethode in der zytogenetischen Diagnostik routinemäßig angewendet wird. Eine weitere Möglichkeit der Darstellung von Chromosomen ist die Q-Bänderung, die durch das Anfärben AT-reicher DNA-Regionen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Quinacrin entsteht und in etwa den G-Banden entspricht (Caspersson et al., 1972), sowie die R-Bänderung (Dutrillaux und Lejeune et al., 1971), bei der vor der Färbung mit dem Giemsafarbstoff eine Salzsäuredenaturierung durchgeführt wird und dadurch ein zum Giemsa-banding reverses Bandenmuster entsteht.

Diese Entwicklungen auf dem Sektor der Bänderungstechniken und der dadurch bedingten besseren Charakterisierungsmöglichkeiten von Chromosomen führten zur Entstehung der derzeit gültigen Nomenklatur menschlicher Chromosomen, dem sog. „International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ (ISCN, 1995).

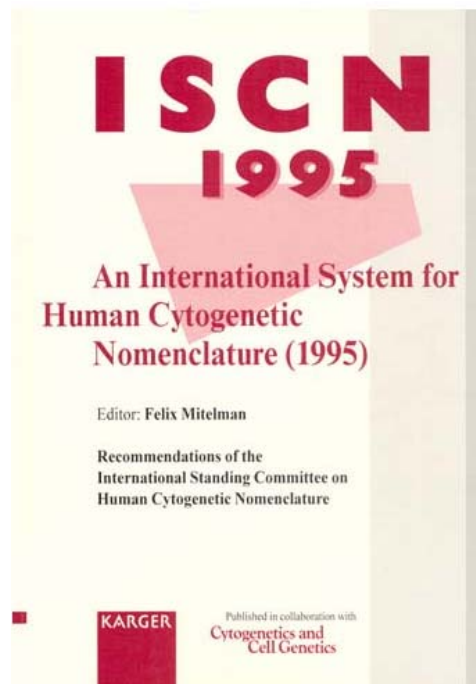


Abb.2 : Aktuelle Ausgabe der ISCN mit der derzeit gültigen Nomenklatur der menschlichen Chromosomen.

Seit Tijo und Levan im Jahre 1956 die Zahl der menschlichen Chromosomen korrekt mit 46 bestimmten, entstand ein neues und verstärktes Interesse an der humanen Zytogenetik. Zahlreiche Labore weltweit begannen die menschlichen Chromosomen genauer zu untersuchen und zu klassifizieren mit dem Ziel, diese überhaupt einzeln identifizieren zu können. Schließlich fand sich eine Fülle von Nomenklaturvorschlägen, die sich zum Teil erheblich voneinander unterschieden und daher zu großer Verwirrung unter den Wissenschaftlern führte. Um dieser Verwirrung ein Ende zu bereiten, trafen sich im Jahre 1960 auf der berühmt gewordenen Denver – Konferenz zum ersten Mal anerkannte Forscher, um eine weltweit gültige Nomenklatur herauszugeben, die dann als Hilfs- und Verständigungsmittel in der gesamten Zytogenetik verwendet werden sollte. Von diesem Zeitpunkt an folgten regelmäßige Konferenzen, auf denen jeweils die neuesten zytogenetischen Erkenntnisse in die Nomenklatur mit aufgenommen wurden. So einigte man sich zum Beispiel auf eine Einteilung der Chromosomen nach ihrer Größe und Lage des Zentromers in 7 Gruppen A – G. Unter A wurden die großen metazentrischen Chromosomen 1 – 3 zusammengefasst, unter B die großen submetazentrischen Chromosomen 4 und 5, Gruppe C enthält die mittelgroßen metazentrischen und submetazentrischen Chromosomen 6 – 12, inklusive X, Gruppe D umfasst die mittelgroßen akrozentrischen Chromosomen 13 – 15, Gruppe E bezeichnet die relativ kurzen meta – und submetazentrischen Chromosomen 16 – 18, Gruppe F die kurzen metazentrischen Chromosomen 19 – 20 und Gruppe G zuletzt die kurzen akrozentrischen Chromosomen 21, 22 und Y (siehe ISCN 1995)

Ein weiterer bedeutender Schritt in der Entstehung dieser internationalen Nomenklatur erfolgte im Jahre 1970, als Caspersson zum ersten Mal einen gebänderten menschlichen Karyotyp vorstellte. Nunmehr konnten Chromosomen nicht mehr nur an ihrer Größe identifiziert werden, sondern auch anhand ihres Bänderungsmusters. Dies führte 1971 auf der Paris-Konferenz zu einem erneuerten Nomenklaturvorschlag unter Würdigung und Miteinbeziehung dieser Bänderungsverfahren (Pariser Konferenz, 1971).

1977 in Stockholm war dann schließlich die Geburtsstunde einer international gebräuchlichen Nomenklatur. Im Sinne einer Überarbeitung und Zusammenfassung aller bisherigen Treffen sollte nun ein ständiges Komitee von Wissenschaftlern die weiteren Entwicklungen in der Zytogenetik im Auge behalten und eine stets aktuelle Nomenklatur herausgeben. Der Titel dieser Nomenklatur lautete: „An International System for Human Cytogenetics“, abgekürzt ISCN (ISCN 1978). Die Erstausgabe der ISCN erschien 1978 unter folgendem, heute noch gültigem Nomenklaturvorschlag: Die Einteilung der Chromosomen nach ihrer Größe und ihrem Zentromer in die Gruppen A – G von 1963 wurde beibehalten. Zur näheren

Charakterisierung der durch GTG – Färbung hervorgebrachten spezifischen Banden sollte ein einfaches Nummerierungssystem dienen. Beginnend am Zentromer, welches bei allen menschlichen Chromosomen die Nummerierung 11 erhielt, wurden sowohl für den p – Arm, als auch für den q – Arm alle GTG – Banden vom Zentromer in Richtung Telomer in aufsteigender Reihenfolge durchnummeriert. Hierfür wurden zunächst für jedes Chromosom charakteristische Banden als Orientierungspunkte bestimmt. Diese Orientierungspunkte stellen gewisse Bereiche eines Chromosoms dar, bei denen einzig und allein der Wiedererkennungswert dieser Bereiche zählt, ohne eine Unterscheidung zwischen GTG – positiven und – negativen Bereichen vorzunehmen. Nach jedem dieser Orientierungsbanden (maximal 3 pro langem oder kurzem Arm) erhöht sich die Nummerierung distalwärts um 1. Erscheinen zwischen 2 spezifischen Orientierungsbanden weitere Banden, die nicht zuvor als charakteristische Orientierungspunkte festgelegt wurden, wird der zugehörigen Nummerierung eine zweite Ziffer, wiederum beginnend mit 1, hinzugefügt. Diese erhöht sich ebenfalls in distaler Richtung jeweils um 1, bis zu einer maximalen Anzahl von 9 Banden zwischen 2 Orientierungsbanden. Zum besseren Verständnis sei hier die Bande 1p21 als Beispiel aufgeführt: 1p bezeichnet den kurzen Arm von Chromosom 1; 2 steht für die zweite Orientierungsbande in diesem Arm und 1 bezeichnet die erste Bande innerhalb der zweiten Orientierungsbande. Spaltet sich nun eine der nach diesem Prinzip benannten chromosomalen Banden in weitere Subbanden auf, werden diese ebenfalls in distaler Richtung nach einem Punkt hinter der Bandenbezeichnung durchnummeriert (Abb. 3).

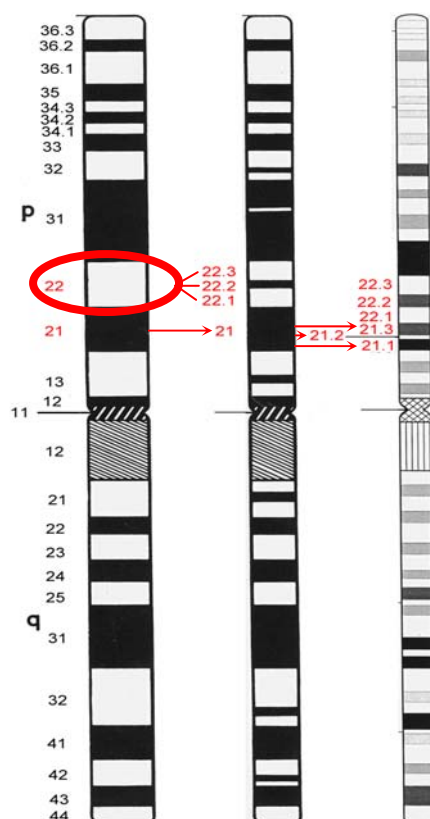


Abb. 3: Aufspaltung von chromosomalen Banden in Subbanden an Beispiel von Chromosom 1, nach der derzeit gültigen Nomenklatur der ISCN 1995; der GTG-dunklen Bande 1p21 wird demzufolge eine Aufspaltung in die Subbanden 1p21.1, 1p21.2 und 1p21.3 zugewiesen (rote Pfeile); nach demselben Schema erhält die GTG-helle Bande 1p22 (rote Ellipse) die Aufspaltungen in die Subbanden 1p22.1, 1p22.2 und 1p22.3 (rote Striche).

So entstehen nach Auffassung der ISCN aus der giemsa-hellen Bande 1p22 die 3 Subbanden 1p 22.1, 1p22.2 und 1p22.3. Bei einer weiteren Unterteilung von Subbanden wird eine zweite Ziffer nach dem Punkt hinzugefügt, wie immer bei 1 beginnend in distaler Richtung jeweils um 1 ansteigend. Diese noch tiefer gehende Nomenklatur war vor allem ab dem Jahre 1981 nötig, dem Erscheinungsjahr der zweiten Auflage der ISCN, da in den Jahren 1975 und 1976 durch die Studien von Dutrillaux bzw. Yunis an Prophase- und Prometaphase-Chromosomen (Dutrillaux B., 1975 und Yunis J.J., 1976) diese winzigen Subbanden erst durch hochauflösende Kultivierungs- und Bänderungsmethoden sichtbar gemacht werden konnten. Auch hier sei nochmals darauf hingewiesen, dass diese sog. „einfache Durchnummerierung“ von Banden und Subbanden nur als Hilfsmittel für eine bessere Orientierung auf dem Chromosom und einer möglichst leichten Verständlichkeit diene, jedoch in keinsten Weise ein Schema über die Abstammung der einzelnen GTG – positiven und - negativen Banden

darstellte, da zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei biologische Erkenntnisse auf diesem Gebiet vorlagen.

1985 erschien eine Neuauflage der ISCN, jedoch ohne wesentliche Änderungen in der Nomenklatur. 1991 folgte eine weitere Neuauflage mit einem zusätzlichen Leitfaden für eine Nomenklatur in der Tumorzytogenetik. In der bisher neuesten Ausgabe der ISCN von 1995 wurden schließlich auch die Erkenntnisse aus der *in-situ*-Hybridisierungstechnik berücksichtigt (siehe Abb. 4). Desweiteren sei hier noch erwähnt, dass sich die ISCN nicht nur mit der Nomenklatur von Chromosomen beschäftigte, sondern auch eine umfassende Nomenklatur für die Beschreibung aberranter Karyotypen entwickelte, auf die in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen wird, da alle Untersuchungen an unauffälligen Metaphasen vorgenommen wurden (siehe ISCN 1995).

1.5 Methoden der Chromosomendiagnostik

1.5.1 Chromosomendiagnostik in der Zytogenetik

Die Möglichkeit menschliche Chromosomen in Form eines Karyogramms darzustellen und zu untersuchen verhalf der Zytogenetik ihre führende Position in der humangenetischen Diagnostik einzunehmen. Derzeit können Chromosomenanalysen sowohl pränatal, an noch ungeborenen Kindern, z.B. nach Amniozentese, nach Chorionzottenbiopsie, aus Nabelschnurblut oder im Rahmen der allerdings in Deutschland nicht erlaubten Präimplantationsdiagnostik, als auch postnatal aus Lymphozyten sowie Fibroblasten routinemäßig durchgeführt werden. Indikationen für eine solche zytogenetische Untersuchung sind meist ein erhöhtes mütterliches Alter, sonografische Auffälligkeiten des Foeten, postnatale Auffälligkeiten bei Kindern, sowie die Abklärung habitueller Aborte oder ungewollter Kinderlosigkeit (Strachan und Read, 2005).

Die Zytogenetik erlaubt jedoch nur eine Beurteilung des menschlichen Genoms mit einer Auflösung von 4–6 Mio. Basenpaaren, d.h., dass neben numerischen Aberrationen nur die korrekte Anzahl von Banden und deren Abfolge überprüft werden kann. So bleibt eine Vielzahl weiterer, kleinerer oder größerer Chromosomenanomalien aufgrund der Zytogenetik allein oft ungeklärt. Eine Lösung dieses Problems, bietet der Einsatz der molekularen Zytogenetik.

1.5.2 Chromosomendiagnostik mit Hilfe der molekularen Zytogenetik

Die molekulare Zytogenetik in Form der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) beschäftigt sich mit der Markierung genetischen Materials auf den Chromosomen und deren fluoreszenz-optischen Darstellung.

Die Methode wurde erstmals 1986 von Pinkel et al. vorgestellt. Hierbei werden DNA-Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (direkte Methode) oder über Haptene, wie Biotin und Digoxigenin (indirekte Methode) über Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1988) oder Nick Translation (Rigby et al., 1977) markiert und im Anschluss denaturiert, so dass die DNA dann als Einzelstrang vorliegt. Die Metaphasechromosomen, die zur Hybridisierung auf dem Objektträger (OT) verwendet werden sollen, werden ebenfalls denaturiert. Während des folgenden Hybridisierungsvorgangs kann nun die markierte Sonden-DNA an die homologen Sequenzen der chromosomalen Ziel-DNA auf dem OT binden und über eine Auswertung der Fluoreszenzsignale an einem entsprechenden Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 4).

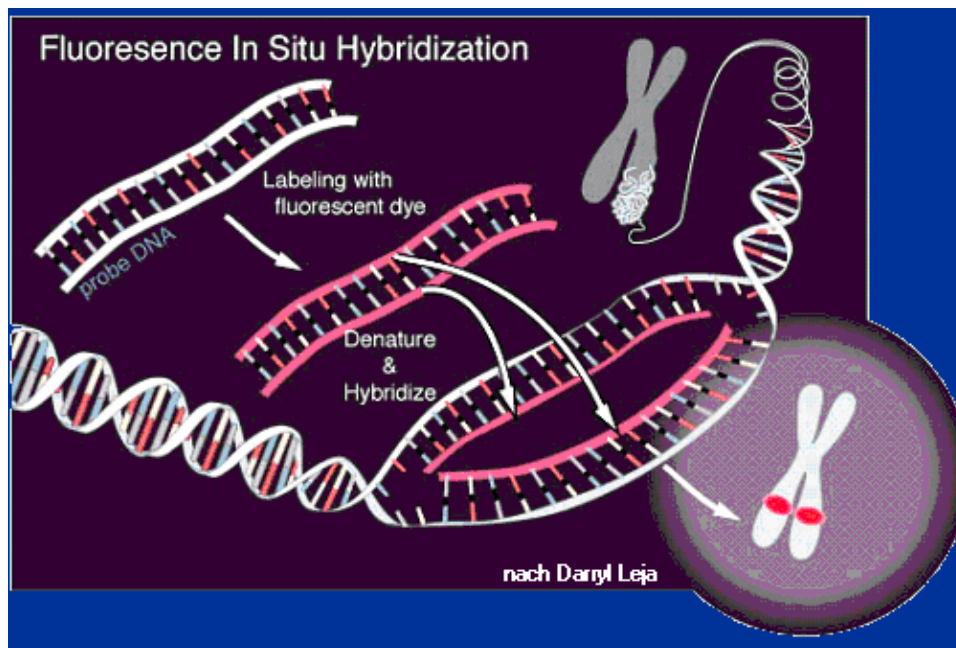


Abb. 4: Prinzip der Fluoreszenz – *in – situ* - Hybridisierung: Die markierte und denaturierte Proben-DNA bindet an die ebenfalls denaturierte Ziel-DNA; nach der Hybridisierung ist der markierte DNA-Bereich als Fluoreszenzsignal sichtbar (<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/fish.html>).

Durch das zunehmende Interesse an der FISH-Technik und ihren sich bietenden diagnostischen Möglichkeiten, vollzogen sich in den letzten 10-15 Jahren enorme Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der molekularen Zytogenetik.

1989 konnte Nederlof und Mitarbeiter erstmals die gleichzeitige Darstellung von 3 Zielsequenzen mit 3 unterschiedlichen Farbstoffen vorstellen. Aus dieser technischen Errungenschaft ging 1996 die Weiterentwicklung zur gleichzeitigen Darstellung des gesamten menschlichen Karyotyps in 24 verschiedenen Farben in nur einem Hybridisierungsschritt hervor (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996). Diese unabhängig voneinander entstandenen Methoden, die sich nur durch ihre Auswertungstechnik unterscheiden, bezeichnet man als „Spectral Karyotyping“ (SKY) und „Multiplex-FISH“ (M-FISH). Hierbei werden Sonden für jeweils ein gesamtes Chromosom, sog. whole-chromosome-painting-Sonden (wcp`s), die durch Mikrosezierung oder *flow sorting* gewonnen werden, mit 5 Fluorochromen markiert, wodurch für jedes Chromosom eine andere Farbkombination entsteht. Mit Hilfe dieser Techniken war es nun möglich chromosomale Translokationen zu charakterisieren und z.B. die Herkunft von Markerchromosomen zu bestimmen. Jedoch blieben intrachromosomale Veränderungen, wie Inversionen, Duplikationen und Deletionen weiterhin unerkannt.

Erst die Entwicklung von FISH-Bänderungsverfahren bot hierfür eine Lösung (Liehr et al., 2002b). Zu erwähnen sind hier vor allem der *chromosome barcode* (Lengaur et al., 1993), *RX-FISH* (Müller et al., 1998), *SCAN* (Kakazu et al., 2003), sowie das *MCB* (Chudoba et al., 1999), welches für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Das Prinzip des MCB beruht darauf, dass mit Hilfe der Mikrosezierung DNA-Banken gewonnen werden, die das ganze Chromosom abdecken und sich in den Randbereichen überlappen. Dies garantiert eine lückenlose Abdeckung des Chromosoms mit DNA-Proben und damit das Vermeiden von nicht-informativen Lücken. Diese DNA-Banken wurden mit 5 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Ziel dieser Markierung ist, die einzelnen DNA-Banken, sowie die überlappenden Regionen zwischen 2 DNA-Banken durch unterschiedliche Fluorochrome bzw. jeweils einzigartige Kombinationen mehrerer Fluorochrome zu charakterisieren. Die Auswertung erfolgte mit einer speziellen Software (ISIS von Metasystems[®]). Sie ist in der Lage, das auf diese Art markierte Chromosom automatisch in eine definierte Anzahl von Segmenten zu unterteilen, den Farbcode eines jeden Segments zu ermitteln und als Farbklassifikator zu speichern. Somit kann jedem Pixel eine Pseudofarbe zugeordnet werden, was schließlich ein Vielfarben-Bänderungsmuster des Chromosoms ergibt (Abb. 5).

Mittlerweile existiert ein MCB-Sondenset für alle 24 menschlichen Chromosomen (Liehr et al., 2002a), sowie die Weiterentwicklung zu einem MCB-Sondenset, das das gesamte menschliche Genom in nunmehr einem Hybridisierungsschritt darstellen kann (m-MCB von Weise et al., 2003).

Das MCB hat sich vor allem in der Diagnostik von exakten Bruchpunktlokalisationen (Lemke et al., 2001) und intrachromosomalen Rearrangements, wie z.B. interstitiellen Deletionen, Inversionen und Duplikationen (Starke et al., 2001, Weise et al., 2002, Kuchler et al., 2001) durchgesetzt. Es findet jedoch auch Anwendung in ZOO-FISH-Studien (Mrasek et al., 2001), sowie an Untersuchungen zu Interphase-Chromosomen (Lemke et al., 2002, Weise et al., 2002a).

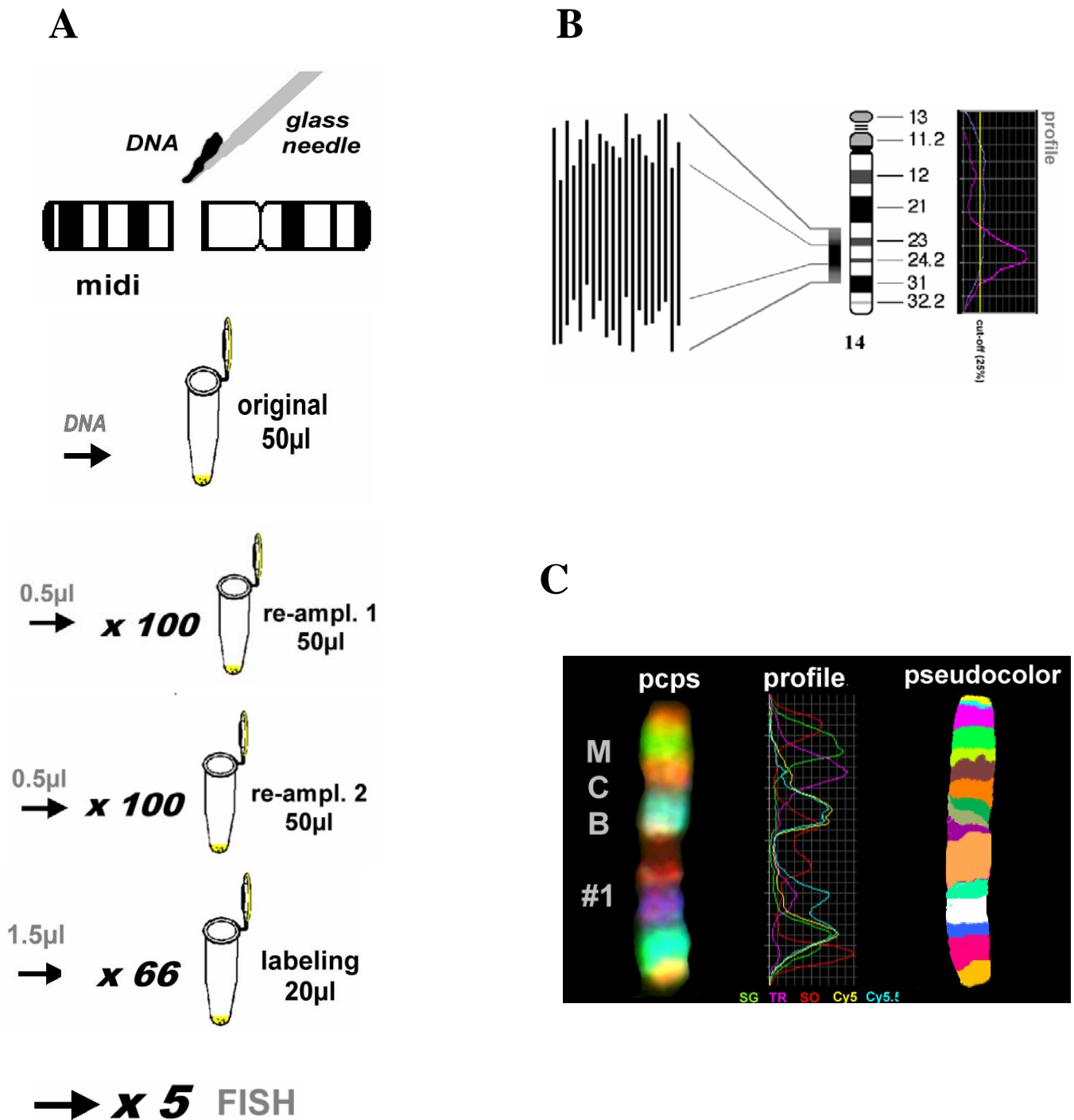


Abb. 5: Prinzip des MCB (Liehr et al., 2002a).

Zu A: Prinzip der Glasnadel-Mikrosezierung, Vervielfältigung und Markierung.

Zu B: Anzahl und chromosomaler Bereich einer MCB-Bank nach Mikrosezierung.

Zu C: Prinzip der überlappenden Einzelbanken dargestellt für das Chromosom 1 in den Echtfarben, den Fluorochromprofilen und den Pseudofarben.

1.6 Aktueller Forschungsstand zur Chromosomenarchitektur

In den letzten Jahren konnten auf dem Gebiet der Chromosomenstruktur zwei bedeutende Fortschritte errungen werden, die einen Großteil bisheriger Anschauungen, die unter anderem auch aufgrund der ISCN-Nomenklatur vertreten wurden, widerlegen konnten.

Zum einen sei hier die Untersuchung der Interphase-Chromosomen-Architektur mittels MCB erwähnt, die das Prinzip der Chromosomendekondensation während des Zellzyklus grundlegend neu beleuchtete. Durch die bisherige Vorstellung einer scheinbaren Kondensierung des Chromatinfadens während der Mitose, glaubte man, dass die Chromosomen während der verschiedenen Mitosestadien über unterschiedliche Längen verfügten. So war man etwa der Annahme, dass Metaphasechromosomen aufgrund des Kondensierungsprozesses relativ kurz seien, wohingegen Interphasechromosomen durch eine völlige Entspiralisierung des Chromatinfadens in extrem langer Form vorlägen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Chromosomen in der Interphase in etwa die gleiche Länge und auf DNA-Ebene auch das gleiche Bandenmuster aufweisen wie Metaphasechromosomen und demnach nicht im konventionellen Sinne entspiralisiert sind. Chromosomen bleiben also während aller Zellzyklusphasen in ihrer DNA-vermittelten Bandenstruktur erhalten. Desweiteren findet die so geglaubte Kondensation der Chromosomen im Wesentlichen in der Breite der Chromosomen statt, und weniger in deren Länge (Claussen et al., 2002; Lemke et al., 2002; Weise et al., 2002a). Trotz der hohen Reproduzierbarkeit der chromosomalen Bandenmuster, die letztendlich erst zur Theorie der Chromosomendekondensation führten, sind sie stets nur ein reproduzierbares präparationsbedingtes Artefakt, welches in vivo in menschlichen Chromosomen in dieser Form nie auftritt. Man geht jedoch davon aus, dass die konventionelle Chromosomenpräparation die chromosomale Struktur in ähnlicher Weise verändert, wie dies auch im Interphasekern lebender Zellen während der Transkription geschieht, so dass hier der wahren Grund für die hohe Reproduzierbarkeit gesehen werden kann.

Zum anderen verhalf die Methode des sog. Chromosomen-Stretching zu wesentlichen neuen Einblicken in den Aufbau von Chromosomen, vor allem über die unterschiedlichen Eigenschaften von GTG-hellen und –dunklen Banden. Claussen und Mitarbeiter entwickelten im Jahre 1994 aus den Erfahrungen aus dem Bereich der Mikrosezierung ein Verfahren zum Dehnen von Chromosomen, das sog. *chromosome stretching* (Claussen et al., 1994). Basierend auf der Beobachtung, dass sich Chromosomen in wässriger Umgebung beim Einstechen der Glasnadel während der Mikrosezierung weich und elastisch verhalten und der

Glasnadel zum Teil sogar etwas ausweichen, gelang es, Metaphase-Chromosomen, welche auf Deckgläschen aufgetropft und GTG – gefärbt wurden, mit Hilfe einer in der Mikrosezierung verwendeten Glasnadel von der Unterlage abzuheben und über eine Steuerung am Mikromanipulator unter Sichtkontrolle an einem Inversmikroskop in die Länge zu ziehen, von einem ursprünglichen 400 – Bandenniveau bis hin zu 1600 Banden. Dies war jedoch nur an „nicht gealterten“ Chromosomen in einem feuchten Milieu möglich, weil gealterte und trockene Chromosomen keine dehbare Konsistenz mehr aufweisen. Da das Inversmikroskop über eine Kamera an einen Monitor angeschlossen war, konnte der Dehnungsprozess der Chromosomen und das Aufspaltungsverhalten der GTG – Banden in Subbanden genau verfolgt und auf Video aufgezeichnet werden.

Nach Entdeckung des *chromosome-stretching* begannen Hliscs et al., 1997 mit einer detaillierten Untersuchung über das Dehnverhalten von Chromosom 6. Mit demselben Versuchsaufbau wie von Claussen zuvor beschrieben, zeigte er, dass von 400 zu 1400 Banden gestreckte Chromosomen 6 ein durchgehend reguläres Bandenmuster aufweisen. Desweiteren beobachtete er, dass G-pos. Banden leicht gestreckt werden können und zu einer Aufspaltung in je 3 - 6 G-pos. und 2 – 5 G-neg. Subbanden führen, wohingegen G-neg. Banden aus dem 400 Banden- Ausgangsstadium während des Dehnungsvorgangs unverändert bleiben. Dies ließ ihn schlussfolgern, dass chromosomale Subbanden nur aus GTG – dunklen Banden hervorgehen und GTG – helle Banden aus dem 400 Bandenstadium in einem früheren Präparationsschritt möglicherweise schon vorgedehnt werden und deshalb keine weitere Dehnung mit *chromosome stretching* mehr möglich ist (oder eine regionale Schwellung von Proteinen, die zum Erscheinen der hellen und dunklen Banden im 400 – Bandenstadium führt [Claussen et al., 2002]). Mit dem Wissen darüber, welche Subbanden aus welchen Banden hervorgehen, war er in der Lage, ein neues hochauflösendes Ideogramm von Chromosom 6 zu erstellen, in dem, im Gegensatz zum gebräuchlichen ISCN – Ideogramm, alle Subbanden aus GTG – dunklen Banden hervorgehen. Eine weitere Hypothese, die aus dieser Arbeit entstand, war die Annahme, dass in den GTG – dunklen Banden, die sich aufspalten und für Hliscs daher das Zentrum der Kondensierung von Chromosomen darstellen, die DNA folglich dichter gepackt sein muss, als in GTG – hellen Banden und durch das Dehnen sozusagen entpackt wird. Diese Erklärung deckt sich mit den Erkenntnissen von Saitoh und Laemmlli (1993 und 1994) über die Entstehung von GTG – Banden.

Im Jahre 2001 begannen Kuechler et al., diese Aussagen am kurzen Arm des Chromosoms X zu verifizieren. Auch ihr gelang es, mit Hilfe von *chromosome stretching* ein reproduzierbares Bandenmuster auf dem 1400 Bandenniveau herzustellen und zu zeigen, dass sich nur GTG – dunkle Banden in helle und dunkle Subbanden aufspalten. Eine Aufspaltung GTG – heller Banden war nie zu beobachten. Ausserdem konnte sie mit ihren Stretching-Experimenten durch das Fehlen einer dunklen Subbande eine Mikrodeletion der Größe 3 – 3,5 Mb in Xp nachweisen, welche verantwortlich ist für eine Variante der Duchenne'schen Muskeldystrophie. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die *Stretching*-Methode bis zu einer gewissen Deletionsgröße auch für diagnostische Zwecke anwendbar ist. Kuechlers Vorschlag für einen weiteren Einsatz dieser Methode in der Diagnostik lautete daher, die *Stretching*-Methode mit der *FISH*-Technik zu kombinieren, um weitere Mikrodeletionen nachzuweisen und bisherige Kartierungsergebnisse damit zu überprüfen und zu hinterfragen.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Basierend auf den bisherigen Untersuchungen zur Dehnbarkeit menschlicher Chromosomen (Claussen et al., 1993, 1994, Hliscs et al., 1997b und Kuechler et al., 2001), sowie den neuesten Erkenntnissen auf dem Gebiet der Chromosomenarchitektur (Lemke et al., 2002; Weise et al., 2002a) und den exakt dokumentierten Abläufen während der zytogenetischen Präparation (Hliscs et al., 1997a, Claussen et al., 2002), besteht das Ziel dieser Arbeit darin, mit Hilfe einer neuartig konzipierten und von den bisherigen Methoden unabhängigen Herangehensweise, einen weiteren wissenschaftlichen Beweis für die o.g. Ergebnisse zum Aufspaltungsverhalten chromosomaler Banden zu erbringen.

Zu diesem Zweck wird eine Kombination aus zytogenetischer Kultivierung und Präparation von menschlichen Chromosomen in unterschiedlich langen Bandenstadien, von 300 Banden bis hin zu 850 Banden, mit einer molekular-zytogenetischen Färbung, dem multicolor-banding, und dessen anschließende softwaregestützte Auswertung erstellt. Hiermit gelingt es, die Abfolge der chromosomalen Bandenaufspaltung nachzuvollziehen und zu verifizieren.

Diese neuartige Untersuchungsmethode wird zunächst an Beispiel des Chromosoms 5 etabliert. Anschließend wird die Untersuchung auf die Chromosomen 6 und X ausgeweitet. Die Ergebnisse daraus werden mit den Daten aus bereits bekannten Arbeiten von Hliscs et al., 1997 und Kuechler et al., 2001 verglichen. Weiterhin wird die Analyse der chromosomalen Bandenaufspaltung auf die Chromosomen 18, 19 und 20 ausgeweitet. Die Fragestellung

hierbei bezieht sich vor allem darauf, ob die gewählte Untersuchungsmethode auch bei diesen, relativ kurzen Chromosomen verlässlich angewandt werden kann und, ob es Unterschiede im Aufspaltungsverhalten von genarmen Chromosomen, wie das charakteristische giemsa-dunkle Chromosom 18, und genreichen, wie dem relativ giemsa-hellen Chromosom 19, gibt.

Der Schwerpunkt der Auswertung aller untersuchten Chromosomen liegt letztendlich darin, eine Art Hierarchie in der chromosomalen Bandenaufspaltung zu finden, die in jedem Chromosom in derselben Abfolge stattfindet und mit deren Hilfe die Zuordnung von Subbanden zu den biologisch korrekten „Originalbanden“ möglich ist. Folgerichtig müsste dann die bisher gültige ISCN-Nomenklatur im Bezug auf die genauen Aufspaltungsverhältnisse auf ihre Gültigkeit, bzw. Zweckmäßigkeit hin überprüft und in berechtigtem Maße korrigiert werden.

Desweiteren wird in dieser Arbeit das Einsatzgebiet des multicolor-banding, vor allem im Bezug auf hochauflösende Bänderungsmethoden, weiter ausgedehnt, womit weitergehende Untersuchungen z.B. der Interphasekernarchitektur ermöglicht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Lymphozytenanzucht und Chromosomenpräparation

Chromosomenpräparationen können grundsätzlich aus jedem Biopsiematerial, das kernhaltige und teilungsfähige Zellen enthält, durchgeführt werden. Für diese Arbeit wurden aufgrund der leichten Verfügbarkeit durch Venenpunktion und den guten Präparationseigenschaften, Blutlymphozyten einer weiblichen Testperson, deren Karyotyp zuvor bereits als unauffällig mit 46,XX bestimmt worden war, verwendet.

Die Untersuchung von Chromosomen in verschiedenen Bandenstadien machte jedoch eine unterschiedliche Kultivierung der Lymphozyten erforderlich. Aus diesem Grund war es nötig, drei verschiedene Kultivierungsmethoden anzuwenden, die zu Chromosomen mit dem jeweils gewünschten Bandenniveau führten.

2.1.1 Konventionelle Chromosomenpräparation (400-500 Banden)

Verwendete Reagenzien:

Aqua dest.

mit Seralpur DELTA (Seral[®]) gewonnenes Reinstwasser; ist entionisiert, organisch rein, partikelfrei und zusätzlich autoklaviert

RPMI 1640 (Wachstumsmedium)

RPMI 1640 mit Glutamax-Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin (Gibco[®])

fetales Kälberserum (Biochrom KG[®]), 12%

Penicillin (100000 U/ml) / Streptomycin (10000 U/ml) (Biochrom KG[®])

Phytohämagglutinin (PHA)

Lyophilisiertes PHA (Seromed[®]) in 5 ml *Aqua ad iniectabilia* – Wasser (Braun) lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern

Hypotone Kaliumchlorid-Lösung

KCl (Merck[®]) 0,56%

in *Aqua dest.*

Fixativ

Methanol (Merck®) : Eisessig (Merck®) = 3:1

Colcemid-Lösung

Konzentration 10 µg/ml

Durch Venenpunktion wird unmittelbar vor dem Ansetzen der Kultur venöses Blut entnommen und in ein mit Heparin benetztes, steriles Röhrchen überführt. Das Vollblut wird unter sterilen Bedingungen in Kulturflaschen (Cellstar, Greiner) überführt und wie folgt angesetzt:

Auf 1ml heparinisiertes Blut werden 10 ml des RPMI-1640-Mediums zugegeben, sowie 100 µl des starken Antigens Phytohämagglutinin, gewonnen aus der Bohne *Phaseolus vulgaris*, welches die T-Lymphozyten während einer Kultivierungszeit von 72 Stunden bei 37°C im Brutschrank zur Zellteilung anregt.

Um die Ausbeute mitotischer Zellen zu erhöhen, werden 90 Minuten vor dem Ende der Kultivierungszeit 100 µl des Spindelgiftes Colcemid, aus *Colchium autumnale*, in den Kulturansatz pipettiert. Dies bewirkt eine Arretierung aller Zellkerne, welche sich zu diesem Zeitpunkt in der Mitose befanden, im Stadium der Metaphase.

Die eigentliche Präparation beginnt mit der Überführung des Kulturansatzes in ein 14 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon). Dieses wird bei 1500 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird danach abgenommen. Anschließend werden die Zellen in einer hypotonen KCl-Lösung für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Hypotoniebehandlung führt zum Zerplatzen der Erythrozyten, während die kernhaltigen Lymphozyten lediglich anschwellen. Dies hat zum einen den Vorteil, dass unerwünschte Zelltypen (Erythrozyten) entfernt werden, und zum anderen, dass vorgequollene Kerne bei der späteren Präparation eine ausreichende Spreitung der Metaphasechromosomen erlauben.

Im Anschluss an die Hypotonie wird 1ml eiskaltes Fixativ zur Fixierung und Reinigung des Zellsediments zugesetzt und erneut bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand aus hämolysierten Erythrozyten wird danach verworfen und das zurückgebliebene Pellet aus Zellsediment nun in 10 ml Fixativ inkubiert und nochmals zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird insgesamt noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Wasch-Schritt wird das Pellet in 1 ml Fixativ resuspendiert und kann nun zum Auftropfen auf gereinigte

und fettfreie Glasobjektträger verwendet werden oder bei -20°C über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

Auf den zuvor mit Seidenpapier gereinigten Objektträger, der nun in einer feuchten Kammer stehen muss, werden in der Regel 2 Tropfen Suspension aufgetropft. Um etwaige Plasmareste zu entfernen, werden ca. $20\mu\text{l}$ Fixativ nachgetropft. Der Objektträger wird bei Raumtemperatur getrocknet, danach in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 95%, 100%) für jeweils 3 Minuten dehydriert und muss anschließend entweder über Nacht bei 60°C im Brutschrank oder drei Tage bei Raumtemperatur altern (nach Verma und Babu, 1989).

2.1.2 Präparation kurzer Chromosomen (300-400 Banden)

Die Präparation besonders kurzer Chromosomen ist normalerweise nicht das Ziel einer konventionellen Chromosomenpräparation. Diese Methode wurde speziell für die Evaluierungsstudien des Multicolor-bandings (MCB) und zur Analyse des Aufspaltungsverhaltens von GTG-hellen und GTG-dunklen Banden eingesetzt.

Für die Präparation wurden 2 Tropfen einer konventionellen Zellsuspension aus Blut, wie unter 2.1.1 bereits beschrieben, auf einen gereinigten Objektträger gegeben und dieser sofort auf einer 70°C warmen Heizplatte getrocknet, im Anschluss daran in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und zur Alterung aufbewahrt.

Durch das Fehlen von Fixativ bei diesem Präparationsansatz wird die Interaktion zwischen Essigsäure, Wasser und den zellulären Proteinen auf ein Minimum reduziert. Somit kann die wasser-induzierte Schwellung, die für das Dehnen der Chromosomen, sowie dem Erscheinen des GTG-Bandenmusters verantwortlich ist, nur in einem geringen Umfang stattfinden (Claussen et al., 2002). Dies garantiert Chromosomen mit dem niedrigen Auflösungs-niveau von etwa 300 bis 400 Banden.

2.1.3 Präparation langer Chromosomen (550-800 Banden)

Verschiedene Protokolle für die Präparation besonders langer oder auch sogenannter Prometaphase-Chromosomen wurden Ende der 70er und Anfang der 80er Jahre entwickelt, um die Auflösung und die Aussagekraft GTG-gebänderter Chromosomen zu erhöhen.

In dieser Arbeit wurden diese Methoden wieder aufgegriffen, um das MCB zu evaluieren und das Aufspaltungsverhalten der GTG-Banden zu untersuchen.

2.1.3.1 Methotrexat-Thymidin-Methode (nach Hagemeijer et al., 1979)

Methotrexat (MTX) ist ein kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolat-Reduktase. MTX reduziert durch die Inhibition dieses Enzyms den Gehalt an freiem Thymidin, welches für die DNA-Synthese essentiell ist. Eine Reduktion des Thymidingehalts führt somit zur Blockierung des Zellzyklus. Der MTX-Block kann durch Zugabe von Thymidin aufgehoben werden. Eine geringere Kondensation der Chromosomen wird durch eine kurze Colcemidbehandlung erreicht.

Verwendete Reagenzien:

MTX-Lösung

MTX Molekulargewicht: 498,4, ca.500; d.h. 1 M entspricht 500 g/l

Die MTX 50 Injektionslösung (Medac[®]) mit einer Konzentration von 50 mg/2 ml wird 1:50 mit *Aqua dest.* verdünnt (=10⁻³M Stammlösung). Die Lösung ist relativ instabil und sollte als fertige Gebrauchslösung (10⁻⁵) aliquotiert (je 1ml) bei -20°C im Dunkeln gelagert werden.

Thymidin-Lösung

2,5 mg Thymidin (Sigma[®]) werden in 10 ml *Aqua dest.* gelöst und steril filtriert. Diese 10⁻³ M Gebrauchslösung wird ebenfalls zu je 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

30-40 Tropfen Heparin-Vollblut werden in 10 ml Kulturmedium eingetropfelt und für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden werden 100 µl der MTX-Gebrauchslösung zugegeben und weiter inkubiert. Nach weiteren 16 Stunden wird die Kultur geteilt (je 5 ml pro sterilem Zentrifugenröhrchen), einmal mit serumfreien Medium gewaschen und nach dem Abzentrifugieren (800 U/min) in Kompletmedium aufgenommen. Jeder Kultur werden nun

50 µl Thymidin-Lösung zugegeben und für weitere 3-4 Stunden inkubiert. Die anschließende Colcemid- und Hypotonie-Behandlung wird, wie unter 2.1.1 beschrieben, durchgeführt.

2.1.3.2 BrdU-Methode (nach Scheres et al., 1982)

Diese Kultivierungsmethode führt zu weniger Metaphasen, als die konventionelle Präparation ohne Thymidin-Block und Brom-deoxy-Uridin (BrdU). Aber ein Großteil, der sich teilenden Zellen befindet sich in der Prometaphase und enthält sehr lange Chromosomen.

1 ml Heparin-Vollblut wird in 10 ml des Mediums RPMI 1640 und 100 µl des Mitogens Phytohämagglutinin (PHA) für 72 Stunden bei 37°C kultiviert. Anschließend werden 3,3 mg Thymidin zugegeben und für 17 Stunden inkubiert, abgewaschen und für weitere 6,5 Stunden in 10 ml RPMI 1640 mit 360 µg BrdU (Sigma[®]) kultiviert. Die Kultur wird ohne Colcemid-Schritt geerntet, wobei die Zellen mit einer 0,075 M KCl-Lösung für ca. 10 min bei 37°C inkubiert werden. Danach werden die Zellen mit Fixativ fixiert und 5-mal damit gewaschen. Die Zellsuspension wird bei -20°C gelagert.

Das Auftropfen möglichst langer Chromosomen erfolgt für beide Kultivierungsmethoden gleichermaßen:

Die gereinigten Objektträger werden schräg in eine feuchte Kammer gestellt, welche auf 60°C vorgewärmt wurde, um die Luftfeuchtigkeit innerhalb der Kammer zu erhöhen (Hliscs et al., 1997). Nachdem 2 Tropfen Suspension aufgetropft und leicht angetrocknet sind, werden die Objektträger großzügig (100-200 µl) mit Fixativ überspült. Somit werden Plasmareste ab gespült und die Chromosomen weiter fixiert. Ausserdem bewirkt die, in der relativ großen Menge Fixativ enthaltene Essigsäure, die Aufnahme von Wasser aus der Raumluft, was wiederum zur besseren Quellung und damit Sichtbarmachung der Chromosomen führt. (Claussen et al., 2002) Die Objektträger werden anschließend bei weiterhin hoher Luftfeuchtigkeit auf einer angefeuchteten, 60° warmen Heizplatte getrocknet. Die Alterung erfolgt unter denselben Bedingungen, wie unter 2.1.1 beschrieben.

2.2 MCB-Sondenherstellung

2.2.1 Mikrosezierung

Die Methode der Mikrosezierung erlaubt es, einzelne Abschnitte von Chromosomen mechanisch mit einer Glasnadel aus einer Metaphase herauszulösen. Nach Vermehrung des herausgeschnittenen DNA-Materials mittels PCR können DNA-Banken konstruiert werden, mit deren Hilfe spezifische Sonden hergestellt werden können.

Für die Herstellung, der für diese Arbeit notwendigen MCB-Sonden wurden Mikrosezierungssonden aus dem Bestand des molekularzytogenetischen Labors des Instituts für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena verwendet (Liehr et al., 2002).

2.2.2 Markierungs-PCR

Die für das jeweils gewünschte Chromosom benötigten PCP's werden nun in einer Markierungs-PCR mit Fluoreszenzfarbstoffen, bzw. Haptenen in Form von modifizierten Nucleotiden (Biotin-16-dUTP, SpectrumOrangeTM-dUTP, TexasRedTM-dUTP, SpectrumGreenTM und Diethylaminocumarin) nach dem jeweiligen Markierungsschema im Anhang behandelt.

Verwendete Reagenzien:

Markierungsmix

Lösung aus 2 mM dATP, dCTP, dGTP und 1 mM dTTP (GeneAmp[®]- dNTP's, Perkin Elmer).

Die Konzentration von dTTP muss deshalb geringer sein, weil an dessen Stelle die angebotenen Fluoreszenzfarbstoffe an die DNA binden sollen.

PCR-Puffer

Perkin Elmer, 100 mM Tris-HCl; pH 8,3; 500 mM KCl

Amplitaq[®] DNA-Polymerase

Perkin Elmer, 5 U/ μ l

DOP-Primer

Stammlösung: 40 μM ; Endkonzentration: 5 μM

Sequenz: 5'CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'

Zur Markierung einer DNA-Bank wird aus oben genannten Reagenzien folgender Lösungsansatz pipettiert (Tab. 1):

	Stammlösung	Endkonzentration	μl pro Bank
H ₂ O (Ampuwa)			12,08
Puffer	10 x	2 x	2
DOP-Primer	40 μM	2,00 μM	1
Labelmix	10 x	1 x	2
MgCl ₂	25 mM	2,50 mM	2
modifizierte Nucleotide	(je nach Hersteller- angaben 0,8 – 2,0 μl)		
AmpliTaq	5 U/ μl	0,03 U/ μl	0,12

Tab. 1: Lösungsansatz zur Markierung einer DNA-Bank

Folgende Fluorochrome wurden zur direkten Markierung eingesetzt (Tab. 2):

Name/Abkürzung	Hersteller	Absorptions-maximum (nm)	Emissions- maximum (nm)
Diethylaminocumarin-5-dUTP/DEAC	NEN Life Science Products, Inc.	426	480
SpectrumGreen-dUTP	Abbott	497	524
SpectrumOrange-dUTP	Vysis	559	588
ChromaTide-TexasRed-12-dUTP/TR	Molecular Probes	587	612

Tab. 2: Auflistung der zur direkten Markierung verwendeten Fluorochrome.

Folgendes Hapten wurde zur indirekten Markierung verwendet:

Biotin-16-dUTP; Hersteller:Roche

Pro Lösungsansatz wird laut Markierungsschema im Anhang ein Fluoreszenzfarbstoff bzw. Hapten eingesetzt. Bei doppelt markierten DNA-Banken dementsprechend zwei Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Haptene.

Zu diesem Ansatz werden zuletzt 2 µl DNA-Bank pipettiert.

Der fertige Ansatz durchläuft nun das PCR-Programm „label 20“ unter folgenden Einstellungen (Tab. 3).

1	92°C	3 min	Initiale Denaturierung
2	91°C	1 min	Denaturierung
3	56°C	1 min	Primer-Bindung (Annealing)
4	70°C	2 min	DNA-Synthese (Elongation)
5	72°C	5 min	DNA-Synthese
6	4°C		Temperatur wird bis zur Beendigung des Programms konstant gehalten

Tab. 3: Auflistung der Einzelschritte im PCR-Programm „label 20“

Die Schritte 2 – 4 durchlaufen hierbei 20 Zyklen.

2.2.3 DNA-Fällung

Verwendete Reagenzien:

t-RNA

Roche, als Träger-DNA

Natriumacetat 3 M, pH 5,2

24,6 g Natriumacetat (wasserfrei), Sigma[®]

auf 100 ml mit *Aqua dest.* auffüllen

pH 5,2 mit Eisessig(Merck[®]) einstellen

Dextransulfat (DS)

Ansatz: 2 g DS

2 ml 20 x SSC

2 ml 0,5 M Natriumphosphat

5 ml deionisiertes Formamid

→ auf 10 ml mit *Aqua dest.* auffüllen

→ bei 70°C ca. 3 Stunden lösen

Nach der Markierungs-PCR muss die markierte DNA im nächsten Schritt gefällt werden. Hierfür werden pro Einzelbank 10 µl t-RNA, 5 µl Natriumacetat und 88 µl Ethanol_{abs} zugegeben. Die Einzelbanken eines Chromosoms werden gemeinsam in einem dementsprechend großen Ansatz gefällt werden. Der Ansatz mit den enthaltenen DNA-Banken wird nun bei -80°C für 20 min inkubiert, anschließend für 15 min bei 15300 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das zurückgebliebene Pellet für 5 min in einer unter Vakuum stehenden Zentrifuge getrocknet. Zuletzt wird die getrocknete, markierte DNA für das MCB in 30 µl Dextransulfat gelöst und kann nun für einen MCB-Hybridisierungsansatz verwendet oder bei -20°C im Dunkeln gelagert werden (Sambrook und Moniat, 1989).

2.3 Hybridisierung (Rautenstrauss und Liehr, 2002)**2.3.1 Behandlung der Objektträger****2.3.1.1 Pepsinverdau****Verwendete Reagenzien**

1 x PBS (Biochrom KG[®], 9,55 g/l)

47,75 g auf 5 l *Aqua dest.*

Pepsin-Lösung (Sigma[®])

10 mM HCl (95 ml *Aqua dest.* + 5 ml 0,2 n HCl)

2% Pepsin-Stocklösung (1 g Pepsin auf 50 ml *Aqua dest.*)

Postfixations-Lösung

1%ige Paraformaldehydlösung, gelöst in 1 x PBS mit 50 mM MgCl₂
(500 µl Paraformaldehyd + 450 µl 1 x PBS + 50 µl MgCl₂)

Der Erfolg einer Hybridisierung hängt im Wesentlichen vom Vorliegen eines relativ plasmafreien Präparates ab. Um dies zu gewährleisten, nutzt man die Eigenschaften des Verdauungsenzyms „Pepsin“, welches in der Lage ist, Proteine und somit auch Zellplasmaproteine, abzubauen.

In eine auf 37°C vorgewärmte 100 ml Küvette mit 10 mM HCl-Lösung werden 500 µl Pepsinstammlösung (Sigma®) zugegeben. Die getropften und gealterten Objektträger werden darin für 5 min inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur in 1 x PBS für weitere 5 min gewaschen. Zur Stabilisierung der durch den Pepsinverdau nicht mehr so fest haftenden Chromosomen werden die Objektträger nun mit 100 µl Postfix-Lösung überschichtet und nach 10 minütiger Inkubation erneut für 5 min in 1 x PBS gewaschen. Eine Dehydrierung in der Ethanolreihe, sowie die Trocknung bei Raumtemperatur erfolgen im Anschluss.

2.3.1.2 Denaturierung

Verwendete Reagenzien:

70%ige Formamid-Denaturierungs-Lösung

140 ml Formamid + 20 ml 20 x SSC + 40 ml *Aqua dest.*

Damit Sonden-DNA überhaupt an chromosomale DNA auf den Objektträgern binden kann, ist deren einzelsträngiges Vorliegen eine Grundvoraussetzung. Dies erreicht man, indem man die Objektträger mit jeweils 100 µl 70%igen Formamids überschichtet und auf einer 72°C warmen Heizplatte exakt 3 min denaturiert. Um den nun einzelsträngigen Zustand der DNA beizubehalten, werden die Objektträger für 3 min in -20°C kalten 70%igen Ethanol dehydriert, danach für je weitere 3 min in 95% und 100%igem Ethanol. Nachdem die Objektträger luftgetrocknet sind, ist deren Vorbehandlung abgeschlossen.

2.3.2 Behandlung der Sonden-DNA

Verwendete Reagenzien:

Dextransulfat

→ siehe 2.2.3

COT-1 DNA

Stammlösung: 1 mg/ml (GibcoBRL®)

1 Volumen COT-1 DNA wird mit dem doppelten Volumen Ethanol_{abs} versetzt und vollständig eingetrocknet.

Für MCB #5, #6 und # X werden 25 µl Cot-1 DNA eingesetzt, für MCB #18 und #19 nur 15 µl.

Ebenso wie die chromosomale DNA denaturiert wurde, muss auch die Sonden-DNA denaturiert werden, um hybridisieren zu können. Dies geschieht in einem sog. Prähybridisierungsschritt mit COT-1 DNA. Diese blockt repetitive Sequenzen innerhalb der Sonden-DNA ab, die sonst zu unerwünschten Hintergrundsignalen führen würden.

5 µl der Sonden-DNA werden zusammen mit 7 µl Dextransulfat in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß mit der eingetrockneten Menge an COT-1 DNA gegeben und durchlaufen nun folgendes „Prehyb“-Denaturierungsprogramm im Thermocycler (Tab. 4).

75°C	5 min	Denaturierung
4°C	2 min	Abkühlung zur Stabilisierung des denaturierten Zustands
37°C	30 min	Renaturierung
		Temperatur wird bis zur Beendigung des Programms beibehalten

Tab. 4: Auflistung der Einzelschritte im Denaturierungsprogramm „Prehyb“.

2.3.3 Auftragen der Sonden-DNA

Sofort nach Beendigung des „Prehyb“-Programmes wird die nun vorhybridisierte Sonden-DNA auf den bereits vorbehandelten Objektträger aufgetragen und mit einem 24 x 24 mm Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Eine Abdichtung der Ränder mit Fixogum (Marabu®) verhindert die Austrocknung. In einer feuchten Kammer erfolgt nun bei 37°C über Nacht die Hybridisierung der Sonden-DNA auf die chromosomale Ziel-DNA auf dem Objektträger.

2.4 Detektion

Verwendete Reagenzien:

20 x SSC (GibcoBRL®)

3,0 M Natriumchlorid + 0,3 M Natriumcitrat

50%ige Formamid-Lösung

50 ml 20 x SSC + 200 ml *Aqua dest.* + 250 ml Formamid (Merck®, M = 45,04 g/mol), mit 1 n HCl auf pH 7,0 – 7,5 einstellen

2 x SSC

50 ml 20 x SSC + 450 ml *Aqua dest.*
mit 1 n HCl auf pH 7,0 – 7,5 einstellen

4 x SSC/Tw

100 ml 20 x SSC + 400 ml *Aqua dest.* + 250 µl Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat, Sigma®)
mit 1 n HCl auf pH 7,0 – 7,5 einstellen

SSCTM

0,25 g Marvel, fettfreie Trockenmilch, in 5 ml 4 x SSC/Tw lösen
bei 1500 U/min zentrifugieren; oberste Schicht entfernen, da sie noch ungelöstes Marvel enthalten kann

Strept-Avidin-Cy 5 (Amersham®)

3:100 SSCTM

1 x PBS (Biochrom KG®, 9,55 g/l)47,75 g auf 5 l *Aqua dest.*DAPI/Antifade

Gebrauchslösung: 0,4% 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma®), Stocklösung:
 50 µg/ml mit Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories®)
 1:1000 – 4:1000 ansetzen; Lagerung bei 4°C

Nach Beendigung der Inkubation bei 37°C wird das Deckgläschen vorsichtig entfernt und der Objektträger 3-mal für jeweils 5 min bei 42°C in 50%igem Formamid gewaschen, gefolgt von 3 Waschsritten in 2 x SSC ebenfalls bei 42°C. Wurden beim Markieren der Sonden-DNA nur direkt markierte Nucleotide verwendet, wird der Objektträger anschließend bei Raumtemperatur für 2 min in 4 x SSC/Tw und in 1 x PBS gewaschen.

Wurde jedoch das Hapten Biotin beim Labeln eingesetzt, welches selbst nicht fluoresziert, ist nun ein Detektionsschritt mit dem direkt markierten Antikörper Strept-Avidin-Cy 5 nötig.

Hierfür wird der Objektträger kurz in 4 x SSC/Tw eingetaucht, daraufhin mit 100 µl SSCTM überschichtet, sowie mit einem 24 x 60 mm Deckglas abgedeckt und bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Das SSCTM bewirkt eine Abblockung unspezifischer Bindungsstellen für die nachfolgend verwendeten Antikörper. Nach 15 minütiger Inkubation wird das Deckglas entfernt und der Objektträger bei Raumtemperatur kurz in SSC/Tw gewaschen, bevor er mit 100 µl der Antikörperlösung überschichtet wird und erneut unter einem Deckglas für 45 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach diesem Detektionsschritt wird der Objektträger einmal in 4 x SSC/Tw für 5 min und 2-mal in 1x PBS für ebenfalls 5 min auf einem Schüttler gewaschen. Eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe schließt sich an. Die Lufttrocknung erfolgt zur Schonung der Fluoreszenzfarbstoffe im Dunkeln. Zuletzt erfolgt die Gegenfärbung der Chromosomen mit 20 µl DAPI/Antifade und die Abdeckung des Objektträgers mit einem 24 x 60 mm Deckglas.

2.5 Auswertung

Die Präparate wurden am Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss[®]) mit einem 6-Filterssystem, welches die Aufnahmen von DAPI, Spectrum Green, Spectrum Orange, Texas Red, Cy 5 und DEAC nacheinander ermöglicht, aufgenommen und ausgewertet.

Die Bildaufnahme und Verarbeitung erfolgte mit einer Standard-CCD-Kamera (IMAC[®]) und der ISIS-Software der Firma Metasystems GmbH, Altlußheim, sowie der Paint shop pro 4-Software (Microsoft[®], 1997) (vgl. auch Liehr et al., 2002a). Für jedes MCB wurde eine eigene Falschfarbendatei erstellt (siehe Anhang).

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl der geeigneten Pseudofarben

Bei der Auswertung des MCB war es bisher üblich, mit etwa 24 Pseudofarben pro Chromosom zu arbeiten. Für die Auswertung hochauflösender Chromosomen und deren Aufspaltung in Subbanden, erwies sich eine solche Pseudofarbdatei jedoch als unzureichend. Daher wurde die Anzahl der Pseudofarben für jedes Chromosom so lange erhöht, bis ein geeignetes Pseudofarbenbandenmuster in der gewünschten Auflösung erreicht war. Für Chromosom 5 war dies erst der Fall bei 80 Pseudofarben. Unter Verwendung der üblichen 24 Pseudofarben blieb das Farbbandenmuster in allen Chromosomenlängen stabil. (siehe Abb. 6)

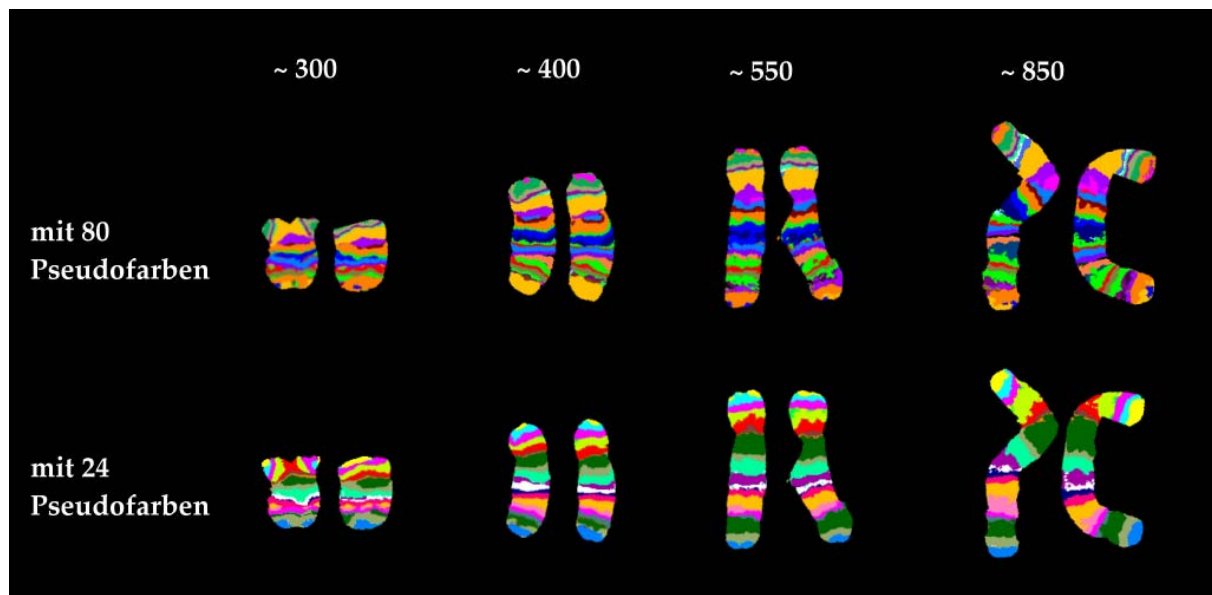


Abb. 6: Gegenüberstellung von MCB #5 in den 4 versch. Bandenstadien (300, 400, 550 und 850) mit einer Pseudofarbdefinition aus 80 zu vergebenden Pseudofarben und einer zweiten Pseudofarbdefinition, bestehend aus 24 Pseudofarben.

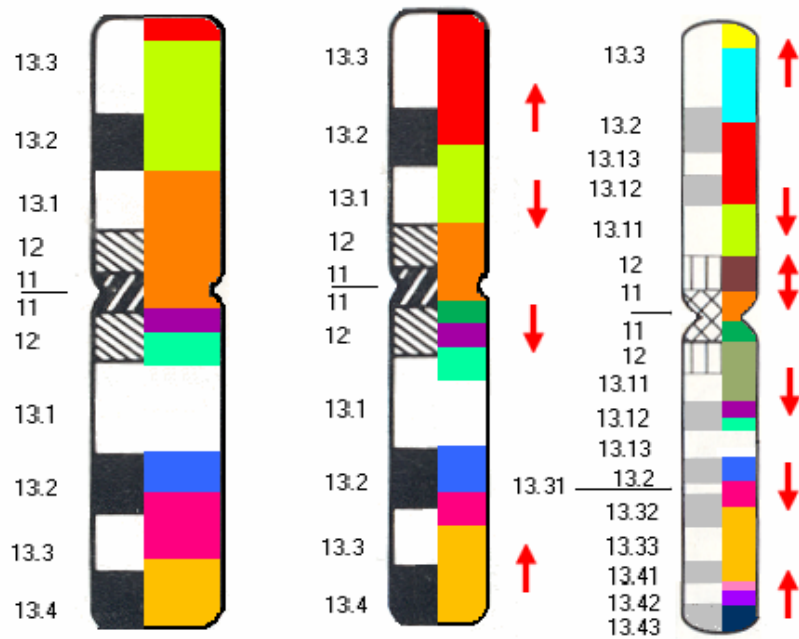
Aus Tabelle 5 ist ersichtlich mit welcher Anzahl an möglichen Pseudofarben die für diese Arbeit ausgewählten Chromosomen ausgewertet wurden, um den 4 unterschiedlichen Auflösungsstufen von 300 Banden bis hin zu 850 Banden gerecht zu werden und wie viele Pseudofarbbanden dabei jeweils entstanden sind.

Chromosom	Anzahl der max. zu vergebenden Pseudofarben	Anzahl der Pseudofarbbanden im 850-Bandenstadium	Anzahl der Pseudofarbbanden im 550-Bandenstadium	Anzahl der Pseudofarbbanden im 400-Bandenstadium	Anzahl der Pseudofarbbanden im 300-Bandenstadium
5	80	39	34	21-24	18
6	60	40	36	32	29
X	40	31	30	26	21
18	40	18	14	8	
19	24	17	10	9	
20	24	13	11	9	

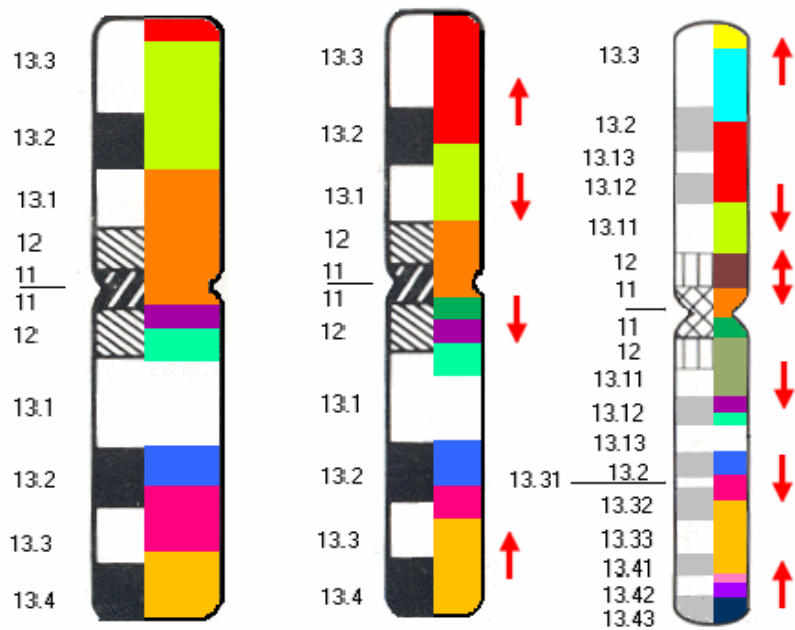
Tab. 5: Auflistung der zur Auswertung jedes Chromosoms verwendeten Pseudofarbdateien unter Angabe der maximal zu vergebenden Pseudofarben, sowie der tatsächlichen Anzahl der von der Software vergebenen Pseudofarben in den jeweiligen Bandenstadien (für die einzelnen Farbdefinitionen siehe Anhang).

3.2 Verifizierung der Aufspaltungsverhältnisse

Pseudofarbdateien mit einer ähnlich hohen Anzahl an Pseudofarben, wie die zur Auswertung des jeweiligen Chromosoms bereits verwendete Pseudofarbdatei erlauben auch eine ebenso hohe Auflösung und lassen ein vergleichbares Pseudofarbbandenmuster erkennen, welches bei genauer Betrachtung zu identischen Resultaten im Aufspaltungsverhalten von Subbanden führt. Somit konnte gezeigt werden, dass die vorgestellten Ergebnisse nicht nur das Produkt einer zufällig ausgewählten Pseudofarbdatei sind, sondern auf reproduzierbaren Bandenmustern basieren. Abb.7 zeigt diese Tatsache am Beispiel von Chromosom 19, welches unter Auswertung zweier versch. Pseudofarbdateien zu identischen Ergebnissen führt.



Auswertung von Chromosom 19 mit 24 Pseudofarben



Auswertung von Chromosom 19 mit 20 Pseudofarben

Abb. 7: Verifizierung der Aufspaltungsverhältnisse am Beispiel von Chromosom 19; die Auswertung mit einer Pseudofarbdefinition aus 24 Pseudofarben, sowie eine zweite Auswertung mit einer Pseudofarbdatei aus 20 Pseudofarben und einer ähnlich hohen Auflösungseigenschaft führen zu vergleichbaren Pseudofarbbandenmustern und Aufspaltungsverhältnissen; letztere sind durch die roten Pfeile dargestellt.

3.3 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom 5

Zur Analyse des Aufspaltungsverhaltens von chromosomalen Banden in Subbanden wurden für alle in dieser Arbeit untersuchten Chromosomen mittels MCB jeweils 10 Chromosomen in den 4 verschiedenen Bandenstadien (300, 400, 550 und 850 Banden) ausgewertet. Die dazu verwendete Pseudofarbdatei, sowie die dabei in unterschiedlicher Anzahl entstandenen Pseudofarbbanden sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Um die Farbbanden, deren Anzahl mit zunehmendem Kondensierungsgrad stetig abnahm, in ihrer Lage und Größe bestimmen zu können, war es nötig, diese auf die darunter liegenden GTG-Banden, bzw. in diesem Fall auf die GTG-identischen DAPI-Banden zu übertragen und zu kartieren (Abb. 8).

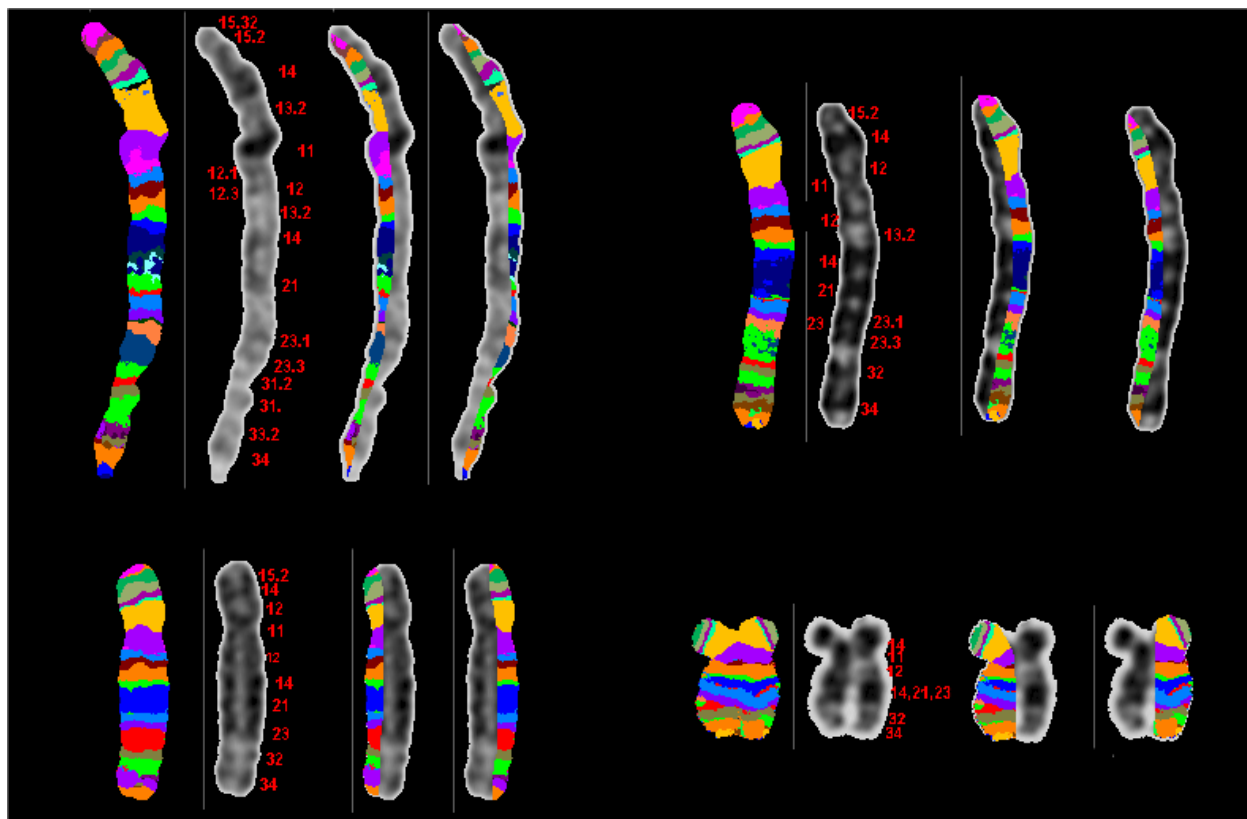


Abb. 8: Kartierung und Übertragung der Pseudofarbbanden von Chromosom 5 auf die DAPI-Banden in den verschiedenen Bandenstadien 850, 550, 400 und 300; die roten Ziffern bezeichnen die auf der ISCN 1995 basierende Bandennomenklatur.

Mit Hilfe dieser Kartierung konnte nun eine detailgetreue Übertragung in die von der ISCN vorgegebenen Ideogramme erfolgen (Abb. 9).

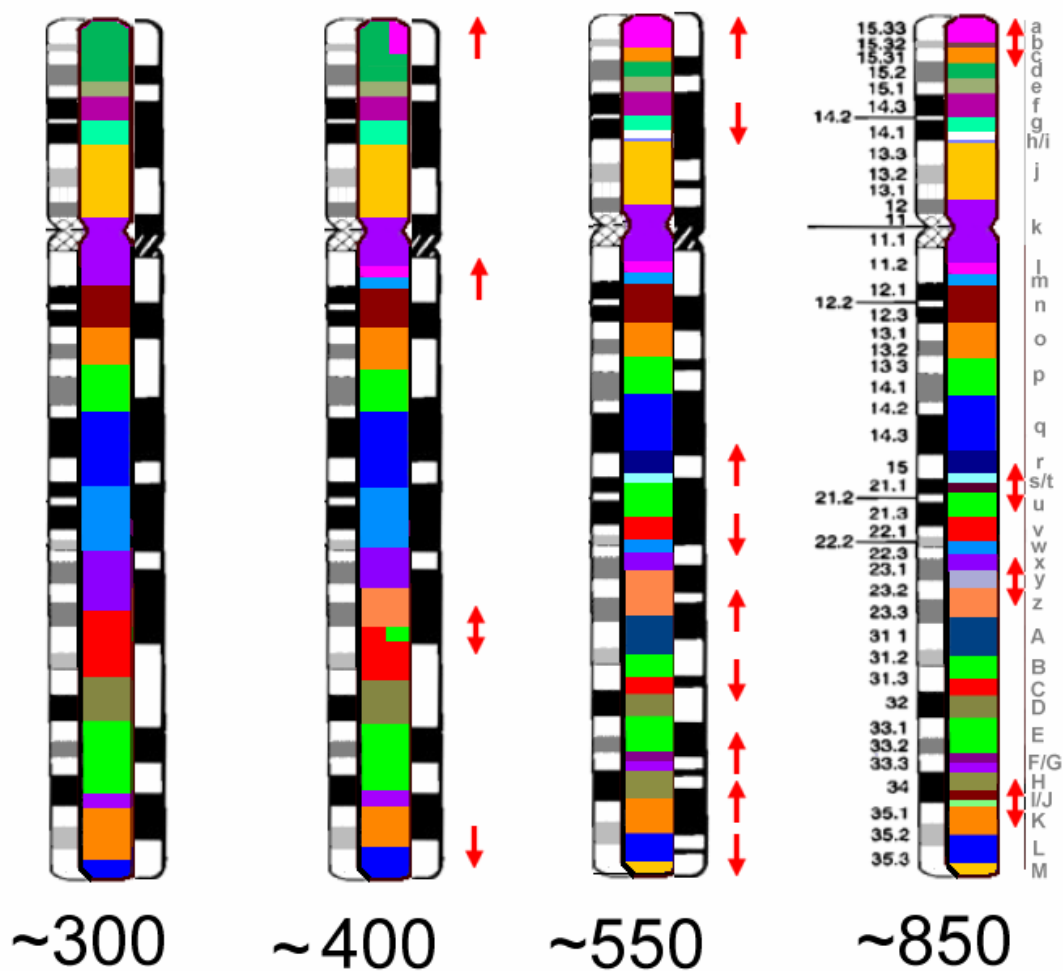


Abb. 9 Übertragung der Pseudofarbbanden von Chromosom 5 in die ISCN-Ideogramme; die einzelnen Banden wurden am rechten Bildrand mit a – z und A – M beschriftet; die roten Pfeilen weisen dabei in die Richtung, in der die Dekondensierung stattfindet.

Die 39 Pseudofarben, die sich auf dem Chromosom 5 bei 850 Banden zeigen, wurden zur besseren Überschaubarkeit mit a – z und A – M beschriftet. Da nicht alle Chromosomen einer Länge exakt in ihrem Falschfarbenbandenmuster übereinstimmten, wurden nur die Farben als ganze Bande in das ISCN-Ideogramm eingezeichnet, die in mindestens 8 von 10 Chromosomen auftraten. Wenn eine Farbe in mindestens 5 von 10 Chromosomen auftrat, wurde sie als halbe Farbbande in das Ideogramm eingetragen. Letzteres war jedoch nur dreimal im 400-Bandenstadium der Fall.

Anhand des MCB-Bandenmusters und dem offensichtlichen Verschwinden bestimmter Farbbanden kann man eine Hierarchie der bandenspezifischen Dekondensierung des Chromosoms erkennen. Ausgehend von den kondensierten Chromosomen (300 Banden) hin zu den höher aufgelösten Chromosomen (400 → 550 → 850 Banden) dekodensieren zuerst die telomer-nahen Bereiche, die zentromer-nahen Bereiche und der Bereich 5q23 → 5q31 (300 – 400 Banden). Dem folgt, zwischen dem 400 - und 550 – Bandenstadium, die Dekondensierung der Bereiche 5p15, 5p14 und allen GTG-dunklen Bereichen in 5q, mit Ausnahme von 5q12 und 5q32. Zuletzt, zwischen 550 und 850 Banden, dekodensieren die Bereiche 5p15.2, 5q21.2 → q21.3 und 5q34 (Abb. 9).

Die Regionen, die während des Dekondensierungsprozesses mehr oder weniger stabil bleiben, sind 5p15.33 (MCB-Bande a), 5p15.1 (MCB-Bande e), 5p13.3 (MCB-Bande), 5p11 → q11.2 (MCB-Bande k) 5q13.1 (~ MCB-Banden n – p), 5q15 (MCB-Bande q), 5q22.3 (MCB-Bande x), 5q31.1 (MCB-Bande C), 5q32 (MCB-Bande D), 5q33.1 (MCB-Bande E) und 5q35.3 (~ MCB-Banden L-M) (Abb. 10).

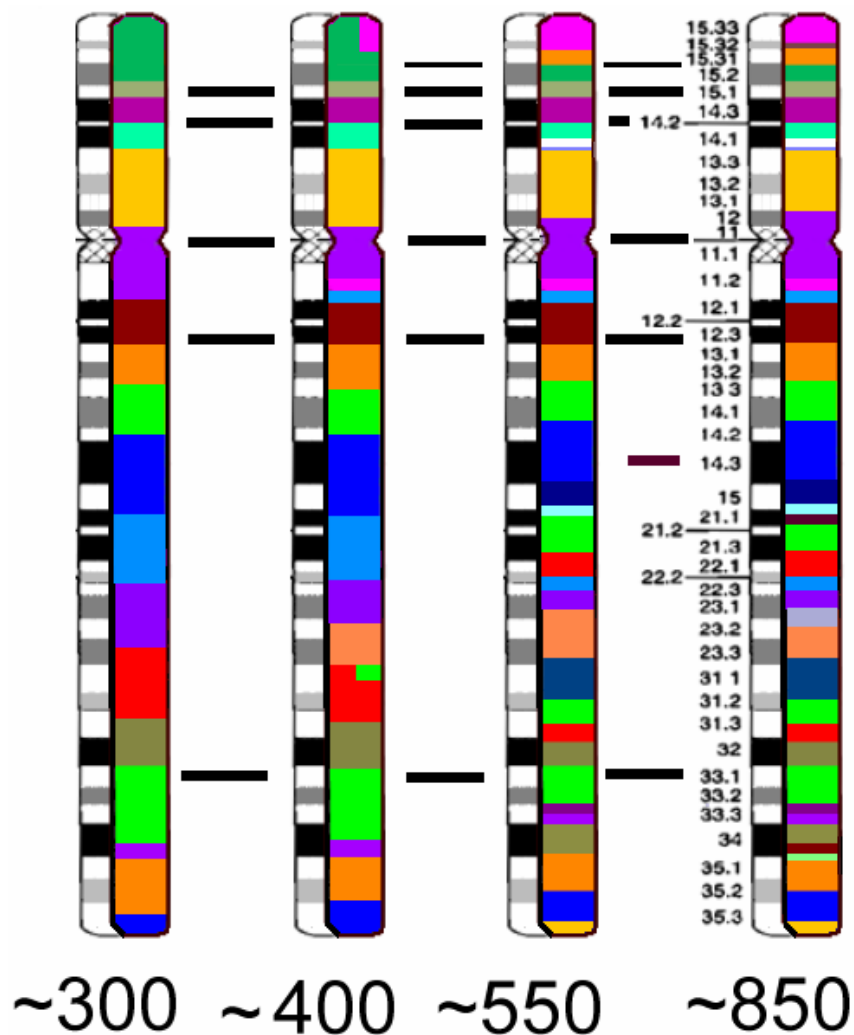


Abb. 10: MCB-Banden, die während des gesamten Dekondensierungsprozesses stabil bleiben (mit schwarzen Balken dargestellt).

Die einzige GTG-dunkle Bande, die stabil bleibt, ist 5q32 (MCB-Bande D).

Nachdem geklärt war, welche Regionen stabil bleiben und sozusagen schon „vordekondensiert“ sind, war es leicht herauszufinden in welchen Regionen die Dekondensierung stattfindet. Wie in Bild Nr.9 dargestellt, muss die Dekondensierung der chromosomalen Region 5q12 gegen das Zentromer stattfinden, da die Subbanden l und m zwischen die Banden k und n während der Dekondensierung vom 400- zum 550-Bandenstadium insertieren. Distal von Bande n erscheint keine weitere MCB-Bande. Deshalb muss die Dekondensierung ausschließlich in proximaler Richtung stattfinden. Das bedeutet, dass die Subbande 5q12.1 von der Hauptbande 5q12 abstammt. Wie soeben am Beispiel der Bande

5q12 erklärt wurde die Herkunft der übrigen Subbanden analog dazu abgeleitet. Die Richtung der Dekondensierung des Chromosoms ist mit roten Pfeilen in Abb. 9 dargestellt.

Anhand der Ergebnisse aus den MCB-Untersuchungen konnten nun die eigentlich homologen Regionen zwischen dem Chromosom #5 auf 300-Bandenebene und 850-Bandenebene definiert werden (Graue Linien in Bild Nr. 11). Hierbei erkennt man deutlich, dass sich nur GTG-dunkle Banden in Subbanden aufspalten. Darüber hinaus entsprechen 27 von insgesamt 45 Banden auf Chromosom #5 nicht den durch das MCB festgestellten Aufspaltungen. Dies bedeutet, dass 60% der Banden auf Chromosom #5 nicht mit der bisher verbreiteten und akzeptierten ISCN-Nomenklatur übereinstimmen. So müssten z.B. im p-Arm die Banden ab 5p15.2 eigentlich p15.21, p15.22, p15.23 und p15.3 lauten und nicht, wie bisher angenommen p15.2, p15.31, p15.32 und p15.33. Alle von der ISCN „fehlinterpretierten“ Banden sind in Bild Nr.8 zusammen mit einem neuen Bezeichnungsvorschlag, basierend auf den Daten dieser Arbeit, in roter Schrift dargestellt.

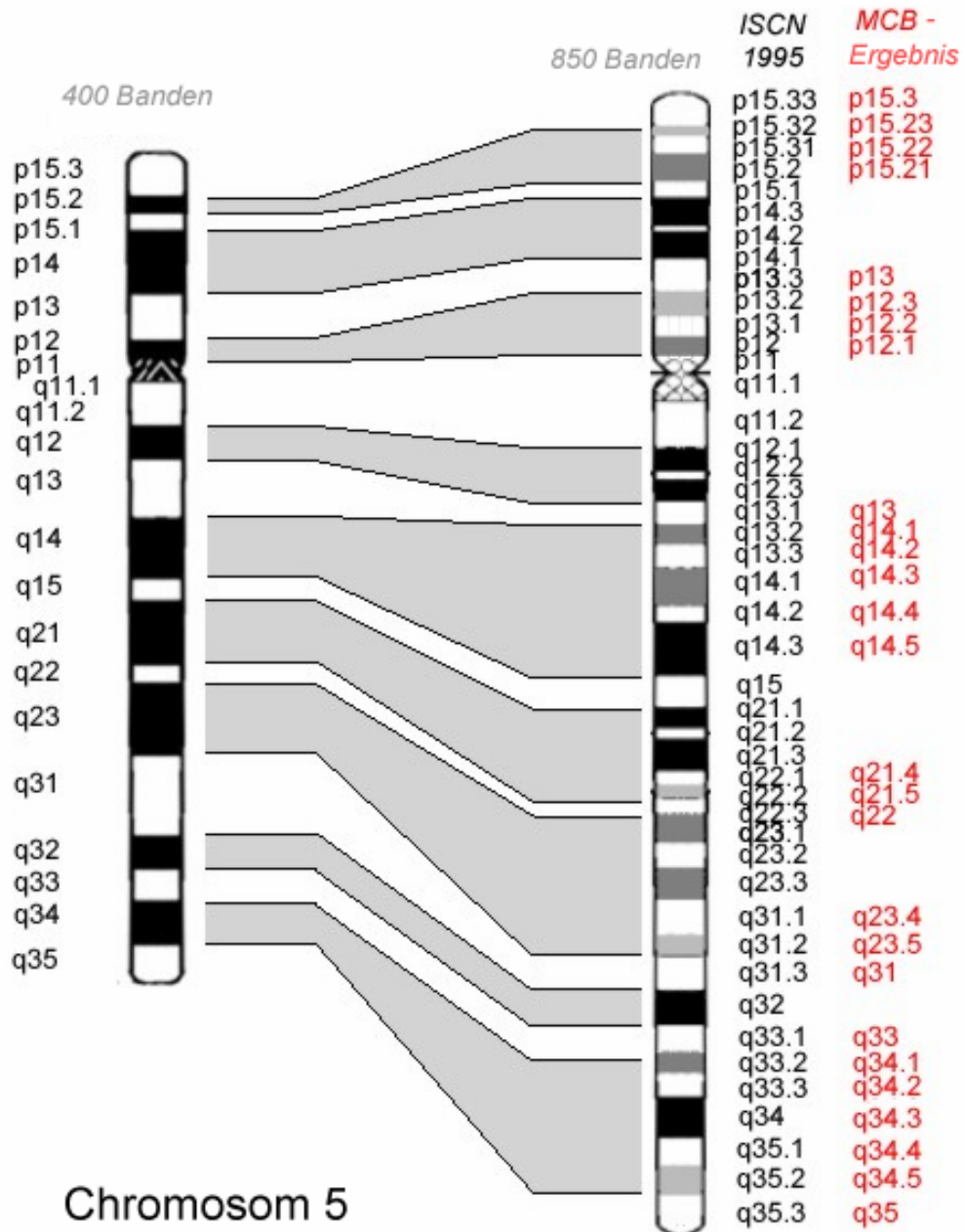


Abb. 11: Gegenüberstellung von homologen Bereichen und den daraus zu entnehmenden Aufspaltungsverhältnissen von Chromosom #5 im 300 – und 850 – Bandenniveau; in schwarzer Schrift, die von der ISCN vorgegebene Nomenklatur; in roter Schrift, Vorschlag für eine, anhand der MCB-Ergebnisse erbrachte neue Nomenklatur.

3.4 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom 6

Das zweite Chromosom, welches mittels hochauflösendem MCB auf seine Subbandenaufspaltung hin untersucht wurde, war Chromosom 6, bei dem bereits aus früheren Chromosomen-Stretching-Versuchen Ergebnisse zum Aufspaltungsverhalten vorhanden waren. Die Auswertungen der MCB - Ergebnisse wurden aber unabhängig davon für jeweils 10 Chromosomen der Länge 300-, 400-, 550- und 850 Banden vorgenommen (für Pseudofarbdatei und Anzahl der Farbbanden siehe Tab. 5 und Anhang).

Im Verlauf der weiteren Auswertung wurden die MCB – Banden wiederum auf die zugrunde liegenden DAPI – Banden übertragen und dementsprechend kartiert (Abb.12).

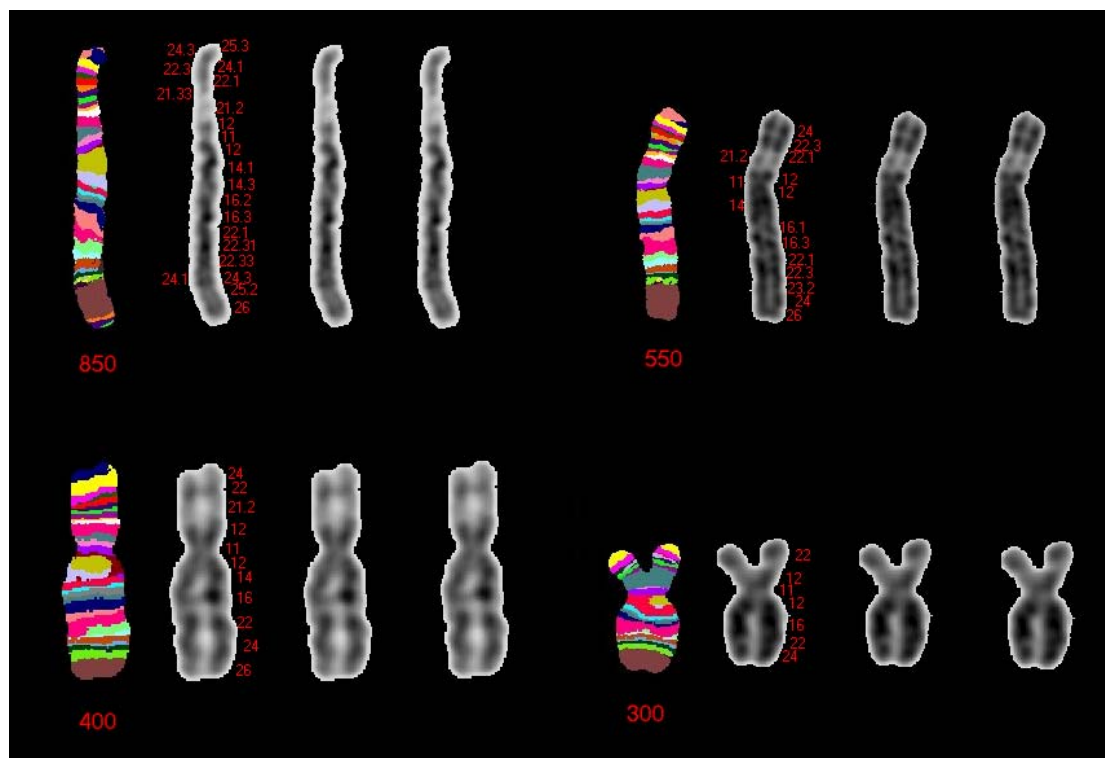


Abb. 12: Übertragung und Kartierung der MCB-Banden auf die entsprechenden DAPI-Banden in den vier zu untersuchenden Bandenstadien auf Basis der ISCN-Nomenklatur.

Anhand dieser Kartierung konnte die Übertragung der Pseudofarbbanden in die Ideogramme der ISCN vorgenommen werden (Abb.13).

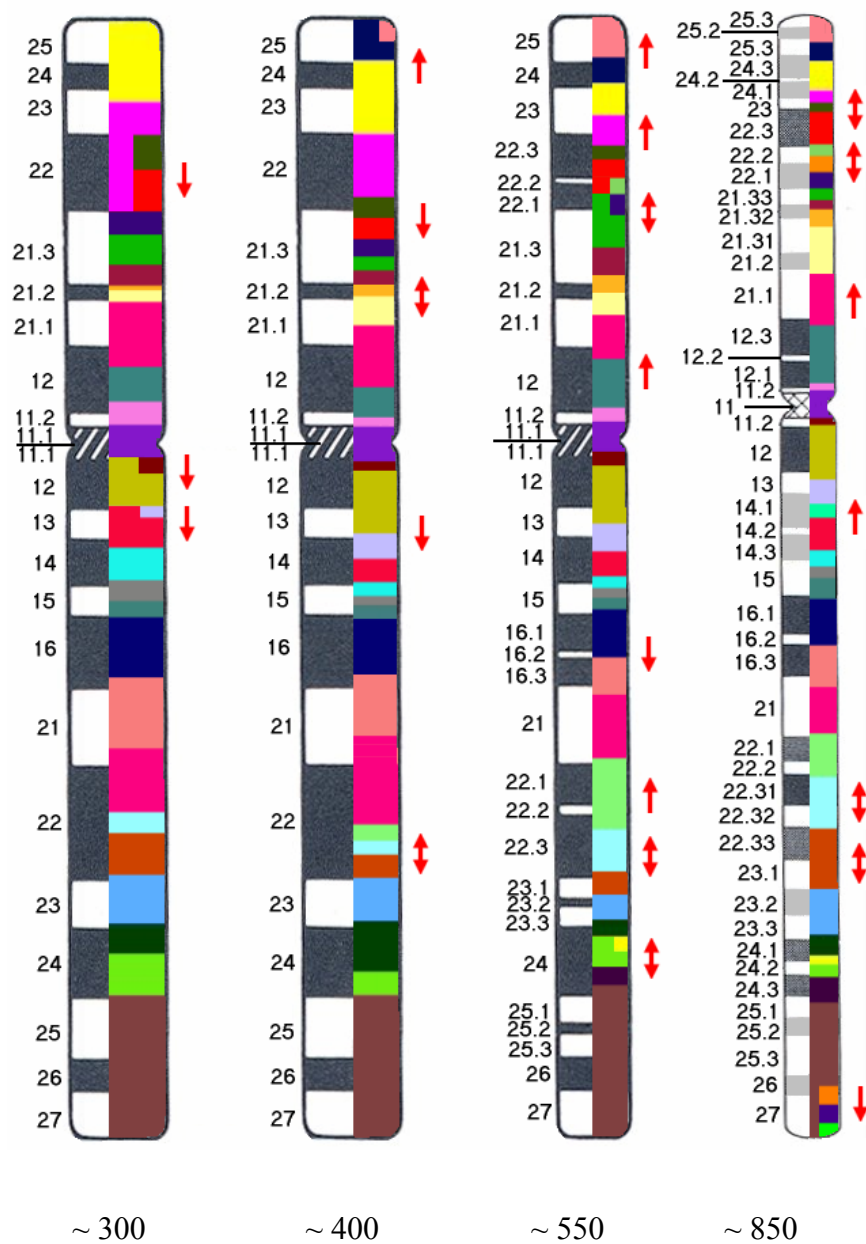


Abb. 13: Übertragung der Pseudofarbbanden von Chromosom 6 die in ISCN-Ideogramme mit Darstellung der Dekondensierungsrichtung (rote Pfeile).

Die hierbei wieder nur als halbe Banden eingezeichneten Farben waren nicht in allen Chromosomen einer Länge vorhanden. Sie tauchten jedoch zuverlässig in der nächst höheren Dekondensierungsstufe auf und können daher als Übergangsstadium betrachtet werden. Die genaue Betrachtung der Pseudofarbbandenmuster ließ eine streng organisierte Hierarchie in der Subbandenaufspaltung erkennen. Beginnend mit Chromosomen im 300 – Bandenstadium erfolgen die Aufspaltungen zunächst im Zentromerbereich, sowie in der Region p22. Gefolgt von Aufspaltungen im Telomerbereich des kurzen Armes, in p 21.2 und q22 bei Chromosomen im 400- Bandenstadium. Im nächst höheren Bandenstadium sind weitere Aufspaltungen in p22, p12, q16, q22 sowie q24 zu beobachten. In der höchsten Dekondensierungsstufe bei 850 Banden waren Aufspaltungen in q14 und in der Telomerregion des langen Armes zu beobachten (Abb.14).

Unter Beachtung dieser Dekondensierungsbereiche und jener Bereiche, die während des gesamten Dekondensierungsprozesses unverändert bleiben, ließ sich die eigentliche Herkunft der Subbanden nun schlussfolgern und eine dem gerechtwerdende Nomenklatur gefunden werden. Abb. 14 soll die Abstammungsverhältnisse noch einmal verdeutlichen.

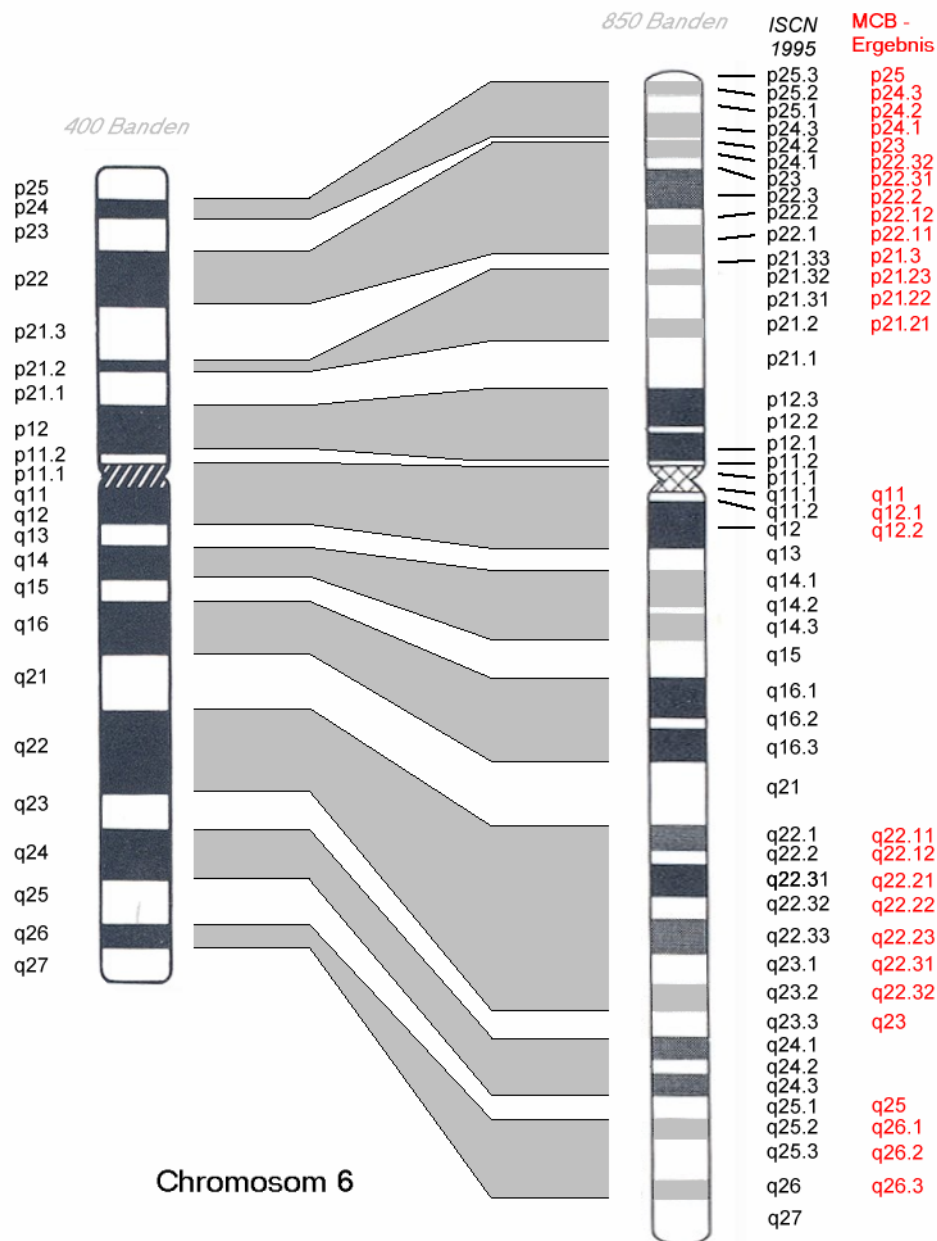


Abb. 14 : Gegenüberstellung von Chromosom 6 im 400- und 850-Bandenstadium unter Aufzeigung der Aufspaltungsverhältnisse der Subbanden als graue Linien und eines daraus resultierenden neuen Nomenklaturvorschlags in roter Schrift.

Wie bereits zuvor für Chromosom 5 nachgewiesen, konnte auch hier gezeigt werden, dass Subbandenaufspaltungen nur aus GTG – dunklen Bereichen möglich sind, während die GTG-hellen Bereiche unverändert bleiben.

Im Falle des Chromosoms 6 sind 29 von insgesamt 48 Banden von der ISCN nicht abstammungsgetreu benannt worden, so dass in 60% aller Banden eine neue Nomenklatur nötig wäre.

3.5 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom X

Für das Subbandenaufspaltungsverhalten von Chromosom X lagen ebenso wie für Chromosom 6 bereits Daten aus früheren *chromosome-stretching*-Untersuchungen vor, die jedoch im Hinblick auf die MCB-Auswertung erst nachrangig betrachtet und verglichen wurden (für Pseudofarbdatei und Anzahl der Farbbanden siehe Tab 5 und Anhang).

Zur genauen Betrachtung der Farbbanden, die während der Kondensierung verschwinden, wurden alle Farbbanden erneut auf die entsprechenden DAPI-Banden übertragen und kartiert (Abb.15).

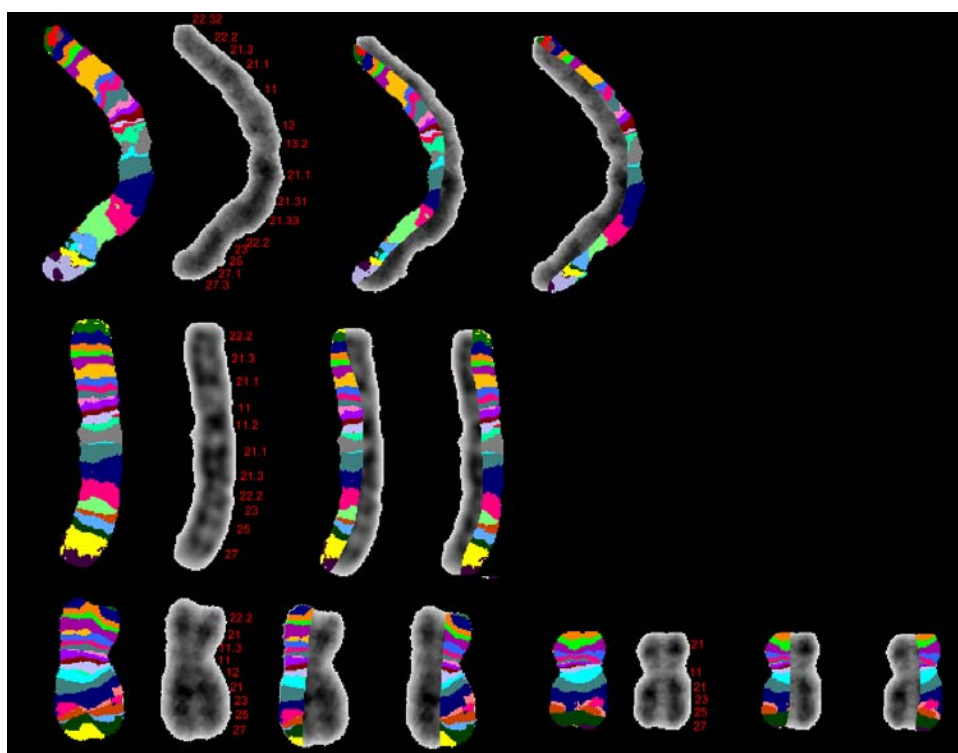


Abb. 15: Übertragung und Kartierung der MCB-Banden von Chromosom X gemäß der ISCN-Nomenklatur (rote Bandenbeschriftung) auf die entsprechenden DAPI-Banden in den vier zu untersuchenden Bandenstadien.

Anhand dieser Kartierung war es möglich die Pseudofarbbanden in die von der ISCN vorgeschlagenen Ideogramme für Chromosom X exakt einzuzichnen und sich so einen Eindruck darüber zu verschaffen, in welchen Regionen Veränderungen im Pseudofarbbandenmuster auftreten (Abb.16).

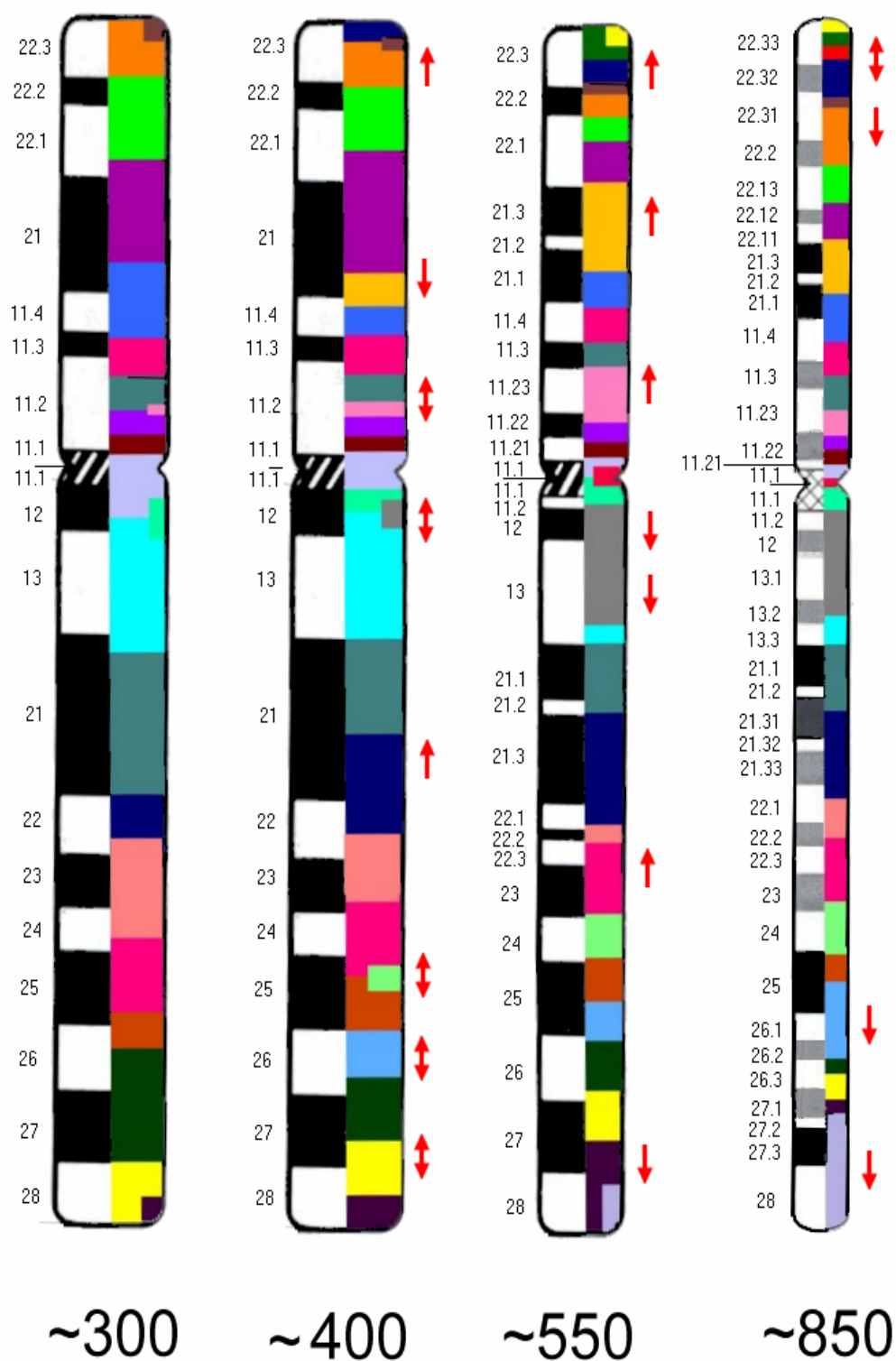


Abb. 16: Übertragung der Pseudofarbbanden des Chromosom X in die ISCN-Ideogramme mit Darstellung der Dekondensierungsrichtung in roten Pfeilen.

Pseudofarbbanden, die in mindestens 5 von 10 Chromosomen gleicher Länge auftraten, wurden dabei wieder als halbe Farbbanden eingezeichnet. Diese sollen den Übergang in das nächst höher dekondensierte Stadium anzeigen. Bei einer Betrachtung von kondensierten zu dekondensierten Chromosomen, war ein Schema in der Subbandenaufspaltung zu erkennen. Die Bereiche, die zwischen dem 300 – und 400 - Bandenstadium dekondensieren, liegen zentromer- und telomernahe, sowie in p21, q21 und q25 - q26. Danach folgen im 550 – Bandenstadium Aufspaltungen in den Bereichen p22.1, p11.3, q21.31, q21.33, sowie weitere Aufspaltungen an beiden Armen in der Telomerregion. Zuletzt sind im 850 – Bandenstadium Aufspaltungen in den Bereichen p22.32, q25 – q26.2 und erneut telomernah zu sehen (Abb.16).

Es zeigte sich, dass Aufspaltungen wiederum nur aus GTG – dunklen Bereichen möglich sind. Aus den Ergebnissen der Dekondensierungsrichtung ließen sich Rückschlüsse auf die tatsächliche Herkunft der chromosomalen Subbanden ziehen.

Der Vergleich eines X- Chromosoms im 400 – Bandenstadium mit einem X – Chromosom im 850 – Bandenstadium soll die Abstammung der Subbanden verdeutlichen und aufzeigen, in welchen Bereichen die ISCN – Nomenklatur nicht gerechtfertigt ist (Abb.17).

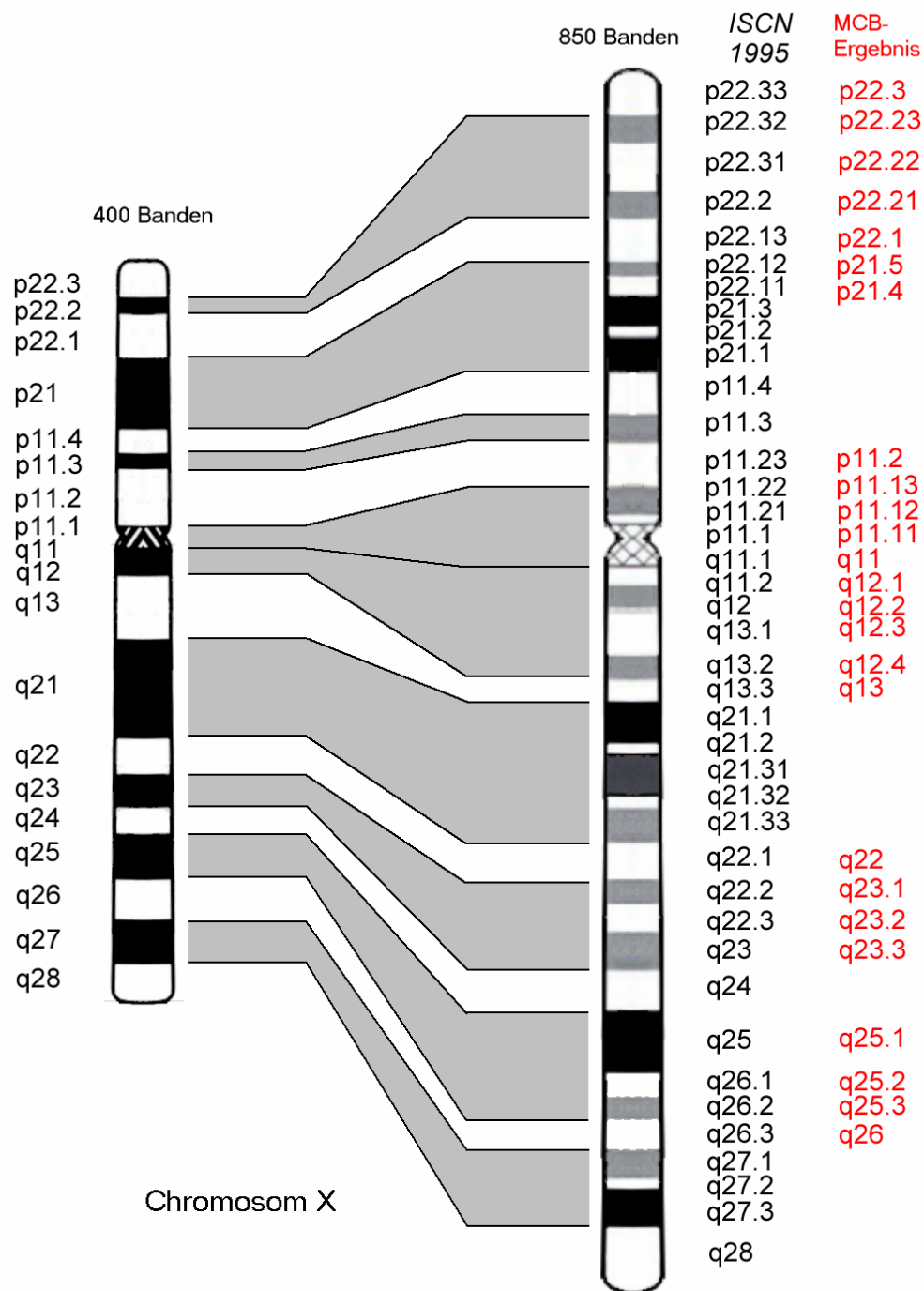


Abb.17: Gegenüberstellung von Chromosom X im 400- und 850-Bandenstadium unter Aufzeigung der Aufspaltungsverhältnisse der Subbanden als graue Linien und eines daraus resultierenden neuen Nomenklaturvorschlags in roter Schrift.

Basierend auf den MCB – Ergebnissen konnte für 25 Banden auf Chromosom X eine andere Herkunft nachgewiesen und dementsprechend auch eine neue Nomenklatur abgeleitet werden. Dies zeigt, dass 62% der Banden auf Chromosom X durch eine Fehlinterpretation von Seiten der ISCN inkorrekt benannt wurden.

3.6 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom 18

Nachdem mittels hochauflösendem MCB die Subbandenaufspaltung von Chromosom 5 nachgewiesen war, und diese Methode auch an den Chromosom 6 und X bestätigt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob diese Methode auch an relativ kleinen Chromosomen mit geringem Aufspaltungspotential angewendet werden kann. Zunächst wurden hierbei von Chromosom 18 jeweils 10 Chromosomen der 4 Bandenstadien betrachtet und die Veränderungen im Farbbandenmuster durch Übertragung und Kartierung auf DAPI-Banden schematisch dargestellt (Abb.18).

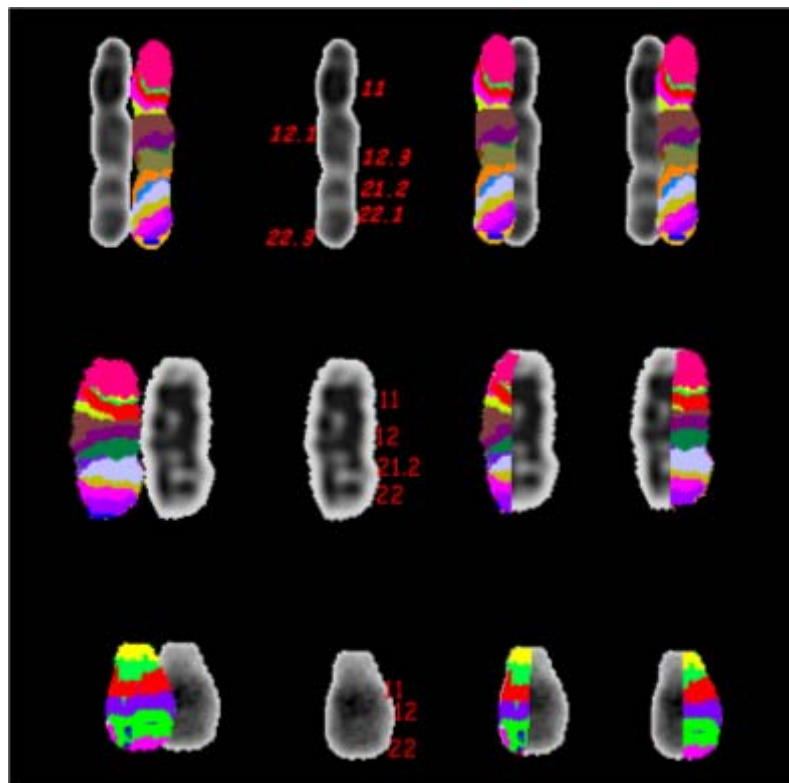


Abb.18 : Übertragung und Kartierung der Pseudofarbbanden des Chromosoms 18 gemäß der ISCN-Nomenklatur auf die entsprechenden DAPI – Banden.

Diese Kartierung ermöglichte eine detailgetreue Darstellung der MCB-Banden innerhalb der ISCN-Ideogramme und verschaffte einen besseren Überblick darüber, in welchen Regionen Veränderungen stattfinden (Abb.19).

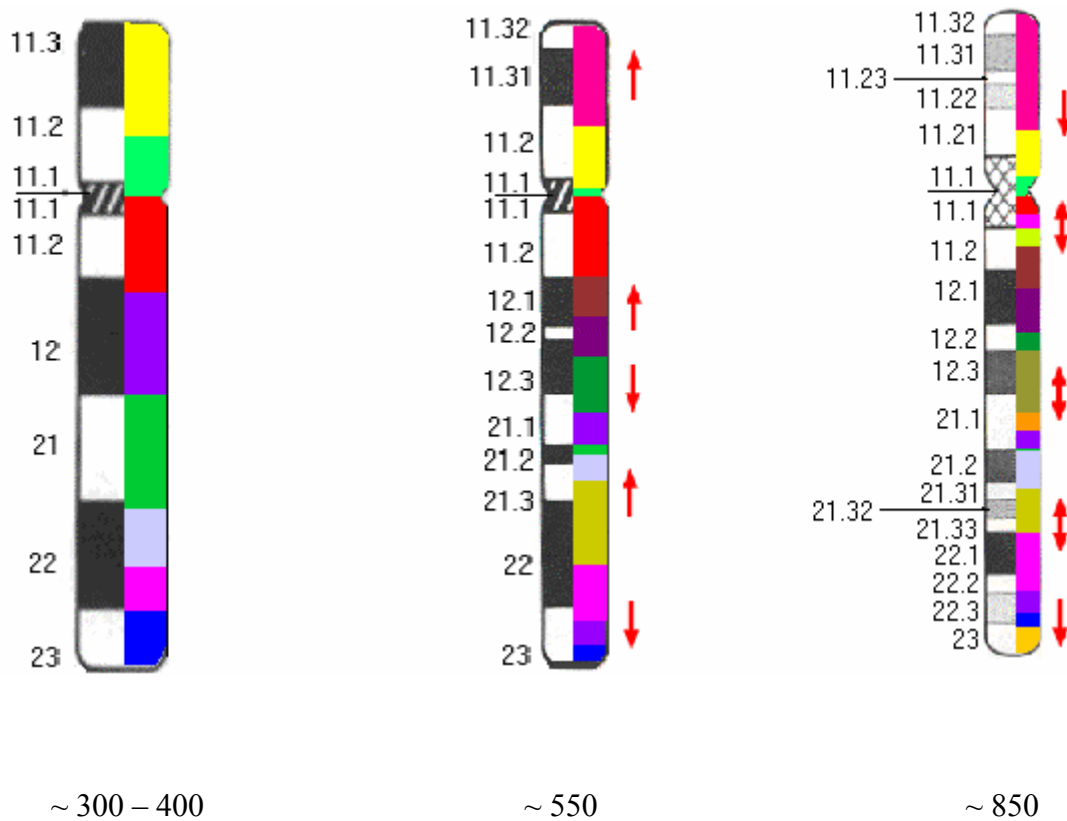


Abb. 19: Übertragung der Pseudofarbbanden von Chromosom 18 in die ISCN-Ideogramme mit Darstellung der Dekondensierungsrichtung anhand der roten Pfeile.

Die Bandenmuster stimmten in den Chromosomen mit derselben Auflösung überein, so dass die Verwendung von halb eingezeichneten Farbbanden diesmal nicht nötig war.

Die Hierarchie in der Bandenaufspaltung war auch hier nachvollziehbar. In der Dekondensierung vom 400 – zum 550 – Bandenniveau, erfolgt zunächst die Aufspaltung wiederum im Bereich der Telomere, sowie an der Bande q12 und q 21.2. Im weiteren Verlauf der weiteren Dekondensierung (von 550 zu 850 Banden) folgen schließlich Aufspaltungen in den Regionen p11.22, q11.1 – 2, q12.3 – 4 und q21.32.

Anhand dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Banden, die während der Dekondensierung unverändert bleiben, war es möglich die Herkunft der Subbanden, wie schon bei Chromosom 5 beschrieben, zu analysieren und neu zu benennen (Abb.20).

Wie erwartet erfolgt die Aufspaltung von Subbanden nur aus GTG – dunklen Banden.

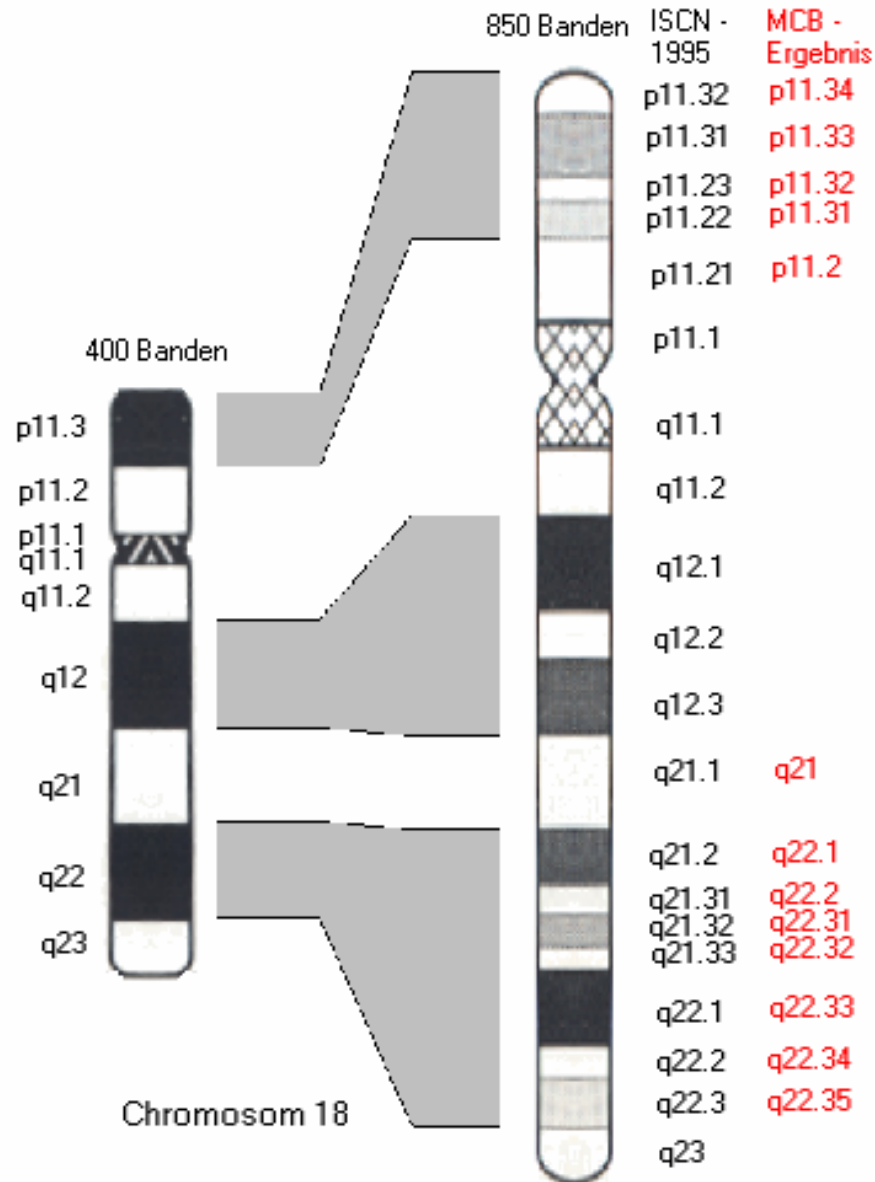


Abb. 20: Gegenüberstellung von Chromosom 18 im 400- und 850-Bandenstadium unter Aufzeigung der Aufspaltungsverhältnisse der Subbanden als graue Linien und eines daraus resultierenden neuen Nomenklaturvorschlags in roter Schrift

Die MCB – Ergebnisse erbrachten bei 13 von insgesamt 20 erkennbaren GTG – Banden auf Chromosom 18 eine andere Herkunft und damit Nomenklatur von Subbanden. 65% der Banden auf Chromosom 18 sind in der ISCN – Nomenklatur nicht entsprechend ihrer Abstammung bezeichnet.

3.7 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom 19

Als weiteres kleines Chromosom wurde nun Chromosom 19 genauer auf sein Aufspaltungsverhalten hin untersucht. Es stellte sich heraus, dass aufgrund der Größe des Chromosoms und der geringen Anzahl von Subbanden bereits eine Pseudofarbdatei mit 24 Farben (siehe Anhang und Tab. 5) für ein hochauflösendes Pseudofarbbandenmuster ausreichend war.

Zur Klärung der Frage in welchen GTG - Bereichen des Chromosoms 19 Pseudofarbbanden verschwinden, wurden diese in gewohnter Weise auf die analogen DAPI – Banden übertragen und kartiert (Abb.21).

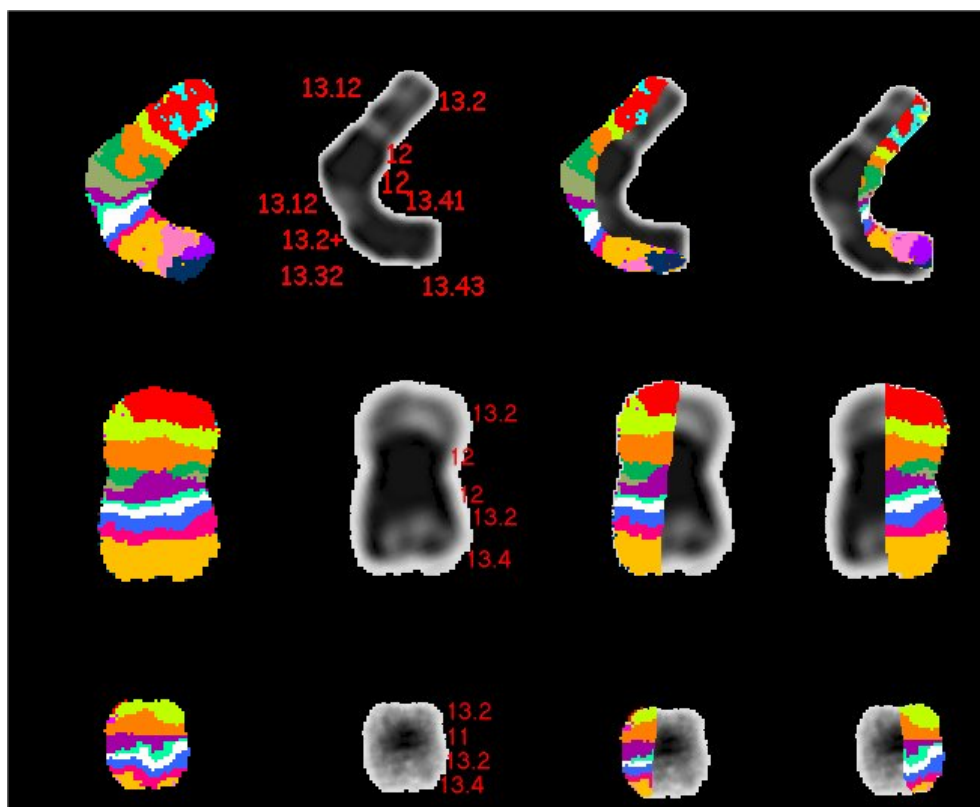


Abb. 21: Übertragung und Kartierung der Pseudofarbbanden von Chromosom 19 gemäß der ISCN-Nomenklatur auf die entsprechenden DAPI – Banden.

Entsprechend dieser Kartierung wurden die MCB – Banden anschließend in die genormten Ideogramme der ISCN eingetragen (Abb.22).

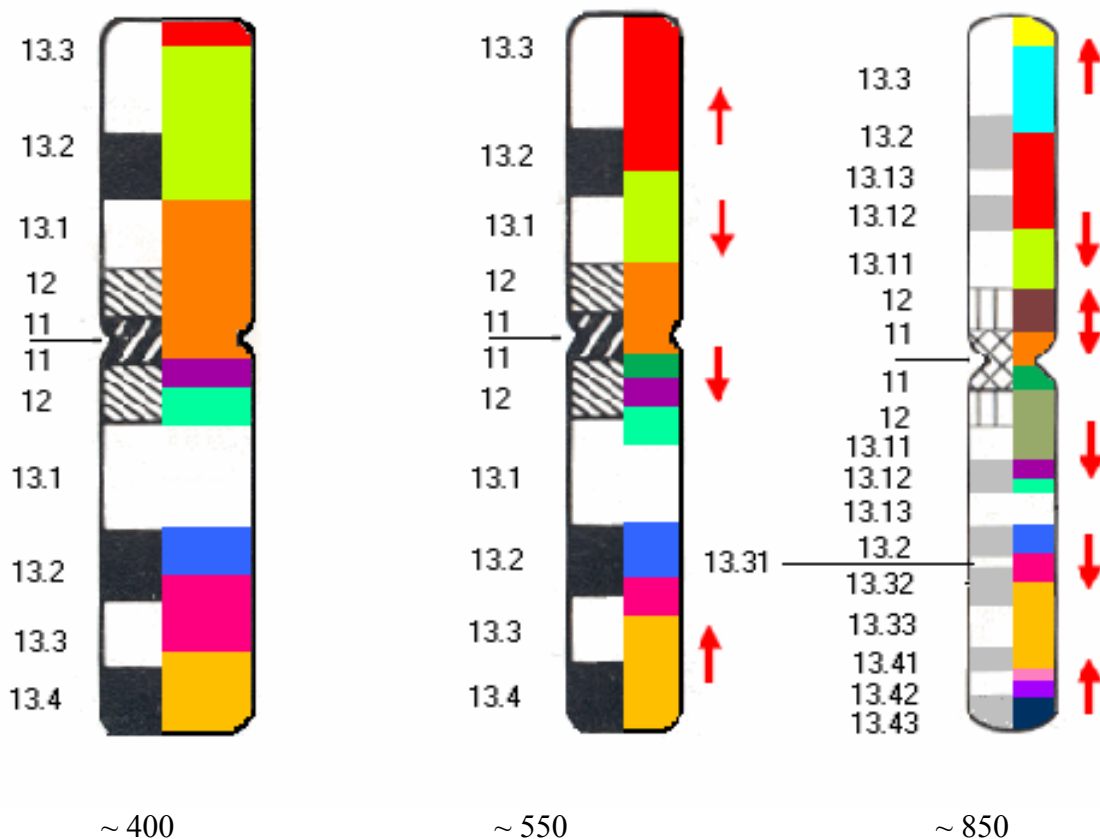


Abb. 22: Übertragung der Pseudofarbbanden von Chromosom 19 auf ISCN-Ideogramme und Darstellung der Dekondensierungsrichtung anhand der roten Pfeile.

Da auch bei Chromosom 19 die Farbbandenmuster aller 10 ausgewerteten Chromosomen einer Länge jeweils identisch waren, fiel die Verwendung von halb eingezeichneten Farbbanden in die Ideogramme weg.

Nach eingehender Betrachtung des Farbbandenmusters wurde ersichtlich, dass der Dekondensierungsprozess zentromer-nah, sowie in den Bereichen p13.2 und q13.4 von Stadium 300 – 400 zu 550 beginnt und sich in den Bereichen p13.3, p12 und q13.2 von 550 zu 850 Banden fortsetzt (siehe Abb.22).

Nun galt es erneut den Ursprung der Subbanden zu analysieren. Die Pseudofarbbanden, die während der Dekondensierung stets in denselben Bereichen blieben, dienten auch hier wieder als Ausgangspunkt. Auch im Fall von Chromosom 19 bestätigte sich, dass chromosomale Subbanden nur aus Aufspaltungen von GTG – dunklen Bereichen hervorgehen (Abb.23).

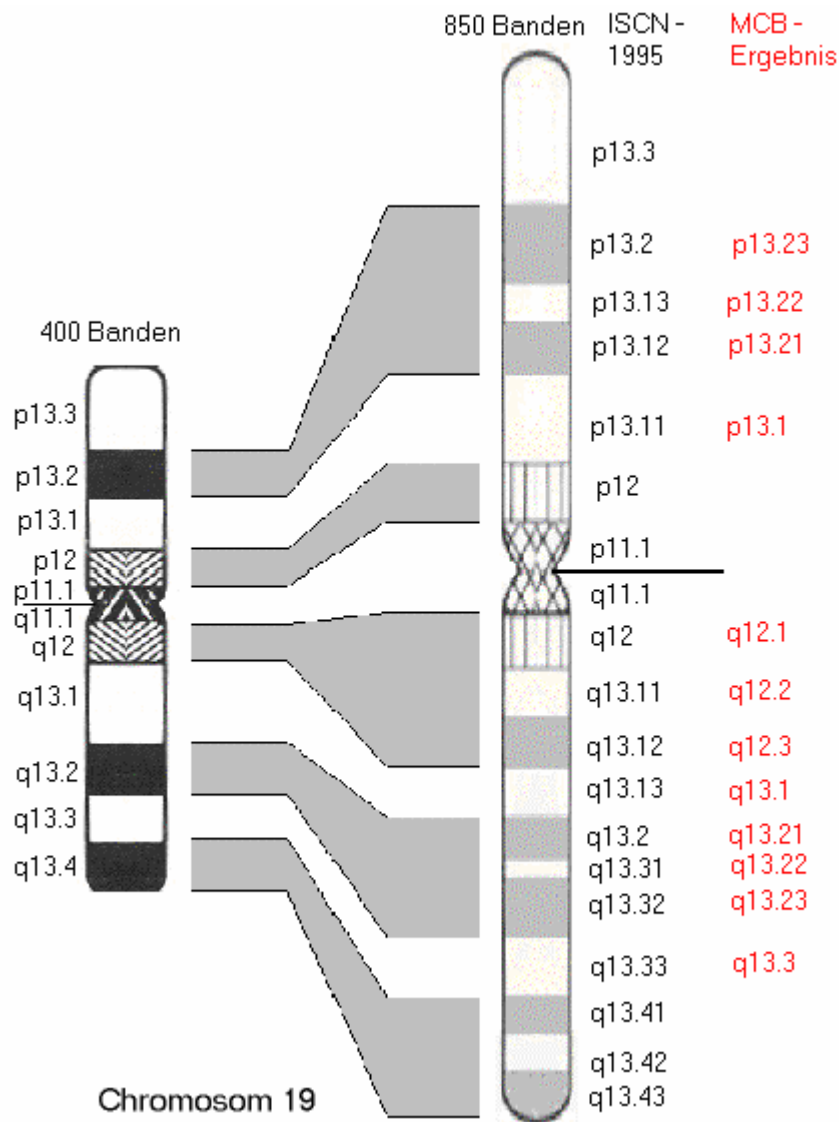


Abb. 23: Gegenüberstellung von Chromosom 19 - Ideogrammen im 300-400-Bandenstadium und 850-Bandenstadium; die Herkunft der Subbanden ist mit grauen Linien dargestellt, ein neuer Nomenklaturvorschlag anhand der MCB - Ergebnisse in roter Schrift.

Durch die MCB - Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass insgesamt 12 von 19 GTG - Banden, bezogen auf ihre Herkunft, von der ISCN fehlinterpretiert wurden. Diese 12 Banden wurden nun nach Kenntnis der Subbandenaufspaltung mit einer neuen Nomenklatur versehen (siehe Abb.23 rote Schrift).

Die ISCN - Nomenklatur zeigte sich erneut in über 63% der Banden auf Chromosom 19 als nicht korrekt interpretiert.

3.8 Ergebnisse zu den Untersuchungen an Chromosom 20

Aus der Reihe der relativ kurzen Chromosomen wurde nun nach Bearbeitung der Chromosomen 18 und 19 das Chromosom 20 genauer untersucht. Allerdings musste vor der eigentlichen Auswertung dieses Chromosoms dem vorhandenen MCB-Mix, bestehend aus drei DNA-Banken, eine weitere DNA-Bank im p-terminalen Bereich des Chromosoms hinzugefügt werden, da aufgrund mangelnder Überlappung in diesem Bereich keine aussagekräftige Auflösung zu erreichen war (siehe auch 4.4 und Anhang). Die Anzahl der in den unterschiedlichen Bandenstadien entstandenen Pseudofarbbanden, sowie die dafür verwendete Pseudofarbdatei können Tab. 5 entnommen werden. Wie bereits bei Chromosom 19 beschrieben, erwies sich auch für Chromosom 20 die relativ geringe Anzahl von maximal 24 zu vergebenden Pseudofarben als ausreichend für eine hochauflösende Pseudofarbbandendarstellung. Pseudofarbbanden, die nicht in allen Chromosomen einer Länge vorkamen, wurden nach denselben Kriterien wie bereits bei Chromosom 5 geschildert, als halbe Banden eingezeichnet.

Die Abnahme der Anzahl der Pseudofarbbanden machte zur genauen Bestimmung über Lage und Größe eine Übertragung und Kartierung der Pseudofarbbanden auf die zugrunde liegenden DAPI – Banden erforderlich (Abb.24).

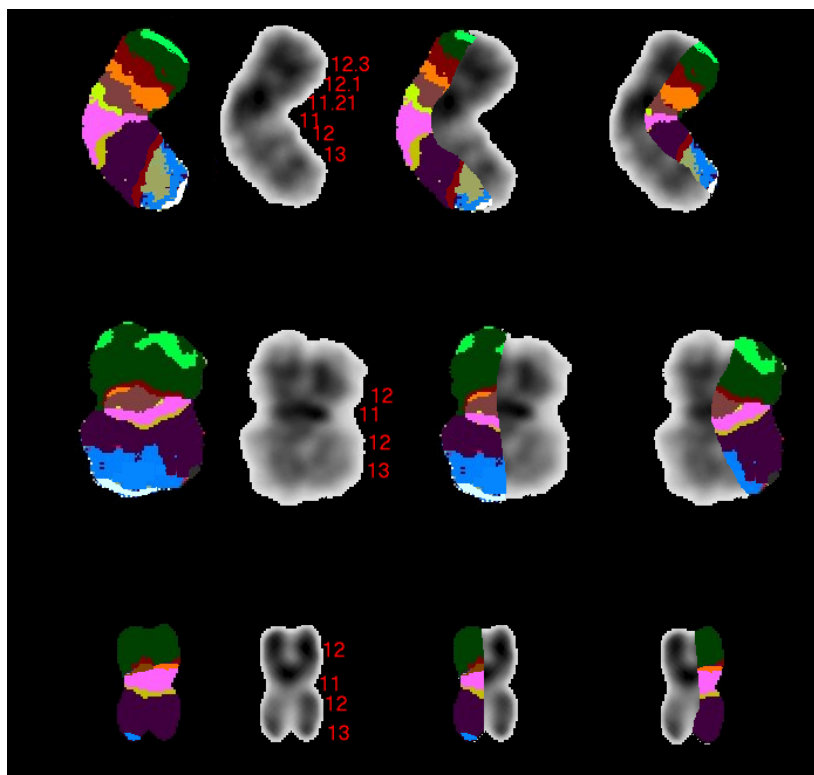


Abb. 24: Kartierung und Übertragung der Pseudofarbbanden von Chromosom 20 gemäß der ISCN 1995 auf die entsprechenden DAPI – Banden.

Die anschließende Übertragung der MCB – Banden in die genormten ISCN – Ideogramme, ließ erkennen, in welchen Regionen Veränderungen im Farbbandenmuster vorliegen (Abb.25).

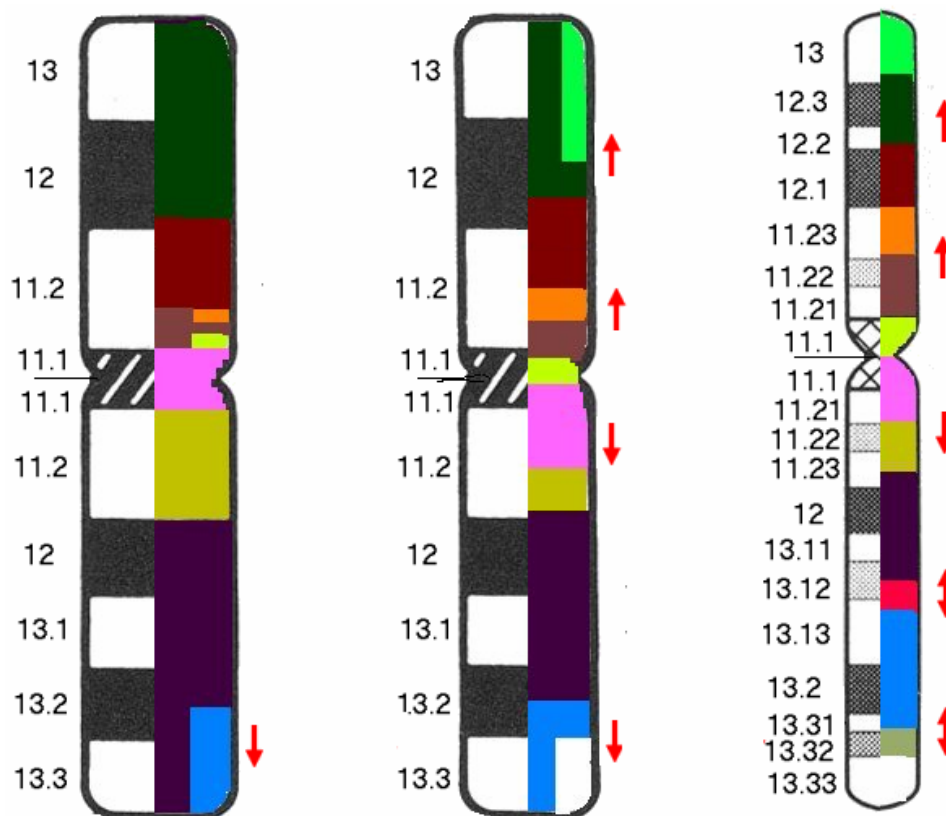


Abb. 25: Übertragung der Pseudofarbbanden in ISCN-Ideogramme und Darstellung der Dekondensierungsrichtung mit Hilfe der roten Pfeile.

Anhand dieser Darstellung war wiederum ein und regionenspezifisches Schema der Dekondensierung zu erkennen. Dieses beginnt im Telomerbereich des langen Arms, setzt sich fort im Zentromerbereich und beiden Telomerbereichen und endet schließlich mit der Dekondensierung in den Bereichen p11.22 und q12 – q13.12 (Abb.25).

Die Aufspaltungen in Subbanden erfolgen ausschließlich in GTG – dunklen Bereichen. Somit ergibt sich für eine Vielzahl von Banden auf Chromosom 20 eine andere Herkunft, als von der ISCN bisher angenommen.

Abb.26 soll dies in einer Gegenüberstellung von einem idealisierten kondensierten und dekondensierten Chromosom 20 verdeutlichen.

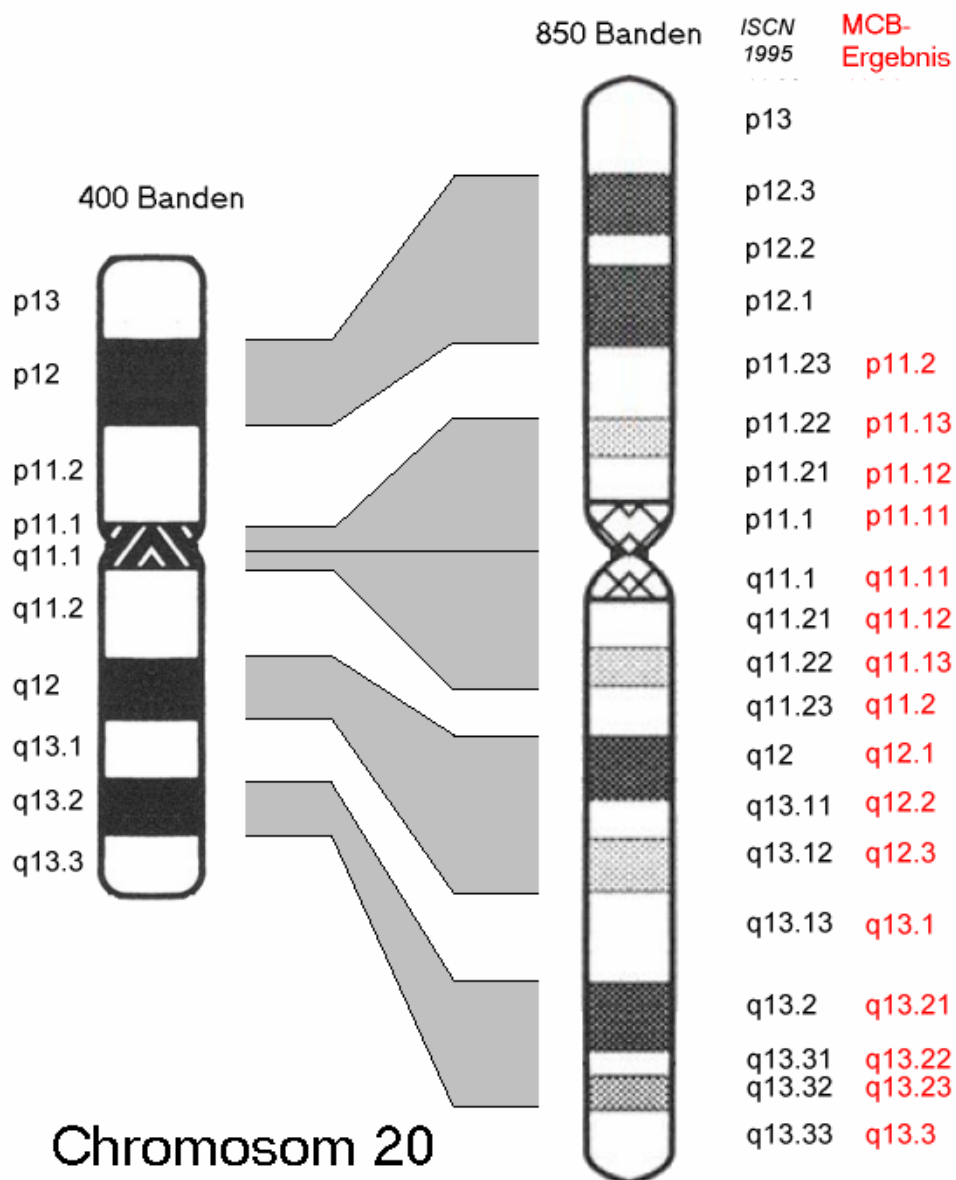


Abb. 26: Gegenüberstellung von Chromosom 20-Ideogramme im 300–400–Bandenstadium und 850–Bandenstadium; die Herkunft der Subbanden ist mit grauen Linien dargestellt, ein neuer Nomenklaturvorschlag anhand der MCB – Ergebnisse in roter Schrift.

Die MCB – Ergebnisse zeigen, dass 16 von 20 Banden auf Chromosom 20 eine andere Herkunft aufweisen als von der ISCN bisher angenommen. Ein Vorschlag für eine neue Bandennomenklatur entsprechend dieser Ergebnisse ist in roter Schrift in Abb. 26 beigelegt. Demnach liegt die Quote der durch die ISCN fehlinterpretierten Banden auf Chromosom 20 bei 80%.

4. Diskussion

4.1 Neue Erkenntnisse zur Subbandenaufspaltung

Als das MCB etabliert wurde, war man zunächst der festen Überzeugung, die Anzahl der Pseudofarbbanden, die im 550-Bandenstadium zu finden waren, würden stets auch in allen anderen Bandenstadien vertreten sein (Chudoba et al., 1999). Der Grund für dieses Postulat lag darin, dass Tumorchromosomen, die in einem weit geringeren Bandenstadium als Lymphozytenchromosomen vorlagen, tatsächlich dieselbe Anzahl von Pseudofarbbanden aufwiesen, wenn man bei der Auswertung auch dieselbe Pseudofarbkombination aus der Computersoftware verwendet. Diese Aussage jedoch wurde in dieser Arbeit relativiert. Durch Erhöhung der Pseudofarbkombinationen von bisher gebräuchlichen 24 auf bis zu 80 Farbkombinationen, konnte gezeigt werden, dass Chromosomen, die durch spezielle Kultivierungsmethoden (siehe Abschnitt 2.1.3) eine höhere Streckung aufweisen, auch bei der MCB-Auswertung mit einer größeren Anzahl von Pseudofarbkombinationen eine höhere Auflösung im Pseudofarbbandenmuster erreicht werden kann. So steigt die Anzahl der Pseudofarbbanden an Chromosomen mit hoher Auflösung, während sie bei geringerer Auflösung abnimmt. Als Beispiel sei hier auf die Untersuchungen an Chromosom 5 aus dieser Arbeit hingewiesen, dessen Pseudofarbbandenanzahl je nach Auflösung zwischen 18 Farbbanden im 300-Bandenstadium und 39 im 850-Bandenstadium variiert (publiziert in Lehrer et al., 2004).

Ursächlich für eine höhere MCB-Auflösung ist folglich zu einem Großteil die Anzahl der Farbkombinationen, die für ein Chromosom von der Computersoftware, nach vorheriger manueller Einstellung, freigegeben werden. Bei genauerer Untersuchung dieses Zusammenhangs, gelangte man zu der Erkenntnis, dass ein relativ großes Chromosom, wie z.B. Chromosom 5 für eine hohe MCB-Auflösung bis zum Subbandenniveau eine Farbkombination von bis zu 80 Pseudofarben benötigt. Für ein kleines Chromosom, wie z.B. Chromosom 19 oder 20 genügt jedoch eine kleine Farbkombination mit 24 Pseudofarben, da eine weitere Erhöhung zu keiner höheren MCB-Auflösung führte. Hierbei muss bemerkt werden, dass nicht alle vorgegebenen Farben sich im tatsächlichen MCB-Bild des Chromosoms widerspiegeln. Sie bilden vielmehr einen detaillierten Pool an Pixeldefinitionen, die erst mit zunehmender Länge der Chromosomen bei der Darstellung zum Tragen kommen.

Um die Frage der Subbandenabstammung zu klären, bzw. die bisherigen Ergebnisse aus den *chromosome-stretching*-Versuchen zu verifizieren, schlugen Kuechler et al, wie unter 1.6 bereits erwähnt, vor, die *stretching*-Methode mit der *FISH*-Technik zu kombinieren. Da jedoch Untersuchungen zeigten, dass sich gestreckte Chromosomen nur schwer oder zum Teil auch überhaupt nicht mit *FISH*-Sonden hybridisieren lassen, musste eine alternative Methode gefunden werden, um verlässlich Chromosomen bis auf Subbandenniveau zu erhalten und untersuchen zu können. Schließlich stellte sich die Kultivierung von Prometaphase-Chromosomen als geeignete Methode dafür heraus (siehe 2.1.3), mit der zwar kein ganz so hohes Bandenniveau wie beim *chromosome-stretching* zu erreichen war, aber immerhin ein Bandenstadium bis 850 Banden und eine Hybridisierung mit MCB-Sonden keine Schwierigkeiten bereitete. Da selbst die Ideogramme der ISCN kein höheres Bandenstadium aufweisen, genügte dieses Stadium für einen direkten Vergleich zwischen der Auffassung der ISCN und den Ergebnissen dieser Arbeit über die Aufspaltung von Banden in Subbanden. Darüber hinaus war die Frage nach Subbanden mit *chromosome-stretching* schon zweimal zuvor mit denselben Schlussfolgerungen beantwortet worden, so dass es sinnvoll erschien, dies mit einer weiteren, weniger mechanisch manipulierten, bzw. unabhängigen zweiten Methode zu verifizieren.

Die Auswahl der zu untersuchenden Chromosomen wurde folgendermaßen durchgeführt: Chromosom 5, an dem das MCB erstmals vorgestellt wurde, besitzt hervorragende Hybridisierungseigenschaften, verspricht daher ein hohes geradlinig unterteiltes Vielfarben-Bänderungsmuster und wurde deshalb als erstes Chromosom untersucht.

Die Chromosomen 6 und X wurden weniger nach ihren Hybridisierungseigenschaften, sondern vielmehr aufgrund der Tatsache, dass hier bereits Daten aus *chromosome-stretching*-Experimenten zum Vergleich vorlagen, ausgewählt.

Um nachzuweisen, ob die unterschiedliche MCB-Auflösung auch an relativ kurzen Chromosomen, die auch nur eine geringe Anzahl von Subbanden und einen unterschiedlichen Gengehalt aufweisen, zu beobachten ist, wurden zuletzt die Chromosomen 18, 19 und 20 untersucht.

Bei der Auswertung dieser Chromosomen konnte mit der jeweils geeigneten Pseudofarbkombination gezeigt werden, dass mit Abnahme des Bandenniveaus von 850 auf 300 auch die Anzahl der Pseudofarbbanden abnahm. Eine Erklärung für das Entstehen neuer Pseudofarben in längeren und höher aufgelösten Chromosomen findet sich darin, dass in

diesen Chromosomen der Anteil der sich überlappenden DNA-Banken, aufgrund der durch die jeweilige Kultivierungsmethode nicht stattgefundenen Kondensierung, in die Länge gezogen wird und daher die einzelnen Farbintensitäten in diesen Bereichen abnehmen. Bei der detaillierten Untersuchung darüber, in welchen chromosomalen Abschnitten eine solche Variation im Pseudofarbbandenmuster zu finden ist, war ein definiertes Schema zu erkennen, welches in allen untersuchten Chromosomen nachzuvollziehen war. Ausgehend von den relativ kondensierten Chromosomen mit etwa 300 – 400 Banden hin zu den dekondensierten mit 550 – 850 Banden finden sich neue Pseudofarbbanden zunächst im Telomer- und Zentromerbereich und anschließend erst in den übrigen Bereichen des p - und q-Armes. Bezogen auf das darunter liegende GTG-Bandenmuster, bzw. hier dem GTG-gleichen DAPI-Muster, konnte anhand der Vorgehensweise, wie in 3.2 – 3.8 beschrieben, gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Aufspaltung in Subbanden und dem Entstehen neuer Pseudofarbbanden besteht. Ebenso konnte bestätigt werden, dass die Aufspaltung von Banden in helle und dunkle Subbanden nur aus GTG-dunklen Banden möglich ist, während die GTG-hellen Ausgangsbanden aus dem 300 – 400 Bandenniveau unverändert bleiben.

Um die exakte Abstammung der Subbanden zu verifizieren, war es nun möglich zumindest für die Chromosomen 6 und X die Daten von Hliscs und Kuechler mit den jetzigen MCB-Ergebnissen zu vergleichen. Sowohl die Ergebnisse von Chromosom 6, als auch die Ergebnisse von Chromosom X sind identisch mit den Ergebnissen aus den *chromosome-stretching*-Untersuchungen, bis auf die Tatsache, dass durch *chromosome-stretching* mit einem Bandenniveau von bis zu 1400/1600 Banden noch mehr Subbanden auf ihren Ursprung hin untersucht werden konnten, als mit dem hier verwendeten Chromosomen auf einem Niveau von bis zu 850 Banden. Abbildung 27 zeigt den direkten Vergleich der Subbandenzuordnung mit a) *chromosome-stretching* und b) hochauflösendem MCB von Chromosome 6.

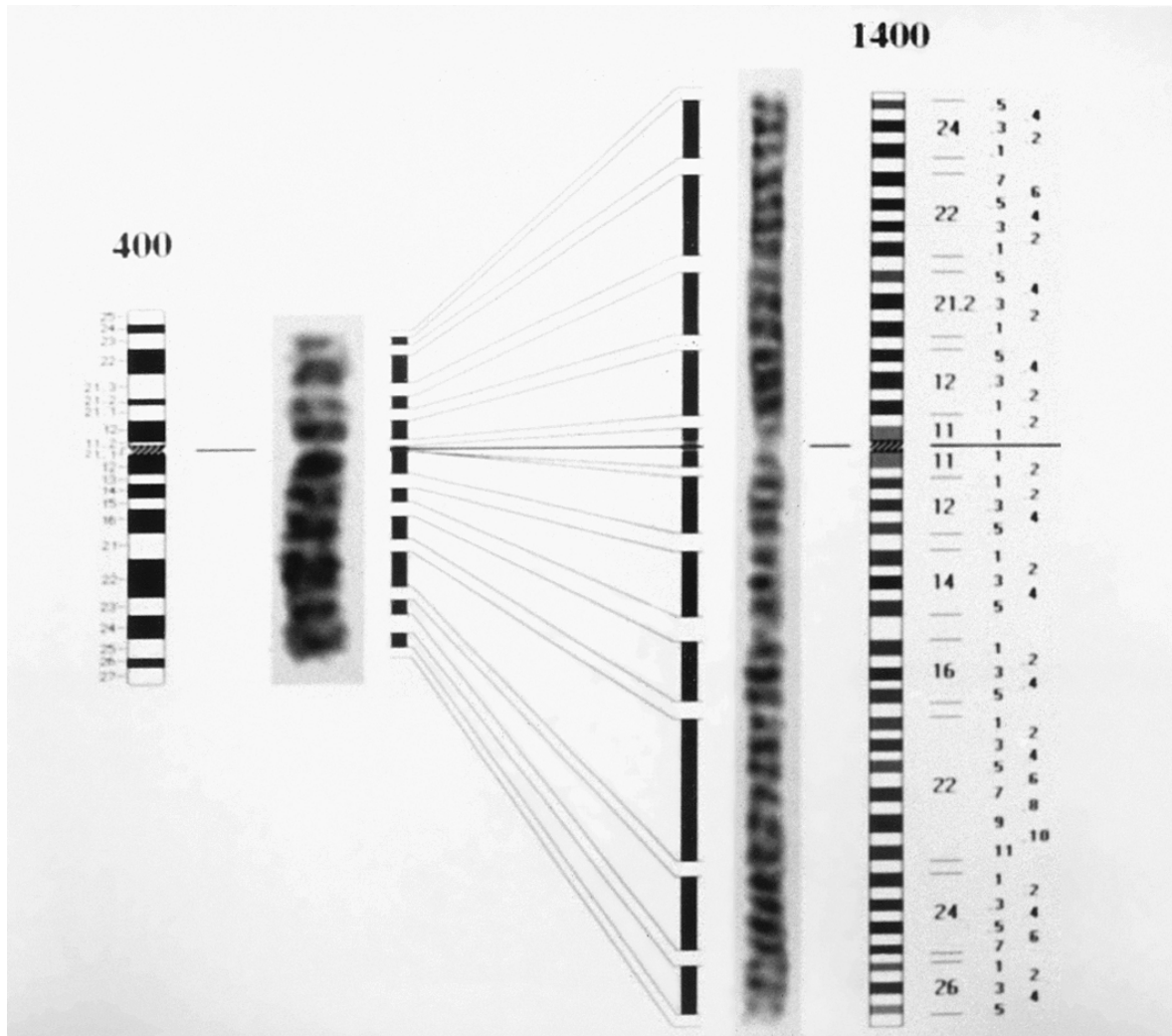


Abb. 27a: Chromosome-Stretching an #6 von 400 auf 1400 Banden. Verfolgung des Aufspaltungsmusters und Zuordnung der Subbanden zu den entsprechenden Banden (Hliscs et al., 1997).

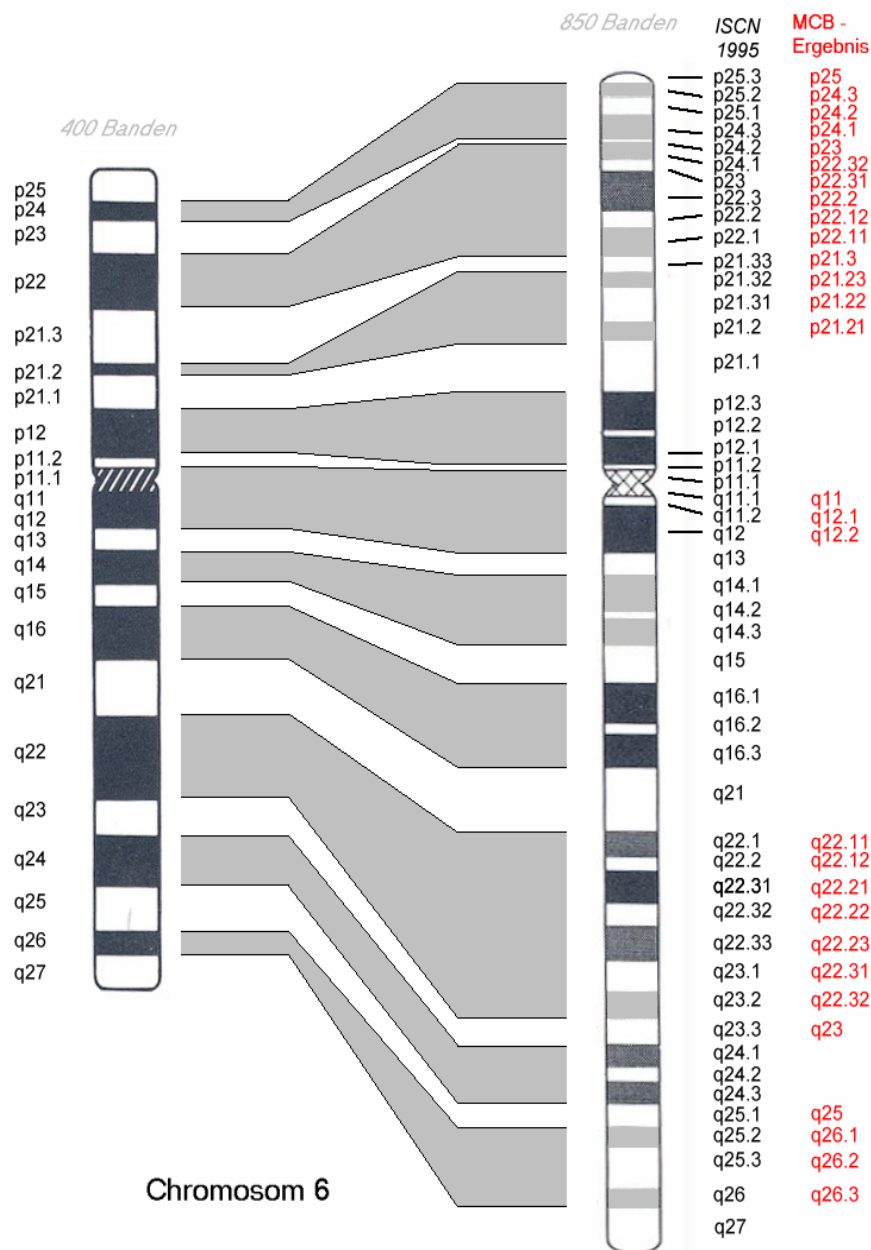


Abb. 27 b: Aufspaltungsverhalten von #6 anhand der MCB-Ergebnisse aus dieser Arbeit. Alle Subbanden konnten auf dieselben Ursprungsbanden wie beim chromosome-stretching zurückgeführt werden.

4.2 Verifizierung der Aufspaltungsverhältnisse

Damit gewährleistet werden konnte, dass die MCB-Ergebnisse, die aus dieser Arbeit hervorgegangen sind, nicht nur ein Zufallsprodukt einer jeweils willkürlich festgesetzten Pseudofarbdatei und deren Interpretation bei der Auswertung ist, war es notwendig, eine Reihe von Untersuchungen zur Verifizierung dieser Ergebnisse durchzuführen.

Zunächst wurden die Ergebnisse der Chromosomen 6 und X mit den bereits vorliegenden Daten aus den *chromosome-stretching*-Arbeiten verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle mit MCB untersuchten Subbanden auf dieselben GTG-dunklen Ursprungsbanden zurückgeführt werden konnten, wie es bei den *stretching*-Experimenten der Fall war (siehe 3.4 und 3.5).

Für alle weiteren untersuchten Chromosomen, bei denen diese Möglichkeit der Überprüfung nicht gegeben war, wurde eine weitere Auswertung mit einer Pseudofarbdatei, die sowohl in der Anzahl der Pseudofarben, als auch der maximal erreichbaren Auflösung der zuerst verwendeten Pseudofarbdatei ähnlich, aber keinesfalls identisch war, durchgeführt (siehe 3.2). Auch mit dieser Methode gelangte man durch genaue Betrachtung der Veränderungen in den MCB-Mustern bei zunehmender Bandenlänge zu denselben Resultaten, wie bereits bei der ersten Auswertung und somit konnte eine Reproduzierbarkeit der Aufspaltungsverhältnisse nachgewiesen werden. Abb.28 verdeutlicht dies noch einmal am Beispiel des kurzen Arms von Chromosom 6, das hier mit zwei unterschiedlichen Pseudofarbdefinitionen zu identischen Aufspaltungsergebnissen führt.

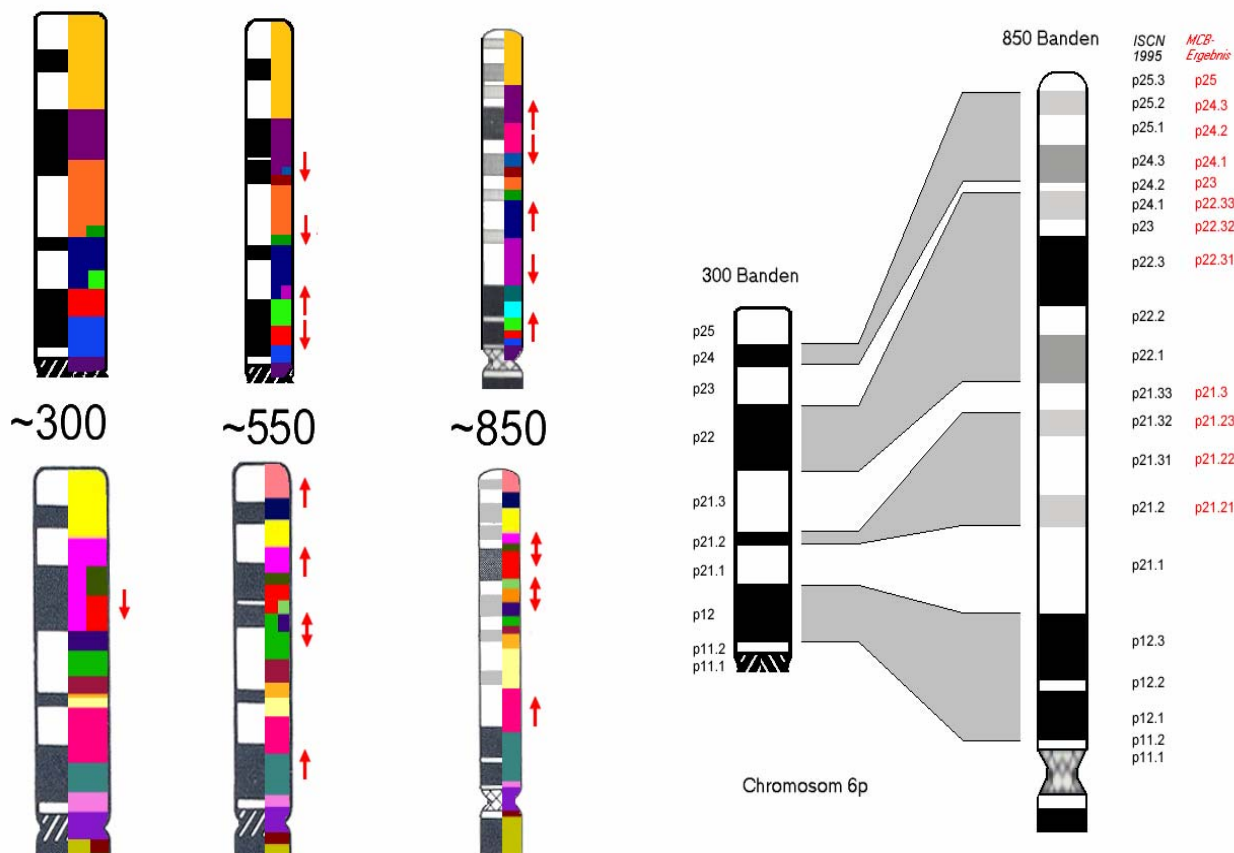


Abb. 28: Darstellung des kurzen Arms von Chromosom 6 in 2 unterschiedlichen, aber in ihrer Auflösung ähnlichen Pseudofarbdefinitionen; beide zeigen ein identisches Aufspaltungsmuster (siehe rote Pfeile) und führen zu denselben Ergebnissen bei der Betrachtung der Subbandenherkunft (graue Linien).

4.3 Notwendigkeit einer neuen Nomenklatur

Nachdem erneut gezeigt werden konnte, dass das bisherige Nomenklatorsystem, ohne biologische Grundlage in Bezug auf die Abstammung der Subbanden, nicht gerechtfertigt ist, ist es nun an der Zeit, sich um eine Nomenklatur, die diese Erkenntnisse berücksichtigt und beinhaltet, zu bemühen.

Um eine möglichst leichte Verständlichkeit und Überschaubarkeit zu ermöglichen, und damit auch ein höheres Maß an Akzeptanz zu erreichen, wurde der Nomenklaturvorschlag aus dieser Arbeit nahe an das bisherige ISCN-System angelehnt. Die Einteilung der Chromosomen in jeweils einen langen und kurzen Arm wurde ebenso übernommen, wie auch der Beginn der Bandennummerierung vom Zentromer aus distalwärts zu den beiden Telomeren. Weiterhin behielt man die Bezeichnung der in 4.1 beschriebenen spezifischen Orientierungsbanden bei, so dass die jeweils erste Ziffer im Nomenklatorsystem unverändert übernommen wurde.

Veränderungen wurden erst ab der zweiten Ziffer im Nummerierungssystem vorgenommen. Subbanden, die auf höherem Bandenniveau auftauchen, wurden nicht mehr zwischen zwei Orientierungsbanden durchnummeriert, sondern ihrer eigentlichen Abstammungsbande, die nun ja bekannt war, zugewiesen. Die Möglichkeit, eine Subbande einer GTG-hellen Bande, z.B. Xq22 (GTG-hell) mit den Subbanden Xq22.1-3 (hell-dunkel-hell) zuzuschreiben, wie es zuvor oft der Fall war, war jetzt ausgeschlossen, da eindeutig nachgewiesen werden konnte, dass Subbanden nur aus Aufspaltungen GTG-dunkler Banden hervorgehen. Im Falle der oben erwähnten Bande Xq22 gibt es also keine zugehörigen Subbanden. Denn Xq22.1 ist nichts weiter als die Bande Xq22 selbst und die Subbanden Xq22.2 und Xq22.3 gehören zur darunter liegenden GTG-dunklen Bande Xq23 und lauten daher nach neuem Nomenklaturvorschlag Xq23.1 und Xq23.2. Nach diesem Prinzip konnte für alle untersuchten Subbanden, die nach dem ISCN- System scheinbar aus GTG-hellen Banden entsprungen sind, eine neue Bezeichnung gefunden werden. Ebenso konnte die Bezeichnung einiger Subbanden, die zwar GTG-dunklen Banden zugeschrieben wurden, jedoch nicht den wahren zugrunde liegenden GTG-dunklen Banden, richtig gestellt werden, so zum Beispiel, die Subbande Xq11.2, die wie sich gezeigt hat, nicht zu Xq11 gehört, sondern zu Xq12 und daher im eigentlichen Sinne Xq12.1 heißen müsste (siehe auch Abb.29).

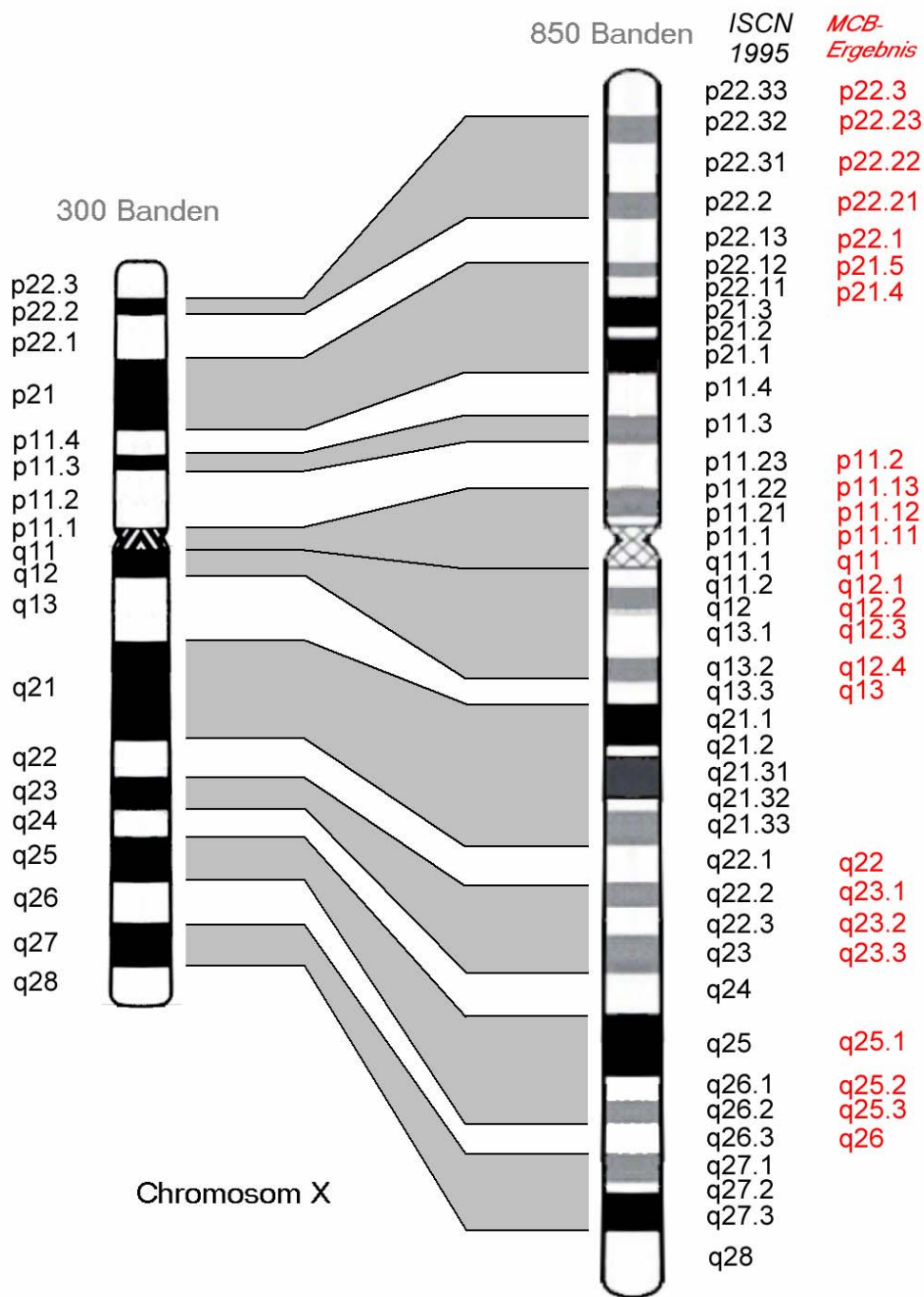


Abb. 29: Ideogramm von Chromosom X im 300- und 850-Bandenstadium mit bisheriger Nomenklatur (schwarze Schrift) und neuem Nomenklaturvorschlag (in roter Schrift).

4.4 Bedeutung für die physikalische Kartierung von Genen

Der Nachweis darüber, dass chromosomale Subbanden nur aus den GTG-dunklen Banden hervorgehen können, führt zwangsläufig zu einer neuen und kritischen Betrachtung der bisherigen physikalischen Kartierung von Genen bzw. DNA-Proben. Vielfach konnte bereits beobachtet werden, dass die Lokalisation einer DNA-Probe von deren Hersteller auf eine GTG-dunkle Bande projiziert wurde. Nach der Hybridisierung wurde diese jedoch oftmals in einem GTG-hellen Bereich wiedergefunden. Dieser Sachverhalt warf unweigerlich die Frage nach eventuell vorliegenden intrachromosomalen Aberrationen auf, da die DNA-Probe ja eindeutig nicht am vorgegebenen Ort zu finden war. Unter Berücksichtigung der neuen Erkenntnisse zur Subbandenaufspaltung ist für diese Fälle eine plausible Lösung denkbar. Schließlich ist es möglich, dass die verwendete DNA-Probe nach Herstellerangaben auf einem relativ niedrigen Auflösungslevel in einem GTG-dunklen Bereich liegt, jedoch nach Hybridisierung auf Chromosomen in einer höheren Auflösungsstufe und nach bereits vollzogener Subbandenaufspaltung nun in einem GTG-hellen Bereich anzutreffen ist. Somit wäre nach Kenntnis der genauen Aufspaltungsverhältnisse die Diskussion über eventuelle Aberrationen hinfällig.

4.5 Grenzen des MCB

Mit Hilfe der Präparationsmethoden für sog. Prometaphase-Chromosomen, gelang es in dieser Arbeit, ein Bandenniveau von bis zu 850 Banden zu erreichen und dies auch in einer entsprechend hohen MCB-Auflösung darzustellen. Nun stellt sich die Frage, ob an Chromosomen, die auf ein noch höheres Bandenniveau kultiviert wurden, auch das MCB noch in der Lage ist, eine gleichermaßen hohe Auflösung zu erreichen. Allerdings wurden für die Auswertung auf dem bisherigen Niveau bereits 80 Pseudofarben als mögliche Farbklassifikatoren, bei einer durch die Software limitierten maximal möglichen Anzahl von 99 Pseudofarben, verwendet, so dass für die Auswertung eines Chromosoms 5 im 1400-Bandenstadium vermutlich weit mehr als 99 Pseudofarben freigegeben werden müssten.

Eine weitere Fragestellung bezüglich des hochauflösenden Verhaltens des MCB ergibt sich aus der Überlegung, ob, relativ unabhängig von Kultivierungsmethoden, durch Erhöhung der Anzahl der DNA-Banken für ein Chromosom und die dadurch entstehende Zunahme der

Überlappungsbereiche, eine höhere Auflösung erzielt werden kann. Beobachtungen am Chromosom 20 lassen dies vermuten: Zu Beginn der Untersuchungen an diesem Chromosom wurde ein MCB-Mix bestehend aus 3 DNA-Banken verwendet. Da die Ergebnisse im Hinblick auf eine möglichst hohe Auflösung nicht zufrieden stellend ausfielen, wurde der Versuch unternommen, durch Verwendung einer zusätzlichen DNA-Bank aus dem Telomerbereich des p-Arms diese Ergebnisse zu verbessern (siehe Markierungsschema für Chromosom 20 im Anhang). Dies erwies sich als zutreffend und wurde seither für die Auswertung dieses Chromosoms als neuer, standardisierter MCB-Mix für Chromosom 20 verwendet. Dies wirft jedoch die Frage auf, ob eine Mehrzahl an DNA-Banken generell an jeden Chromosom in jeder Chromosomenregion die Auflösung zu verbessern vermag und inwieweit diese Erhöhung der DNA-Banken durch die Technik der Mikrosezierung und letztendlich auch durch die optischen und manuellen Fähigkeiten der mikrosezierenden Person begrenzt wird.

Nichts desto trotz erwies sich das MCB als einzige *FISH*-Methode mit der es möglich war eine solch hohe Auflösung bis auf Subbandenniveau zu erreichen. Andere *FISH*-Methoden, wie etwa der *chromosome bar code* (Müller et al., 1997) oder *SCAN* (Kakazu et al., 2003), das auf bandenspezifischen DNA-Banken basiert, welche das GTG-Muster farbig imitieren, scheitern an dieser Aufgabe.

5. Ausblick

Nach Analyse der Chromosomen 5, 6, 18, 19, 20 und X im Hinblick auf ihr Aufspaltungsverhalten in Subbanden, müssten nun als nächstes auch die bis dato noch nicht untersuchten weiteren 19 menschlichen Chromosomen auf diese Weise überprüft werden. Erst ein abschließendes Ergebnis über den gesamten menschlichen Karyotyp mit exakter Definition aller chromosomalen Subbanden in Form eines neuen, die Herkunft der Banden erklärenden Nomenklaturvorschlags, macht es sinnvoll, die ISCN-Kommission auf ihre mehr oder weniger willkürliche und nicht korrekte Nomenklatur hinzuweisen und wichtiger noch, sie von der Notwendigkeit einer Reformation der ISCN zu überzeugen. Da die ISCN jedoch seit je her als die weltweit gültige „Bibel der Zytogenetik“ betrachtet wird, ist es sicherlich schwierig, eine in den Köpfen der Zytogenetikern seit Jahrzehnten verankerte Nomenklatur in einem solch großen Umfang zu ändern, da dies zwangsläufig auch bedeuten würde, dass sämtliche zytogenetischen Beschreibungen, Genkartierungen und Angaben über die Lage von DNA-Sonden nicht korrekt und daher hinfällig wären. Somit scheint die Forderung nach einer Reformation der ISCN schier undenkbar, im Sinne der wissenschaftlichen Korrektheit ist sie jedoch dringend erforderlich. Vielleicht findet sich ein Kompromiss zwischen der bisherigen Nomenklatur und dem auf biologischen Grundlagen basierenden neuen Nomenklaturvorschlag.

Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt, der sich aus den Daten dieser Arbeit ergibt, wäre die Untersuchung von Chromosomen aus anderen Geweben, wie z.B. Amniozyten oder auch Knochenmarkzellen. Hierbei wäre ein besonderes Augenmerk darauf zu richten, ob die Hierarchie in der Subbandenaufspaltung an den bereits untersuchten Lymphozyten identisch ist mit der Hierarchie in anderen Zelltypen, oder ob gewebsspezifische Unterschiede vorliegen, die eventuell durch ein anderes Transkriptionsmuster oder dem Prinzip der regionalen Schwellung von Proteinen zu erklären sind.

Ebenso bietet die Untersuchung von evolutionären Umbauten, die zu Fusionen bzw. Unterbrechung von GTG-Banden führen einen weiteren Ansatzpunkt. Eine Untersuchung dieser Regionen mit dem MCB könnte weitere Aufschlüsse über das Aufspaltungsverhalten von Subbanden und deren mögliche Bedeutung liefern.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mit der Methode des MCB das Aufspaltungsverhalten von chromosomalen Banden in Subbanden zu analysieren und mit den bereits durch *chromosome-stretching* erhobenen Daten zu diesem Thema zu vergleichen, sowie die Notwendigkeit einer grundlegenden Reformation der ISCN hervorzuheben.

Zunächst wurde die MCB-Auswertung durch Erhöhung der sonst üblichen 24 Pseudofarbkombinationen auf bis zu 80 Kombinationen, je nach Größe des auszuwertenden Chromosoms, modifiziert und somit eine zuverlässige Möglichkeit geschaffen, das MCB-Vielfarbenmuster in unterschiedlich hohen Auflösungen darzustellen.

Nach Etablierung dieser Methode erfolgte die Analyse der Subbandenaufspaltungen an den Chromosomen 5, 6, 18, 19, 20 und X. Durch eingehende Betrachtung der Verteilung der MCB-Pseudofarbbanden im Verlauf der unterschiedlichen Auflösungsstufen von 300 bis hin zu 850 Banden konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass alle chromosomalen Subbanden, sowohl helle, als auch dunkle, einzig und allein aus GTG-dunklen Banden hervorgehen, während GTG-helle Ausgangsbanden im Verlauf der chromosomalen Dekondensation ihre ursprüngliche Form und Größe beibehalten. Desweiteren war an allen untersuchten Chromosomen eine Art „Aufspaltungshierarchie“ zu erkennen, die zeigte, dass die Dekondensation und damit Streckung der Chromosomen im Zentromer- und Telomerbereich beginnt und sich erst danach auf die p- und q-Arme ausweitet. Diese Hierarchie könnte einen Ausgangspunkt für nachfolgende Studien zur Abfolge und zum Verständnis von Transkriptionsmechanismen darstellen.

Der direkte Vergleich der Ergebnisse aus den Chromosomen 6 und X aus dieser Arbeit mit den bereits existierenden Daten aus *chromosome-stretching*-Untersuchungen führte zu identischen Rückschlüssen im Hinblick auf das Aufspaltungsverhalten in Subbanden und die zugrunde liegenden GTG-dunklen Ursprungsbanden. Dies wurde als weiterer Beweis für die wissenschaftliche Korrektheit der Subbandenaufspaltung gewertet.

Da die weitgehend willkürlich festgelegte ISCN-Nomenklatur in ihrer jetzigen Form annehmen lässt, Subbanden könnten sowohl aus GTG-hellen wie auch aus GTG-dunklen Banden hervorgehen, war es nötig, diese Nomenklatur zu revidieren und mit Hilfe eines neuen Nomenklaturvorschlags, der zwar in Anlehnung an das bisherige System, jedoch unter Verdeutlichung der zugrunde liegenden, biologisch korrekt zugeordneten GTG-dunklen Ursprungsbanden erstellt wurde, zu belegen.

Durch diese Arbeit offerieren sich weitere Forschungsoptionen, wie z. B. eine abschließende Untersuchung des chromosomalen Aufspaltungsverhaltens des gesamten menschlichen Karyotyps, sowie vergleichende Studien zur Aufspaltungshierarchie in unterschiedlichen Geweben.

7. Literaturverzeichnis

Arnold J. (1879)

„Über feinere Strukturen der Zelle unter normalen und pathologischen Bedingungen“
Virchows Arch. Path. Anat., Vol 77: 181-206

Caspersson T., Zech L., Johansson C. (1970)

„Analysis of human metaphase chromosomes set by aid of DNA-binding fluorescent agents“
Exp. Cell Res., Vol 62: 490-492

Caspersson T., De La Chapell A., Schroder J., Zech L. (1972)

„Quinacrin fluorescence of metaphase chromosomes. Identical pattern in different tissues“
Exp. Cell Res., Vol 72: 56-59

Chudoba I., Plesch A., Lörch T., Lemke J., Claussen U., Senger G. (1999)

„High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes“
Cytogenet Cell Genet 84: 156-160

Claussen J., Claussen N., Claussen U. (2001)

„Humangenetik Skript 1 für Studierende der Biologie und Medizin“

Claussen U., Hennies HC., Lüdecke HJ., Senger G., Spielvogel H., Reis A., Telenius H., Mazur A., Horsthemke B. (1993)

„Microdissection of GTG-banded chromosomes and PCR-mediated cloning“
Chromosomes Today 11: 183-189

Claussen U., Mazur A., Rubtsov N. (1994)

„Chromosomes are highly elastic and can be stretched“
Cytogenet. Cell Genet 66: 120-125

Claussen U., Michel s., Muhlig 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: 136-146

Dutrillaux B., Lejeune J. (1971)

„Sur une nouvelle technique d`analyse du caryotype humain”

LR Acad. Sci. Paris, Vol 272: 2638-2640

Dutrillaux B. (1975)

„Various banding simutaneously obtained on the same slides, after treatment by BrdU”

Humangenetik, 1975 Dec. 23; 30 (4): 297-306

Flemming W. (1880)

„Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen“

Arch. mikr. Anat., Vol 18: 151-259

Ford C.E., Miller O.J., Polani P.E., de Almeida J.C., Briggs J.H. (1959)

„A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis Turner Syndrome“

Lancet, Vol 1: 711

Hagemeijer A., Smit EM., Bootsma D. (1979)

„Improved Identification of chromosomes of leukemic cells in methotrexate-treated cultures”

Cytogenet Cell Genet, Vol 23: 208-212

Hliscs R., Mühlig P., Claussen U. (1997 a)

„The spreading of metaphase is a slow process which leads to a stretching of chromosomes”

Cytogenet Cell Genet 76: 167-171

Hliscs R., Mühlig P., Claussen U. (1997 b)

„The nature of G-bands analyzed by chromosome stretching“
Cytogenet Cell Genet 79: 162-166

Hsu T.C. (1952)

„Mammalian chromosomes in vitro. The karyotype of man“
J. Hered., Vol 43: 167-172

ISCN 1978

„An international System for Human Cytogenetic Nomenclature 1978“

ISCN 1995

„An international System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995“
Felix Mitelmann (ed)
S. Karger Verlag, Basel, 1995

Jacobs P.A., Strong J.A. (1959)

„A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism“
Nature, Vol 183: 302-303

Kakazu N., Bar-Am I., Hada S., Ago H., Abe T. (2003)

„A new chromosome banding technique, spectral color banding (SCAN), for full characterization of chromosomal abnormalities“
Genes Chromosomes Cancer 37: 412-416

Kuechler A., Müller C.R., Liehr T., Claussen U. (2001)

„Detection of microdeletions in the short arm of the X chromosome by chromosome stretching“
Cytogenet Cell Genet, Vol 95: 12-16

Lehrer H., Weise A., Michel S., Starke H., Mrasek K., Heller A., Claussen U., Liehr T. (2004)

„The hierarchically organized splitting of chromosome bands into sub-bands analyzed by multicolor banding (MCB)“

Cytogenet Genome Res 105: 25-28

Lejeune J. (1959)

„Le Mongolisme: Premier exemple d'abberation autosomique humaine“

Ann. Genet. Sem. Hop., Vol 1 : 41-49

Lemke J., Chudoba I., Senger G., Stumm M., Loncarevic I., Henry C., Zabel B., Claussen U. (2001)

„Improved definition of chromosomal breakpoints using high-resolution multicolour banding“

Hum Genet Vol. 108: 478-483

Lemke J., Claussen J., Michel S., Chudoba I., Muhlig P., Westermann M., Sperling K., Rubtsov N., Grummt UW., Ullmann P., Kromeyer-Hauschild K., Liehr T., Claussen U. (2002)

„The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase“

Am J Hum Genet 71: 1051-1059

Lengauer C., Speicher M.R., Popp S., Jauch A., Taniwaki M., Nagaraja R., Riethmann H.C., Donis-Keller H., D'Urso M., Schlessinger D. (1993)

„Chromosomal bar codes produced by multicolour fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes“

Hum Mol Genet 2 (5): 505-512

Liehr T., Heller A., Starke H., Rubtsov N., Trifonov V., Mrasek K., Weise A., Küchler A., Claussen U. (2002a)

„Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes“

Int J Mol Med 9: 335-339

Liehr T., Heller A., Starke H., Claussen U. (2002b)

„FISH banding methods: applications in research and diagnostics“

Expert Rev Mol Diagn 2: 217-225

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 2001, Vol. 93: 242-248

Müller S., Rocchi M., Ferguson-Smith M.A., Wienberg J. (1997)

„Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization“

Hum Genet., Vol 100: 271-278

Nederlof P.M., Robinson D., Abuknesha R., Wiegant J., Hopmann A. H., Tanke H.J., Raap A.K. (1989)

„Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences“

Cytometry, Vol 10: 20-27

Pariser Konferenz, 1971

Festlegung einer neuen Chromosomennomenklatur auf der Grundlage neuer Färbungen

Pinkel D., Straume ., Gray J.W. (1986)

„Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitive, fluorescence hybridization“

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol 83: 2934-2938

Rautenstrauss B.W., Liehr T. (2002)

„FISH Technology“

Springer, Berlin 2002

Rigby P.W., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P. (1977)

„Labeling deoxyribonucleic acid to high activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I”

J. Mol. Biol., Vol 133: 237-341

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988)

„Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostabile DNA polymerase“

Science, Vol. 239: 487-491

Saitoh Y., Lämml U.K. (1993)

„From the chromosomal loops and the scaffold to the classic bands of metaphase chromosomes“

Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1993;58:755-65

Saitoh Y., Lämml U.K. (1994)

„Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold“

Cell. 1994 Feb 25;76(4):609-22

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)

„Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed.)

Cold Spring Harbor Laboratory Press

Scheres J.M., Merckx G.F., Hustinx T.W. (1982)

„Prometaphase banding of human chromosomes with basic fuchsin”

Hum Genet, Vol 61: 8-11

Schröck E., du Manoir S., Veldmann T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M.A., Ning Y., Ledbetter D.H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T. (1996)

„Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes”

Science, Vol 273: 494-496

Seabright M. (1971)

„A rapid banding technique for human chromosomes”

Lancet, Vol 30: 971-972

Speicher M.R., Ballard G.S., Ward D.C. (1996)

„Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH“

Nature Genetics, Vol 12: 368-375

Starke H., Raida., Trifonov V., Clement J.H., Loncarevic I., Heller A., Bleck C., Nietzel A., Rubtsov N., Claussen U., Liehr T. (2001)

„Molecular cytogenetic characterization of an acquired minute supernumary marker chromosome as the sole abnormality in a case of clinically diagnosed as atypical Philadelphia-negative chronic myelogenous leukaemia”

Br. J. Haematol., Vol 113: 435-438

Strachan T., Read A.P. (2005)

„Molekulare Humangenetik”

Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage 2005

Sutton W.S. (1904)

„The chromosomes inheritance”

Biol. Bull, Vol 4: 231-248

Tijo J.H., Levan A. (1956)

„The chromosome number of man”

Hereditas, Vol 42: 1-6

Verma R.S., Babu A. (1989)

„Human Chromosomes- Manual of basic technologies”

Pergamon Press, New York 1989

Waldeyer W. (1888)

„Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen”

Arch. mikr. Anat., Vol 32: 1

Weise A., Starke H., Heller A., Tönnies H., Volleth M., Stumm M., Senger G., Nietzel A., Claussen U., Liehr T. (2002)

„Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterized by high resolution multicolor banding (MCB) and region specific FISH probes”

J Med Genet, Vol 39: 434-439

Weise A., Starke H., Heller A., Claussen U., Liehr T. (2002a)

„Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis – a multicolor banding (MCB) analysis”

Int J Mol Med, Vol 9, 359-361

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, Vol 103: 34-39.

Yunis J.J. (1976)

„High resolution of human chromosomes”

Science, Vol.191 (4233): 1268-1270

8. Publikationen

Kongressbeiträge

Lehrer H., Weise A., Michel S., Starke H., Mrasek K., Heller A., Kuechler A., Claussen U., Liehr T. (2003)

„Giemsa-dark bands split into dark and light subbands as demonstrated by multicolor banding (MCB)”

Med Genetik 2003; Vol 15, p 274 (Abstractnr. W2 04)

Claussen U., Lehrer H., Hliscs R., Kuechler A., Weise A., Liehr T. (2004)

„The splitting of chromosome bands into sub-bands analyzed by multicolor-banding (MCB) and chromosome stretching”

Abstracts zum 54th annual meeting of the American Society of Human Genetics, 26.-30. 10. 2004, p50 (Abstractnummer 164)

Claussen U., Nelle H., Hliscs R., Kuechler A., Weise A., Liehr T. (2005)

„The hierarchically organized splitting of chromosomes into sub-bands analysed by multicolour-banding (MCB) and chromosome stretching”

Med Genetik 2005; Vol 17, p 93 (Abstractnr. P149)

Claussen U., Lehrer H., Hliscs R., Kuechler A., Weise A., Liehr T. (2005)

„The splitting of human chromosome bands into sub-bands”

Europ J Hum Genet 2005, Vol 13 Suppl.1, p 62 (Abstractnr. C01)

Artikel

Liehr T., Weise A., Starke H., Lehrer H., Claussen U. (2004)

„Multicolor FISH probe sets and their applications”

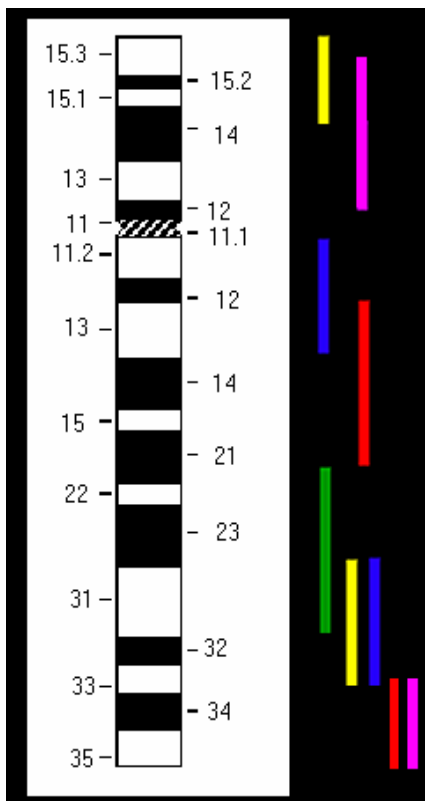
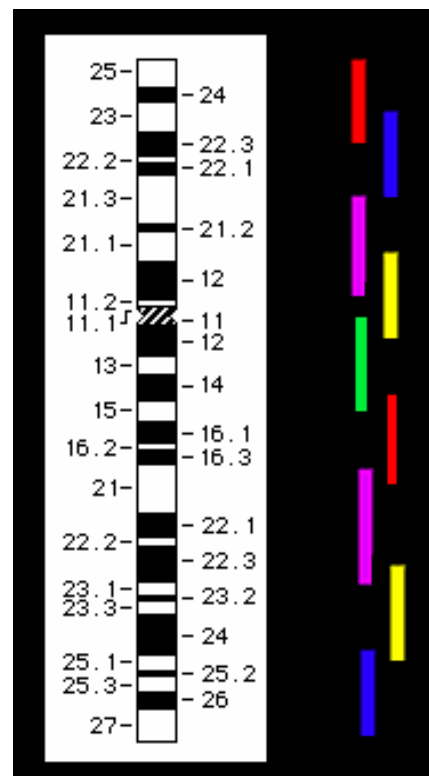
Histol Histopathol Vol. 19: 229-237

**Lehrer H., Weise A., Michel S., Starke H., Mrasek K., Heller A., Claussen U., Liehr T.
(2004)**

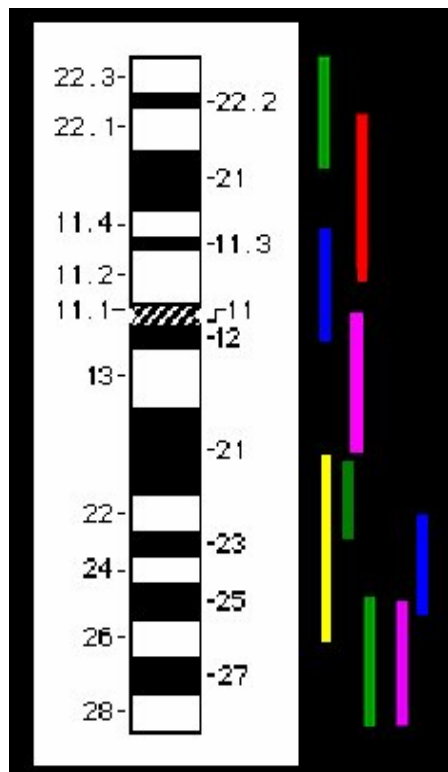
„The hierarchically organized splitting of chromosome bands into sub-bands
analyzed by multicolor banding (MCB)“

Cytogenet Genome Res 105: 25-28

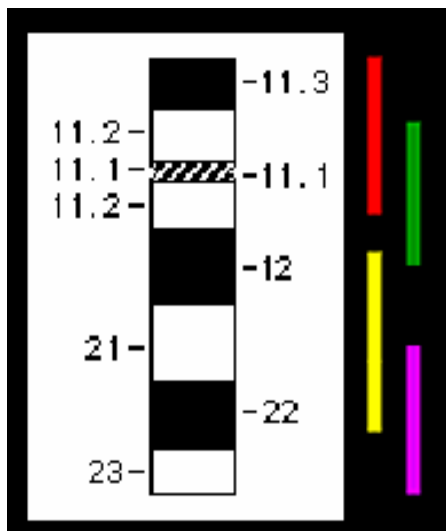
Anhang

Markierungs-Schemata der verwendeten MCB's:MCB 5:MCB 6:

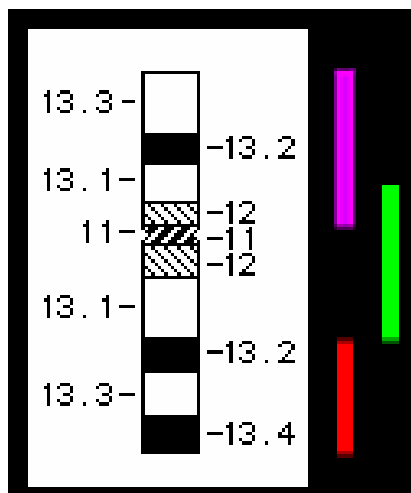
MCB X:



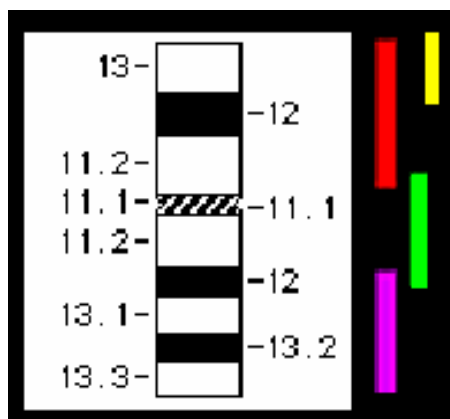
MCB 18:



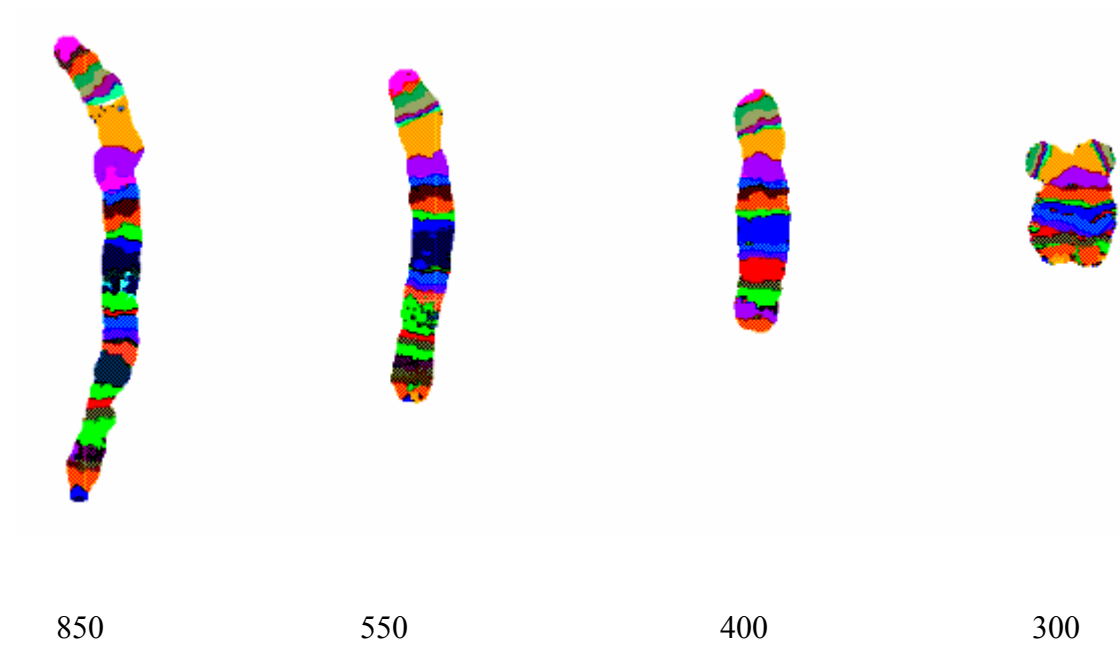
MCB 19:



MCB 20:



■ Cy5
 ■ Texas Red
 ■ Cy5.5
 ■ Spec.Orange
 ■ Spec.Green

Original MCB-Bilder:**Chromosom 5 in 4 verschiedenen Bandenstadien:****Chromosom 6 in 4 verschiedenen Bandenstadien:**

Chromosom X in 4 verschiedenen Bandenstadien:

850



550



400



300

Chromosom 18 in 3 verschiedenen Bandenstadien:

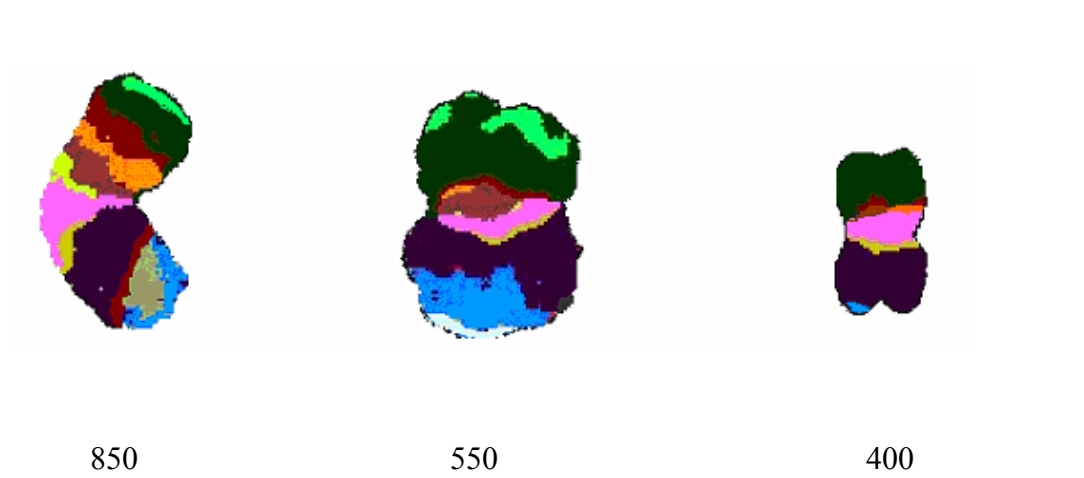
850



550



400

Chromosom 19 in 3 verschiedenen Bandenstadien:**Chromosom 20 in 3 verschiedenen Bandenstadien:**

Verwendete Pseudofarbdateien:

für Chromosom 5:

	FITC	SpO	TR	Cy5	Cy5.5	
1	0	0	0	90	0	Yellow
2	0	0	0	100	0	Cyan
3	0	0	0	100	10	Magenta
4	0	0	0	100	0	Green
5	0	0	0	100	0	Red
6	0	0	0	100	0	Orange
7	0	0	10	100	0	Brown
8	0	0	20	100	0	Purple
9	0	0	30	100	0	Dark Green
10	0	0	50	90	0	Light Green
11	0	0	60	80	0	Light Blue
12	0	0	70	70	0	Light Cyan
13	0	0	80	60	0	Light Blue
14	0	0	90	50	10	Light Blue
15	0	0	90	50	10	Pink
16	0	0	90	50	20	Pink
17	0	0	90	50	10	Pink
18	0	0	30	30	90	Purple
19	0	0	20	10	100	Purple
20	0	0	20	10	100	Yellow
21	0	0	20	10	100	Light Blue
22	0	10	10	10	100	Red
23	0	20	10	10	100	Blue
24	0	40	10	10	90	Brown
25	0	60	20	10	80	Orange
26	0	80	10	0	60	Green
27	0	90	10	0	40	Blue
28	0	100	10	0	20	Dark Green
29	0	100	10	0	10	Dark Green
30	0	100	10	0	10	Green
31	10	100	10	0	0	Light Blue
32	10	100	10	0	0	Light Blue
33	30	100	10	0	0	Green
34	40	90	10	0	0	Red
35	60	80	10	0	10	Blue
36	80	60	0	0	10	Purple
37	100	30	0	0	0	Green
38	100	20	0	0	10	Orange
39	100	10	0	0	10	Blue
40	100	10	0	0	10	Blue
41	100	0	0	10	30	Green
42	90	0	0	20	50	Red
43	80	0	0	30	60	Brown
44	40	0	0	50	80	Green
45	30	0	0	60	80	Purple
46	10	0	0	60	80	Purple
47	10	0	0	60	80	Green
48	0	0	0	70	80	Magenta
49	0	0	0	70	80	Cyan
50	0	0	0	70	80	Cyan
51	0	10	0	70	70	Yellow
52	0	20	0	70	70	Yellow
53	0	30	0	70	60	Brown
54	0	30	0	80	50	Grey
55	0	40	0	80	50	Grey
56	0	40	0	80	40	Purple
57	0	40	0	90	30	Green
58	100	0	0	0	0	Green
59	0	100	0	0	0	White
60	100	0	0	0	0	Blue
61	0	100	0	0	0	Blue
62	0	100	0	0	0	Yellow
63	0	100	0	0	0	Purple
64	0	100	0	0	0	Cyan
65	100	0	0	0	0	Green
66	0	100	0	0	0	Dark Green
67	0	100	0	0	0	Dark Green
68	0	100	0	0	0	Brown
69	100	0	0	0	0	Purple
70	100	0	0	0	0	Pink
71	100	0	0	0	0	Magenta
72	100	0	0	0	0	Green
73	0	100	0	0	0	Orange
74	100	0	0	0	0	Brown
75	100	0	0	0	0	Blue
76	100	0	0	0	0	Blue
77	100	0	0	0	0	Light Green
78	100	0	0	0	0	Green
79	100	0	0	0	0	Light Blue
80	100	0	0	0	0	Red

Pseudofarbdefinition mit maximal 80 möglichen Pseudofarben zur Auswertung von Chromosom 5.

	FITC	SpO	TR	Cy5	Cy5.5	
1	30	90	40	10	10	Yellow
2	30	90	40	10	10	Cyan
3	30	90	40	10	10	Magenta
4	40	80	40	10	10	Dark Green
5	70	60	30	10	20	Red
6	80	50	30	10	20	Light Green
7	80	40	30	20	20	Brown
8	80	30	30	30	20	Orange
9	70	20	40	50	20	Dark Green
10	50	10	50	70	20	Olive
11	40	10	50	70	20	Purple
12	10	10	80	60	20	Light Cyan
13	10	10	80	50	20	White
14	10	30	80	40	30	Blue
15	10	40	70	40	40	Pink
16	20	40	50	30	70	Yellow
17	10	40	40	20	80	Light Red
18	10	30	20	20	90	Purple
19	0	20	10	20	100	Magenta
20	10	20	10	30	90	Olive
21	10	10	10	60	80	Light Blue
22	10	10	10	70	70	Red
23	20	10	10	80	50	Blue
24	20	10	10	80	50	White

Pseudofarbdefinition mit maximal 24 möglichen Pseudofarben zur vergleichenden Analyse von Chromosom 5.

für Chromosom 6:

	FITC	SpO	Cy5.5	Cy5	TR	
1	10	0	60	30	70	Yellow
2	10	0	60	30	70	Cyan
3	10	0	70	30	60	Magenta
4	10	0	80	30	60	Red
5	20	10	90	20	40	Green
6	20	10	90	20	40	Blue
7	20	10	100	10	20	Brown
8	20	20	90	10	20	Orange
9	20	40	90	10	20	Purple
10	20	70	70	10	10	Light Green
11	20	80	50	10	10	Magenta
12	20	90	40	10	10	Yellow
13	20	90	30	10	10	White
14	30	90	30	10	10	Blue
15	30	90	20	20	10	Pink
16	40	80	20	30	10	Grey
17	50	80	10	30	10	Light Blue
18	70	60	10	30	10	Purple
19	80	50	10	30	10	Brown
20	90	20	10	40	10	Yellow
21	90	30	10	30	20	Light Purple
22	70	30	10	40	50	Red
X	70	30	10	30	50	Light Green
Y	60	30	10	40	60	Cyan
mar	50	30	10	40	70	Grey
23	30	20	10	50	80	Light Blue
27	30	20	10	50	80	Yellow
28	20	20	10	60	80	Blue
29	10	10	10	70	70	Pink
30	10	10	10	80	60	Pink
31	10	10	10	90	50	Light Green
32	10	10	20	90	40	Light Blue
33	20	10	30	90	30	Orange
34	20	0	30	90	30	Blue
35	40	10	60	60	20	Light Blue
36	30	10	80	50	20	Dark Green
37	30	20	90	30	10	Yellow
38	30	10	90	20	10	White
39	30	20	90	30	20	Light Purple
40	20	10	90	30	20	Light Green
41	70	0	10	70	30	Dark Green
42	60	0	10	70	40	Light Green
43	60	0	10	70	40	Light Blue
44	50	0	10	60	60	Light Purple
45	60	0	10	70	40	Dark Green
46	50	0	10	60	60	Orange
47	50	0	10	60	60	Cyan
48	50	0	10	60	60	Brown
49	50	0	10	60	60	Purple
50	60	0	20	50	60	Magenta
51	50	0	20	60	60	Dark Purple
52	60	0	30	40	60	Red
53	80	0	50	20	30	Light Green
54	80	0	50	20	30	Red
55	80	0	50	20	20	Blue
56	80	0	50	20	20	Grey
57	80	0	50	20	20	Light Blue
58	80	0	50	20	20	Orange
59	80	0	50	20	20	Light Green
60	80	0	50	20	20	Dark Blue

Pseudofarbdefinition mit maximal 60 möglichen Pseudofarben zur Auswertung von Chromosom 6.

	FITC	SpO	TR	Cy5	DEAC	
1	80	0	50	20	20	Yellow
2	100	10	0	0	10	Cyan
3	100	10	0	0	10	Magenta
4	100	20	0	0	10	Green
5	100	20	0	0	10	Red
6	100	30	0	0	20	Light Green
7	90	40	0	0	20	Brown
8	90	40	10	0	20	Orange
9	80	50	10	0	20	Green
10	60	70	10	0	30	Light Green
11	50	80	20	0	30	Purple
12	30	90	20	0	40	Light Green
13	20	90	20	0	40	White
14	20	90	20	0	40	Blue
15	20	80	20	0	50	Pink
16	10	80	20	0	60	Yellow
17	20	60	20	10	70	Pink
18	20	50	30	10	80	Purple
19	10	50	30	10	80	Magenta
20	20	30	30	10	90	Yellow
21	20	30	30	10	90	Light Purple
22	20	20	40	20	90	Red
23	10	10	50	20	80	Light Green
24	10	10	60	20	80	Yellow
25	10	10	70	30	60	Yellow
26	10	0	70	40	60	Light Green
27	10	0	80	40	50	Grey
28	10	0	80	50	40	Blue
29	20	0	80	50	40	Yellow
30	20	0	70	60	30	Orange
31	30	10	60	60	40	Blue
32	30	0	50	70	40	Light Green
33	40	0	40	80	30	Brown
34	40	0	30	80	30	Dark Green
35	50	0	30	70	30	Orange
36	50	0	20	80	30	Light Purple
37	50	0	20	80	30	Blue
38	50	0	10	80	30	Blue
39	60	0	10	70	30	Light Blue
40	70	0	10	70	30	Cyan
41	70	0	10	70	30	Dark Green
42	60	0	10	70	40	Light Green
43	60	0	10	70	40	Light Green
44	50	0	10	60	60	Light Purple
45	60	0	10	70	40	Light Purple
46	50	0	10	60	60	Orange
47	50	0	10	60	60	Cyan
48	50	0	10	60	60	Brown
49	50	0	10	60	60	Purple
50	60	0	20	50	60	Purple

Pseudofarbdefinition mit maximal 50 möglichen Pseudofarben zur Verifizierung der Ergebnisse von 6.

für Chromosom X:

	FITC	SpO	Cy5.5	Cy5	TR	
1	100	0	0	0	0	Yellow
2	100	0	0	0	0	Cyan
3	100	0	0	0	0	Magenta
4	100	0	10	0	0	Red
5	100	0	20	0	0	Green
6	100	10	20	0	0	Blue
7	100	10	30	0	0	Brown
8	90	30	30	0	10	Orange
9	90	30	30	0	10	Purple
10	80	50	40	0	10	Light Green
11	40	80	40	0	20	Pink
12	20	90	40	0	20	Yellow
13	20	90	40	0	20	White
14	20	80	60	0	20	Light Blue
15	10	60	80	0	20	Pink
16	10	40	90	0	20	Teal
17	10	20	100	10	20	Pink
18	10	10	90	10	40	Pink
19	10	0	80	20	60	Brown
20	10	0	80	20	60	Yellow
21	20	0	60	30	70	Light Purple
22	20	0	50	30	80	Red
X	20	0	40	40	80	Cyan
Y	30	0	40	50	70	Cyan
mar	20	0	30	50	80	Grey
23	50	0	30	70	40	Teal
27	50	0	30	70	40	Yellow
28	60	0	30	70	20	Blue
29	70	0	40	60	10	Pink
30	50	0	50	70	10	Pink
31	40	0	70	60	10	Light Green
32	40	0	70	60	10	Cyan
33	60	0	60	40	30	Brown
34	60	0	60	40	30	Dark Purple
35	60	0	60	40	40	Light Blue
36	70	0	40	30	50	Dark Green
37	70	0	30	30	60	Yellow
38	70	0	20	20	60	Purple
39	70	0	20	20	70	Light Purple
40	70	0	20	20	70	Light Green

Pseudofarbdefinition mit maximal 40 möglichen Pseudofarben zur Auswertung von Chromosom X.

für Chromosom 18:

	FITC	SpO	Cy5.5	Cy5	TR	
1	10	0	60	30	70	Yellow
2	10	0	60	30	70	Cyan
3	10	0	70	30	60	Magenta
4	10	0	80	30	60	Green
5	20	10	90	20	40	Red
6	20	10	90	20	40	Blue
7	20	10	100	10	20	Brown
8	20	20	90	10	20	Orange
9	20	40	90	10	20	Purple
10	20	70	70	10	10	Light Green
11	20	80	50	10	10	Pink
12	20	90	40	10	10	Yellow
13	20	90	30	10	10	White
14	30	90	30	10	10	Light Blue
15	30	90	20	20	10	Pink
16	40	80	20	30	10	Teal
17	50	80	10	30	10	Pink
18	70	60	10	30	10	Pink
19	80	50	10	30	10	Brown
20	90	20	10	40	10	Yellow
21	90	30	10	30	20	Light Purple
22	70	30	10	40	50	Red
X	70	30	10	30	50	Cyan
Y	60	30	10	40	60	Cyan
mar	50	30	10	40	70	Grey
23	30	20	10	50	80	Teal
27	30	20	10	50	80	Yellow
28	20	20	10	60	80	Blue
29	10	10	10	70	70	Pink
30	10	10	10	80	60	Pink
31	10	10	10	90	50	Light Green
32	10	10	20	90	40	Cyan
33	20	10	30	90	30	Brown
34	20	0	30	90	30	Dark Purple
35	40	10	60	60	20	Light Blue
36	30	10	80	50	20	Dark Green
37	30	20	90	30	10	Yellow
38	30	10	90	20	10	Purple
39	30	20	90	30	20	Light Purple
40	20	10	90	30	20	Light Green

Pseudofarbdefinition mit maximal 40 möglichen Pseudofarben zur Auswertung von Chromosom 18.

für Chromosom 19:

	FITC	SpO	TR	Cy5	Cy5.5	
1	10	0	100	0	0	Yellow
2	20	0	100	0	0	Cyan
3	20	0	100	0	0	Magenta
4	20	0	100	0	0	Green
5	30	0	100	0	0	Red
6	50	0	90	0	0	Light Green
7	80	0	60	0	0	Brown
8	80	10	60	0	0	Orange
9	100	10	30	0	0	Dark Green
10	100	20	20	0	0	Olive
11	90	40	20	0	0	Purple
12	90	50	20	0	0	Light Cyan
13	80	60	20	0	0	White
14	60	80	30	0	0	Blue
15	40	90	30	0	0	Pink
16	30	90	30	0	0	Yellow-Orange
17	20	90	40	0	0	Pink
18	10	90	40	0	0	Purple
19	0	0	0	70	70	Magenta
20	0	100	0	0	0	Dark Blue
21	0	0	0	0	0	Dark Blue
22	0	0	0	0	0	Teal
23	0	0	0	0	0	Brown
24	0	0	0	0	0	Purple

Pseudofarbdefinition mit maximal 24 möglichen Pseudofarben zur Auswertung von Chromosom 19.

	FITC	SpO	TR	Cy5	
1	20	0	80	60	Yellow
2	10	100	20	10	Blue
3	20	0	80	60	Magenta
4	20	0	80	60	Green
5	20	0	70	70	Red
6	20	0	70	70	Light Green
7	40	10	70	60	Brown
8	50	10	70	50	Orange
9	60	10	60	50	Dark Green
10	60	10	60	50	Olive
11	70	20	50	50	Purple
12	70	30	50	40	Light Cyan
13	70	40	40	30	White
14	70	50	40	30	Blue
15	70	60	40	20	Pink
16	50	80	30	20	Yellow-Orange
17	50	80	30	20	Pink
18	30	90	30	10	Purple
19	30	90	30	10	Magenta
20	20	100	30	10	Yellow-Green

Pseudofarbdefinition mit maximal 20 möglichen Pseudofarben zur Verifizierung der Ergebnisse von Chromosom 19.

für Chromosom 20:

	FITC	SpO	TR	Cy5	Cy5.5	
1	20	10	0	0	100	Yellow
2	30	10	0	0	100	Cyan
3	40	20	0	0	90	Magenta
4	20	20	10	90	20	Green
5	80	50	20	0	40	Red
6	70	60	20	0	30	Light Green
7	50	80	30	0	20	Brown
8	20	90	40	20	10	Orange
9	10	60	60	50	10	Dark Green
10	0	30	70	60	10	Olive
11	0	10	70	70	10	Purple
12	0	0	70	70	20	Light Cyan
13	0	0	60	60	50	White
14	0	0	50	50	70	Blue
15	0	10	40	30	90	Pink
16	0	50	30	20	80	Yellow
17	10	90	40	10	20	Pink
18	20	80	40	30	20	Brown
19	80	20	40	40	20	Pink
20	70	0	50	50	0	Olive
21	40	0	70	60	0	Purple
22	20	0	70	70	0	Red
23	10	0	70	70	0	Blue
24	0	0	70	70	0	White

Pseudofarbdefinition mit maximal 24 möglichen Pseudofarben zur Auswertung von Chromosom 20.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Fertigstellung meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Uwe Claussen danke ich für die Ermunterung zur Durchführung dieser Arbeit, die Bereitstellung des Themas, sowie für das in mich gesetzte Vertrauen und sein großes Engagement, die Ergebnisse dieser Arbeit über die Institutsgrenzen hinaus bekannt zu machen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Anja Weise und Herrn PD Dr. rer. nat. med. habil Thomas Liehr für ihre fabelhafte, stete Betreuung, ihre unermüdliche Unterstützung und ihre vielen praktischen Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Den Gutachtern danke ich für ihr Interesse an dem bearbeiteten Thema und ihre Mühe, die vorliegende Arbeit zu beurteilen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des molekular-zytogenetischen Labors bedanken, vor allem bei Frau Dr. rer. nat. Heike Starke, Frau Dipl. Biol. Kristin Mrasek, Frau Monika Ziegler und Herrn Ulf Steinhäuser, die mich in die molekular-zytogenetischen Arbeitstechniken eingearbeitet haben und für mich während dieser Zeit zu wahren Freunden geworden sind.

Meinen Eltern Rudolf und Herta Lehrer danke ich von ganzem Herzen für ihre jahrelange Unterstützung, für den unbeirrbaren Glauben an ihre Tochter und ihren unsagbaren Stolz; vor allem meinem Vater, der die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben durfte.

„Es war ein Stück vom Himmel, dass es dich gab.“

Zuletzt möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei meinem Mann, Ralf Nelle, für so vieles zu bedanken: für seinen bedingungslosen Rückhalt, seinen Beistand in allen Lebenslagen und seine unendliche Liebe, mit der er jeden Verdruss ins Gegenteil verkehrt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit 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, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Dr. rer. nat. Anja Weise

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

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar, noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass 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, den 02.09.2005

Lebenslauf

Name: Nelle, Heike Maria
Geburtsname: Lehrer
Geburtsdatum: 14.06.1980
Geburtsort: Neumarkt
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

09/1986 – 07/1990 Grundschule „Bräugasse“, Neumarkt
09/1990 – 07/1999 „Ostendorfer“-Gymnasium, Neumarkt
07/1999 Abitur

Studium:

09/1999 – jetzt Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
08/2001 Ärztliche Vorprüfung
08/2002 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2004 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit 09/2002 Promotionsarbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena bei Herrn Prof. Dr. U. Claussen

Jena, den 02.09.2005