

Zur Bedeutung des Multicolour Bandings bei der Analyse von normalen und aberranten Chromosomen während verschiedener Phasen des Zellzyklus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

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

von Johannes Rudolph Lemke
geboren am 04.10.1976 in Jena

Gutachter

1. Prof. Dr. Uwe Claussen, Institut für Humangenetik und Anthropologie, FSU Jena
2. Prof. Dr. Gustav Jirikowski, Institut für Anatomie II, FSU Jena
3. Prof. Dr. Stephan Diekmann, IMB Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.03.2005

Abkürzungsverzeichnis

BrdU	Bromdesoxyuridin
DAPI	4'6'-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G1	Phase des Zellzyklus (G=gap [engl.: Lücke])
G2	Phase des Zellzyklus (G=gap [engl.: Lücke])
G-Banding	Giemsa Banding
GTG	G-bands by trypsin using Giemsa
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
MCB	Multicolour Banding
mFISH	multicolour Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Prof. Dr.	Professor Doktor
RBG	R-bands by BrdU using Giemsa
R-Banding	Reverse Banding
S	Phase des Zellzyklus (Synthesephase)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	II
Zusammenfassung	1
Einleitung	3
Ziele der Arbeit	5
Improved definition of chromosomal breakpoints using high-resolution multicolour banding. Lemke J, Chudoba I, Senger G, Stumm M, Loncarevic IF, Henry C, Zabel B, Claussen U Hum Genet 108:478–483 (2001).	6
The DNA-Based Structure of Human Chromosome 5 in Interphase. Lemke J, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Mühlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Grummt UW, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Claussen U Am J Hum Genet 71:1052-1059 (2002).	12
Diskussion	21
Schlußfolgerungen	28
Literaturverzeichnis	30
Anhänge:	34
-Lebenslauf	34
-Danksagung	35
-Ehrenwörtliche Erklärung	36

Zusammenfassung

Die exakte Bruchpunktbestimmung und zytogenetische Analyse chromosomaler Veränderungen hängt von vielen Komponenten, wie etwa guter Präparation der Zellsuspension, ausreichender Spreitung der Mitosen und hohem Bandenstadium der Chromosomen maßgeblich ab. Etablierte herkömmliche Bänderungstechniken, wie z.B. Giemsa- und Reverse-Banding, erlauben lediglich eine Unterscheidung zwischen positiven und negativen Banden, was leicht zu Fehlinterpretationen des Ursprungs einzelner Banden führen kann.

Die Methode des MCB von Chudoba et al. (1999), produziert ein Banding, welches durch Hybridisierung sich überlappender Mikrosezierungssonden entlang eines einzelnen Chromosoms entsteht und sich daher genau und ausschließlich an der spezifischen DNA dieses Chromosoms orientiert und letztlich in einem mehrfarbigen Bandenmuster resultiert.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, diese neue Methode auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Bruchpunktbestimmung an aberranten Fällen zu prüfen, sowie die erhaltenen Bruchpunkte mit denen herkömmlicher Bänderungstechniken zu vergleichen und etwaige Unstimmigkeiten aufzuklären. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob und wie genau Chromosomen innerhalb der verschiedenen Phasen des Zellzyklus mittels MCB dargestellt werden können.

Die Bruchpunktanalyse wurde an klinischen Fällen durchgeführt, die größtenteils von auswärtigen Labors eingesandt wurden, wo auch die konventionelle Bruchpunktbestimmung stattfand. Um den Bandenabgleich zu vereinfachen wurde ein MCB Ideogramm erstellt.

Für die Interphaseuntersuchungen wurden Zellen von genetisch unauffälligen Probanden sowie HeLa-Zellen kultiviert. Zellpräparation und FISH wurden nach adaptierten Standardprotokollen durchgeführt. Die Auswertung fand mit Hilfe der mFISH-Software von MetaSystems statt.

Die Ergebnisse zeigten einen zum Teil sehr deutlichen Zugewinn an Genauigkeit der MCB-Bruchpunktbestimmung gegenüber herkömmlichen Bänderungstechniken. Das MCB ermöglichte sogar präzise Bruchpunktanalysen in Fällen, bei denen

konventionelle Techniken versagten. Außerdem wurden häufige Fehlerquellen bei der konventionellen Bruchpunktbestimmung offenbart und ausgewertet.

Darüber hinaus gelang es, Chromosomen auf Bandenniveau im Interphasekern darzustellen, womit erstmals ein direkter Vergleich von Interphase- zu Metaphasechromosomen hinsichtlich ihrer Größe und Form sowie Anordnung und Reihenfolge ihrer einzelnen Banden möglich wurde. Weitere Vergleiche von Interphasechromosomen von HeLa-Zellen, die in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus arretiert wurden, bestätigten diese Analysen. Zusätzlich gelang es, sogar kleinere chromosomale Aberrationen während der Interphase darzustellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das MCB weniger abhängig von äußeren Faktoren wie Präparation oder Spreitung ist als bisherige Bänderungstechniken. Es kann eine höhere Auflösung im Bandenmuster als herkömmliche Methoden erreichen und liefert damit genauere Informationen über die chromosomalen Regionen von Interesse, sowohl während der Meta- als auch erstmals der Interphase. Das Erkennen von chromosomalen Aberrationen im Interphasekern eröffnet darüberhinaus ganz neue Möglichkeiten auf dem Gebiet der molekularen Zytogenetik.

Einleitung

Genetische Erkrankungen werden häufig durch numerische bzw. strukturelle Chromosomenaberrationen verursacht, und umgekehrt können auch Erkrankungen wiederum zu einer Veränderung von Zellen und deren Chromosomensatz führen. Die genaue Analyse dieser Veränderungen kann von enormer diagnostischer und gegebenenfalls therapeutischer Bedeutung sein. Die Karyotypisierung mit konventionellen Bänderungstechniken wie GTG und RBG erreicht bei hochkomplexen Chromosomenveränderungen jedoch häufig ihre Grenzen, da die Bandenauflösung zum einen nur eine Unterscheidung von positiven und negativen Banden erlaubt und zum anderen von vielen äußeren Faktoren beeinflusst wird. So wirken sich beispielsweise eine geringe Spreitung der Metaphaseplatten oder ein zu stark ausgeprägter Proteinsaum um die jeweilige Mitose negativ auf das Bandenmuster bzw. die Bandenauflösung der Chromosomen aus.

Die sehr geringe Unterscheidbarkeit der einzelnen positiven bzw. negativen Banden kann wiederum selbst bei gut gebänderten Chromosomen nur zu einer ungefähren Bruchpunktbestimmung führen. Aberrationen, die nur einzelne Banden oder gar nur Fragmente dieser betreffen, können auf diese Weise der Detektion mit herkömmlichen Bänderungstechniken gänzlich entgehen.

Später entwickelte mFISH-Techniken (Speicher et al. 1996, Schröck et al. 1996) ermöglichten das spezifische Färben von Chromosomen auf DNA-Ebene. Damit kann zwar abgeklärt werden, welche Chromosomen in etwaige Rearrangements involviert sind, die genauen Chromosomenabschnitte bzw. –banden bleiben jedoch im Ungewissen. Auch können intrachromosomale Veränderungen, wie etwa pericentrische Inversionen oder kleinste Duplikationen bzw. Deletionen mit diesen Techniken nicht detektiert werden, da die Morphologie des Chromosoms dabei zu wenig verändert wird.

Basierend auf der mFISH-Technik in Verbindung mit der Mikrosezierung von mehreren sich gegenseitig überlagernden partiellen Chromosomensonden wurde 1999 von Chudoba et al. die Methode des Multicolour Bandings entwickelt, welche es erstmals ermöglichte all diese Einschränkungen zu überwinden. Chromosomen können so DNA-spezifisch gefärbt und anschließend mittels einer speziellen Software hochauflösend gebändert werden.

Bevor diese Methode für Routinezwecke bzw. andere Fragestellungen zur Anwendung kommen konnte, war es nötig, ihre Genauigkeit, Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit genauer zu prüfen und mit konventionellen Bänderungsmethoden zu vergleichen. (Lemke et al. 2001)

Während diese konventionellen Bänderungstechniken vorrangig spezifische Proteinstrukturen stärker oder schwächer anfärben, orientiert sich das MCB direkt an der Abfolge der zu untersuchenden DNA und ermöglicht zusätzlich durch seine Vielfarbigkeit eine deutlich bessere Unterscheidbarkeit der einzelnen Banden an sich.

Aufgrund dieser DNA-Ausrichtung erlaubt diese Methode erstmals auch eine spezifische Bänderung einzelner Chromosomen während aller Phasen des Zellzyklus. Das Banding war bislang ein Phänomen, welches routinemäßig nur an Chromosomen in der Mitose dargestellt werden konnte. Es war lange Zeit kaum möglich, genauere Aussagen zum Wesen der Chromosomen während der Interphase zu treffen. Aus dem Verhalten der Chromosomen während der Mitose wurden Theorien entwickelt und mit Fakten aus Interphase-Analysen ergänzt.

So wurde angenommen, Chromosomen lägen unstrukturiert als relativ lange, dekondensierte DNA-Stränge in eigenen Territorien im Interphasekern vor. Arbeiten neueren Datums wie von Dietzel et al 1998, Chevret et al. 2000 und Volpi et al. 2000 gaben erste Anhaltspunkte für eine gewisse DNA-Strukturierung innerhalb dieser Territorien. Erst mit dem MCB stand jedoch eine hochauflösende Chromosomenfärbetechnik zur Verfügung, um Lage und Form von Interphasechromosomen genauer zu ergründen und mit denen von Chromosomen der Metaphase bzw. den verschiedenen Interphasestadien untereinander zu vergleichen. Dies war Inhalt des letzten Abschnitts der vorliegenden Arbeit. (Lemke et al. 2002)

Damit bettet sich diese Arbeit in übergeordnete Projekte meines Betreuers Prof. Dr. Uwe Claussen zur Aufklärung des Verhaltens von Chromosomen sowie deren Banden in der Meta- und Interphase generell sowie beim Übergang von verschiedenen Phasen in einander ein.

Ziele der Arbeit

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Methode des Multicolour Bandings auf Genauigkeit, Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit zu prüfen und auftretende Schwachpunkte dieser Methode aufzuzeigen und zu diskutieren. Um dies zu erreichen, sollte die Methode des MCB auf eine Vielzahl von klinischen Fällen mit unterschiedlichsten chromosomalen Aberrationen sowie an nicht-aberranten Chromosomen genetisch unauffälliger Probanden angewandt werden. All dies sollte exemplarisch mit dem MCB-Sondenmix für Chromosom 5 geschehen.

Wichtige Aspekte waren hier unter anderem das Auffinden möglicher Artefakte bei diversen Chromosomenveränderungen sowie etwaiger Änderungen des Bandenmusters in Abhängigkeit der Chromosomenlänge.

Des Weiteren sollte ein MCB-Ideogramm erstellt werden, um die Bruchpunktanalyse zu vereinfachen. Differenzen zwischen MCB-Bruchpunkten und den vorher bestimmten Bruchpunkten konventioneller Techniken sollten genauestens analysiert und interpretiert werden.

Darüber hinaus war die Applizierbarkeit des MCB auf die Interphase zu prüfen. Dabei lag das Hauptinteresse auf Lage und Form der Interphasechromosomen sowie der Abfolge und Anordnung der einzelnen Banden im Vergleich zu Metaphasechromosomen. Ein weiteres Augenmerk lag, auch in den Interphaseanalysen, auf Chromosomenlänge und -form und deren möglichen Änderungen während der unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus sowie auf dem Zusammenhang zwischen Chromosomenlänge und Bandenstadium.

Letztlich sollte geprüft werden, ob kleinere Aberrationen möglicherweise bereits auch im Banding von Interphasechromosomen nachvollzogen werden können.

Hum Genet (2001) 108:478–483
DOI 10.1007/s004390100502

ORIGINAL INVESTIGATION

Johannes Lemke · Ilse Chudoba · Gabriele Senger
Markus Stumm · Ivan F. Loncarevic · Cathérine Henry
Bernd Zabel · Uwe Claussen

Improved definition of chromosomal breakpoints using high-resolution multicolour banding

Received: 11 December 2000 / Accepted: 5 March 2000 / Published online: 16 May 2001
© Springer-Verlag 2001

Abstract Characterisation of chromosome rearrangements using conventional banding techniques often fails to determine the localisation of breakpoints precisely. In order to improve the definition of chromosomal breakpoints, the high-resolution multicolour banding (MCB) technique was applied to identify human chromosome 5 breakpoints from 40 clinical cases previously assessed by conventional banding techniques. In 30 cases (75%), at least one breakpoint was redefined, indicating that MCB markedly improves chromosomal breakpoint localisation. The MCB pattern is highly reproducible and, in contrast to conventional banding pattern, is consistent in both short and elongated chromosomes. This might be of fundamental interest for the detection of chromosomal abnormalities, especially in tumour cells. Moreover, MCB even allows the detection of abnormalities that remain cryptic in GTG-banding analysis.

Introduction

Since the first description of the precise number of chromosomes in man by Tijo and Levan in 1956 several techniques have been introduced for routine analysis of the

fine structure of chromosomes. These well established banding techniques, G1G, QFQ and RBG, all lead to chromosome patterns based on alternating light and dark bands, which can lead to equivocal chromosome breakpoints (Rubtsov et al. 1996). Fluorescence in situ hybridisation (FISH), first described by Langner et al. (1981) and substantially improved by Pinkel et al. (1986), enables a coloured "painting" of whole chromosomes as well as parts of chromosomes. Multicolour FISH (Nederlof et al. 1990) and the improved version, 21-colour FISH (M-FISH, Speicher et al. 1996; SKY, Schrüek et al. 1996), allows the simultaneous and specific painting of all single human chromosomes using a minimum of five different fluorochromes. These techniques cannot be used for the detection of inversions, duplications, or the more precise determination of chromosome breakpoints. A FISH-based technique that is capable of improved resolution has been developed by Chudoba et al. (1998, 1999). It results in a multicolour banding pattern based on differentially-labelled overlapping microdissection libraries and allows a computer-assisted quantification of the 5 fluorochrome intensity ratios along the chromosome, with the assignment of pseudo-colours to small chromosome segments (Chudoba et al. 1999).

To investigate the power of the high-resolution multicolour banding (MCB) technique, numerous cases with aberrations of chromosome 5, identified by conventional banding techniques, were reinvestigated with MCB. In 75%, the chromosome breakpoints were redefined, indicating that MCB is a useful technique for precise breakpoint definition.

Materials and methods

Fixed suspension of blood and bone marrow cells from patients with different chromosome 5 aberrations were submitted from 16 different cytogenetic laboratories. Chromosome preparation was performed using routine cytogenetic procedures and chromosome breakpoints had been defined based on G1G- or RBG banding (Fig. 1).

FISH was performed using probes for whole-chromosome painting and a chromosome 5-specific MCB-probe mixture

J. Lemke · I. F. Loncarevic · U. Claussen (✉)
Institut für Hamangenetik und Anthropologie
der Universität Jena, Kollegienstrasse 10, 07740 Jena, Germany
e-mail: ucla@mtf-n.ziti.uni-jena.de
Tel.: 49-3641-935501, Fax: 49-3641-935502

I. Chudoba
MetaSystems GmbH, Altusheim, Germany

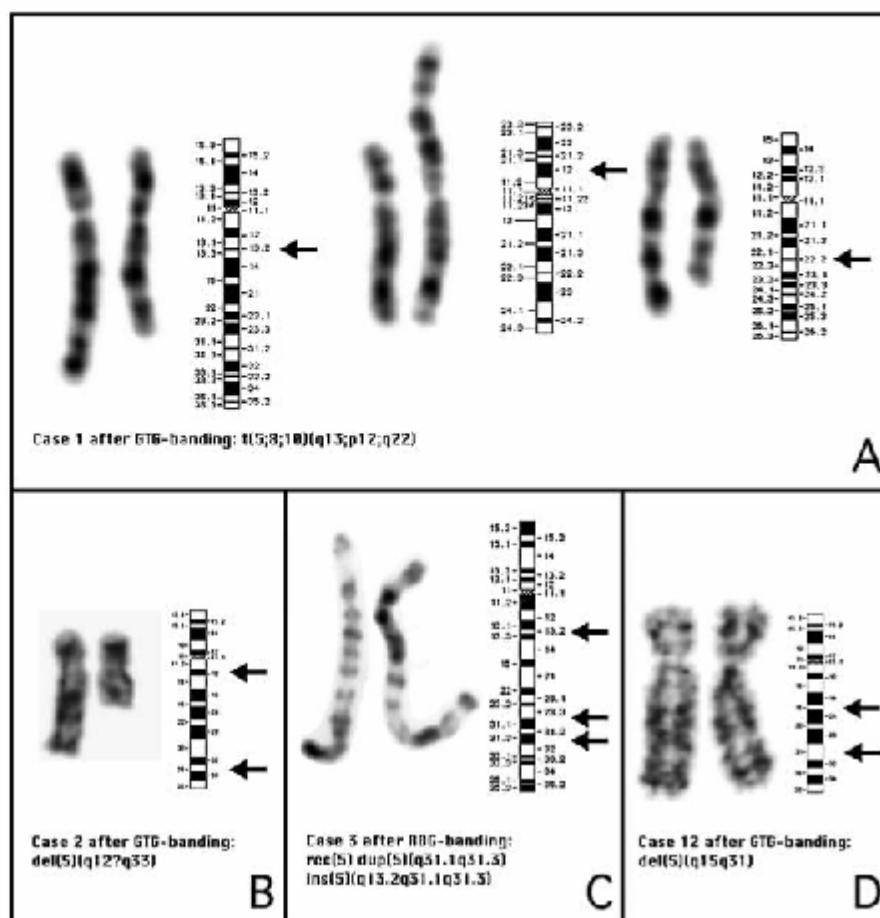
G. Senger
Praxis für Medizinische Genetik, Regensburg, Germany

M. Stumm
Institut für Hamangenetik, Magdeburg, Germany

C. Henry
Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, Rennes, France

B. Zabel
Universitäts-Kinderklinik, Mainz, Germany

Fig. 1A–D Aberrant chromosomes of patient 1, 2, 3 and 12 (A–D) with a derivative chromosome 5 after GTG banding (A, B, D) and RFG banding (C). Each box shows the normal chromosome (left), the aberrant (center) and the ideogram (right). The arrows mark the breakpoints previously defined with conventional banding techniques



(³²P)Cyto5™ *in situ* kit, MetaSystems; for details see Chudoba et al. 1999). Prior to denaturation of the target chromosomes, a pepsin (20 µg/ml, Sigma) treatment at 37°C in 0.01 N HCl was carried out (5 min for lymphocyte and 10 min for bone marrow metaphase spreads, respectively). Prehybridisation with human Cot1-DNA (Lifetechnologies) was performed for 30 min at 37°C. Hybridisation, as well as post-hybridisation washes and detection, were performed using standard protocols. To assign the multicolour banding pattern to distinct regions within chromosome 5, the MCB patterns on chromosomes 5 of more than 100 metaphases were compared to their DAPI (diaminophenylindole) banding patterns, as well as to their ratio profiles. Coloured bands corresponded to a specific ratio and the ratios again corresponded to the precisely mapped region-specific partial chromosome-painting probes of the MCB probe set. Furthermore, the MCB mixture was hybridised together with yeast artificial chromosomes (YACs) (753B8–5p15.3, 772B9–5q12, 790E5–5q14, 823E11–5q22, 827B4–5q34) and a locus-specific probe for Cri-du-chat Syndrome [LSI D5S721, D5S23–5p15.2 (Vysis)]. The bands in which the hybridisation signal of these probes appeared were assigned to the specific loci.

Metaphase spreads were analysed using a fluorescence microscope (Axioplan 2 mot, Zeiss) equipped with appropriate filter sets to discriminate between the five fluorochromes and the counterstain DAPI. Image capturing and processing were carried out using an *in situ* FISH imaging system (MetaSystems, Germany).

The seven probes overlap (Chudoba et al. 1999) and give reproducible fluorochrome intensity ratios at specific chromosomal regions. The MCB pattern is achieved by pixel-wise colour ratio

analysis and pseudo-colour assignment to certain colour ratios. Thus, the coloured bands represent well-defined specific regions within the chromosome.

Results

Figure 2A shows the MCB ideogram of chromosome 5, consisting of 24 different pseudo-coloured bands, which is 6 bands less than the G-band ideogram at the 550 band resolution (ISCN 1995). This difference is due to the large red coloured band covering 5q32 to 5q35, which is not sufficiently differentiated.

The bands of MCB of human chromosome 5 were assigned to their corresponding light and dark G-bands at the 550 band level (ISCN 1995) via the inverted DAPI-banding pattern, precisely located YAC probes and the analysis of the fluorescence intensity profiles of the microdissected region-specific probes (data not shown).

Table 1 summarises the results obtained for the re-examination of chromosomal breakpoints for the 40 cases with chromosome 5 alterations. In 10 cases (25%), MCB analysis confirmed the GTG breakpoints. In 30 cases

480

Table 1 Chromosome breakpoints of 40 clinical cases defined by conventional banding techniques and MCB in comparison

Case*	Disease/indication ^b	GTG/RBC ^c breakpoints	MCB breakpoints
1*	Mental retardation	t(5;8)(q13;q13)(p13;q22)	t(5;8)(q13;q13)(p13;q24)
2*	Idiopathic anaemia	del(5)(q17q33)	del(5)(q14q33)
3*	Pedigree A (proband), developmental delay	rec(5) dup(5)(q31.1q31.3) ins(5)(q13.2q31.1q31.3)	rec(5) dup(5)(q31.1q31.2) ins(5)(q13.1c31.1q31.2)
4*	Pedigree A (father)	ins(5)(q13.2q31.1q31.3)	ins(5)(q13.1c31.1q31.2)
5*	Developmental delay	inv(5)(q14q32)	inv(5)(q13.1q31.2)
6*	Anaplastic lymphoma	ins(2;5)(?;?) ins(2;5)(?;?) de(5)(q?)	ins(2;5)(p23;q35.2q1c) ins(2;5)(p23;q35.2q33) del(5)(q13.3q35?)
7*	MDS	de(5)(q?)	del(5)(q13.3q35)
8*	T-lymphoblast: NHL	inv(5)(q14q34)	inv(5)(q15q34)
9*	AML M6	de(5)(q12c32)	del(5)(q13q34)
10*	AML M6	de(5)(q11c31)	del(5)(q11.2q3c)
11*	CLL	de(5)(q13c31q33)	del(5)(q13.1q3c)
12*	Malformations	de(5)(q15q31)	del(5)(q15q23.2)
13	Suspected MDS	de(5)(q?)	No deletion found
14*	AML M2	de(5)(q31)	del(5)(q32q33)
15*	AML	de(5)(p2?)dup(5)(p?)	del(5)(p13p1c)dup(5)(p13p14)
16*	AML	tr(5;13)(p2;p21.2)	t(5;13)(p12;p21.2)
17*	AML M3	de(5)(q13?)	del(5)(q13.1q3c)
18*	Sec. AML	de(5)(q13?)	del(5)(q13.1q35)
19*	MDS	de(5)(q31)	del(5)(q21q35)
20	MDS	der(5)t(5;17)(5pter→5q12::17q11→17q23) der(17)t(5;17)(5c35→5q32::17p13→17q11)	der(5)t(5;17) (5pter→5q12::17q11→17q23) ?:(17)t(5;17) (5q35→5q32::17p13→17c11)
21*	Lynch syndrome	de(5)(q11.2?)	del(5)(q11.2q13.2)
22*	Suspected RABBIT/AML	de(5)(q11q34)	del(5)(q13.1q35)
23	Malformations	1der(5)p?	1cder(5)(pter-pse?)
24*	NHL	tr(5;7)	t(5;7)(q13.1q36)
25*	Sec. AML	de(5)(q?)	t(5;?)q(11.2;?)
26*	AML	de(5)(q13c31?)	del(5)(q22q32)
27*	AML	der(5)t(5;?) der(5)t(5;?)	der(5)t(5;1)(5pter→5q13.1c?) der(11)t(5;11)(?::5c32→5qter)
28*	AML	de(5)(q13c22)	del(5)(q15q23.2)
29	AML	de(5)(q31q35)	del(5)(q31.1q35)
30*	AML	de(5)(q13c33)	del(5)(q12q33)
31*	MDS	de(5)(q33q34)	del(5)(q23q33)
32*	AML	de(5)(q31c34)	del(5)(q11.2q31.3)
33	Pedigree B (grandmother)	ins(5;9)(p13.3;p22p24)	ins(5;9)(p13.3;p22p2c)
34	Pedigree B (father)	ins(5;9)(p13.3;p22p24)	ins(5;9)(p13.3;p22p24)
35	Pedigree B (uncle)	ins(5;9)(p13.3;p22p24)	ins(5;9)(p13.3;p22p24)
36*	Pedigree B (proband), developmental delay	der(5)ins(5;9)(p13.3;p22p24)	der(5)t(5;9)→5p13.3:9p23→9p24
37*	Suspected MDS	de(5)(q12q33)	del(5)(q13.1q3c)

* Cases are marked with an asterisk (*) in which MCB led to a correction of at least one chromosome breakpoint.

^b Diseases abbreviated as follows: AML acute myeloid leukaemia, M1-M6 classifies the AML, sec. AML secondary acute myeloid

leukaemia, CLL chronic lymphocytic leukaemia, MDS myelodysplastic syndrome, NHL non-Hodgkin lymphoma, RABBIT reticulocytopenia with excess of blasts in transformation.

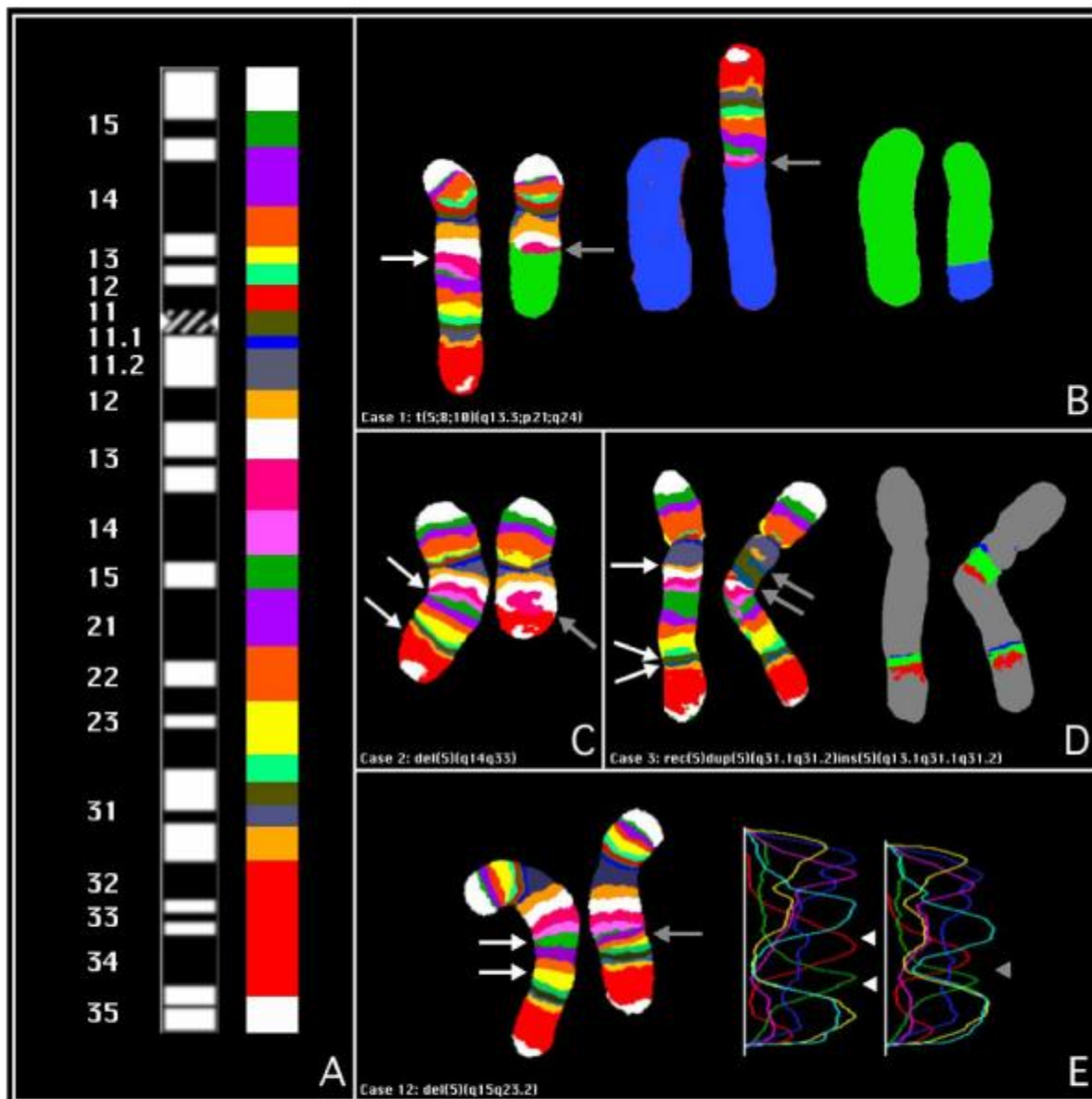


Fig. 2 A MCB ideogram of human chromosome 5 at the 550 band level and assignment to the 550 GTG band ideogram (ISCN 1995). **B** MCB of case 1. The *white arrow* indicates the breakpoint within the pink band. *Grey arrows* show the two remaining parts of the split pink band on the derivative chromosomes 5 and 8. Chromosomes 8 and 10 are artificially coloured in blue and green, respectively. **C** Case 2. The breakpoints of the interstitial deletion of 5q are marked with two *white arrows*. The *grey arrow* marks the fused chromosomal region of the deleted chromosome. **D** Case 3. The brown and grey bands are inserted between the ochre and white bands (*white arrows*). The insertion (*grey arrows*) is de-

tectable, but the orientation is difficult to analyse. On the right, the insertion is marked with pseudo-colours optimised for the questionable chromosomal region, indicating that the insertion is not inverted. **E** The *white arrows* mark the chromosomal region of 5q15→5q23.2 (case 12, Table 1). On the right chromosome the deletion did not lead to a deletion of coloured bands but to a shrinkage of the four coloured bands (green, pink, orange, yellow) involved (*grey arrow*). The *white and grey triangles* in the profiles mark the same chromosome regions as the *white and grey arrows* in the banded chromosomes

(75%), at least one chromosomal breakpoint was redefined by MCB, differing to a greater (5 cases) or lesser extent (15 cases) from the conventionally defined break-

point. In 10 cases, conventional banding techniques failed to reveal precise breakpoints. In contrast to RBG banding alone, MCB was able to define the orientation of an inser-

482

tion in cases 3 and 4 (Table 1). A questionable 5q deletion could not be confirmed in one case (case 13, Table 1; 23 metaphase spreads analysed by MCB). In three cases, MCB failed to reveal the breakpoints: (1) in case 38, only three metaphase spreads were available and none showed an aberrant chromosome 5; (2) in case 39, MCB was performed on a slide stored for several years, which was evidently too long to get sufficient hybridisation signals; (3) in case 40, the quality of the metaphase spreads was extremely poor and caused the colour banding to be too un-specific to unequivocally define the breakpoints.

MCB corrected breakpoints of G-banded chromosomes from cultivated lymphocytes. As observed in case 1, GTG band analysis revealed a complex translocation [t(5;8;10)(q13;p12;q22), Fig. 1A], yet the MCB pattern demonstrated that both the 5q14 dark band and the 5q15 light band also were involved. At the G-band level, this region has been mixed up with the adjoining regions of der(8) and der(10). Whole-chromosome painting, using probes for chromosome 8 and 10, also helped to define the breakpoints, which were finally and substantially corrected to t(5;8;10)(q13.3;p21;q24) (Fig. 2B).

Breakpoint definition after G-banding led to the assignment of a questionable deletion [del(5)(q172q33)] in case 2, due to poor banding resolution (Fig. 1B). MCB analysis, however, revealed the proximal breakpoint more distal than assumed, concurred with the position of the distal breakpoint and detected an interstitial deletion, del(5)(q14q33) (Fig. 2C).

Case 3 showed a recombination of a balanced insertion inherited from the father (case 4). The RBG breakpoints of the recombination [rec(5)dup(5)(q31.1q31.3)ins(5)(q13.2q31.1q31.3), Fig. 1C] differed slightly from those detected with MCB [rec(5)dup(5)(q31.1q31.2) ins(5)(q13.1q31.1q31.2)]. However, the question of whether or not the insertion is inverse could not be answered by RBG banding alone. MCB analysis, highly resolved on 5q31, clearly indicated that the chromosomal region 5q31.1 >5q31.2 is not inserted inversely (Fig. 2D). The chromosome region 5q31.1→5q31.2, represented by the brown and grey band, is inserted between the ochre and the white band (Fig. 2D).

A second artefact is represented by the deletion of 5q15 >5q23.2 (case 12 and 28) that causes very little specific change in the ratio profile peaks of both mainly involved fluorochromes, resulting in coloured bands that are only smaller in the deleted region. This is caused by a shrinkage of the two adjoining profile peaks and the narrowing of the other ratios in this area. However, this deletion was only detectable by analysis of the profiles, not by loss of coloured bands. This artefact occurred in cases 12 (Fig. 1D and 2E) and 28, and in both instances the chromosomal region 5q15 >5q23.2 was found to be deleted.

Discussion

MCB allows high-resolution analysis of the fine structure of chromosomes at the 550 band level, as used for the chro-

somosome breakpoint analysis shown here. It also allows the analysis at an even higher or lower resolution, because the number of false coloured bands per chromosome can freely be assigned using the *ids* software (MetaSystems). All the falsely coloured bands are fluorescence ratio specific and can easily be distinguished from each other.

The band-specific comparison between the MCB pattern and the GTG-banding pattern resulted in a MCB ideogram at the 550 band level (Fig. 2A) that can be used to precisely define the chromosome breakpoints of cases with chromosome 5 aberrations. Comparing the MCB pattern of chromosomes 5 of different lengths indicates that, usually, the order and number of coloured bands remains exactly the same. Chromosomes of the same size, but of different metaphase spreads, and even of different samples, also show coloured bands of about the same size. Whereas in chromosomes of differing size the sizes of their coloured bands can vary significantly, as has been described previously by Chudoba et al. (1999). This phenomenon can be observed in the three GTG-band ideograms of ISC (1995) as well, where bands have split into sub-bands and thereby grown in their absolute size. However, this effect can even be observed in a pair of chromosomes within one metaphase, due to their different localisation in the centre and on the periphery of the spread, respectively.

Chromosomal breakpoints were reinvestigated with the help of MCB, utilising a greater number of metaphase spreads. In most of the cases at least 7 metaphase spreads were evaluated. The breakpoints were found to always appear within the same coloured bands, which demonstrated the reproducibility of the method (Chudoba et al. 1999).

The results obtained from the reinvestigation of chromosome breakpoints previously determined by conventional banding techniques indicate that in 75% of the cases at least one breakpoint revealed by the conventional banding techniques had to be redefined. In relation to the total number of breakpoints analysed with MCB, 69% were redefined. In 34% of all breakpoints, MCB assigned neighbouring bands, or the next after, to be involved. In 29%, a precise GTG breakpoint definition was not possible. In the remaining 6%, other GTG-based evaluation resulted in the definition of breakpoints that differed substantially from the MCB results. All chromosome breakpoints redefined by MCB were in agreement with the conventional banding pattern.

Furthermore, MCB is not as dependent on the quality of metaphase spreads as conventional banding techniques. In 29 of the 40 cases conventional chromosomal analysis was performed on bone marrow cells, which often present chromosomes of reduced quality and thereby probably hamper a more precise breakpoint definition. In the remaining 11 cases, lymphocyte chromosomes were analysed that usually show a better banding pattern. In fact, MCB-defined breakpoints differed slightly or sometimes not at all from the conventionally defined chromosome breakpoints of lymphocytes.

The 4 cases presented in Fig. 1 show that the G-R-banding quality clearly depends on the quality of the chro-

mosomes. Poorly banded chromosomes, especially of tumour cells, could hardly be analysed; on the other hand, better-banded chromosomes do not always avoid misinterpretations. With those conventional banding techniques it is not possible to discriminate between 2 bands of identical dark or light colour, and therefore breakpoints can hardly be unequivocally defined using conventional banding techniques alone (Rubtsov et al. 1996; Chudoba et al. 1999).

In case 3, the changes in the intensity profiles caused by the insertion lead to the following artefact. Between the inserted brown band and the ochre band of 5q13.1, an artificial band arises, representing the chromosomal area 5q13.1::5q31.1. Unfortunately, this artificial band has the same constitution as the band representing 5q31.2, resulting in exactly the same gray band. This effect, already described by Speicher et al. (1996) and Chudoba et al. (1999), is caused by the flaring of the fluorescence signals at the junction of the breakpoints. However, pseudo-colours for chromosome 5 optimised only for band 5q31 show unequivocally a non-inverted insertion (Fig. 2D). The higher resolution of this region was only possible due to an improvement in the assignment of the ratios to the coloured bands by software.

The MCB pattern has to be reviewed by analysing the fluorescence intensity ratio profiles. This is necessary since in two cases (Fig. 2D and E; cases 12 and 28 in Table 1) the aberrations were not visible in the normal MCB pattern. Both artefacts resulted from an unfortunate overlap of the single probes in the MCB mixture and the earlier described flaring of the fluorochromes. In the event that a deletion only leads to shrinkage of the ratio profiles (see Fig. 2E), the flaring ratios also result in a shrinkage of the coloured bands involved, not in their loss. This could mostly be prevented by a better design of the overlapping areas of the fluorescent intensity profiles. A more spacious overlapping of two or more fluorochromes could help to avoid artefacts being produced and perhaps could even be used to create MCB patterns of higher resolution. Despite these limitations, the analysis of the ratio profiles gives all the information to control MCB pseudo-colour patterns.

In general, chromosomal aberrations that cause artefacts while using the normal MCB-5 pseudo-colour band set (case 3, 4, 12 and 28) become visible by carefully analysing the fluorescence ratios (Chudoba et al. 1999) and, if possible, by improving resolution, creating highly contrasted pseudo-colours for the chromosome region of interest.

Up to the present time, the application of a painting probe, with subsequent comparison with the DAPI- or G-bands, facilitated breakpoint assignment. For exactly determining breakpoints, specific probes were needed, but no or only little information about other changes within the chromosome could be obtained. The advantage of MCB is to precisely determine breakpoints and give full

information on all chromosome-specific material by only one hybridisation of the probe set.

MCB is able to detect chromosome aberrations that do not alter the banding pattern of conventionally stained chromosomes (Fig. 1C and 2D). This might be of special interest for cytogenetic investigations of tumour cells, because they more often show short chromosomes of reduced quality that cannot be precisely characterised using the standard techniques. In future, despite all technical restrictions existing so far, one has to consider that MCB, once established for all human chromosomes, will be available for routine cytogenetic analysis and might be able to replace, in part, conventional banding techniques.

Acknowledgement We gratefully acknowledge the co-operation of Carl Zeiss (Jena, Germany), for providing the microscopic equipment and MetaSystems (Albstadt, Germany) for the *iris* software. We thank Profs. and Drs. Michel Lessard (Brest, France), Svetlana Harder (Kiel, Germany), Doms Grunert and Sabine Barmtzke (Bremen, Germany), Carsta Löffler (Caermütz, Germany), Gere Kastner (Schwerin, Germany), Birgit Joan Hartert, Germany), Cathi Wermke and Gundula Thiel (Berlin, Germany), Silke Bröderlein (Ulm, Germany), Christel Müller (Leipzig, Germany), Heidrun Holland (Leipzig, Germany), Sabine Uranko (Leuven, Belgium), Kyra Michalova (Prague, Czech Republic) and Francesca Lo Mee (Rennes, France) for providing us with clinical samples and Mariano Rocchi (Bari, Italy) for supplying us with chromosome region specific YAC clones.

References

- Chudoba J, Plešch A, Lörch T, Claussen U, Senger G (1998) Multi-color-banding for the identification of interstitial deletion of chromosome 5. *Medgen 10*: 116A
- Chudoba J, Plešch 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
- ISCN (1995) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995. Mitelman F (ed), Karger, Basel
- Langner PR, Waldrop AA, Ward DC (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA 78*: 6633
- Nederhof PM, van der Flier S, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ, Ploem JS, van der Ploeg M (1990) Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry 11*: 126
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA 83*: 3934
- Rubtsov N, Senger G, Kuznetz C, Neumann A, Kalbova C, Janker K, Heensen V, Claussen U (1996) Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection, DNA amplification, and reverse painting. *Hum Genet 97*: 405
- Schröck E, da Mazon S, Veldman L, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith M, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Gurin Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science 273*: 494
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DS (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet 12*: 368
- Tijo JIL, Levan A (1956) The chromosome number of man. *Hereditas 42*: 1

The DNA-Based Structure of Human Chromosome 5 in Interphase

Johannes Lemke,¹ Jan Claussen,^{1,6} Susanne Michel,¹ Ilse Chudoba,^{1,7} Peter Mühlig,⁴ Martin Westermann,² Karl Sperling,⁵ Nikolai Rubtsov,⁶ Ulrich-Walter Grummt,³ Peter Ullmann,³ Katrin Kromeyer-Hauschild,¹ Thomas Liehr,¹ and Uwe Claussen¹

Institutes of ¹Human Genetics and Anthropology, ²Mitochondrial Research, and ³Physical Chemistry, Friedrich Schiller University, ⁴Institute of Molecular Biotechnology, and ⁵Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany; ⁶Institute of Human Genetics, Humboldt University, Berlin; ⁷MetaSystems GmbH, Alfdorf, Germany, and ⁸Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

In contrast to those of metaphase chromosomes, the shape, length, and architecture of human interphase chromosomes are not well understood. This is mainly due to technical problems in the visualization of interphase chromosomes in total and of their substructures. We analyzed the structure of chromosomes in interphase nuclei through use of high-resolution multicolor banding (MCB), which paints the total shape of chromosomes and creates a DNA-mediated, chromosome-region-specific, pseudocolored banding pattern at high resolution. A microdissection-derived human chromosome 5-specific MCB probe mixture was hybridized to human lymphocyte interphase nuclei harvested for routine chromosome analysis, as well as to interphase nuclei from HeLa cells arrested at different phases of the cell cycle. The length of the axis of interphase chromosome 5 was determined, and the shape and MCB pattern were compared with those of metaphase chromosomes. We show that, in lymphocytes, the length of the axis of interphase chromosome 5 is comparable to that of a metaphase chromosome at 600-band resolution. Consequently, the concept of chromosome condensation during mitosis has to be reassessed. In addition, chromosome 5 in interphase is not as straight as metaphase chromosomes, being bent and/or folded. The shape and banding pattern of interphase chromosome 5 of lymphocytes and HeLa cells are similar to those of the corresponding metaphase chromosomes at all stages of the cell cycle. The MCB pattern also allows the detection and characterization of chromosome aberrations. This may be of fundamental importance in establishing chromosome analyses in nondividing cells.

Introduction

Interphase chromosomes analyzed with currently available routine cytogenetic techniques do not exhibit any recognizable structures such as bands, centromeres, telomeres, or specific shapes. It has therefore been assumed that chromosomes in interphase are relatively decondensed (Comings 1968). Until now, the concept of condensation and decondensation of chromosomes during mitosis was well established and has profoundly influenced our understanding of the structure and function of chromosomes during mitosis. This concept implies that chromosomes in interphase are very long and condense after S phase. Clustering of chromatin loops results in condensation, giving very long prophase chromosomes, which show thousands of bands (Yunis 1981). These further condense to prometaphase, metaphase, and anaphase

chromosomes. Decondensation takes place as cells return, via telophase, to interphase.

Surprisingly, there have been no scientific investigations directly confirming this dynamic concept—for example, by comparing the total length of chromosomes in interphase and metaphase. There is, however, indirect evidence, such as countless daily observations that harvesting chromosomes shortly after S phase results in elongated prophase and prometaphase chromosomes. Also, pictures of cells in G2 phase showing interlaced threads of elongated chromosomes that are sometimes much longer than the diameter of interphase cells are well known. Furthermore, the extent of compaction of chromosomes in interphase cells, estimated in both yeast (Giucci et al. 1994) and human lymphoma cell lines (Lawrence et al. 1988) by measuring the distances between fluorescently labeled DNA probes, was found to be significantly different when compared with mitotic chromosomes, with a two- to tenfold compaction of mitotic chromosomes in comparison with interphase chromosomes. In addition, the phenomenon of premature chromosome condensation (Johnson and Rao 1970) and results obtained from high-resolution chromosome preparations (Yunis 1976) provide further support for our understanding of chromosomes in interphase nuclei. It

Received June 3, 2002; accepted for publication August 1, 2002; electronically published October 7, 2002.

Address for correspondence and reprints: Dr. U. Claussen, Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich Schiller Universität, Kollegienstraße 10, D-07740 Jena, Germany. E-mail: ucla@uni-jena.de

¹ The first two authors contributed equally to this work.

© 2002 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved. 0022-2997/2002/7105-1051\$15.00

was observed that human prophase chromosomes can be very long, showing as many as 3,000 bands per haploid set (Yunis 1981). In addition, numerous investigations dealing with proteins such as topoisomerase II, HMC, SMC, H1, and H3, which have been confirmed to be involved in—or responsible for—chromosome condensation, have been published (for a review, see Koshland and Strunnikov [1996]). None of these data, however, can fully explain the speed with which chromosomes change their structure during mitosis or the fact that homologous metaphase chromosomes sometimes show extreme differences in size.

Experience with artificial stretching of human chromosomes (Claussen et al. 1994; Hliscs et al. 1997a) indicates that a significant chromosome-elongation process takes place during routine chromosome preparation. This leads to doubts as to whether chromosomes in interphase are indeed very long. Furthermore, microirradiation experiments (Cremer et al. 1982) and molecular cytogenetic investigations with whole-chromosome paints (Cremer et al. 1988; Lichter et al. 1988; Pinkel et al. 1988) or region-specific microdissection probes (Cremer et al. 1993; for review, see Cheveret et al. 2000; Cremer and Cremer 2001) have confirmed a territorial organization of chromosomes in interphase nuclei that is more likely to be equivalent to short chromosomes in interphase.

To completely paint chromosomes in interphase, to measure their length, and to analyze their DNA-based banding structure, the microdissection-based high-resolution multicolor banding (MCB) technique was used. This is a FISH approach first described by Chudoba et al. (1999). The results show that chromosomes in interphase are not decondensed but are as short as metaphase chromosomes and show almost the same MCB pattern. This pattern can be used for the identification of small structural aberrations in chromosomes.

Material and Methods

MCB on Lymphocyte Interphase Chromosome 5

To examine the shape and banding pattern of interphase chromosomes and to measure their length, an MCB pattern was generated using a human chromosome 5-specific hybridization mixture on lymphocyte interphase nuclei from a normal male subject, as described elsewhere for metaphase chromosomes (Chudoba et al. 1999). Microscopic analysis was performed using an Axioptan II microscope (Zeiss) equipped with a CCD camera (Sony), an HBO 100 mercury lamp, and filter sets for 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), diethylaminocoumarin, fluorescein isothiocyanate, Cy3, Cy3.5, and Cy5. Images were captured and analyzed using the Isis imaging system (MetaSystems), which allows the level of the chromosome region-specific MCB resolution to be freely defined. Interphase chromosomes were an-

alyzed at the 6-, 11-, 16-, and 21-band level. The lengths of the axes of routinely harvested and flattened interphase chromosomes were measured using the Isis imaging system. Statistical analyses were performed using the Levene test and the *t* test.

Chromosome elongation during drying of the fixative on the slide is mainly influenced by the humidity. Therefore, we also measured the length of interphase and metaphase chromosomes in half-spherical lymphocytes obtained by drying the fixative at a humidity of <7%. Fixed lymphocyte suspensions, routinely harvested for chromosome analysis, were dropped onto dry slides and dried under vacuum (DNA Speed Vac; Savant), without rotating the slides, at 22°C and a humidity of <7%. The MCB pattern of chromosome 5 was generated as described above. A laser scanning microscope (LSM 510 Meta; Zeiss) was used to measure the length and to analyze the shape of chromosome 5 at interphase and metaphase. Statistical analyses were performed using the Levene test and the *t* test.

Comparison of the Length of Metaphase and Interphase Chromosome 5

The length of the center line of both chromosomes 5 from lymphocyte metaphases was measured using the Isis imaging system. The band resolution level was determined by counting the number of dark and light bands and by comparing the results with the number of bands on the ideograms published in the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Mittelman 1995). The relationship between the length of chromosome 5 and the number of G1G bands was determined by linear regression.

Cell Cycle-Specific MCB on HeLa Interphase Chromosome 5

Synchronized HeLa cells were used to investigate cell cycle-specific aspects of chromosomal shapes and banding patterns of interphase chromosomes. HeLa cells synchronized in interphase were harvested every 2 h throughout the cell cycle, and 50 cells were analyzed at each time point. Logarithmically growing cells were synchronized by application of either a thymidine block, with subsequent arrest of the mitotic cells by N₂O (Schmiady and Sperling 1981), or a double thymidine block without N₂O treatment, to arrest the cells in the S phase. For the thymidine block, cells were cultured with 2 mM thymidine for 16 h, for a further 7 h in normal medium, and then were treated with N₂O (4.2 kPa/cm²) for 8.5 h. After release of the N₂O block, the mitotic cells were harvested by gentle shaking and were plated into six 5-cm petri dishes. After 45 min, the cells had entered the G1 phase. Every 2 h, cells from one dish were harvested, incubated in hypotonic KCl, fixed in three changes of methanol/acetic acid (3:1), dropped onto wet slides, and air dried.

For the double thymidine block, which synchronizes cells between the early S phase and G₂, cells were cultured with 2 mM thymidine for 16 h, for 11 h in normal medium, and for a further 12 h with 2 mM thymidine. After removal of the second thymidine block, the cells were harvested as described above. Calyculin A (10 nM; Sigma) was added to parallel cultures for 60 min before harvesting. The degree of synchrony (>90%) could be estimated in the prematurely condensed chromosomes in the course of the cell cycle.

Results

MCB on Interphase Chromosome 5

Nearly all interphase nuclei showed MCB patterns on chromosome 5 very similar to those of corresponding metaphase chromosomes at different, freely chosen, colored band levels (1, 6, 11, 16, and 21; fig. 1). Typically, both telomeric bands were visible, and the centromeric region did not show the characteristic constriction. Although a center line can be positioned as for metaphase chromosomes, interphase chromosomes are not as straight as metaphase chromosomes, being bent and sometimes folded. In 36 (34.0%) of the 106 nuclei analyzed, the complete MCB patterns of both chromosomes were visible. Sometimes very small colored bands, most often from the pericentromeric region, are not visible. Therefore, a complete banding pattern is defined as ≈ 10 colored bands being present at the 11-colored-band level, using the Isis software. This corresponds to an ≈ 200 -band level of G-banded chromosomes. The choice of a higher level, such as the 16- or 21-band level, for the definition of a completely banded chromosome would have resulted in the exclusion of too many chromosomes. Conversely, the six-band level is too low to characterize a chromosome 5 as being completely banded. Fifteen nuclei (14.2%) showed one completely banded chromosome 5, and one nucleus (0.9%) showed no MCB signal at all. In the remaining 54 nuclei (50.9%), the chromosome 5 MCB patterns were either incomplete, overlapping, or both. The similarity in shape between chromosome 5 in interphase and metaphase allows the measurement of the length of interphase chromosomes, defined as the length of the center line between both telomeric bands (fig. 1). In 67 of the 87 completely banded interphase chromosome 5, the axes could be precisely positioned, and in the remaining 20, delineation of the axes was not possible, because of strong folding and loop configurations. The mean \pm SD length of interphase chromosome 5 was $12.0 \pm 2.3 \mu\text{m}$.

Three-dimensional intact chromosome 5 in half-spherical interphase nuclei revealed a gross banding pattern based on seven differently labeled microdissection libraries of the MCB probe mixture. The mean \pm SD length of interphase chromosome 5 was $6.6 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ($n = 17$), whereas metaphase chromosome 5 ($5.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$,

$n = 10$) on the same slide were significantly shorter ($P < .002$).

Comparison between the Lengths of Interphase Chromosome 5 and Metaphase Chromosome 5

To compare the length of interphase chromosomes to the band resolution of G-banded metaphase chromosomes, we first investigated whether a correlation exists between the length of metaphase chromosomes and their band level. The relationship (fig. 2) was highly significant ($P < .001$) and was used to determine the length of interphase chromosome 5, which was found to be as long as metaphase chromosome 5 at 600 G-band resolution.

Cell Cycle Specific Banding Pattern of Interphase Chromosome 5 in HeLa Cells

The MCB pattern of chromosome 5 in HeLa cells is present throughout the cell cycle (fig. 3). In contrast to G1 (fig. 3A), chromosomes in S and G₂ phases are wider (fig. 3B and 3C) because of the replication-induced increase in the DNA content. Furthermore, the boundaries of chromosomes in S phase appear to be more diffusely marked when compared with those in G1 and G₂. When compared with metaphase chromosomes, interphase chromosomes are wider at all stages of the cell cycle (fig. 3).

Identification of Chromosome Aberrations on Interphase Chromosomes

The aberrations of chromosome 5 in HeLa cells are clearly visible in both metaphase (fig. 3D) and interphase (fig. 3A–C). The similarities in the banding patterns pose the question of whether the MCB of interphase chromosomes can be used for diagnostic purposes. To address this issue, cells from two subjects with known structural chromosome 5 aberrations were analyzed at interphase. Subject 1 was a child with congenital malformations and a duplicated interstitial insertion on 5q, present in cultivated lymphocytes (fig. 4A). Subject 2 was a patient with acute myeloid leukemia (AML M6), characterized by a 5q deletion present in cultivated bone marrow cells (fig. 4B). In both subjects, the 5q aberrations were clearly detectable (fig. 4), and the breakpoints, as previously determined on metaphase chromosomes (Lemke et al. 2001), were confirmed. Figure 4A also shows the folded structure of both chromosomes 5. The normal, clearly painted chromosome 5 is shown along with the aberrant chromosome 5 on which not all bands are visible. The aberrant chromosome 5 is characterized by the green band derived from 5q31 (*gray arrow*), which is inserted in 5q13, and is flanked by the ochre and white bands. In figure 4B, the deleted chromosome 5 of the 5q- syndrome can also be identified on the basis of its interphase banding pattern.

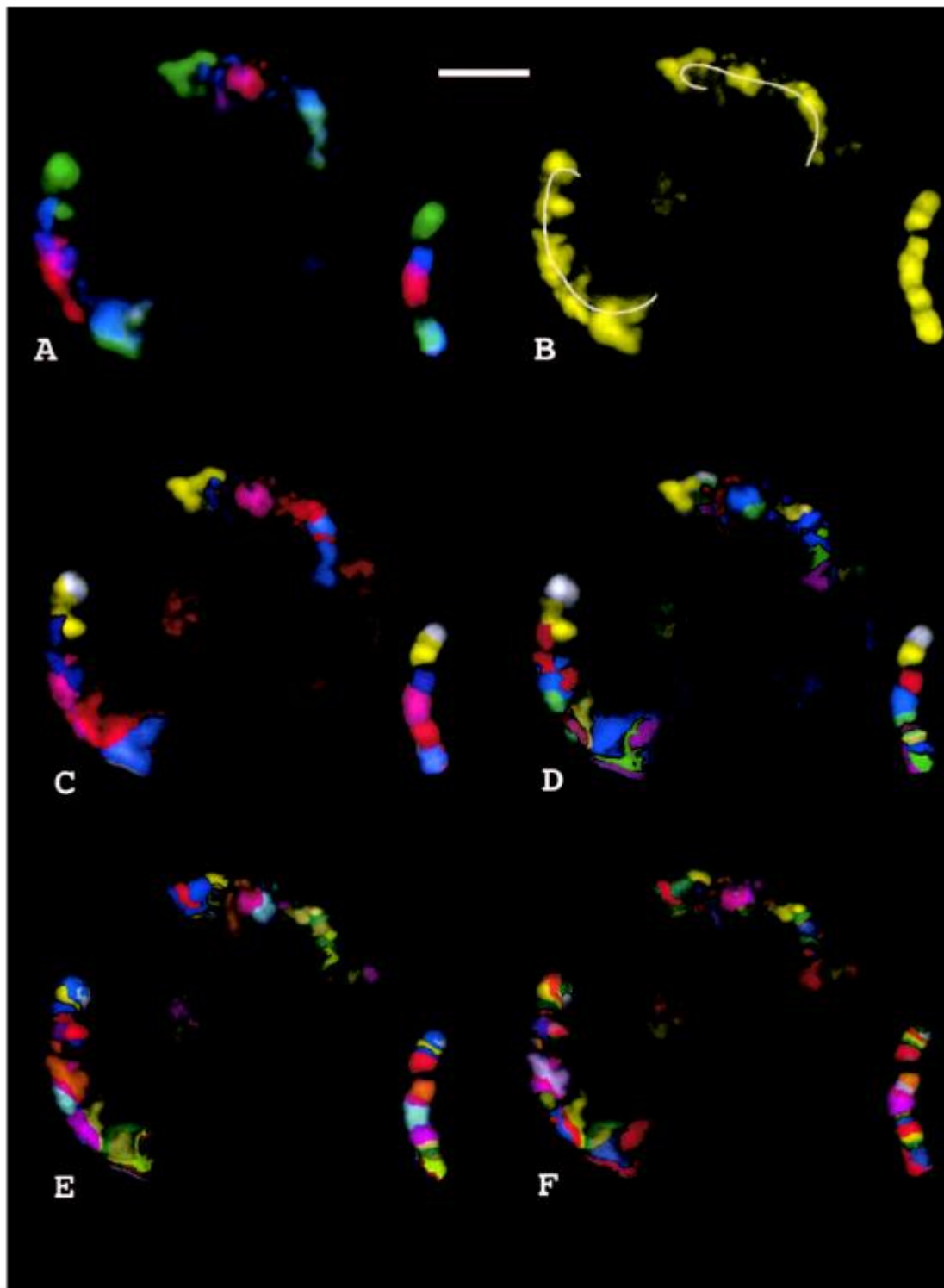


Figure 1 Human chromosome 5 in a normal lymphocyte interphase nucleus at different MCB pattern resolutions. Both interphase chromosomes 5 are visible, showing the same color patterns as their corresponding metaphase chromosomes 5 on the right. Scale bar = 5 μ m. *A*, Both chromosomes in the interphase nucleus hybridized with the MCB probe mixture. The different colors arise from the fluorescence signals taken with the individual filter combinations. DNA-based pseudocolors are not integrated. *B*, Both chromosomes 5, in one color. The MCB probe mixture has been used as a whole chromosome-painting probe. The lines represent the chromosome axes as center lines between the telomeric bands and were used to measure the length of the interphase chromosomes 5. *C*, *D*, *E*, and *F* show both chromosomes 5 in 6, 11, 16, and 21 different pseudocolors, respectively.

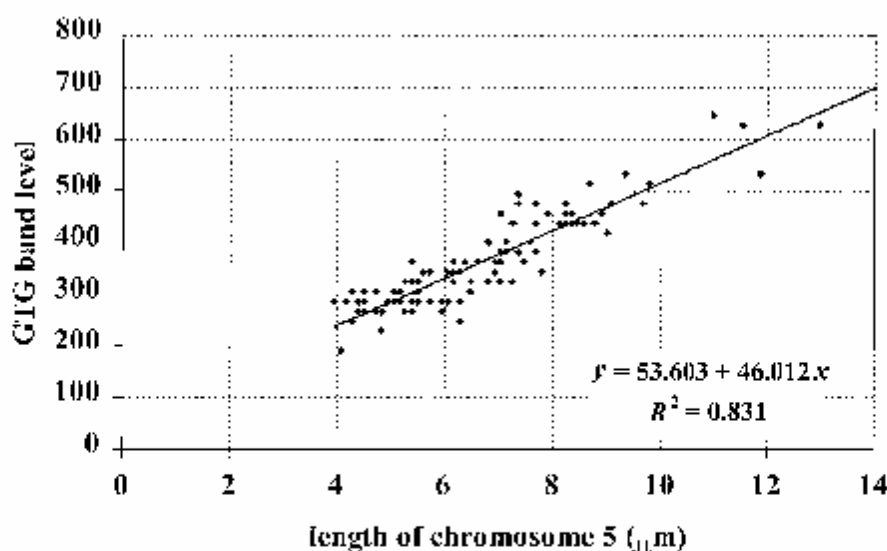


Figure 2 Correlation between the length of metaphase chromosome 5 of lymphocytes and its GTC band resolution (individual data points are represented by point markers; $n = 100$). The relationship is highly significant ($P < .001$), and R^2 confirms a linear relationship between the variables. Interphase chromosomes are on average of 12 μm in length and are therefore similar to metaphase chromosomes at the 600 band resolution level.

Discussion

Length of Chromosomes in Interphase Nuclei

Chromosomes in interphase are thought to (1) be much longer than chromosomes in prophase, (2) further condense to metaphase and anaphase chromosomes, and (3) become decondensed and longer after telophase. However, our results show that chromosomes in interphase are very similar in length to metaphase chromosomes. Therefore, doubts arise about the concept of chromosome condensation in general. We propose that all the convincing experiments published to date that deal with H3- and SMC-phosphorylation with respect to chromosome condensation (Garley et al. 1978; Hirano 1999; Strunnikov and Jessberger 1999; Wei et al. 1999) may explain phenomena related to the formation and/or compaction of chromosome loops that influence the width of chromosomes in two dimensions (Weise et al. 2002) and probably their volume in three dimensions. The length of the chromosome axis, the third component of chromosome condensation (Koshland and Strunnikov 1996), is clearly not influenced as much, although this has not been investigated directly by FISH. Technical difficulties preventing such an investigation have been solved here by the use of MCB.

The distances between fluorescently labeled DNA probes on human lymphoma cells indicate as much as a tenfold compaction of mitotic chromosomes, when

compared with interphase chromosomes (Lawrence et al. 1988). In addition, Yunis (1976, 1981) showed that prophase chromosomes are very long, in comparison with metaphase chromosomes. The discrepancy between these observations and our findings may be due to prophase chromosomes being artificially elongated during drying of fixative on the slide during chromosome preparation (Illies et al. 1997b). It also indicates that cell cycle-specific differences in the preparation-induced chromosome-elongation process may occur. In comparison with metaphase and interphase chromosomes, prophase chromosomes appear to be more sensitive to preparation-induced chromosome elongation. This elongation is a prerequisite for obtaining well-spread metaphases useful for chromosome analysis (Illies et al. 1997b). Chromosomes, routinely harvested for chromosome analysis shortly after completion of S phase, probably contain chromosome region-specific proteins that can easily be stretched during drying of the fixed cells on the slide, resulting in prophase chromosomes. Chromosomes harvested late after completing their S phase, however, are more resistant to preparation-induced chromosome stretching, leading to metaphase chromosomes that are relatively short. Chromosome-stretching experiments indicate that G-light bands are the stretchable units and that a hierarchy exists in their elasticity (Illies et al. 1997a; Küchler et al. 2001). Consequently, the stable G-band-

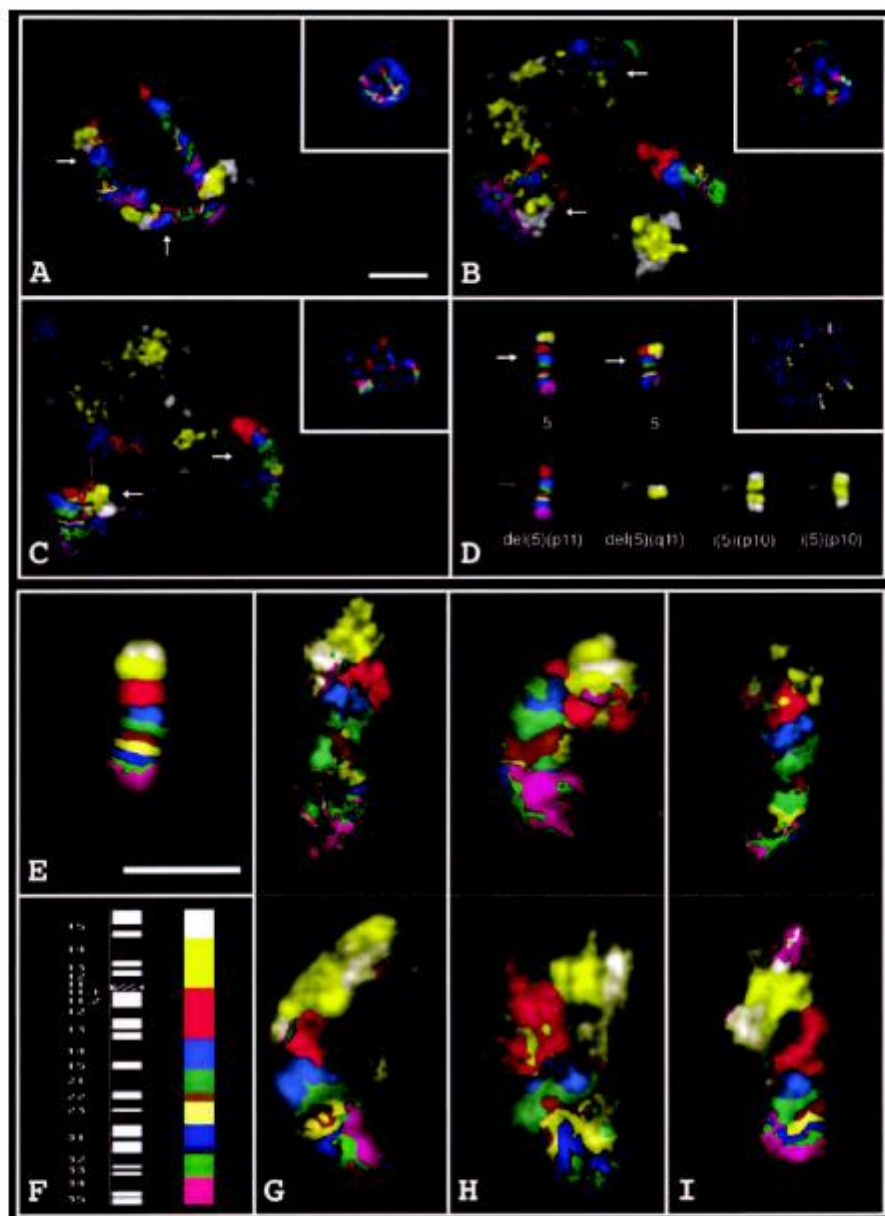


Figure 3 Multicolor-banded human chromosomes 5 in G1, S, and G2 phases and in the metaphase stage of HeLa cells. Light arrows indicate the normal chromosomes; gray arrows indicate the chromosomes with a deletion of the short arm, $\text{del}(5)(p11)$; gray triangles indicate the chromosomes with a deletion of the long arm, $\text{del}(5)(q11)$, and the isochromosome $5p, i(5)(p10)$. Scale bars = $5 \mu\text{m}$ (scale bar in A is representative for A–D, and that in E is representative for E–I). A, MCB pattern of the normal and rearranged chromosomes 5 of a HeLa cell arrested at G1 of the cell cycle. Some chromosomes are close to each other by chance, and the MCB pattern is identical to that of the chromosomes in metaphase (see D). The same interphase nucleus is shown on the right, at lower magnification. The cell is DAPI-stained (blue background), and the different colors arise from the fluorescence signals taken with the individual filter combinations. B, An interphase nucleus shown arrested in S phase, comparable to A. C, An interphase nucleus shown arrested in G2 phase. Chromosome 5 in S phase is as long as in the G1 and G2 phases, but wider. In all stages of the cell cycle, the MCB patterns of chromosome 5 are identical. All HeLa-specific chromosome aberrations visible at the metaphase stage can also be identified on interphase chromosomes in the G1, S, and G2 phases. E, Metaphase chromosome 5 from HeLa cells at the same magnification (scale bar = $10 \mu\text{m}$) as the two chromosomes in the G1 phase (G), the S phase (H), and the G2 phase (I). An idiogram of chromosome 5 (Mittelman 1995) and the corresponding colored bands are shown in F. The shape of the interphase chromosomes and the colored bands indicate similarities with metaphase chromosomes.

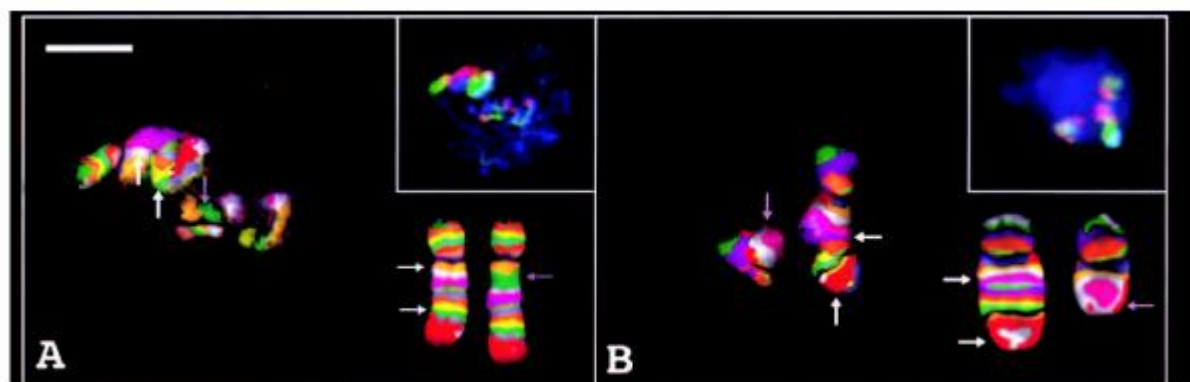


Figure 4 Multicolor-banded interphase chromosomes 5 in two clinical cases of structural chromosome aberrations. Scale bar = 5 μ m. **A**, Lymphocyte chromosomes 5 of a boy with congenital malformations, revealing a duplicated insertion of the green band derived from 5q31, between the ochre and white bands at 5q13. The green band on the short arm of chromosome 5 differs from the green color of band 5q31 and from that of the inserted band (gray arrow). Both chromosomes 5 shown are folded. The same cell, DAPI-stained, is shown on the top right, at lower magnification. The light arrows indicate the breakpoints on the normal chromosome 5 in the interphase (left) and metaphase stages (right). **B**, A chromosome 5 from cultivated bone marrow cells of a patient with leukemia (AML M6) with a 5q- syndrome. The light arrows indicate the breakpoints on the normal chromosomes 5 in the interphase (left) and metaphase stages (right), and the gray arrows indicate the rearranged chromosome 5 and its deletion breakpoint.

ing patterns occur, which provide the basis for most chromosome analyses.

The standard deviations of the length of flattened interphase chromosomes obtained after routine chromosome preparation and of intact three-dimensional chromosomes after preparation at reduced humidity are small. This indicates a stable length of interphase chromosomes. The mean length of flattened interphase chromosomes 5 obtained after routine chromosome preparation is 12 μ m, about twice the length of those obtained after drying the fixative at a humidity of $\leq 7\%$. Nearly identical results were found in a similar comparison of the length of metaphase chromosomes (Hliscs et al. 1997b). Metaphase chromosomes of the C group obtained after short-term evaporation of the fixative at 80°C were $\sim 3 \mu$ m in length, and routinely harvested and dried metaphase chromosomes were $\sim 5.6 \mu$ m.

Chromosome-stretching analysis (Hliscs et al. 1997a; Küchler et al. 2001) revealed that G-light bands represent chromosome regions that can be stretched. Chromosome stretching takes place during drying of the fixed suspension on the slide (Hliscs et al. 1997b) and, as discussed above, this is a prerequisite to obtaining metaphase spreads of sufficient quality for chromosome analyses. Without chromosome preparation-induced stretching, chromosomes are short and probably do not show any bands. The banding pattern may be regarded as a preparation-induced artifact, although this does not sufficiently reflect the fact that chromosome preparation leads to characteristic and highly reproduc-

ible morphological changes of chromosomes on which chromosome analyses are based. The biology behind the formation of these "reproducible artifacts" may be related to a chromosome region-specific fixed hierarchy in the potential of proteins of the chromatin to be stretched, but this has not been investigated. The methanol, acetic acid, and water of the fixative may interact with proteins of the chromatin, especially in G-light bands, thus resulting in their elongation. Following this interpretation, one may assume that routine chromosome preparation using fixative and drying of the fixed suspension on the slide induces a dramatic genomewide elongation of all chromosome regions in which house-keeping genes are located, leading to a banded metaphase spread. A similar mechanism may operate in living cells, restricted to single chromosome regions, to open the chromatin (G-light chromosome regions) for the transcription machinery, probably in a function-specific manner.

The Banded Structure of Interphase Chromosomes

Ideas about the chromosomes in interphase nuclei have been influenced by the previous inability to visualize analyzable structures. We show for the first time, to our knowledge, that interphase chromosomes are structured, with a highly reproducible DNA-specific banding pattern. This will profoundly enhance our understanding of the architecture of the interphase nucleus. The existence of such a banding pattern can be regarded as a logical con-

1058

Am. J. Hum. Genet. 71:1051–1059, 2002

sequence of the observation by Dietzel et al. (1998) that the chromosome arm domains in interphase nuclei show separate signals.

Some interphase chromosomes 5 show an incomplete MCB pattern. This partial loss of chromosome 5-specific MCB signals may be due to technical problems, because FISH techniques are predominantly adapted to metaphase chromosomes and not to interphase nuclei. This is supported by the observation that an MCB probe mixture of reduced hybridization quality resulted in increased partial loss of MCB signals. The margins of interphase chromosome 5 in S phase appear to be less sharply marked, which may also be a preparation-induced artifact. We decided not to investigate this in more detail.

Interphase nuclei in living cells are three-dimensional. Routine chromosome preparation, however, leads to flattened interphase nuclei, and significant alterations of the structure of chromosomes in interphase nuclei of cells flattened during preparation are expected. However, the similarity between the DNA-based banding pattern of flattened interphase chromosomes and that of metaphase chromosomes suggests that, in living cells, both three-dimensional intact interphase chromosomes and metaphase chromosomes may be more similar than expected. The preparation technique we used to gain information about three-dimensional intact interphase chromosomes led to half-spherical interphases, which are not optimal. In an attempt to preserve the three-dimensional chromatin structure of the interphase nuclei, we fixed cells with buffered formaldehyde; however, subsequent MCB did not give sufficient hybridization signals.

The DNA-based banding pattern of interphase chromosomes is very similar to that of metaphase chromosomes. This holds true not only for the G2 phase but also for the G1 and S phases. Consequently, the terms "chromosome territory" and "chromosome domain" will no longer be needed and can be replaced by the term "interphase chromosome." Chromosomes are chromosomes throughout the whole cell cycle, and ideas and concepts are needed in dealing with structural changes and reorganization of chromosomes during the cell cycle, with regard to functional aspects and tissue specificity. Several models for the organization and architecture of chromosomes in interphase nuclei have been discussed (for review, see Chevret et al. [2000] and Cremer and Cremer [2001]) that indicate that the basic information about interphase chromosomes available at present is not sufficient to define the correct model. Technical advances are needed, especially in FISH technology, to enable the dynamic changes in interphase nuclei to be visualized.

The position of genes inside chromosomes in interphase depends on the transcriptional activity of the gene

(Dietzel et al. 1999). Active genes are located at, or close to, the surface of interphase chromosomes. Inactive genes are more central, suggesting that dynamic position changes probably interfere with functional aspects. The chromosome preparation-induced elongation mechanism described by Hlises et al. (1997b), which probably takes place exclusively in G-light bands (Hlises et al. 1997a) where the housekeeping genes are placed (Johlmquist 1992), may have an equivalent in the interphase. The mechanisms to open chromatin structures for transcription could relocate structures from an internal to a more external position, depending upon whether the genes are active or inactive. For the human X chromosomes in interphase cells, Eils et al. (1996) showed that the active X chromosome has the larger and more irregular surface. An extreme variation of this is the observation that transcriptionally upregulated genes in the major histocompatibility complex on the short arm of chromosome 6 were found to be on an external loop, apparently outside the chromosome 6 territory (Volpi et al. 2000). Also, tissue-specific aspects of the same mechanism of transcriptional activation have been shown for the epidermal differentiation complex at 1q21 in keratinocytes, where the genes are active, and in lymphoblast interphase nuclei, where they are silenced (Williams et al. 2002). We therefore assume a hierarchy in the distance from actively transcribed chromosomal DNA to their interphase chromosome territory, which corresponds to the hierarchy of the splitting of bands into their sub-bands for pro-, prometa-, and metaphase chromosomes.

Chromosome 5 aberrations in HeLa interphase cells, such as tip or deletions of the p and q arms, are clearly visible (fig. 3). In clinical cases (fig. 4), chromosome 5 aberrations can also be detected. Therefore, we speculate that, in the future, the form of all human chromosomes, together with their substructures, will be visualized in three dimensions and will be used to detect chromosome aberrations in interphase nuclei. This opens new possibilities for cytogenetic investigations.

Acknowledgments

We thank Bernhard Horsthemke for helpful discussions. This investigation was supported, in part, by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the European Union (grant QLRT-1999-31590).

References

- Chevret F, Volpi RV, Sheer D (2000) Mini review: form and function in the human interphase chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 90:13–21
- Chudoba I, Plešć A, Lorch T, Lemke J, Claussen U, Senger G (1999) High resolution multicolour-banding: a new tech-

- nique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84:156–160
- Claussen U, Mezer A, Rubtsov N (1994) Chromosomes are highly elastic and can be stretched. *Cytogenet Cell Genet* 86:120–125
- Coatings DE (1988) The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am J Hum Genet* 20:440–460
- Cremer T, Cremer C (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev Genet* 2:292–301
- Cremer T, Cremer C, Schneider T, Baumann H, Heus L, Kirsch-Volders M (1982) Analysis of chromosome positions in the interphase nuclei of Chinese hamster cells by laser-DV microirradiator experiments. *Hum Genet* 62:201–209
- Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Diezel S, Rieke B, Schroek E, Speicher MR, Mathias U, Jauch A, Emmerich P, Schertan H, Ried T, Cremer C, Lichter P (1993) Role of chromosome territories in the function of compartmentalisation of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58:777–792
- Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells detected by in situ hybridisation using chromosome specific library probes. *Hum Genet* 80:235–246
- Dietzel S, Jauch A, Kienle D, Qu G, Holtgreve-Grz H, Eils R, Munkel C, Birmer M, Melzer PS, Trent JM, Cremer T (1998) Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei. *Chrom Res* 6:25–33
- Dietzel S, Schiessel K, Little G, Delemann P, Rappold GA, Eils R, Cremer C, Cremer T (1999) The 3D positioning of ANTL and ANFL genes within female X chromosome territories correlates with gene activity. *Exp Cell Res* 257:63–67
- Eils R, Dietzel S, Bertin E, Schroek E, Speicher MR, Ried T, Robert-Nicoud M, Cremer C, Cremer T (1996) Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J Cell Biol* 135:1427–1440
- Guacci V, Hogan E, Koshland D (1994) Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol* 125: 517–530
- Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Deaven LL, Tabej RA (1978) Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis of Chinese hamster cells. *Eur J Biochem* 84: 1–15
- Hirano T (1989) SAC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Dev* 13:11–19
- Illies R, Mühlhög P, Claussen U (1997a) The nature of G-bands analysed by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 79:167–166
- (1997b) The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 76:164–171
- Holmquist GP (1992) Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am J Hum Genet* 51: 17–37
- Johnson RT, Rao PN (1970) Mammalian cell fusion. II. Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 226:717–722
- Koshland D, Strunnikov A (1996) Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:305–333
- Kuechler A, Mueller CR, Liehr T, Claussen U (2001) Detection of microdeletions in the short arm of the X chromosome by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 95:12–16
- Lawrence JB, Villave CA, Singer RH (1988) Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 52:51–61
- Lemke J, Chudoba I, Seiger G, Stumm M, Loncarevic B, Henry C, Zabel B, Claussen U (2001) Improved definition of chromosomal breakpoints using high-resolution multi-colour banding. *Hum Genet* 108:478–483
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80: 224–234
- Mittelmark F (ed) (1985) ISCN (1985): an international system for human cytogenetic nomenclature. Karger, Basel
- Pükel D, Landegren J, Collins C, Fuscoe J, Segars R, Lucas J, Gray J (1988) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9138–9142
- Schurciady H, Sperling K (1981) Length of human prematurely condensed chromosomes during G0 and G1 phase. *Exp Cell Res* 134:461–465
- Strunnikov AV, Jessberger R (1999) Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: conserved molecular properties for multiple biological functions. *Eur J Biochem* 263: 6–13
- Volpi EV, Chevret E, Jones T, Vatcheva R, Williamson J, Beck S, Campbell RD, Goldsworthy M, Powis SH, Ragoussis J, Trowsdale J, Sheer D (2000) Large scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci* 113:1565–1576
- Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97:99–109
- Weise A, Starke H, Heiler A, Claussen U, Liehr T (2002) Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis: a multicolor banding analysis. *Int J Mol Med* 9:359–361
- Williams RR, Broad S, Sheer D, Ragoussis J (2002) Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei. *Exp Cell Res* 272:163–175
- Yunis JJ (1976) High resolution of human chromosomes. *Science* 191:1268–1270
- (1981) Mid-prophase human chromosomes: the attainment of 2000 bands. *Hum Genet* 56:293–298

Diskussion

Die Methode des Multicolour Bandings erlaubt es erstmals, Chromosomen unabhängig von Länge, Spreitung und Qualität der Metaphasen auf Bandenniveau darzustellen, da sich das Bandenmuster an der zu untersuchenden Ziel-DNA und nicht, wie konventionelle Techniken, an chromosomalen Proteinen orientiert.

Die einzelnen Mikrosezierungssonden des MCB-Cocktails verursachen ein sich ständig änderndes aber hochspezifisches Fluorochromintensitätsprofil entlang der Chromosomenachse, welches vom Nutzer in beliebige Abschnitte unterteilt werden kann. Diesen Abschnitten werden Falschfarben zugeordnet, was letztendlich in einem typischen Bandenmuster für das jeweilige Chromosom resultiert. Kleinste Veränderungen des Intensitätsprofils schlagen sich somit auch im MCB Muster nieder.

Das MCB Muster verhält sich sehr konstant. Chromosomen gleicher Länge zeigen MCBanden gleicher Größe, Anordnung und Reihenfolge, während die Bandengröße abhängig von der Chromosomenlänge, ähnlich dem G-Banding, leicht variieren kann. Auch Bruchpunkte chromosomaler Aberrationen stellen sich unabhängig vom Kondensationsgrad der jeweiligen Chromosomen immer in den gleichen Falschfarbbanden dar.

Um diese MCBanden dem etablierten ISCN G-Bandenideogramm vergleichbar zu machen, konnte ein MCB-Ideogramm erstellt werden, welches in seiner Auflösung ungefähr einem Metaphasechromosom des 550 Bandenstadiums entspricht. Die Bandenzuordnung wurde mit Simultanhybridisierungen lokusspezifischer Sonden sowie dem Abgleich mit diversen Intensitätsprofilen und reversem DAPI-Banding gesichert.

Der Vergleich der MCB-Bruchpunkte mit denen herkömmlicher Methoden anhand von 40 klinischen Fällen mit unterschiedlichsten Aberrationen zeigte zum Teil deutliche Differenzen.

In 30 der 40 Fälle wurde zumindest einer der involvierten Bruchpunkte mittels MCB neudefiniert. Auf die komplette Anzahl aller Bruchpunkte bezogen, entspricht dies 69%, wovon in 34% der bisher angenommene Bruchpunkt in der Nachbarbande bzw. der darauf folgenden lag. In weiteren 29% war eine exakte Bruchpunktbestimmung mit konventionellen Techniken gar nicht möglich und in den verbleibenden 6%

wichen die GTG-Bruchpunkte aus unbekannter Ursache stark vom MCB-Ergebnis ab.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Hauptursache für Fehldeutungen der GTG-/RBG-Bruchpunkte. Die Abfolge von ausschließlich positiven und negativen Banden im Muster eines Chromosoms führt zu einer nur sehr geringen Bandenunterscheidbarkeit und kann gerade bei Aberrationen bzw. Rearrangements leicht zu Fehlinterpretationen des eigentlichen Bandenursprungs führen. Nahezu jeder zweite, der später mittels MCB neudefinierten Bruchpunkte war aufgrund dieser geringeren Auflösung konventioneller Bänderungstechniken bisher unpräzise oder gar falsch. Hier wird die Überlegenheit des MCB besonders deutlich, da sich durch seine Vielfarbigkeit eine ungemein höhere Unterscheidbarkeit der einzelnen Banden ergibt.

Die Ergebnisse belegen außerdem eine geringere Anfälligkeit des MCB gegenüber den bereits genannten Störgrößen wie Spreitung der Metaphasen und Chromosomen. Die Bruchpunktbestimmung wurde in 11 der 40 Fälle an Chromosomen von Lymphozyten vorgenommen, welche häufig von vornherein zu einer besseren Spreitung und Bandenauflösung neigen. Dies ist wohl auch ein Grund dafür, daß in diesen 11 Fällen mit MCB keine oder nur geringfügige Bruchpunktabweichungen festgestellt wurden. Der Großteil der bearbeiteten Fälle dieser Arbeit (29) beruhte allerdings auf einer Bruchpunktbestimmung an Knochenmarkszellen, welche für herkömmliche Bänderungstechniken oft nur eine geringere Qualität bieten. Auch hier wird die Überlegenheit des MCB sehr deutlich, denn selbst in sehr kurzen, schlecht GTG-bänderbaren Chromosomen (200 G-Banden-Stadium oder weniger) kann mit dieser Methode eine Bandenauflösung erzielt werden, die noch der eines 550 G-Bandenstadiums entspricht. Dementsprechend führte die Bruchpunktbestimmung mittels MCB an solchen Chromosomen auch deutlich häufiger zu Berichtigungen. Jedoch bewahren auch gut gespreitete Lymphozytenchromosomen nicht vor Fehlinterpretationen wie Fall 1 verdeutlicht.

Rückvergleichend ließ sich sagen, daß sich jegliche mit MCB neudefinierten Bruchpunkte wiederum auch in Übereinstimmung mit dem G- bzw. R-Bandenmuster befanden.

Allerdings zeigte sich, daß das MCB bei Aberrationen in seltenen Fällen auch zu Fehlinterpretationen bzw. Artefakten führen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden

2 Typen solcher Aberrationen entdeckt. In einem Fall (Fall 3) handelte es sich um eine Insertion eines kleineren Duplikates aus dem distalen in den proximalen q-Arm des Chromosoms 5. Dabei entstand an den beiden Insertionspunkten durch das Überstrahlen und Vermischen der nun neu aneinander grenzenden Fluorochromkonstellationen eine artifizielle neue Bande, welche in ihrer Zusammensetzung einer bereits definierten vorhandenen Bande im distalen q-Arm sehr stark entsprach, die dem duplizierten Abschnitt direkt angrenzte.

In diesem Falle konnte ein neues eigens definiertes Bandenmuster, das sich in seinem Auflösungsmaximum besonders auf die Region der Duplikation konzentrierte und alle sonstigen Informationen (Banden) außer Acht ließ, den genauen Umfang der Insertion aufdecken. Zusätzlich war es möglich durch diese fokussierte Auflösungsoptimierung, auch die Orientierung der Insertion aufzuklären. Da es sich hier im Umfang um lediglich einen Bruchteil einer einzelnen G-Bande handelte, war dies mit herkömmlichen Bänderungsmethoden bislang völlig unmöglich.

Im anderen Falle (Fall 12 und Fall 28) handelte es sich um die Deletion eines Bereiches im q-Arm, welche sich im MCB-Bandenmuster nicht als Verlust von Banden, sondern lediglich als Schrumpfung der beteiligten Banden zeigte. In den Fluorochromintensitätsprofilen zeigte sich eine deutliche Verkleinerung der Peaks der betroffenen Fluorochrome und damit auch ihrer Intensitäten. Da das MCB aber hauptsächlich auf der Unterscheidung von Fluorochromrelationen zueinander, nicht aber der Intensitäten an sich beruht, kommt es bei solchen Deletionen nicht zum Bandenverlust. Solange sich die Fluorochrommischungsverhältnisse nicht auffällig ändern und die Deletion damit nur zu einer Stauchung der Intensitätsprofile führt, schlagen sich Intensitätsverminderungen auch nicht in einem MCBandenverlust nieder, sondern lediglich in einer Verschmälerung der beteiligten Banden.

In solch einem Fall, wie auch im ersten (Fall 3), hülfe vor allem eine bessere Abdeckung und Überlagerung der einzelnen Mikrosezierungssonden entlang der Chromosomenachse, um eine Repräsentation eines Areals durch zwei oder gar nur ein Fluorochrom zu vermeiden.

Allerdings lassen sich die eben genannten MCB Artefakte auch anhand der Intensitätsprofile erkennen und eventuell durch Erstellen von höher auflösenden Bandenmustern beheben.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß das MCB bei der Analyse von Bruchpunkten in Metaphasechromosomen signifikante Vorteile bietet, da es eine

deutlich höhere Auflösung und Bandenunterscheidbarkeit bietet und gerade an Material, welches für konventionelle Bänderungsmethoden oft schlecht zugänglich ist, eine bei weitem bessere Auflösung gewährleistet.

Allerdings sollte im direkten Vergleich zwischen MCB und GTG/RBG auch darauf hingewiesen werden, daß die weithin etablierten konventionellen Methoden auch kaum schlagbare Vorteile bieten. Sie sind ohne großen technischen Aufwand und Vorarbeit bei äußerst geringen Kosten sehr leicht, schnell und nutzerfreundlich durchzuführen.

Als Konsequenz der DNA-Orientierung des MCB ergab sich erstmals die Gelegenheit, Chromosomen unabhängig von Pro- bzw. Metaphase einzeln und als Ganzes im Zellkern auf Bandenniveau darzustellen.

Für GTG gebänderte Metaphasechromosomen konnte ein signifikanter Zusammenhang ($P < 0,001$) zwischen der Länge des Chromosoms und seinem Bandenstadium gefunden werden. Anhand dieses Graphen (Figure 2, Lemke et al. 2002) ließ sich die Länge eines Interphasechromosoms direkt einem Metaphasenbandenstadium zuordnen.

Für Interphasechromosomen 5 wurde eine Länge von $12,0 \pm 2,3 \mu\text{m}$ gemessen, was ergo einem Bandenstadium von lediglich ca. 600 in der Metaphase entspricht. Die geringe Standardabweichung spricht sogar für eine relative Konstanz der Länge der Interphasechromosomen. Auch 3D-Untersuchungen bestätigten, daß Interphasechromosomen 5 zwar länger als Metaphasechromosomen sind, jedoch nicht um ein Vielfaches, wie bislang angenommen. Je höher das MCBandenstadium gewählt wurde, desto gewundener zeigte sich die Chromosomenachse, ohne daß dies allerdings die tatsächliche Länge des Interphasechromosoms beeinflusste, denn der Abstand der Telomere zueinander blieb ja unverändert.

Dies steht im Gegensatz zu Arbeiten, die davon ausgehen, daß Interphasechromosomen vielfach länger als Prophasechromosomen seien und ein noch höheres Bandenstadium als das von 2000 Banden (wie in Prophasen beobachtet) aufweisen (Yunis et al. 1976, 1981). Darüberhinaus wurde angenommen, Chromosomen kondensierten im Verlauf von Pro-, Prometa-, Meta- und Anaphase immer stärker, um schließlich nach der Telophase erneut zu dekontensieren.

Diese Diskrepanzen der zellzyklusunterschiedlichen Bandenstadien können eventuell durch die Beobachtungen von Hliscs et al. 1997 erklärt werden, welche zeigten, daß das hohe Bandenstadium von Prophasechromosomen hauptsächlich durch eine spezielle Chromosomenpräparation und das anschließende Auftropfen auf den Objektträger verursacht wird und Chromosomen außerdem zellzyklusabhängig unterschiedlich stark auf eben genannte präparative Manipulation ansprechen.

Die weithin bekannten und etablierten GTG Bandenstadien sowie deren Ideogramme laut ISCN 1995 scheinen damit weniger auf tatsächlich morphologische, als eher präparativ artifizielle Phänome zurückführbar zu sein.

Die Interphase-MCB Analysen zeigten, ein überraschend konstantes und stark metaphaseähnliches Bandenmuster. In gut einem Drittel aller untersuchten Interphasekerne (n=106) stellten sich beide Chromosomen 5 komplett gebändert dar. Fast die Hälfte der Kerne konnte jedoch für die Auswertung nicht herangezogen werden, da sich beide Chromosomen überlagerten oder unvollständige Bandenmuster aufwiesen. Dieser nicht unbeträchtliche Anteil ließe sich sicherlich noch weiter dezimieren, wenn die Analyse an dreidimensional intakten Kernen auf den selben MCBandenstadien durchgeführt werden könnte und sich die Präparations- bzw. FISH-Methodik noch stärker auf Interphasekerne optimieren ließe.

Um das MCB des Chromosoms 5 während der verschiedenen Interphasestadien untereinander zu vergleichen, wurden HeLa-Zellen kultiviert, synchronisiert und dann jeweils in der G1-, S- und G2-Phase arretiert. In allen Phasen zeigte sich ein metaphaseähnliches Banding. Auch die Länge der Chromosomen 5 war phasenunabhängig relativ ähnlich. Der offensichtlichste Unterschied bestand in der Form der Chromosomen bzw. deren einzelnener Banden. Beide erschienen aufgelockerter und aufgeweiteter als im Vergleich zu Metaphasechromosomen, was vermuten läßt, daß sich nach der Telophase zwar kaum eine Verlängerung der Chromosomenlänge ergibt, dafür wohl aber ein stärkeres seitliches Ausloopen von Chromatin stattfindet. Am augenscheinlichsten wird dies an S-Phase-Chromosomen. Ob dieses Phänomen allerdings wirklich auf funktionelle Hintergründe

zurückzuführen ist oder doch eher auf einem präparationsbedingten Artefakt beruht, wurde nicht genauer untersucht.

Dietzel et al. 1999 beschrieb, daß die Position der einzelnen Gene innerhalb der jeweiligen Interphaseterritorien in Abhängigkeit zu ihrer Transkriptionsaktivität stehen könnten. So lägen aktive Gene mehr peripher und oberflächennah im Interphasechromosom und wären somit für die Transkription leichter zugänglich, im Gegensatz zu inaktiven Genen, welche sich vornehmlich zentral befänden.

Der Mechanismus, Chromatinstrukturen der Transkription zugänglicher zu machen, in dem DNA-Strukturen innerhalb des Interphasechromosoms von zentral nach peripher verlagert werden, könnte ein Equivalent zu dem von Hliscs et al. 1997 beschriebenen Prozeß des Aufspaltens heller G-Banden innerhalb dunkler darstellen. Auch könnten Parallelen in der Hierarchie der Aufspaltung der einzelnen hellen G-Banden und –Subbanden zu der transkriptionalen Aktivität der Gene, die sie beherbergen, liegen.

Andere vergleichende Arbeiten von aktiven und inaktiven X-Chromosomen (Eils et al. 1996) zeigten, daß das transkriptionsaktive X-Chromosom eine größere und unregelmäßigere Oberfläche hat als das inaktivierte.

Darüber hinaus liegen transkriptionell hochregulierte Gene, wie die des Major Histocompatibility Complex auf 6p ebenso auf der Oberfläche des jeweiligen Interphaseterritoriums (Volpi et al. 2000).

Interphasekerne sind in vivo dreidimensional, in situ jedoch präparationsbedingt stark abgeflacht und somit nahezu zweidimensional, was starke Strukturveränderungen der Interphasechromosomen vermuten läßt. Die Gleichartigkeit der MCBandenmuster von Interphase- und Metaphasechromosomen in situ läßt jedoch auf eine viel größere Ähnlichkeit beider Chromosomentypen in vivo schließen als bisher angenommen wurde. Aufgrund dieser Gleichartigkeit erscheint der Begriff „Interphasechromosom“ nunmehr auch angebrachter als die bisherigen Termini „Domäne“ oder „Territorium“.

Das Bändern von Interphasechromosomen ermöglicht darüber hinaus auch die Detektion verschiedener chromosomaler Veränderungen und Rearrangements, wie an 2 Fällen demonstriert werden konnte. In beiden Fällen zeigten Chromosomen der

Interphase exakt die selben MCB Muster (einer Insertion(5) vom distalen q-Arm nach weiter proximal bzw. einer Deletion von 5q) wie schon die Metaphasechromosomen. Gleiches gilt für den aberranten Karyotyp der HeLa-Zelllinie.

Diese Tatsache verdeutlicht, daß Interphasekerne durchaus zur Analyse von Chromosomenbanden herangezogen werden und hinsichtlich bestimmter Fragestellungen eine vergleichbare Qualität und Bandenauflösung wie in der Metaphase gewährleisten können. Die Bandenauswertbarkeit der Chromosomen der Interphase scheint der der Metaphase jedoch aufgrund der aufgelockerteren Morphologie bislang noch unterlegen. Trotz allem gestattet das MCB eine gewisse Unabhängigkeit von Mitosen, was interessante Ansätze zur Vereinfachung und Optimierung der Präparation und vor allem der Kultivierung von Zellen für die Chromosomenanalyse bietet.

Schlußfolgerungen

Das Multicolour Banding überliegt aufgrund seiner DNA-Ausrichtung und Vielfarbigkeit in Präzision und Auflösungsvermögen den herkömmlichen Bänderungstechniken, wie GTG bzw. RBG teils deutlich.

Es wurde gezeigt in welchem Ausmaß Bruchpunktbestimmungen bisher von Fehlinterpretation beeinflusst wurden und worauf diese zurückzuführen sind. Auch sehr kleine Aberrationen, welche von herkömmlichen Methoden bislang nicht oder nur schlecht detektierbar waren, können mit MCB genau dargestellt werden, was anhand der Orientierung der Insertion eines Bandenfragments (Fall 3, Lemke et al. 2001) gezeigt werden konnte.

Die Möglichkeit, Chromosomen mit MCB während der Interphase hochauflösend zu bändern, erlaubte es erstmals einen direkten Vergleich von Form, Größe und Strukturierung von Interphase- mit Metaphasechromosomen durchzuführen. Es zeigte sich, daß Chromosomen in der Interphase viel mehr mit Metaphasechromosomen gemein haben, als bisher vermutet wurde. So ist beispielsweise die Chromosomenachse nicht um ein Vielfaches länger als in der Metaphase. Auch haben Interphasechromosomen die gleiche MCBandenabfolge wie Metaphasechromosomen bei einer zusätzlich recht ähnlichen Bandenanordnung. Dies verdeutlicht, daß das Chromatin in der Interphase wohl auch sehr ähnlich strukturiert und nicht weitgehend dekondensiert und nahezu amorph in Territorien liegt.

Die lockerere Anordnung der Banden und deren größeres Volumen bei vergleichbarer Chromosomenachslänge läßt statt dessen ein seitliches Ausloopen von Chromatin eher vermuten als eben einen drastische Längenzuwachs durch Dekondensation.

Das MCB ist darüber hinaus so präzise, daß auch im Interphasekern kleinere Chromosomenanomalien detektiert werden können, was an 2 unterschiedlichen Fällen dokumentiert wurde. Dies eröffnet der Bruchpunktbestimmung in der Zytogenetik und molekularen Zytogenetik völlig neue Möglichkeiten.

Wenn es möglich ist, die Methodik des MCB an Interphasechromosomen weiter zu optimieren und zu perfektionieren, könnte auch routinemäßig eine verlässliche Chromosomenanalyse auf Bandenniveau mitoseunabhängig durchgeführt werden.

Dies erscheint besonders im Hinblick auf die Schwierigkeiten der Kultivierung von Zellen bzw. des Stimulierens der Mitosebildung einiger Zellkulturen von großem Vorteil, denn beides entfiel in diesem Falle, was zusätzlich eine beträchtliche Zeit- und Arbeitseinsparung bedeutete.

Außerdem kann diese Methode dazu verwandt werden, um auch die dreidimensionale Gestalt der Interphasechromosomen genauer zu ergründen, was in der vorliegenden Arbeit nur ansatzweise geschah, und damit helfen, zellzyklus- bzw. phasenspezifische Chromosomenunterschiede aufzuklären und das Konzept des Zellzyklus schlüssiger werden zu lassen.

Literaturverzeichnis

- Chevret E, Volpi EV, Sheer D. 2000. Mini review: form and function in the human interphase chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 90:13-21.
- Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Claussen U, Senger G. 1998. Multi-color-banding for the identification of interstitial deletion of chromosome 5. *Medgen* 10:116A.
- 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 U, Mazur A, Rubtsov N. 1994. Chromosomes are highly elastic and can be stretched. *Cytogenet Cell Genet* 66:120-125.
- Comings DE. 1968. The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am J Hum Genet* 20:440-460.
- Cremer T, Cremer C. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev Genet* 2:292-301.
- Cremer T, Cremer C, Schneider T, Bauman H, Hens L, Kirsch-Volders M. 1982. Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV microirradiation experiments. *Hum Genet* 62:201–209.
- Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Dietzel S, Rinke B, Schroek E, Speicher MR, Mathieu U, Jauch A, Emmerich P, Schertan H, Ried T, Cremer C, Lichter P. 1993. Role of chromosome territories in the function of compartmentalisation of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58:777–792.
- Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L. 1988. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells detected by in situ hybridisation using chromosome specific library probes. *Hum Genet* 80:235–246.
- Dietzel S, Jauch A, Kienle D, Qu G, Holtgreve-Grz H, Eils R, Munkel C, Bittner M, Meltzer PS, Trent JM, Cremer T. 1998. Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei. *Chrom Res* 6:25–33.
- Dietzel S, Schiebel K, Little G, Delemann P, Rappold GA, Eils R, Cremer C, Cremer T. 1999. The 3D positioning of ANT 2 and ANT 3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity. *Exp Cell Res* 252:63–375.
- Eils R, Dietzel S, Bertin E, Schrock E, Speicher MR, Ried T, Robert-Nicoud M, Cremer C, Cremer T. 1996. Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J Cell Biol* 135:1427–1440.
- Guacci V, Hogan E, Koshland D. 1994. Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol* 125: 517–530.

Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Deaven LL, Tobey RA. 1978. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis of Chinese hamster cells. *Eur J Biochem* 84: 1–15.

Hirano T. 1999. SMC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Dev* 13:11–19.

Hlisc R, Mühlig P, Clausen U. 1997. The nature of G-bands analyzed by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 79:162–166.

Hlisc R, Mühlig P, Clausen U. 1997. The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 76:167–171.

Holmquist GP. 1992. Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am J Hum Genet* 51: 17–37.

Johnson RT, Rao PN. 1970. Mammalian cell fusion. II. Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 226:717–722 (1970).

Koshland D, Strunnikov A. 1996. Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:305–333.

Kuechler A, Mueller CR, Liehr T, Claussen U. 2001. Detection of microdeletions in the short arm of the X chromosome by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 95:12–16.

Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc natl Acad Sci, USA* 78:6633–6637.

Lawrence JB, Villnave CA, Singer RH. 1988. Sensitive, highresolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 52:51–61.

Lemke J, Chudoba I, Senger G, Stumm M, Loncarevic IF, Henry C, Zabel B, Claussen U. 2001. Improved definition of chromosomal breakpoints using high-resolution multicolour banding. *Hum Genet* 108:478–483.

Lemke J, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Mühlig 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* 71:1052-1059.

Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80: 224–234.

Mitelman F, Hrsg. 1995. *ISCN 1995: An international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel: S Karger.

- Nederlof PM, van der Flier S, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ, Pleom JS, van der Ploeg M. 1990. Multiple fluorescence in situ hybridisation. *Cytometry* 11:126–131.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci, USA* 83:2934–2938.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J. 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9138–9142.
- Rao PH, Cigudosa JC, Ning Y, Calasanz MJ, Shinsuke I, Shinichi T, Michaeli J, Klein B, Dalla-Favera R, Jhanwar SC, Ried T, Chaganti RSK. 1998. Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma. *Bood* 92:1743–1748.
- Rubtsov N, Senger G, Kuzcera C, Neumann A, Kelbova C, Junker K, Beensen V, Claussen U. 1996. Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection, DNA amplification, and reverse painting. *Hum Genet* 97: 705.
- Schmiady H, Sperling K. 1981. Length of human prematurely condensed chromosomes during G0 and G1 phase. *Exp Cell Res* 134:461–465.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494–497.
- Schröck E, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Spurbeck J, Jaial S, Shaffer LG, Papenhausen P, Kozma C, Phelan MC, Kjeldsen E, Schonberg SA, O'Brien P, Biesecker L, du Manoir S, Ried T. 1997. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet* 101:225–262.
- Senger G, Lüdecke H-J, Horsthemke B, Claussen U. 1990. Microdissection of banded human chromosomes. *Hum Genet* 84:507–511.
- Senger G, Ragoussis J, Trowsdale J, Sheer D. 1993. Fine mapping of human MHC class II region within chromosome 6p21 and evaluation of probe ordering using fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 64:49–53.
- Senger G, Friedrich U, Claussen U, Tommerup N, Brondum-Nielsen K. 1997. Prenatal diagnosis of a half cryptic translocation using chromosome microdissection. *Prenat Diagn* 17:369–374.
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DS. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genet* 12:368–375.
- Strunnikov AV, Jessberger R. 1999. Structural maintenance of chromosomes (SMS) proteins: conserved molecular properties for multiple biological functions. *Eur J Biochem* 263: 6–13.

- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718–725.
- Tijó JH, Levan A. 1956. The chromosome number of man. *Hereditas* 42: 1.
- Veldman T, Vignon C, Schröck E, Rowley JD, Ried T. 1997. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolor spectral karyotyping. *Nature Genetics* 15:406–410.
- Volpi EV, Chevret E, Jones T, Vatcheva R, Williamson J, Beck S, Campell RD, Goldsworthy M, Powis SH, Ragoussis J, Trowsdale J Sheer D. 2000. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci* 113:1565–1576.
- Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97:99–109.
- Weise A, Starke H, Heller A, Claussen U, Liehr T. 2002. Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis: a multicolor banding analysis. *Int J Mol Med* 9:359–361.
- Williams RR, Broad S, Sheer D, Ragoussis J. 2002. Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei. *Exp Cell Res* 272:163–175.
- Yunis JJ. 1976. High resolution of human chromosomes. *Science* 191:1268–1270.
- Yunis JJ. 1981. Mid-prophase human chromosomes: the attainment of 2000 bands. *Hum Genet* 56:293–298.
- Zhang J, Trent JM, Meltzer P. 1993. Rapid isolation and characterization of amplified DNA by chromosome microdissection: identification of IGF1R amplification in malignant melanoma. *Oncogene* 8:2827–2831.

Lebenslauf

Name: Lemke, Johannes Rudolph
Adresse: Am Rähmen 21
07743 Jena
geboren: am 04.10.1976 in Jena
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

1983-1991 POS Wilhelm Pieck, Jena
1991-1993 Gymnasium Am Anger, Jena
1993-1994 Austauschjahr in Norwegen am Ringerike Gymnas, Hønefoss
1994-1996 Gymnasium Am Anger, Jena
1996 Abitur
1996-1997 Zivildienst im OP der HNO der FSU Jena
seit 1997 Praktika bzw. Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena
seit 1998 Studium der Humanmedizin an der FSU Jena
2001 Ärztliche Vorprüfung
2002 1. Teil der Ärztlichen Prüfung,
6-monatiger Aufenthalt als Technical Assistant am Wellcome Trust Sanger Institute in Hinxton/Cambridge, UK
2004 2. Teil der Ärztlichen Prüfung,
Beginn des Praktischen Jahres:
1. Tertian am Centre de Traumatologie et d'Orthopédie der Universität Louis Pasteur in Strasbourg, Frankreich
2. Tertian am Department of Haematology der University of Cambridge, UK
3. Tertian an der Klinik für Neurologie der FSU Jena
2005 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz besonders denjenigen danken, die mich im Verlauf dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Ilse Chudoba, die nicht nur mein Interesse an der Genetik überhaupt erst weckte, sondern mich auch im gesamten Verlauf dieser Arbeit fortwährend in sowohl Theorie als auch Praxis unterstützte, förderte und motivierte.

Herrn Prof. Dr. Uwe Claussen möchte ich zu aller erst für die Ermutigung, das Medizinstudium überhaupt erst aufzunehmen danken, sowie für die herzliche Aufnahme am Institut, für die jahrelange geduldige Unterstützung, für seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für die vielen Ideen und Anregungen, die auch in diese Arbeit eingingen.

Außerdem möchte ich mich bei der MetaSystems GmbH Altlußheim ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Sonden bedanken.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern Katrin und Melchior Lemke für ihre langjährige Unterstützung vor und besonders während meines Studiums.

Ehrenwörtliche Erklärung

Lemke, Johannes Rudolph

Am Rähmen 21

07743 Jena

Hiermit erkläre ich, Johannes Rudolph Lemke, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich diese Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:

Dr. Ilse Chudoba, Prof. Dr. Uwe Claussen, Dr. Gabriele Senger, Dr. Markus Stumm, Dr. Ivan F. Loncarevic, Dr. Cathérine Henry, Prof. Dr. Bernd Zabel, Jan Claussen, Susanne Michel, Prof. Dr. Peter Mühlig, Dr. Martin Westermann, Prof. Dr. Karl Sperling, Prof. Dr. Nikolai Rubtsov, Prof. Dr. Ulrich-Walter Grummt, Dr. Peter Ullmann, Dr. Katrin Kromeyer-Hauschild, Dr. Thomas Liehr

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

daß ich die vorgelegte Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht,

daß ich weder die gleiche, noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 29.06.2005

Johannes Lemke, Verfasser