

# **Zentromernahe, chromosomale Rearrangements im menschlichen Genom**

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades**  
**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Diplom-Biologin Heike Starke  
geboren am 31.01.1971 in Wurzen**



**Gutachter:**

1. Prof. Dr. U. Claussen (Jena)
2. Prof. Dr. G. Theißen (Jena)
3. Prof. Dr. P. Wieacker (Magdeburg)

**Tag der mündlichen Prüfung:**

29.06.2004

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

18.10.2004

## Inhaltsverzeichnis

|   | Seite |
|---|-------|
| <b>I. Einleitung</b> .....  | 1     |
| <b>1.1. Zytogenetik und molekulare Zytogenetik</b> .....  | 3     |
| 1.1.1. Die Anfänge der konventionellen Zytogenetik.....   | 3     |
| 1.1.2. Die Bänderungszytogenetik.....   | 3     |
| 1.1.2.1. Heteromorphismen und Normvarianten.....  | 4     |
| 1.1.2.2. Markerchromosomen.....   | 4     |
| 1.1.2.3. Ringchromosomen.....   | 4     |
| 1.1.2.4. Derivatvchromosomen.....   | 4     |
| 1.1.2.5. Möglichkeiten und Grenzen der Bänderungstechniken.....   | 5     |
| <b>1.2. Die Molekulare Zytogenetik</b> .....  | 5     |
| 1.2.1. Die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....  | 5     |
| 1.2.2. Die Ein- bis Dreifarbf-FISH Methoden.....  | 6     |
| 1.2.3. Die Multicolor-FISH-Verfahren.....   | 7     |
| 1.2.4. FISH-Bänderungsverfahren.....  | 8     |
| <b>1.3. Das Zentromer menschlicher Chromosomen</b> .....  | 8     |
| 1.3.1. Aufbau und Funktion des Zentromers.....  | 8     |
| <b>1.4. Die Zentromer-angrenzenden Regionen</b> .....   | 10    |
| 1.4.1. Die Satelliten-DNA und Heterochromatin-Bereiche.....   | 10    |
| 1.4.2. Die perizentrische Region.....   | 10    |
| <b>1.5. Zielstellung der Arbeit</b> .....   | 11    |
| <br>  |       |
| <b>II. Material und Methoden</b> .....  | 12    |
| <b>2.1. Das Untersuchungsmaterial und dessen Aufarbeitung</b> .....   | 12    |
| 2.1.1. Kultivierung von Lymphozyten aus Blutproben.....   | 12    |
| 2.1.2. Kultivierung von Amnionzellen.....   | 14    |
| <b>2.2. Zytogenetische Bänderungstechniken</b> .....  | 15    |
| 2.2.1. Die GTG- oder Giemsa-Färbung.....  | 15    |
| 2.2.2. Die CBG-Bänderung.....   | 15    |
| 2.2.3. Die NOR-Färbung oder Silberfärbung.....  | 16    |
| <b>2.3. Vorbehandlung der Chromosomenpräparate</b> .....  | 17    |
| 2.3.1. Pepsinverdau und Postfixierung.....  | 17    |
| 2.3.2. Denaturierung der Objektträger.....  | 17    |
| <b>2.4. Vorbehandlung der DNA</b> .....   | 18    |
| 2.4.1. Reinigung der verwendeten DNA-Sonden durch<br>Alkoholpräzipitation.....  | 18    |
| 2.4.2. Denaturierung und Prähybridisierung der Sonden.....  | 19    |
| 2.4.3. Der eigentliche Hybridisierungsansatz.....   | 19    |
| 2.4.4. Hybridisierung von Telomersonden.....  | 20    |
| <b>2.5. Posthybridisierungswaschungen der Präparate</b> .....   | 20    |
| <b>2.6. Die Detektion der indirekt markierten Sonden</b> .....  | 21    |
| <b>2.7. Isolierung von PAC-, BAC- und YAC-DNA<br/>zur Herstellung von Sonden</b> .....  | 22    |
| 2.7.1. Gewinnung von <i>bacterial artificial chromosome</i> (BAC)- und P1-<br>abgeleiteter künstlicher Chromosomen (PAC)-DNA..... | 22    |
| 2.7.2. Bestimmung der DNA-Gehaltes der Sonden.....  | 24    |
| 2.7.3. Aufarbeitung der eingesetzten YAC-Sonden.....  | 24    |

|  |    |
|--|----|
| <b>2.8. Mikrosezierung von Chromosomen und Chromosomenregionen</b>   | 24 |
| <b>2.8.1. Vorbereitende Tätigkeiten</b>  | 25 |
| <b>2.8.2. Durchführung der Mikrosezierung</b>  | 26 |
| <b>2.9. Techniken zur Amplifizierung und Markierung der DNA Sonden</b>   | 27 |
| <b>2.9.1. Die DOP-PCR</b>  | 27 |
| <b>2.9.2. Amplifikation der Proben-DNA</b>   | 27 |
| <b>2.9.3. Markierung der DNA-Sonden</b>  | 30 |
| <b>2.9.4. DNase Behandlung</b>   | 33 |
| <b>2.9.5. Reamplifizierung bereits DOP-amplifizierter Sonden</b>   | 33 |
| <b>2.9.6. Reinigung der markierten DNA durch Alkohol-Fällung</b>   | 34 |
| <b>2.10. Durchführung der Untersuchung auf uniparentale Disomie (UPD)</b>  | 34 |
| <b>2.10.1. Isolation der DNA</b>   | 34 |
| <b>2.10.2. Durchführung der PCR</b>  | 35 |
| <b>2.10.3. Elektrophorese der gewonnenen PCR Produkte</b>  | 35 |
| <b>2.11. Verwendete Sonden</b>   | 36 |
| <br>   |    |
| <b>III. Ergebnisse</b>   | 40 |
| <b>3.1. Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung der perizentrischen Region des Menschen</b>                       | 40 |
| <b>3.1.1. Das Multicolor-Bänderungs-Verfahren (MCB)</b>  | 40 |
| <b>3.1.1.1. Entwicklung von MCB-Banken für den gesamten Chromosomensatz des Menschen</b>                                 | 40 |
| 3.1.1.1.1. Herstellung der Banken  | 40 |
| 3.1.1.1.2. Möglichkeiten und Grenzen der Mikrosezierungsbasierenden MCB Sonden Sets                                      | 42 |
| <b>3.1.1.2. Entwicklung von YAC-, BAC-basierenden MCB Sonden Sets</b>  | 42 |
| 3.1.1.2.1. Das YAC/BAC-MCB 22- Auswahl, Anzucht, Isolierung der BAC-Sonden-DNA   | 42 |
| 3.1.1.2.2. Überprüfung und Kartierung der Sonden   | 43 |
| 3.1.1.2.3. Überprüfung der Abdeckung des Chromosoms 22   | 43 |
| 3.1.1.2.4. Herstellung eines BAC basierenden MCB Sondenmixes   | 44 |
| <b>3.1.2. Die Methoden cenM-FISH und acro-cenM-FISH</b>  | 45 |
| <b>3.1.2.1. Die cenM-FISH Technik</b>  | 45 |
| <b>3.1.2.2. Das acro-cenM-FISH</b>   | 47 |
| <b>3.1.3. Das subcenM-FISH zur Untersuchung der zentromernahen Region</b>  | 48 |
| <b>3.1.3.1. Entwicklung der subcenM-FISH Sonden Sets</b>   | 48 |
| 3.1.3.1.1. Die Auswahl der Sonden  | 48 |
| 3.1.3.1.2. Erstellung von 5-Farben-Sonden Sets zur Untersuchung zentromernaher Veränderungen                             | 48 |
| 3.1.3.1.3. Erstellung eines Sonden Sets zur gleichzeitigen Untersuchungen der perizentrischen Regionen aller Chromosomen | 49 |
| <b>3.1.3.2. Sonden Sets zur Untersuchung von Veränderungen der perizentrischen Region des Chromosoms 9</b>               | 50 |
| <b>3.2. Untersuchung perizentrischer Chromosomenveränderungen- FALLBEISPIELE</b>   | 53 |
| <b>3.2.1. Einzelanwendungen der entwickelten Verfahren</b>   | 53 |
| <b>3.2.1.1. Untersuchung der Patientenproben mit YAC/BAC-MCB 22</b>  | 53 |
| <b>3.2.1.2. Untersuchungen von Heteromorphismen des Chromosoms 9</b>   | 55 |
| 3.2.1.2.1. Auswahl des Untersuchungskollektivs   | 55 |
| 3.2.1.2.2. Durchführung der Untersuchungen von auffälligen Varianten des Chromosoms 9                                    | 55 |
| 3.2.1.2.3. Untersuchungsergebnisse   | 55 |

|  |   |    |
|--|---|----|
| <b>3.2.2.</b>  | <b>Kombinierte Anwendung der verschiedenen Verfahren</b>  | 57 |
| <b>3.2.2.1.</b>  | <b>Untersuchungen von Derivatvchromosomen mit Veränderungen im zentromernahen Bereich</b>   | 57 |
| 3.2.2.1.1.   | Gesamtüberblick der untersuchten Fälle  | 57 |
| 3.2.2.1.2.   | Fallbeispiele von Derivatvchromosomen mit Veränderungen im perizentrischen Bereich  | 58 |
| <b>3.2.2.2.</b>  | <b>Fälle mit auffälligen p-Armen der akrozentrischen Chromosomen</b>  | 60 |
| <b>3.2.2.3.</b>  | <b>Untersuchungen zur Herkunft und Zusammensetzung von Markerchromosomen</b>  | 62 |
| 3.2.2.3.1  | Untersuchung von großen Markerchromosomen mittels Mikrosezierung und MCB Analysen   | 62 |
| 3.2.2.3.2.   | Untersuchungen zur Herkunft und Zusammensetzung von kleinen Markerchromosomen (SMCs) mittels Zentromer- und zentromernaher Sonden | 64 |
| <b>3.2.2.4.</b>  | <b>Anwendung zusätzlicher Verfahren zur Analyse der Struktur und Zusammensetzung von Markerchromosomen</b>                        | 66 |
| 3.2.2.4.1.   | Untersuchungen der Telomerregion von Marker- und Ringchromosomen  | 66 |
| 3.2.2.4.2.   | Untersuchungen mit Lokus-spezifischen Sonden zur Bruchpunktbestimmung von Fällen mit Markerchromosomen vom Chromosom 12           | 69 |
| <b>IV. Diskussion</b>  |   | 71 |
| <b>4.1. Verfahren zur Analyse der perizentrischen Region im menschlichen Genom</b>                       |   | 71 |
| <b>4.1.1. Die Vielfarben-Bänderungstechniken</b>   |   | 71 |
| 4.1.1.1.   | Das Mikrosezierungs-basierende MCB für das menschliche Genom  | 71 |
| 4.1.1.2.   | Grenzen dieser MCB Technik  | 71 |
| 4.1.1.3.   | Entwicklung von YAC-, BAC-basierenden MCB Sonden-Sets   | 72 |
| 4.1.1.4.   | Vergleich der Vielfarb-Bänderungstechniken  | 73 |
| <b>4.1.2. Methoden zur Bestimmung von Veränderungen der Zentromerregion und angrenzender Bereiche</b>    |   | 74 |
| <b>4.1.2.1. Die Technik des cenM-FISH</b>  |   | 74 |
| 4.1.2.1.1.   | Das Problem der Sequenzhomologien der einzelnen Zentromerbereiche   | 74 |
| 4.1.2.1.2.   | Möglichkeiten und Grenzen des cenM-FISH   | 75 |
| <b>4.1.2.2. Das acro-cenM-FISH Sonden Set</b>  |   | 75 |
| <b>4.1.2.3. Das Verfahren des subcenM-FISH</b>   |   | 76 |
| 4.1.2.3.1.   | Möglichkeiten und Grenzen der Methode des subcenM-FISH – Das Problem der zentromernahen Homologien                                | 76 |
| <b>4.1.2.4. Methoden zur Untersuchung von Veränderungen im Chromosom 9</b>                               |   | 77 |
| 4.1.2.4.1.   | Grenzen der eingesetzten Sondenkombinationen für Chromosom 9  | 78 |
| <b>4.2. Charakterisierung von Veränderungen der zentromernahen Regionen der menschlichen Chromosomen</b> |   | 79 |
| <b>4.2.1. Untersuchung von Veränderungen der perizentrischen Region des Chromosoms 9</b>                 |   | 79 |
| 4.2.1.1.   | Charakterisierung von Veränderungen mittels der einzelnen Sondenkombinationen für das Chromosom 9                                 | 79 |
| 4.2.1.2.   | Besonderheiten der verwendeten Sonden   | 79 |
| 4.2.1.3.   | Mögliche Zusammenhänge zwischen den detektierten Veränderungen von Chromosom 9 und Fertilitätstörungen                            | 80 |

|               |   |       |
|---------------|---|-------|
| <b>4.2.2.</b> | <b>Charakterisierung von weiteren Derivatvchromosomen mit Veränderungen im zentromernahen Bereich</b> | 81    |
| 4.2.2.1.      | Perizentrische Inversionen und Duplikationen  | 81    |
| 4.2.2.2.      | Charakterisierung von Auffälligkeiten der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen                 | 82    |
| <b>4.2.3.</b> | <b>Identifizierung und Charakterisierung von Markerchromosomen</b>                                    | 83    |
| 4.2.3.1.      | Markerchromosomen   | 83    |
| 4.2.3.2.      | Identifizierung von satellitischen Markerchromosomen  | 83    |
| 4.2.3.3.      | Bestimmung der Herkunft und Zusammensetzung von nicht satellitischen Markerchromosomen                | 84    |
| 4.2.3.4.      | Nachweis euchromatischer Anteile mit Hilfe des subcenM-FISH   | 84    |
| 4.2.3.5.      | Bewertung der Ergebnisse der Untersuchungen   | 86    |
| 4.2.3.5.1.    | Charakterisierung von überzähligen kleinen Markerchromosomen  | 86    |
| 4.2.3.5.2.    | Einschätzung der Relevanz von Markerchromosomen   | 86    |
| 4.2.3.6.      | Untersuchungen zur Struktur und Stabilität von Ringchromosomen  | 87    |
| 4.2.3.6.1.    | Überzählige Ringchromosomen   | 87    |
| 4.2.3.6.2.    | Ergebnisse der Charakterisierung von Ringchromosomen  | 87    |
| 4.2.3.7.      | Entstehung von kleinen SMCs und UPD   | 88    |
| 4.2.3.7.1.    | Die uniparentale Disomie (UPD)  | 88    |
| 4.2.3.7.2.    | Entstehungsweise von Markerchromosomen  | 89    |
| 4.2.3.8.      | Nachweis uniparentaler Disomien in Fällen mit SMC   | 89    |
| 4.2.3.9.      | Neozentromerische Markerchromosomen   | 90    |
| <b>4.3.</b>   | <b>Resumé und Ausblick</b>  | 91    |
| <b>V.</b>     | <b>Zusammenfassung</b>  | 93    |
| <b>VI.</b>    | <b>Literaturverzeichnis</b>   | i     |
| <b>VII.</b>   | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>  | xvi   |
| <b>VIII.</b>  | <b>Anhang</b>   | xviii |
| <b>IX.</b>    | <b>Lebenslauf</b>   | xli   |
| <b>X.</b>     | <b>Publikationsliste</b>  | xlii  |
| <b>XI.</b>    | <b>Danksagung</b>   | lii   |
| <b>XII.</b>   | <b>Selbständigkeitserklärung</b>  | lv    |

## I. Einleitung

Bisher wurde die zentromernahere oder auch „perizentrische“ Region der menschlichen Chromosomen bei der Untersuchung des Genoms wenig beachtet.

Die Bezeichnung „perizentrische Region“ wird in der Literatur sehr uneinheitlich verwendet. Horvath *et al.* bezeichneten 2001 als **perizentrische Region** die Region, die sich in der „Transitionszone“ zwischen genetisch aktiver (genischer) Region und der heterochromatischen Satellitenregion innerhalb einer signifikanten Distanz von Zentromer und Telomer befindet. Diese Region ist charakterisiert durch relative Genarmut und komplexe Organisation. Sie scheint eine prädisponierte Region für chromosomale Umbauten zu sein (z.B. Horvath *et al.*; 2001, Eichler *et al.*; 1996 und 1997, Jackson *et al.*; 1999).

Mit der Entdeckung der Chromosomen im Lichtmikroskop und damit der Begründung der Zytogenetik des Menschen im Jahre 1879 (Arnold, 1879) und der später gewonnenen Erkenntnis, dass der normale menschliche Karyotyp 46 Chromosomen zeigt (Tijio und Levan, 1956), konnten schon erste Abweichungen vom normalen Karyotyp in Form von überzähligen Chromosomen beobachtet werden. Bereits 1973 (Craig-Holmes *et al.*, 1973) wurden mittels C-Bänderung Studien zu Veränderungen in der perizentrischen Region der Chromosomen durchgeführt, bei denen eine Häufung von Veränderungen vor allem in den heterochromatischen Regionen der Chromosomen 1, 9, 16 und des Y-Chromosoms beobachtet wurde. Die klinische Bedeutung dieser Variationen war jedoch noch weitgehend unklar.

Mit Einführung einer DNA-basierenden Färbemethode, der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) beim Menschen (Pinkel *et al.*, 1986) wurde es möglich, auch Aberrationen sehr kleiner Bereiche im Genom bis hin zu Veränderungen einzelner Gen-Regionen zu charakterisieren. Aber auch die heute zur Verfügung stehenden, hochentwickelten Vielfarben-FISH-Techniken sind zur exakten Analyse von Bereichen kleiner als einige Megabasen nicht geeignet. Insbesondere, wenn die Bestimmung der Herkunft sehr kleiner zusätzlicher Chromosomen, sogenannter Markerchromosomen, notwendig ist, sind den vorhandenen Techniken Grenzen gesetzt.

Zur exakten Charakterisierung der perizentrischen Region auf zytogenetischer und molekular-zytogenetischer Ebene stehen somit bisher (bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit) noch keine geeigneten Verfahren zur Verfügung.

Neuere Erkenntnisse belegen jedoch, dass die heterochromatischen Regionen aufgrund einer durch Aberrationen veränderten Lage zum Euchromatin auch Einfluss auf die Transkription dieser angrenzenden Gen-reichen Regionen haben können (Milot *et al.*, 1996, Karpen und Allshire, 1997, Le Baccon *et al.*, 2001) und dass sie in diesen Bereichen die Transkription z.B. von Tumorsuppressor-Genen hemmen (Bailey *et al.*, 2001, Horvath *et al.*, 2001) können. Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass bei der Karyotypisierung verschiedener Tumoren auch häufig Veränderungen der Heterochromatin-Regionen (Liehr *et al.*, 1997, Le Baccon *et al.*, 2001) beschrieben worden. Weitere Erkrankungen, die vorwiegend Veränderungen im heterochromatischen Bereich aufweisen, sind zum Beispiel das ICF-Syndrom (Sawyer *et al.*, 1995) und das Robert's Syndrom (Barbosa *et al.*, 2000).

Die genannten Fakten sprechen dafür, dass die bisher als weitgehend funktionslos geltenden, heterochromatischen und *repeat*-reichen Regionen (die ca. 15% des menschlichen Genoms (z.B. Spinelli 2003)) sowohl direkt als auch indirekt für die Funktion des Genoms und bei der Entstehung von Erkrankungen von größerer Bedeutung sein könnten als bislang angenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde den perizentrischen Regionen der menschlichen Chromosomen daher besondere Beachtung geschenkt. Es war das Ziel, Veränderungen im zentromernaheren Bereich gezielt untersuchen zu können und dafür geeignete, neue Untersuchungsmethoden zu entwickeln. Es wurden mit den neu entwickelten Verfahren Veränderungen analysiert, die das Zentromer und die angrenzenden heterochromatischen Regionen sowie die erste euchromatische GTG-Bande betreffen, die sich distal ans Heterochromatin bzw. an das Zentromer anschließt. Dabei wurde sowohl auf Veränderungen in den heterochromatischen Regionen der Chromosomen, in den kurzen Armen der



---

akrozentrischen Chromosomen als auch auf strukturelle Umbauten kleinerer Bereiche um das Zentromer eingegangen. Besonderes Augenmerk galt der Bestimmung der Herkunft und Zusammensetzung kleiner überzähliger Markerchromosomen, die meist aus dem Zentromerbereich und evtl. angrenzenden Regionen stammen.

## 1.1. Zytogenetik und molekulare Zytogenetik

### 1.1.1. Die Anfänge der konventionellen Zytogenetik

Als im Jahre 1879 (Arnold, 1879) erstmals menschliche Chromosomen im Lichtmikroskop dargestellt werden konnten und 1888 Waldeyer (Waldeyer, 1888) den Begriff des Chromosoms prägte, begann die eigentliche Entwicklung der Zytogenetik als Wissenschaft, die sich mit den menschlichen Chromosomen als Träger der Erbanlagen beschäftigt (Sutton, 1904, Boveri, 1904). Es war zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht möglich, Chromosomen reproduzierbar und qualitativ gut darzustellen. Es dauerte daher noch einige Zeit, ehe 1956 mittels einer hypotonen Behandlung und der damit verbundenen Spreitung der Chromosomen entdeckt wurde, dass der normale menschliche Karyotyp aus 46 Chromosomen besteht (Tijo und Levan, 1956).

Die ersten Chromosomenanomalien sind erstmals 1959 als Ursache für Erbkrankheiten wie die Trisomie 21 beim Down-Syndrom (Lejeune, 1959) und das Fehlen eines Geschlechtschromosoms beim Ullrich-Turner-Syndrom (Ford *et al.*, 1959) beschrieben worden. Zunächst konnten nur Abweichungen in der Anzahl der Chromosomen und überzählige, strukturell atypische (Marker)Chromosomen nachgewiesen werden (Ilbery *et al.*, 1961, Froland *et al.*, 1963). Überzählige, strukturell auffällige, sogenannte Ringchromosomen des Chromosoms 18, wurden im Jahre 1964 als Ursache von Fehlbildungen beim Menschen beschrieben (De Grouchy-Syndrom; De Grouchy *et al.*, 1964).

Zwar waren zu dieser Zeit schon Variationen im perizentrischen Heterochromatin-Bereich vor allem im Chromosom 1 bekannt (Chicago Conference, 1966), aber eine exakte Untersuchung der Zusammensetzung und der Veränderungen dieser Region und damit die Einschätzung der klinischen Auswirkungen war zum damaligen Zeitpunkt noch nicht möglich.

### 1.1.2. Die Bänderungszytogenetik

Die Einführung einer spezifischen Bänderung der Chromosomen, wie sie von Caspersson (Caspersson *et al.*, 1968, 1970, 1971) erstmals beschrieben wurde, ermöglichte es, Abweichungen in der Bandenabfolge aufgrund von chromosomalen Umbauten zu erkennen, die nicht zu zahlen- oder größenmäßigen Abweichungen führten. Dies war der Beginn der eigentlichen zytogenetischen Diagnostik von strukturellen Chromosomenveränderungen als Ursache von Erkrankungen des Menschen. Bis dahin konnten Chromosomen nur aufgrund ihrer Größe, des Zentromerindex und des Verhältnisses des kurzen zum langen Arm unterschieden und in ihrer Anzahl bestimmt werden.

Parallel entstanden mehrere Bänderungsverfahren, wie z.B. das sogenannte „Q-Banding“ (QFQ), das man durch eine Anfärbung vor allem der AT-reichen Regionen im Chromosom (Weisblum *et al.*, 1972, Ellison und Barr, 1972) mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Quinacrin (Caspersson *et al.*, 1968, 1970, 1971) erhält. Daneben wurde das bis heute noch routinemäßig angewendete GTG\*-oder „G-Banding“ entwickelt (Seabright, 1971), welches auf einer Behandlung der Chromosomen mit Trypsin und anschließender Färbung mit Giemsa-Lösung beruht. Diese Färbung führt zu einer Darstellung von alternierend hellen und dunklen DNA-Bereichen (Banden). Eine zu diesem Banden-Muster reverse Darstellung der Chromosomen stellt das „R-Banding“ (RHG) (Dutrillaux, 1971) dar, welches durch eine Salzsäuredenaturierung bei 87°C mit anschließender Giemsa-Färbung erzeugt wird.

Eine weitere, auch heute noch in der humangentischen Diagnostik eingesetzte, Färbemethode, ist das CBG- oder „C-Banding“ (Arrighi und Hsu, 1971, Sumner 1972), mit dem sich das konstitutive Heterochromatin im Zentromerbereich und in der perizentrischen Region darstellen lässt. Mittels dieser Bänderung lassen sich Varianten im Zentromerbereich und in der perizentrischen Region sowie die Struktur von Markerchromosomen charakterisieren. Eine spezifische Anfärbung der Satellitenstiele im kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21 und 22) erzielt man durch die NOR („nucleolus organizing region“)-Färbung (Howell *et al.*, 1975, Bloom und Goodpasture 1976). Diese Färbung ermöglicht es, Abweichungen in der Größe und Lage der Satellitenregion zu

erkennen. Oft handelt es sich dabei um sogenannte Normvarianten, die gehäuft in der Bevölkerung auftreten aber ohne klinische Folgen für den Träger sind (ISCN, 1995) (siehe nächstes Kapitel). In den folgenden 4 Unterkapiteln werden für die vorliegende Arbeit wichtige Begriffe der Zytogenetik eingeführt.

\*Die Festlegung der 3-buchstabigen Bezeichnung der einzelnen Bänderungsverfahren wurde 1971 auf der „Paris Konferenz“ getroffen.

#### **1.1.2.1. Heteromorphismen und Normvarianten**

Zur Charakterisierung von bestimmten chromosomalen Veränderungen der perizentrischen Region werden oft Begriffe wie Polymorphismen, Normvarianten oder Heteromorphismen verwendet. In der Regel charakterisiert man damit Veränderungen, die sogenannte heterochromatische Bereiche im Genom betreffen, welche im Gegensatz zu den euchromatischen Regionen relativ genarm sind und überwiegend repetitive DNA Sequenzen beinhalten. Hierbei ist die Bezeichnung Heteromorphismen wohl die Exakteste für mikroskopisch sichtbare Veränderungen, die zumeist stabil an die Nachkommen weitergegeben werden (Wyandt und Tonk, 2004). Die meisten der bisher bekannten Veränderungen, die ausschließlich die heterochromatischen Bereiche der Chromosomen betreffen, gelten heute als klinisch nicht relevant. Es ist jedoch zu bedenken, dass eine sehr genaue Charakterisierung der jeweiligen Veränderung notwendig ist, um eine derartige Aussage über den Krankheitswert treffen zu können. Zusätzliche Faktoren, wie das Vorliegen einer uniparentalen Disomie (UPD) (Kotzot *et al.*, 1999) (UPD; siehe 4.2.3.6.) oder bereits erwähnte Wechselwirkungen mit angrenzenden euchromatischen Regionen können dennoch für eine klinische Symptomatik verantwortlich sein.

#### **1.1.2.2. Markerchromosomen**

Als Markerchromosomen werden (meist kleine) mit Hilfe der Routinezytogenetik (GTG-Bänderung) in ihrer Herkunft nicht eindeutig identifizierbare Chromosomen oder Chromosomenfragmente bezeichnet (ISCN 1995). Um Aussagen zur phänotypischen Auswirkung eines Markers treffen zu können, ist es wichtig, dessen Herkunft und Zusammensetzung genau zu kennen. Darüber hinaus ist die Relevanz eines Markerchromosoms abhängig vom mengenmäßigen Anteil in den Zellen (Stärke eines evtl. vorliegenden Mosaiks), vom Gewebe in dem er vorkommt und von weiteren Faktoren, wie z.B. dem Vorliegen einer uniparentalen Disomie (UPD; siehe 4.2.3.6.).

#### **1.1.2.3. Ringchromosomen**

Ringchromosomen nehmen aufgrund ihres Verhaltens während der Zellteilung eine Sonderstellung unter den Markerchromosomen ein. Sie entstehen als Folge von Chromosomenbrüchen, wenn zwei Bruchereignisse im gleichen Chromosom stattfinden. Das entstandene Fragment zwischen den Bruchregionen, welches aufgrund der fehlenden Telomersequenzen instabil wäre, fusioniert an den Bruchstellen (Strachan und Read, 1996). Aufgrund dieser Entstehungsweise geht man davon aus, dass Ringe keine Telomere besitzen und ihre Stabilität gegenüber Abbauprozessen durch die Ringstruktur selbst gewährleistet ist. Man nimmt an, dass ein solcher Ring mindestens eine funktionelle Zentromerregion besitzen muss, um stabil in der Mitose weitergegeben zu werden.

#### **1.1.2.4. Derivatvchromosomen**

Als Derivatvchromosomen werden strukturell veränderte Chromosomen bezeichnet, die entweder aufgrund eines Rearrangements von zwei oder mehr Chromosomen oder durch multiple Veränderungen in einem Chromosom (Translokationen, Duplikationen, Deletionen oder Inversionen) entstanden sind (ISCN 1995). Geht man von dieser Definition aus, ist es abhängig vom Entstehungsmechanismus, ob ein kleines, überzähliges Chromosom als Derivatvchromosom oder als Markerchromosom bezeichnet werden kann.

In dieser Arbeit wurden als Derivatvchromosomen diejenigen veränderten Chromosomen bezeichnet, die aufgrund mehrerer rekombinativ wirksamer Ereignisse entstanden sind oder sich aus Material unterschiedlicher Chromosomen zusammensetzten. Außerdem wurden

Markerchromosomen, die größer als der kurze Arm des Chromosoms 17 waren, als Derivatvchromosomen definiert (Liehr *et al.*, 2004).

#### 1.1.2.5. Möglichkeiten und Grenzen der Bänderungstechniken

Mit Hilfe der oben genannten Bänderungstechniken (1.1.2.) ist es möglich, durch eine Schwarz-Weiß-Darstellung neben Verlusten oder Zugewinnen ganzer Chromosomen (Aneuploidien) und Vervielfachung des gesamten Chromosomensatzes (Polyploidien),

- a) die einzelnen Chromosomen untereinander zu unterscheiden,
- b) Änderungen in der Bandenabfolge und Bandengröße zu erkennen (Claussen *et al.*, 2002) (Deletionen, Duplikationen),
- c) Austausch zwischen einzelnen Chromosomen nachzuweisen (Translokationen) (wenn sie zur Änderung der Bänderung führen) und
- d) Veränderungen des Zentromerindexes der Chromosomen (z.B. durch Inversionen) zu beurteilen.

Jedoch sind die beschriebenen Bänderungen nicht geeignet, Veränderungen zu erkennen, die sich nicht auf die Bandenabfolge und/oder die Größe des Chromosoms und der einzelnen Chromosomenbereiche auswirken. Daneben ist es auch nahezu unmöglich, die chromosomale Herkunft kleiner Markerchromosomen zu bestimmen, die aufgrund ihrer geringen Größe keine Bänderung im eigentlichen Sinne aufweisen. Auch der Mechanismus nicht reziproker (unbalancierter) Translokationen und die exakte Bruchpunktbestimmung bei Deletionen, Duplikationen und Translokationen sind mittels konventioneller Bänderungsmethoden nicht erfassbar.

## 1.2. Die Molekulare Zytogenetik

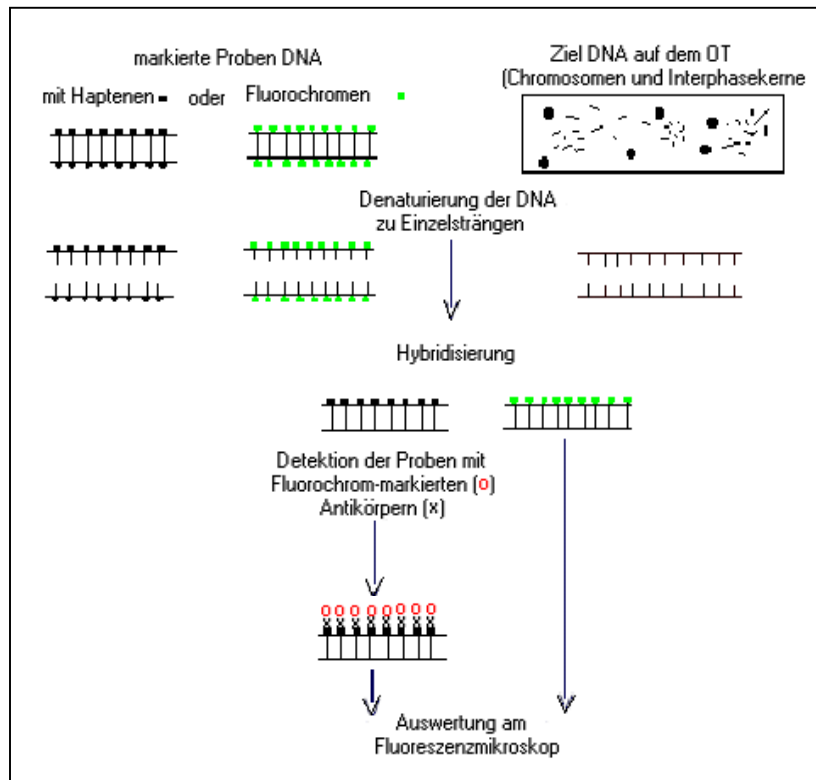
Zur Schließung dieser eben genannten „diagnostischen Lücke“ dient heute die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Mit dieser Technik ist es möglich, sowohl im Interphasekern als auch in der Metaphase einzelne Chromosomenabschnitte bis hin zu einzelnen Genen oder Gen-Abschnitten differenziert anzufärben.

### 1.2.1. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Im Jahre 1986 (Pinkel *et al.*, 1986) wurde die erste Anwendung der *in situ* Hybridisierung an menschlichen Chromosomen publiziert, bei der statt mit radioaktiver Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet wurde (Langer *et al.*, 1981). Dies war der Beginn einer rasanten Entwicklung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, der FISH Technik. Die ersten Zwei-Farb-FISH Experimente wurden bereits 1986 beschrieben (Hopman *et al.*, 1986). Durch die Entwicklung verschiedener Detektionssysteme konnte neben der erhöhten Schnelligkeit (das Ergebnis war bereits nach 2-3 Tagen zu erwarten) auch eine größere Variabilität der Methode durch die gleichzeitige Anwendung verschiedener Farbstoffe (für verschiedene chromosomale Regionen) erreicht werden. Die FISH Technik fand dadurch breitere Anwendung in der Diagnostik, wie zum Beispiel zur näheren Charakterisierung von in der Bänderungsanalyse auffälligen, durch Aberrationen entstandenen Chromosomen (z.B. Liehr *et al.*, 1992). Die ersten Dreifarben-FISH Analysen wurden 1989 durchgeführt (Nederlof *et al.*, 1989) und kamen zunächst in der Routinezytogenetik und später auch z.B. zum Nachweis strahleninduzierter Chromosomenbrüche zur Anwendung (Gebhart *et al.*, 1996).

#### Das Prinzip der FISH

Die FISH ist eine Methode, mit der es möglich ist, bestimmte DNA Bereiche in verschiedenen Zellen und Geweben darzustellen. Das erzeugte FISH-Signal wird direkt im biologischen Material (*in situ*), also in den jeweiligen DNA-Bereichen sichtbar. Das Prinzip der FISH (siehe Abb.1) beruht darauf, dass in die Sonden-DNA direkt Fluoreszenzfarbstoffe (direkte Markierung) oder Haptene eingebaut werden (indirekte Markierung), an die ein fluoreszenzmarkierter Antikörper gebunden werden kann.

**Abb. 1.1.:**

→Die auf einem Objektträger (OT) vorliegende unmarkierte Ziel-DNA (rechts) und die markierte Sonden-DNA (links) werden →denaturiert und anschließend hybridisiert. Es folgt dann eine →Inkubation bei 37°C: Es lagern sich die markierten einzelnen DNA-Stränge an die homologen Bereiche der ebenfalls einzelsträngigen Ziel-DNA an. →Bei der indirekten Methode (Markierung mit Haptenen) schließt sich ein Detektionsschritt zur Anlagerung der fluoreszenzmarkierten Antikörper an die integrierten Haptene an →Auswertung am Fluoreszenzmikroskop.

### 1.2.2. Die Ein-bis Dreifarb-FISH Methoden

Die in der FISH verwendeten Sonden können sowohl einzeln als auch in Kombination eingesetzt werden. Für ihren Einsatz in Zwei bis Dreifarb-FISH Analysen müssen mindestens zwei Fluorochrome zur Anwendung kommen. So wurden Chromosomenanalysen-Analysen zur Strahlen-Sensitivität mittels *painting*-Sonden durchgeführt, die mit je einem Fluorochrom und einer Kombination beider Farbstoffe markiert waren (Gebhart *et al.*, 1996).

Die erste Dreifarb-FISH Methode unter Verwendung von Zentromersonden wurde 1996 beschrieben (Yurov *et al.*, 1996). Daneben konnte eine weitere Sondenkombination zur Bestimmung des Geschlechts und zum Ausschluss einer Trisomie 18, bestehend aus den Zentromeren X, Y und 18, etabliert werden (Harper und Wells, 1999). Diese Kombination findet, ebenso wie die lokus-spezifischen Sonden zur Detektion der häufigsten Trisomien 13 und 21 (Eiben *et al.*, 1999), auch heute noch in der Pränataldiagnostik Anwendung.

Für die Ein- bis Dreifarb-FISH Methoden kommen vorwiegend folgende Sonden zu Einsatz:

#### Painting Sonden

Die *painting* Sonden färben ganze Chromosomen („*whole chromosome painting*(wcp)-Sonden) oder Chromosomenarme („*partial chromosome painting*(pcp)-Sonden) an. Mit ihnen ist es z.B. möglich, mittels GTG-Bänderung erkannte, Translokationen hinsichtlich der beteiligten Chromosomen zu verifizieren. Voraussetzung ist jedoch, dass die beteiligten Chromosomen bereits bekannt sind. Intrachromosomale Veränderungen lassen sich mit *wcps* nicht nachweisen. Verwendet man Arm-spezifische Sonden, ist es möglich, perizentrische Inversionen darzustellen. Aussagen zu Bruchpunktbereichen und zu den involvierten Regionen eines Chromosoms sind mit diesen Sonden nicht möglich.

#### Zentromersonden

Zur Markierung der DNA-Komponente der Zentromerregion der einzelnen Chromosomen dienen zumeist Alpha-Satelliten Sonden. Die Alpha-Satelliten DNA ist im Zentromerbereich aller primären menschlichen Chromosomen zu finden und stellt eine hoch repetitive DNA Fraktion dar. Diese Sonden sind weitgehend spezifisch für das Zentromer eines Chromosoms.

### Lokus-spezifische Sonden

Lokus-spezifische Sonden sind für verschiedene Genorte kommerziell erhältlich. Es gibt zahlreiche Sonden für Mikrodeletionssyndrome und Sonden für chromosomale Regionen, die Onkogene beinhalten. Daneben ist es möglich, für Forschungszwecke auch von verschiedenen Ressourcententren BAC-, YAC-, oder Cosmid-Sonden von nahezu jeder Region im menschlichen Genom zu bestellen.

### Weitere etablierte FISH Verfahren

Die Methode der Glasnadel-basierenden **Mikrosezierung** wurde erstmals 1981 beschrieben (Scalenghe *et al.*, 1981). Weitere Mikrosezierungs-Experimente, zunächst an Maus-Chromosomen (z.B. Röhme *et al.*, 1984, Fox *et al.*, 1985, Edström *et al.*, 1987) und schließlich an menschlichen Chromosomen, (Bates *et al.*, 1986, Kaiser *et al.*, 1987, Martinson *et al.*, 1989) folgten.

Die Identität und Spezifität der gewonnenen DNA Bank wird durch Hybridisierung auf normale menschliche Metaphaseplatten („*reverse painting*“; Carter *et al.*, 1992) bestimmt. Mit dieser Technik ist es möglich, sowohl die Herkunft von Markerchromosomen zu bestimmen (Senger *et al.*, 1990, Rubtsov *et al.*, 1996) als auch die Zusammensetzung von Translokationschromosomen und deren Bruchpunkte aufzuklären. Eine weitere Anwendung der Mikrosezierung ist die Gewinnung von DNA-Banken von Chromosomen oder chromosomalen Teilbereichen, die als DNA-Sonden Anwendung finden können (z.B. Lüdecke *et al.*, 1990), wie dies bei den unter 1.2.5. und 1.2.6. beschriebenen M-FISH- und MCB-Sonden Sets der Fall ist.

Allerdings ist die Methode der Mikrosezierung zeit- und kostenaufwendiger als die meisten FISH Verfahren und wird daher nur in wenigen Laboren routinemäßig zur Diagnostik angewendet.

Die Methode der **Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)** wurde im Jahre 1992 erstmals von Kallioniemi *et al.* beschrieben. Anders als bei den sonst gebräuchlichen FISH Techniken wird hier die Patienten-DNA als gesamtgenomische DNA aus Gewebenschnitten oder Zellsuspension gewonnen, amplifiziert (Speicher *et al.*, 1993) und markiert (du Manior *et al.*, 1993, Larramendy *et al.*, 1998).

Mit dieser Technik können so unbalancierte Veränderungen ab einer Größe von ca. 10Mb (Kallioniemi *et al.*, 1994, Huang *et al.*, 2000, Tönnies *et al.*, 2001) und größere überzählige Markerchromosomen nachgewiesen werden. Jedoch entgehen Chromosomenaberrationen, bei denen es zu keinen Imbalancen im Genom kommt, ebenso wie Verluste oder Zugewinne kleinerer (weniger als 10Mb) Bereiche dieser Untersuchung. Mit dieser Methode kann zudem keine sichere Analyse von zentromernahen Bereichen, den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen und den Telomerbereichen erfolgen, da es hier oft zu einer ungleichmäßigen Anfärbung und damit zu unspezifischen Verläufen der Fluoreszenzprofile kommt.

### **1.2.3. Die Multicolor-FISH-Verfahren**

Bereits 1989 wurde von der Arbeitsgruppe um Nederlof (Nederlof *et al.*, 1989) die erste FISH Methode beschrieben, bei der mit drei Fluorochromem gleichzeitig gearbeitet wurde. Eine Erweiterung des erzielten Farbspektrums bis auf 7 bzw. 12 Farben wurde in weiteren Entwicklungen angestrebt (Ried *et al.*, 1992, Dauwese *et al.*, 1992). Schließlich konnten im Jahre 1996 erstmals von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen zwei Verfahren beschrieben werden, die es möglich machten, mit einer Hybridisierung alle 24 menschlichen Chromosomen verschiedenfarbig darzustellen.

Der Unterschied beider Verfahren liegt lediglich darin, wie die jeweiligen Farbstoffe der Chromosomen aufgenommen und mittels Software verrechnet werden. Bei beiden Verfahren wird jedem Chromosom zur besseren Unterscheidung per Computersoftware eine sogenannte Pseudofarbe zugeordnet. Bei der Arbeitsgruppe um Schröck (Schröck *et al.*, 1996) handelte es sich um die sogenannte SKY-Technik („*spectral karyotyping*“), die zur Aufnahme der fünf Farbstoffe ein Interferometer verwendet. Die zweite 24-Farben-Technik, das M-FISH („*Multiplex-FISH*“), verwendet verschiedene Fluoreszenzfilter, die auf die

Wellenlängen der eingesetzten Fluorochrome abgestimmt sind (Speicher *et al.*, 1996). Weitere Arbeiten erschienen 1998 zum *multicolor-FISH* (Senger *et al.*, 1998, Tanke *et al.*, 1998) und zum *24-color-FISH* (Azoifeifa *et al.*, 2000).

Mit Hilfe dieser 24-Farb-Techniken ist es möglich, ab einer Größe von 10 Mb Verluste oder Zugewinne von chromosomalen Regionen und Stückaustausche zwischen allen nicht homologen Chromosomen in einer Hybridisierung darzustellen. Auch hochkomplexe interchromosomale Umbauen sind so in einem Experiment zu erfassen. Ist jedoch eine exakte Charakterisierung der Bruchpunktregionen auf Subbandenniveau oder eine Erkennung von Umbauten innerhalb der einzelnen Chromosomen (intrachromosomal), wie Inversionen, Duplikationen oder Deletionen kleinerer Bereiche nötig, stößt man auch mit diesen Techniken an Grenzen, da hier als Proben Ganzchromosomen-Sonden eingesetzt werden.

#### 1.2.4. FISH-Bänderungsverfahren

Bei den FISH-Bänderungsverfahren sind als Beispiele der „*chromosome bar code*“ (Müller *et al.*, 1997) und das sogenannte Rx-FISH (*cross species color banding*, Müller *et al.*, 1998) zu nennen. Beim Rx-FISH werden als Sonden Ganzchromosomensonden vom Gibbon zur Hybridisierung auf menschliche Chromosomen verwendet. Durch die evolutionär bedingten Abweichungen im Karyotyp zwischen Mensch und Gibbon kommt es zur Anfärbung von Teilbereichen auf den homologen menschlichen Chromosomen, so dass letztendlich eine „Bänderung“ der Chromosomen entsteht. Allerdings werden hier nur 3 Fluorochrome eingesetzt, und es können deshalb nur ca. 80 Teilbereiche unterschieden werden.

Um weitere Veränderungen zu erfassen, die noch kleinere DNA-Bereiche betreffen, entstand schon 1992 die Idee, eine hoch auflösende Bänderung der Chromosomen zu entwickeln. Zunächst wurde dies durch Abdeckung der Chromosomen mittels YAC Proben (yeast artificial chromosome) versucht. So wurden beim „*Chromosomal bar code*“ (Lengauer *et al.*, 1992 und 1993) die Sonden mit verschiedenen Fluorochromen markiert und zeigten nach gleichzeitiger Hybridisierung eine verschiedenfarbige Bänderung über das Chromosom verteilt. Ein Defizit der Methode ist die nur lückenhafte Abdeckung der Chromosomen, die eine Analyse aller Regionen unmöglich macht.

Vollständige Abdeckung, hohe Auflösung und Reproduzierbarkeit wurde durch die Entwicklung des *Multicolor banding* (MCB) gewährleistet, das zur Charakterisierung von Veränderungen am Chromosom 5 erstmals zur Anwendung kam (Chudoba *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass mit dieser Technik für das Chromosom 5 ein hoch auflösendes, reproduzierbares Bandenmuster erzielt werden kann, das weitgehend unabhängig vom Kondensierungsgrad der Chromosomen ist und der konventionellen GTG-Bänderung in der Bandenzahl gleichkommt oder sie noch übertrifft. Jedoch zeigt auch dieses Verfahren in der perizentrischen Region eine noch unzureichende Auflösung.

### 1.3. Das Zentromer menschlicher Chromosomen

#### 1.3.1. Aufbau und Funktion des Zentromers

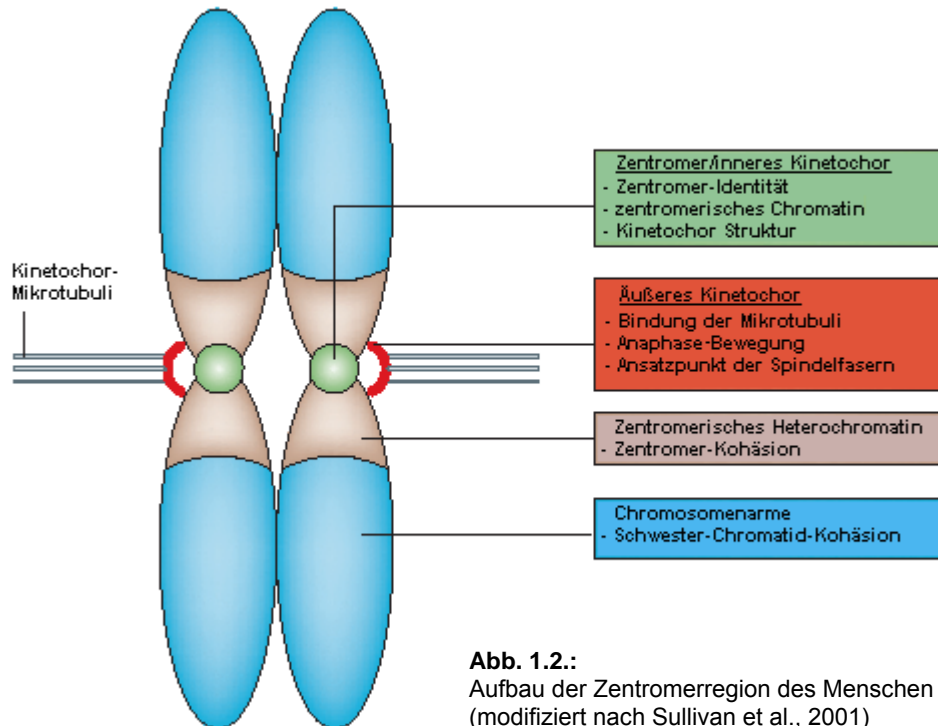
Das Zentromer der menschlichen Chromosomen ist lichtmikroskopisch als Einschnürung sichtbar (Pschyrembel, 1996) und wurde erstmals von Walter Flemming im Jahre 1880 als solche („primäre Einschnürung“) beschrieben (Flemming, 1880).

Schon seit 1900 war bekannt, dass Zentromere eine entscheidende Rolle bei der Vererbung spielen und nicht der meiotischen Rekombination unterliegen. Zunächst nahm man an, dass die Zentromere eine festgelegte DNA-Sequenz besitzen, über die sich ihre Funktion definiert. Inzwischen ist erwiesen, dass die Entscheidung, wo sich das Zentromer ausbildet, nicht nur von der DNA-Sequenz bestimmt wird (Sullivan *et al.*, 2001).

Hier spielen vor allem auch epigenetische, also von der Sequenz unabhängige, Faktoren eine Rolle (z.B. Cleveland *et al.*, 2003). Diese Theorie wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass sowohl die Struktur des Kinetochors als auch die der Zentromerproteine in

der Evolution einen stark konservierten Bereich darstellt, nicht jedoch die DNA-Struktur des Zentromers.

In den Zentromeren sind große Mengen sogenannter repetitiver AT-reicher DNA enthalten. In diesem Bereich sind Monomere, die aus ca. 171bp bestehen, mehrere 100 bis 1000 mal tandemartig angeordnet (= Alpha-Satelliten DNA) (Rosenberg *et al.*, 1978).



Das Zentromer stellt den Bereich dar, in dem die Chromosomentrennung während der Zellteilung ansetzt. Der schematische Aufbau eines menschlichen Zentromers und die Lokalisation der funktionalen Komponenten ist in Abb. 1.2. dargestellt. Normalerweise besitzt jedes menschliche Chromosom ein Zentromer. Im Zuge von chromosomalen Umbauten können jedoch auch di- und multizentrische Chromosomen entstehen. Meist ist von diesen jedoch nur eines funktionell aktiv (Sullivan und Willard, 1998). Das heißt, die Zentromer-Proteine, die für die Ausbildung des Spindelapparates wichtig sind, sind bei multizentrischen Chromosomen nur in einem Zentromer lokalisiert. Dadurch kann sich auch nur in diesem eine Spindel ausbilden und das Chromosom kann stabil in der Mitose weitergegeben werden. Sind dagegen mehrere Zentromere auf einem Chromosom aktiv, wird das betreffende Chromosom bei der Zellteilung getrennt. Man findet in solchen Fällen oft in einigen Zellen Fragmente des ursprünglichen multizentrischen Chromosoms.

Es ist bekannt, dass es breite Variationen in der Größe des Zentromerbereiches durch Amplifikation oder Deletion von Zentromer-DNA (meist der Alpha-Satelliten DNA) gibt, die jedoch nicht zu klinischen Konsequenzen führen. Im Extremfall ist die Zentromerregion nicht mit FISH Sonden nachweisbar oder um ein Vielfaches vermehrt vorhanden (z.B. Liehr *et al.*, 2003).

Ein Chromosom oder Chromosomenfragment, das kein funktionsfähiges Zentromer hat, geht in der Regel im Zuge der Zellteilungsvorgänge aufgrund des fehlenden Ansatzpunktes der Spindelfasern nach und nach verloren (Wandall *et al.*, 1998). Aber auch stabile Chromosomen bzw. Chromosomenfragmente (Markerchromosomen; siehe 1.1.2.3.) ohne primäre Zentromere sind bekannt. Diese bilden meist ein funktionelles, sekundäres Zentromer, ein sogenanntes Neozentromer aus (Depinet *et al.*, 1997). Zum Teil kommt es auch durch chromosomale Umbauten aufgrund von Aberrationen und innerhalb der menschlichen Karyotypevolution zur Inaktivierung von (primären) Zentromeren und/oder zur



Ausbildung von Neozentromeren. Bisher sind ca. 60 Fälle mit neozentrischen Marker- oder Derivatvchromosomen beschrieben (Amor und Choo, 2002).

Eine Unterscheidung von aktiven und inaktiven Zentromeren ist mittels (fluoreszenz-) markierter Antikörper möglich, die gegen im Zentromer vorhandene Proteine gerichtet sind. Als spezifisch für funktionell aktive Zentromere bzw. Neozentromere wird eine Färbung mit den Proteinen CENP-C, CENP-A und CENP-E angesehen (Sullivan und Schwarz, 1995, Warburton *et al.*, 1997).

## 1.4. Die Zentromer-angrenzenden Regionen

### 1.4.1. Die Satelliten-DNA und Heterochromatin-Bereiche

Neben der hoch repetitiven Alpha-Satelliten DNA im Zentromerbereich aller primären menschlichen Chromosomen gibt es die sogenannte Beta-Satelliten DNA, die u.a. in den kurzen Armen aller akrozentrischen Chromosomen zu finden ist.

Die klassische Satelliten-DNA wird je nach ihrer Zusammensetzung in die Unter-Klassen I, II und III unterteilt. Diese setzen sich aus einer unterschiedlichen Mischung von *repeat*-Sequenzen zusammen. Von diesen unterscheiden sich die Satelliten DNA 1, 2 und 3 aufgrund ihrer enthaltenen Sequenzen (Prosser *et al.*, 1986).

In der perizentrischen Region der Chromosomen 3 und 4 und auf den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen ist Satellit 1 DNA zu finden (Wyandt und Tonk, 2004). Satellit 2 DNA ist hauptsächlich auf den Chromosomen 1 und 16 im Bereich des Heterochromatinblockes und in der perizentrischen Region der Chromosomen 2 und 10 lokalisiert. Sie enthält Wiederholungen der Sequenz ATTCCATTTCG. Satellit 3 DNA ist in den Heterochromatinblöcken der Chromosomen Y, 1, 9 und 16 anzutreffen und ist vorwiegend aus Wiederholungen der Sequenz ATTCC zusammengesetzt. Diese Satelliten DNA färbt sich in der DAPI-Färbung sehr stark an und kann auch mittels C-Bänderung gezielt dargestellt werden. Man geht davon aus, dass die heterochromatischen Bereiche der Chromosomen 1, 9 und 16 eine in sich unterschiedliche Zusammensetzung bezüglich der Satelliten DNA aufweisen (Tagarro *et al.*, 1994). Mittels FISH lassen sich diese Regionen daher auch getrennt voneinander darstellen.

Ansammlungen *repeat*-reicher Sequenzen haben sich im Verlauf der Evolution vor allem in von der Spezialisierung betroffenen Regionen akkumuliert und gelten als Vorstufen der menschlichen Karyotypevolution. In diesen Regionen treten überdurchschnittlich oft Bruchereignisse gefolgt von chromosomalen Umbauten auf. Da diese aufgrund der schon genannten Genarmut dieser Regionen meist nicht zu Konsequenzen für den Träger führen, sind sie von der Selektion nicht direkt betroffen und werden unverändert an die Nachkommen weitergegeben (Wyandt und Tonk, 2004).

### 1.4.2. Die perizentrische Region

Untersuchungen der perizentrischen Regionen des Menschen haben gezeigt, dass sich diese Bereiche häufig aus (innerhalb des jeweiligen Chromosoms) duplizierten Bereichen zusammensetzen (Horvath *et al.*, 2001, Eichler *et al.*, 1996, Jackson *et al.*, 1999), die aber ihren Ursprung auch in anderen menschlichen Chromosomen haben können (z.B. Eichler *et al.*, 1997). Oft sind hier auch Inversionen in Verbindung mit Anhäufung von Duplikationen nachgewiesen (z.B. Tunnacliffe *et al.*, 1993), so dass diese Region als palindromische Struktur vorliegt. Größere duplizierte Bereiche wurden auch in der zentromernahen Region der Chromosomen 1, 2 und 9 nachgewiesen (Tunnacliffe *et al.*, 1993, Hardas *et al.*, 1994, Edwards *et al.*, 1995, Maresco *et al.*, 1996, Nothwang *et al.*, 1998). Neben den perizentrischen Regionen der genannten Chromosomen gibt es weitere Untersuchungen der zentromernahen Region im X-Chromosom (Eichler *et al.*, 1996 und 1997) und im Chromosom 16 (Eichler *et al.*, 1996, Horvath *et al.*, 2000). Auch verschiedene akrozentrische Chromosomen, wie Chromosom 21 und 22, zeigen ebenfalls eine große Anzahl sowohl inter-

als auch intrachromosomal duplizierter Bereiche (Dunham *et al.*, 1999, Hattori *et al.*, 2000, Bailey *et al.*, 2002, Bridgland *et al.*, 2003).

So scheint die perizentromerische Region prädisponiert für chromosomale Umbauten, wie den Einbau von Duplikons, zu sein. Aber nicht nur die häufig beobachteten Duplikationen und Inversionen sondern auch Transpositionen und Deletionen dieser Bereiche wurden für verschiedene Chromosomen beschrieben (z.B. Eichler *et al.*, 1996 und 1997, Jackson *et al.*, 1999).

### **1.5. Zielstellung der Arbeit**

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die zentromernahe Region in menschlichen Chromosomen und Veränderungen dieser Region molekular-zytogenetischen Analysen zugänglich zu machen und zu untersuchen.

Da die vorhandenen Verfahren gerade in der zentromernahen, euchromatischen Region nicht ausreichend informativ waren, wurde es zunächst notwendig, neue Techniken und /oder Sondenkombinationen zu entwickeln, mit denen es gelang, diese Region genauer zu analysieren.

Mit den entwickelten Methoden sollten Veränderungen untersucht werden, die das Zentromer und die angrenzenden heterochromatischen Regionen sowie die erste euchromatische (GTG-) Bande betreffen, die sich distal ans Heterochromatin bzw. an das Zentromer anschließt. Hierbei war das Ziel der Untersuchungen, sowohl bislang als Normvarianten geltende Veränderungen näher zu charakterisieren, als auch Veränderungen dieses perizentrischen Bereiches, die zu klinischen Auffälligkeiten führen. Dabei galt besonderes Augenmerk den verschiedenen Markerchromosomen, Vergrößerungen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen, perizentrischen Inversionen, sowie Duplikationen und Deletionen des perizentromerischen Bereichs.

#### **Fragestellungen:**

→ Ist es möglich, Veränderungen der perizentrischen Region des menschlichen Genoms auf molekular-zytogenetischer Ebene umfassend zu charakterisieren?

→ Sind die Mechanismen, die zur Bildung von Zentromerpolymorphismen, perizentrischen Inversionen und kleinen Markerchromosomen führen, DNA-Sequenz-basierend?

→ Ist eine exakte Bruchpunktbestimmung und damit eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation für kleine Marker möglich?

→ Treten Veränderungen der perizentrischen Regionen auch in der Normalbevölkerung auf?

→ Gibt es eine Korrelation zwischen der Zusammensetzung eines Markerchromosoms und der klinischen Symptomatik bzw. gibt es Marker, die euchromatische Regionen enthalten und dennoch nicht zu Auffälligkeiten bei ihrem Träger führen?

## II. Material und Methoden

### 2.1. Das Untersuchungsmaterial und dessen Aufarbeitung

Als Untersuchungsmaterial für die durchgeführten Analysen dienten sowohl Lymphozyten aus peripherem Blut oder Nabelschnurblut, Amniozyten aus Fruchtwasserpunktaten, Trophoblasten aus Chorionzottenbiopsie als auch Zellen aus Knochenmarkbiopsaten, die im Rahmen der molekular-zytogenetischen Diagnostik eingesandt wurden. Die Proben standen in Form von Frischmaterial oder als bereits aufgearbeitete Zellsuspension, bzw. Objektträger (OT) mit Metaphaseplatten (MPP) zur Verfügung. Des Weiteren wurden für einige Untersuchungen menschliche Zelllinien verwendet.

#### 2.1.1. Kultivierung von Lymphozyten aus Blutproben

##### Verwendete Lösungen

###### A. dest.

\* für alle Lösungen (außer Lösungen für die PCR) wurde entionisiertes, organisch reines und partikelfreies Reinstwasser mit Seralpur DELTA (Seral<sup>®</sup>) verwendet, das vor Gebrauch autoklaviert wurde.

###### Wachstumsmedium

RPMI 1640 mit Glutamax-Zusatz

Enthält: L-Alanin und L-Glutamin (GibcoBRL), fetales Kälberserum (Biochrom KG) 12 %, Penicillin (1000 U/ml) und Streptomycin (1000 U/ml; Biochrom KG) 1 %.

###### Phytohämagglutinin (PHA)

Lyophilisiertes PHA (Seromed<sup>®</sup>) wurde in 5 ml A. dest. (Ampuva<sup>®</sup>, Fresenius) gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

###### KCl-Lösung

Von KCl (Merck) mit A. dest. Herstellung einer 0,56 %igen Lösung

###### Colcemid-Lösung

Stammlösung (Seromed<sup>®</sup>) mit einer Konzentration von 10 µg/ml

###### Fixativ

Gemisch aus 3 Teilen Methanol (Merck) und einem Teil Eisessig (Merck<sup>®</sup>)

###### Aufsteigende Ethanol-Reihe :

Der absolute Ethanol wurde mit A. dest. auf 70 % und 95 % verdünnt.

##### Zellkultivierung

Die Zellen der eingesandten Proben wurden nach Standardprotokoll (Verma und Babu 1994), abhängig vom Zelltyp, in Kulturmedium stimuliert und weiter kultiviert bis eine ausreichende Zelldichte im Kulturgefäß zu verzeichnen war.

Für eine Kultivierung von Blutlymphozyten aus heparinisiertem Vollblut wurde als Medium RPMI 1640 verwendet und mit Phytohämagglutinin 72 h bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Sättigung von 5 % das Wachstum der T-Lymphozyten gezielt stimuliert.

Anschließend wurde ,bei postnatalem Material, 30 min vor der Präparation zur Arretierung der Zellen im Stadium der Metaphase 1 µg Colcemid, ein synthetisch hergestelltes Derivat des Colchizins, zur Kultur zugesetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Die als Mitosegift wirkende Substanz, ein Produkt der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*), verhindert die

Ausbildung der Mikrotubuli, die den Spindelapparat bilden. So werden alle Zellen im Metaphasestadium gestoppt und man erhält so möglichst viele Metaphaseplatten zur Analyse der Chromosomen.

### **Chromosomenpräparation**

Zur Aufarbeitung wurde die Zellkultur in ein steriles 15 ml Falkon<sup>®</sup> Röhrchen überführt. Anschließend wird die Probe 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wird das Sediment zur Lyse der Erythrozyten mit 10 ml einer 37°C warmen, hypotonen KCl-Lösung versetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt zur Stabilisierung der Zellen eine Präfixierung durch Zugabe von 1-2 ml gekühltem Fixativ. Dadurch wird unter ausreichender Luftfeuchtigkeit ein Ausfällen der Proteine, eine Schwellung der Zellen und dadurch eine Dehnung der Chromosomen (Claussen *et al.*, 2002) erreicht.

Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei gleicher Drehzahl wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das verbleibende Sediment nochmals mit 10 ml Fixativ eluiert. Dieser Vorgang wurde noch 2mal wiederholt, bevor die Suspension mit 10 ml Fixativ für mindestens 45 min oder über Nacht bei -20°C belassen wurde, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten.

Danach wurde erneut zentrifugiert und das Sediment nach Abnehmen des Überstandes zur weiteren Verwendung, je nach Zelldichte, in ca. 1 ml Fixativ belassen.

Bei besonders hoher Zelldichte kann die Suspension später nochmals nach Bedarf mit Fixativ verdünnt werden.

Die so gewonnenen Zellsuspensionen werden nun zur Verminderung der DNA-schädigenden Wirkung des Fixativs (Depurinierung der DNA durch die enthaltene Essigsäure) bei -20°C aufbewahrt. Sie können auf diese Art über einige Jahre ohne größeren Qualitätsverlust gelagert werden.

### **Herstellung der Metaphasepräparate**

Vor dem Auftropfen der Zellsuspension wurden die Objektträger (Menzel-Superfrost) gründlich mit Seidenpapier oder in Prilwasser gereinigt und in einem Methanol-Salzsäure-Gemisch (nur bei Prilwasser-gereinigten OT's notwendig) bis zur Verwendung gelagert.

Unmittelbar vor dem Auftropfen wurden die OT's in 4°C kaltes *A. dest.* gestellt und die Zellen auf die noch feuchte Oberfläche getropft.

Eine optimale Spreitung der Metaphaseplatten ist vor allem abhängig von der umgebenden Luftfeuchtigkeit und Temperatur (Hliscs *et al.*, 1997). Deshalb sollte man diese beiden Komponenten möglichst mittels Heizplatte und feuchter Kammer (bzw. wenn möglich klimatisierter Raum) konstant halten. Eine Luftfeuchte von ca. 50 % bei RT hat sich als günstig für die Spreitung erwiesen.

Durch die Verdunstung des Fixativs wird eine Fixierung der Zellen und durch die umgebende (Luft-)Feuchtigkeit eine Dehnung der Chromosomen erzielt.

Nach dem Auftropfen der Zellsuspension kann zur Verlängerung des Verdunstungsvorgangs, und damit zur noch besseren Spreitung, mit reinem Fixativ nachgetropft werden. Allerdings besteht hier auch die Gefahr, dass die Chromosomen aus der Metaphase über den gesamten OT versprengt werden.

Zur Trocknung kann man die OT's bei 50°C auf die Heizplatte legen oder einfach bei RT trocknen lassen. Anschließend erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei 70 %, 95 % und absolutem Alkohol und eine abschließende Lufttrocknung bei RT.

Die so hergestellten Chromosomenpräparate können bis zu einigen Wochen bei RT aufbewahrt werden. Bei längerer Lagerdauer empfiehlt sich jedoch eine Aufbewahrung bei -20°C.

Für die Verwendung der OT's für die FISH Analyse ist stets ein frisch getropfter OT einem schon länger gelagerten vorzuziehen. Soll jedoch am gleichen Tag hybridisiert werden, an dem das Präparat hergestellt wurde, ist es besser den OT zur Alterung der Chromosomen für 2 h bei 60°C zu inkubieren.

## 2.1.2. Kultivierung von Amnionzellen

### Verwendete Lösungen

#### Wachstumsmedien

- a) Chang-Medium (Irvine Scientific):  
= Mischung aus 10 ml Chang-Medium C (Supplement) und 90 ml Basalmedium B  
Zugabe von 1 ml L-Glutamin (Biochrom AG) und 10000 U Penicillin+ Streptomycin  
(10000 µg/ml)
- b) AmnioMax-C100 Medium (GibcoBRL):  
= 90 ml Basalmedium und 15 ml Supplement

#### Colcemid-Lösung

Stammlösung (BiochromAG) mit einer Konzentration von 10 µg/ml 1:1 mit sterilem A. dest verdünnen

#### Trypsin-EDTA Lösung

Gebrauchslösung (BiochromAG) mit 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS

#### Hypotone Lösung

15 ml 1 % 3-Natriumcitrat-Dihydrat Lösung (Merck) und  
10 ml 0,33 % MgCl<sub>2</sub>Hexahydrat (Merck)

Vor Gebrauch: Zugabe von 1ml einer Hyaluronidase (Sigma)-Lösung 150 U/ml (50 mg in 100 ml sterilem A. dest.)

#### Fixativ

Gemisch aus 3 Teilen Methanol (Merck) und einem Teil Eisessig (Merck)

### Vermehrung von Zellen mittels *in situ* Technik

Die Kultivierung von Amnionzellen wurde in der Regel in vier Ansätzen durchgeführt; zwei mit AmnioMax-Medium und zwei mit Chang-Medium (Verma und Babu, 1994).

Nach der Zentrifugation des nativen Fruchtwassers bei 900 U/min für 7-10 min wurde anschließend der Überstand abgenommen und das aufgeschüttelte Sediment zum Einsähen der Zellen auf saubere, sterile OT's, die in einer Quadriperm-Schale mit dem jeweiligen Medium überschichtet wurden, verwendet.

Nach einer Inkubation für mindestens 4 Tage bei 37°C bei einer O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Sättigung von 5 % erfolgte eine Kontrolle des Wachstums im Inversmikroskop (Zeiss) und evtl. ein erster Austausch des Mediums gegen frisches, der alle zwei Tage bis zur gewünschten Klondichte wiederholt wurde.

Zur Aufarbeitung wurde der OT entnommen, frisches AmnioMax-Medium und ca. 50 µl Colcemid-Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation von 105 min wurde bei Vorhandensein von ausreichend Mitosen die Präparation durchgeführt. Nach Entfernung des Mediums wurde dazu der OT mit der hypotonen Lösung behandelt und ca. 10 min bei RT inkubiert. Anschließend gab man 3 ml frisches kaltes Fixativ hinzu und inkubierte weitere 10 min. Nach zwei weiteren Fixationsschritten mit Inkubation für 5-10 min wurde der OT nochmals mit Fixativ gespült und anschließend luftgetrocknet.

### Anzucht in Kulturflaschen

Diese Technik wurde bei Amniozyten und Zellkulturen angewendet (Verma und Babu, 1994), um ausreichend Material für weiterführende Untersuchungen bereitzustellen oder zur Absicherung der zytogenetischen Diagnostik bei schlechtem Zellwachstum.

Dazu wurden aus dem Zellsediment des zentrifugierten Fruchtwassers einige Tropfen in eine mit Chang-Medium gefüllte Kulturflasche gegeben und unter oben genannten Bedingungen ebenfalls für mindestens vier Tage inkubiert. Der Wechsel des Mediums erfolgte nach einer Woche und einen Tag vor der Aufarbeitung.

Bei ausreichender Klonzahl (mindestens 15 Klone) wurde zur Ablösung der Zellen Trypsin-EDTA Lösung (37°C) aufgebracht und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die gelösten Zellen auf neue, sterile, in AmnioMax gelagerte OT's, aufgebracht und bis zur Aufarbeitung (nach 2 Tagen) weiter unter o.g. Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen, wie oben beschrieben, präpariert. Die in der Kulturflasche verbliebenen Zellen wurden weiter kultiviert.

→ Da aufgrund der angewendeten Kultivierungstechniken keine Zellsuspension für weiterführende oder Wiederholungsuntersuchungen zur Verfügung stand, erfolgte bei zytogenetisch auffälligen Fällen ein Einfrieren von Probenmaterial, das für eine evtl. notwendige, erneute Kultivierung verwendet werden konnte.

## 2.2. Zytogenetische Bänderungstechniken

### 2.2.1 Die GTG- oder Giemsa-Färbung

Seit ihrer Erstbeschreibung 1971 (Seabright *et al.*, 1971) hat sich die GTG-Bänderung zur gebräuchlichsten Färbemethode der Routinezytogenetik entwickelt und wird bis heute zur Erstellung des Karyotypes sowohl in prä- und postnatalen Untersuchungen als auch in der Tumorzytogenetik angewendet.

Mittels dieser Methode ist auf Grundlage einer alternierenden hell-dunkel-Färbung sowohl eine numerische als auch eine strukturelle Analyse der Chromosomen möglich, sofern es dadurch zu Abweichungen in der Bandenabfolge kommt.

#### Verwendete Lösungen:

##### Trypsinlösung

7,5 g Trypsin (DIFCO) in 100 ml Pufferlösung 1 lösen = Stammlösung (portioniert bei -20°C lagern),

vor Gebrauch 1 ml Stammlösung mit 99 ml Pufferlösung 2 verdünnen

##### Giemsalösung

5-10 %ige Lösung mit Puffer 2 herstellen

##### Pufferlösung 1

gebrauchsfertig (Merck) pH 6,88

##### Pufferlösung 2

= 1x PBS (siehe 2.3.)

Die für 1 h bei 90°C gealterten und abgekühlten OT's werden für 18-20 s in der Trypsinlösung inkubiert, kurz in Puffer 1 gespült und anschließend ca. 5 min in der Giemsalösung gefärbt. Daraufhin wurden die Präparate mit *A. dest.* gespült und luftgetrocknet.

### 2.2.2. Die CBG-Färbung

Mittels der 1971 eingeführten C-Bänderung (Arrighi und Hsu, 1971) ist es möglich, die AT-reichen, heterochromatischen Bereiche der Chromosomen, wie sie auf dem Y-Chromosom und vor allem im perizentrischen Bereich der Chromosomen 1, 9 und 16 auffallen, gezielt anzufärben. Es ist so möglich, Abweichungen in der Ausprägung des Heterochromatins, wie wir sie häufig als Normvarianten finden, zu charakterisieren und so Inversionen, Duplikationen und Deletionen dieser Bereiche zu identifizieren.

**Verwendete Lösungen:**0,2 M Salzsäure

8 ml 1 M HCl (Merck) mit 32 ml *A. dest.* auffüllen

5% Bariumhydroxidlösung

1,25 g Ba(OH)<sub>2</sub> (Merck) mit 25 ml *A. dest.* lösen und filtrieren

2xSSC

gebrauchsfertige 20x SSC-Lösung (Gibco BRL) mit *A. dest.* 10-fach verdünnen und pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

10% Giemsalösung

5 ml Giemsalösung (Merck) mit 45 ml Phosphatpuffer pH 6,88 (Merck) verdünnen

Zur CBG-Bänderung wurden mindestens 1 Tag alte OT-Präparate verwendet, die wie unter 2.1.1. beschrieben, präpariert wurden. Diese wurde 1 h in die 0,2 M HCl gestellt, anschließend kurz mit *A. dest.* gespült und für 7 min in die filtrierte 60°C warme Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung gegeben. Der sich bildende Niederschlag wird mittels Leitungswasser gründlich entfernt und die Präparate für 1 h in 2xSSC bei 60°C inkubiert. Es folgte eine Spülung mit *A. dest.* und eine Lufttrocknung, bevor die OT's 12-15 min in der Giemsalösung gefärbt, kurz gespült und die Färbung im Mikroskop begutachtet wurde. Anschließend konnte eine evtl. notwendige Nachfärbung erfolgen, bevor die OT's eingedeckt wurden.

**2.2.3. Die NOR-Färbung oder Silberfärbung**

Mittels der NOR (*nucleolus organizing region*)-Färbung ist es möglich, die Satellitenregionen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen gezielt anzufärben und auch in diesem Bereich Heteromorphismen, wie Größenveränderungen, das völlige Fehlen der Nukleolus-organisierenden Regionen oder auch Translokationen unter Beteiligung von akrozentrischen Chromosomen nachzuweisen. Ursprünglich wurde diese Färbung mit Silber durchgeführt (Ruzicka, 1891, Bloom und Goodpasture, 1976), bis Howell und Black 1980 eine verbesserte Methode mittels Silbernitrat und eines Kolloid-Entwicklers vorstellten.

**Verwendete Lösungen:**Silbernitratlösung

4 g Silbernitrat (Merck) in 8 ml *A. dest.* lösen

Kolloid-Entwickler

2 g Gelatine (Merck) in 100 ml *A. dest.* lösen und mit 1 ml konzentrierter Ameisensäure (Merck) versetzen

Giemsalösung

Siehe 2.2.2.

Die, wie unter 2.1.1. hergestellten, Präparate wurden mit der Entwickler enthaltenden Silbernitratlösung bedeckt und 2 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde mit *A. dest.* gespült und mit einer 10%igen Giemsalösung 3-5 s gefärbt.

## 2.3. Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

### Verwendete Lösungen

#### Pepsinlösung

Lösung mit 1 % 1 N HCl und 0,5 % Pepsin-Stammlösung (= 1 g Pepsin (Sigma) auf 50 ml A. dest.)

#### 1x PBS

4,775 g PBS Dulbecco (Seromed®) in 1 l A. dest. lösen

#### Postfixierungslösung

Mischung aus 5 % 1 M MgCl<sub>2</sub> (0,5 ml) und 50% Paraformaldehyd-Lösung (5 ml)  
→ mit 4,5 ml PBS ansetzen

### 2.3.1. Pepsinverdau und Postfixierung

Um Plasmareste um die Metaphaseplatten zu entfernen und so die Chromosomen zugänglicher für die DNA-Sonden zu machen, ist es nach dem Altern der OT's notwendig, einen Verdau mit Pepsinlösung durchzuführen.

Dazu wurden die OT's für 5 min bei 37°C in einer Lösung aus 5 ml 0,2 N HCl, 95 ml A. dest. und 500 µl Pepsin inkubiert. Um die Wirkung des Pepsins zu beurteilen, konnten die Präparate danach im Mikroskop im Phasenkontrast beurteilt, und, wenn nötig, die Einwirkzeit bei Bedarf nochmals verlängert werden. In der Regel sind jedoch 5 min Pepsinierung für gut gespreitete Metaphaseplatten (MPP) ausreichend.

Nach Einwirkung des Pepsins wurden die OT's für 5 min in PBS Lösung gestellt und anschließend, zur Härtung der Chromosomen, eine Postfixierung mittels einer Paraformaldehyd-Lösung für 10 min bei RT durchgeführt, bevor die Präparate nochmals 5 min in PBS gespült wurden. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe in 70 %, 95 % und absolutem Alkohol. Danach wurden die OT's bei RT luftgetrocknet.

### 2.3.2. Denaturierung der Objektträger

#### Verwendete Lösungen

#### 70 %ige Formamid-Lösung

mit Formamid (Merck) und 2x SSC eine 70 %ige Lösung herstellen  
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

#### aufsteigende Alkoholreihe

eine Verdünnung von absolutem Alkohol mit A. dest. auf 70 % und 95 %

Um die bei RT doppelsträngige DNA einzelsträngig, und damit zugänglich für eine Bindung mit der (ebenfalls denaturierten= einzelsträngigen) DNA Sonde zu machen, erfolgte eine Denaturierung der Chromosomenpräparate mit 100 µl 70%igem Formamid für 3 min bei ca. 72°C auf der Heizplatte. Durch Verwendung von relativ hoch konzentriertem Formamid wird die Denaturierungstemperatur der DNA, durch Destabilisierung der Wasserstoffbrückenbindung, herabgesetzt (Ferguson *et al.*, 1996). Sie kann daher statt bei ca. 90°C bereits bei ca. 72°C erfolgen und die Struktur der Chromosomen bleibt so erhalten.

Anschließend wurden die Präparate für 3 min in 70 %igen, -20°C kalten Alkohol gestellt, um eine Renaturierung der beiden DNA-Stränge zu verhindern. Es erfolgte dann die weitere Dehydrierung in 95% und absolutem Alkohol gefolgt von einer Lufttrocknung bei RT.



Die Denaturierung der OT's sollte frühestens 2 h vor dem Auftragen der DNA-Sonde erfolgen, da nach längerer Zeit eine (zumindest teilweise) Renaturierung, auch bei RT, nicht ausgeschlossen werden kann.

## 2.4. Vorbehandlung der DNA

### 2.4.1. Reinigung der verwendeten DNA-Sonden durch Alkoholpräzipitation

Um die, mittels DOP-PCR markierte (siehe 2.7.3.), Sonden-DNA von nicht durch die PCR gebundenen Nucleotiden zu trennen, wurde eine Alkoholpräzipitation zur Reinigung der DNA durchgeführt.

#### Verwendete Lösungen:

##### Natriumacetat-Lösung 3 M (bezogen auf Acetat)

24,6 g wasserfreies Natriumacetat (Sigma) auf 100 ml *A. dest.* auffüllen, pH mit Eisessig (Merck) auf 5,2 einstellen

##### *E. coli* tRNA:

Lösung wurde als Stammlösung (Konzentration 10 µg/µl; Boehringer Mannheim) eingesetzt.

#### Ansatz für DNA-Fällung:

Der markierten DNA-Lösung (Volumen 20 µl) wird zugegeben:

20 µl *A. dest.*

10 µl tRNA (½ des Volumens)

5 µl Natriumacetat (¼ des Volumens)

> 2,5 Volumina absoluter Alkohol (Endkonzentration 70 %)

Die Fällung erfolgt bei -20°C mindestens 2 h oder bei -80°C mindestens 10 min.

- Die Zugabe von *A. dest.* diene der Volumenvergrößerung der Probe und ist bei größeren Proben-Volumina nicht notwendig.
- Werden mehrere Sonden (z.B. MCB-, M-FISH Sonden) gemeinsam gefällt, werden die Fällungslösungen entsprechend des Gesamtvolumens (bzw. der Anzahl der Einzelproben) eingesetzt.
- *E. coli* tRNA dient als Träger-DNA und erhöht die Ausbeute an DNA um ca. 10 % (Sambrock *et al.*, 1989) (Statt *E. coli* tRNA kann auch alternativ Lachsspermien-DNA verwendet werden.)

Anschließend wurde die Probe bei maximaler Drehzahl (15300 U/min) bei 4°C für 15 min zentrifugiert. (Danach kann das Pellet 1x mit 70 %igem Alkohol gewaschen und nochmals zentrifugiert werden.) Der Überstand wurde verworfen und das Pellet unter Vakuum bei TR oder bei 60°C im Brutschrank vollständig getrocknet.

Die getrockneten Proben können so bei -20°C aufbewahrt oder bereits in DS bis zur gewünschten Konzentration re-suspendiert und bei -20°C gelagert werden.

Einzelproben wurden (je nach Probenintensität) in 20-25 µl DS gelöst; Probenmixe (MCB-Mixe und subcenM-FISH-Mixe) dagegen meist in 30-35 µl, wenn 5 µl Probe pro Hybridisierung eingesetzt wurden.

## 2.4.2. Denaturierung und Prähybridisierung der Sonden

### Verwendete Lösungen

#### Hybridisierungsmix= Dextransulfat (DS):

2 g Dextransulfat  
2 ml 20x SSC (GibcoBRL)  
2 ml Natriumphosphat (0,5 M)  
5 ml deionisiertes Formamid

- auf 10 ml mit *A. dest.* auffüllen
- gut mischen und ca. 3h (!) bei 70°C lösen

Es wurde vom DS ein Mastermix hergestellt, die Lösung portioniert und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch empfiehlt sich, zum exakteren pipettieren, eine Erwärmung des Gemisches auf ca. 37°C.

#### COT-1-DNA (100 µg)

25 µl /oder die jeweils gewünschte Menge COT-1-DNA (1 mg/ml) (GibcoBRL) mit dem doppelten Volumen absolutem Ethanol versetzen und unter Vakuum oder bei 60°C im Brutschrank eintrocknen und bis zum Gebrauch bei -20°C lagern

Die Denaturierung der, im Hybridisierungspuffer (enthält 50 % Formamid) gelösten, Sonden-DNA erfolgte für 5min bei 75°C, gefolgt von einer raschen Abkühlung auf 4°C, um eine Renaturierung zu verhindern. Anschließend wurde ein Prähybridisierungsschritt der Proben (außer bei Zentromersonden) angeschlossen.

Um möglichst spezifische Signale ohne störende Hintergrundsignale zu erzielen, wurden die eingesetzten Sonden nach der Denaturierung mit humaner COT-1 DNA für ca. 30 min bei 37°C prähybridisiert, um vor allem repetitive Sequenzen abzublocken. Die eingesetzte COT-1 DNA besteht überwiegend aus diesen repetitiven Elementen und kann so spezifisch an diese, in der Proben-DNA vorhandene, binden. Aus dem gleichen Grund wird COT-1 DNA zur Hybridisierung von Zentromer-Sonden nicht oder in sehr geringen Mengen zugegeben, da sonst die enthaltene (repetitive) Alpha-Satelliten-DNA zum großen Teil abgeblockt würde. Bei einigen Zentromer-Proben, die bekanntermaßen Sequenzhomologien zu anderen Zentromeren besitzen, wie es bei Zentromer 4 und 9 der Fall ist, kann zur Erhöhung der Spezifität der Sonde, COT-1 DNA in sehr geringer Menge, bei verkürzter Prähybridisierungszeit (10 min ) eingesetzt werden.

Die Denaturierung (und evtl. kurze Prähybridisierung) der kommerziell erhältlichen Zentromersonden erfolgte in Hybridisierungspuffer mit 60 % Formamid-Konzentration.

## 2.4.3. Der eigentliche Hybridisierungsansatz

Für die Hybridisierung werden die denaturierten und evtl. prähybridisierten Proben auf den Objektträger mit der denaturierten Ziel-DNA aufgetragen. Ein Probenansatz von ca. 12 µl ist ausreichend für eine Hybridisierung auf einer Hälfte des OT's unter Verwendung eines 24x24 mm Deckglases.

Um, vor allem bei längerer Hybridisierungszeit, das Austrocknen der Probe zu vermeiden, wird das Deckglas mit Fixogum® (Marabu) abgedichtet und zur Hybridisierung bei 37°C in einer feuchte Kammer inkubiert.

Bei der überwiegenden Zahl der Sonden ist eine Inkubationszeit über Nacht (mindestens 12 h) ausreichend. Bei kleineren, z.T. „schwächeren“ Sonden, wie YAC- und BAC-Sonden oder den Sonden für M-FISH, hat sich dagegen eine Hybridisierung über 2-3 Tage als geeigneter erwiesen. Hier besteht jedoch auch die Gefahr, dass nicht vollständig abgeblockte, unspezifische Hintergrundsignale stärker zum Tragen kommen und so das Hybridisierungsergebnis negativ beeinflussen können.

#### 2.4.4. Hybridisierung von Telomersonden

Als Probe wurde hier die gebrauchsfertige Lösung des Telomersonden-Kits der Firma DAKO<sup>®</sup> verwendet. Es handelt sich bei der Sonde nicht um eine gewöhnliche DNA-Sonde, sondern um eine PNA-(*Peptide nucleic acid*-) Sonde, die ihre Bindung an die DNA über ein flexibles Peptid-Rückgrat realisiert. Die Vorteile der Sonde liegen in ihrer höheren Spezifität und der Unempfindlichkeit gegenüber abbauenden Enzymen, wie z.B. DNAsen (Egholm *et al.*, 1993).

Die Sonde bindet an die Sequenz des Hexanukleotids TTTAGG, das im Telomerbereich aller Chromosomenarme vorkommt. Da diese Sequenz nicht Chromosomen-spezifisch ist, kann nur eine Aussage darüber gemacht werden, ob Telomer-Regionen auf den Chromosomen oder Markerchromosomen vorhanden sind oder nicht.

##### Verwendete Lösungen:

###### Telomer PNA Probe (DAKO<sup>®</sup>)

Gebrauchsfertige Sonde markiert mit Fluorescein in Hybridisierungslösung (Formamid-haltig)

###### Rinse Solution (DAKO<sup>®</sup>)

Stammlösung; vor Gebrauch Verdünnung 1:50 mit A. dest.

###### Wash Solution (DAKO<sup>®</sup>)

Stammlösung; vor Gebrauch Verdünnung 1:50 mit A. dest.

Die zu untersuchenden OT's wurden, wie unter 2.3.1. beschrieben, vorbehandelt. Es wurden pro halben OT 10 µl der Probenlösung verwendet und die Probe auf dem OT mit der Ziel-DNA für 3-5 min bei 80°C auf der Heizplatte denaturiert. Nach einer Inkubation von ca. 2 h bei 37°C wurde das Deckglas durch schwenken in der *Rinse Solution* entfernt und der OT bei 65°C 5 min mit der *Wash Solution* gewaschen. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe und eine Lufttrocknung. Nach Eindecken des OT mit DAPI Lösung zur Gegenfärbung erfolgte die Auswertung mit dem FITC Filter des Fluoreszenzmikroskops.

#### 2.5. Posthybridisierungswaschungen der Präparate

##### Verwendete Lösungen

###### 2xSSC (s.2.3.1.)

###### 70 % Formamid (s.2.2.2.)

###### 0,4x SSC

aus 2xSSC eine 5-fach verdünnte Lösung herstellen

###### 4x SSCT

aus 20x SSC (gebrauchsfertige Lösung; GibcoBRL) 4x SSC herstellen und mit 250 µl (= 0,05 %) Tween 20 (Sigma) versetzen

###### SSCTM

0,1 g Marvel (fettfreie Trockenmilch) mit 2 ml 4x SSCT lösen

###### 1x PBS (s. 2.2.)

DAPI/Antifade

ca. 0,25 % 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma) (Stocklösung: 50 µg/ml) mit Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories) ansetzen und bei 4°C lichtgeschützt lagern

Um ungebundene, (bzw. unspezifisch-gebundene, heterologe) nicht homologe Sonden DNA zu entfernen, schließen sich der Hybridisierung unterschiedliche Waschprozesse an, die sich in ihrer Temperatur, Salzkonzentration und Formamid-Konzentration und damit in ihrer Stringenz unterscheiden. Welches Protokoll zum Einsatz kommt, hängt entscheidend von den verwendeten Sonden ab. So werden kommerziell erhältliche Sonden und Zentromersonden vorwiegend mit dem vom Hersteller empfohlenen „rapid wash“ behandelt, alle anderen Sonden werden zumeist bei 42°C unter Verwendung von Formamid gewaschen.

Von den hybridisierten OT's werden vorsichtig die Deckgläser entfernt.

- Beim Waschen bei 42°C erfolgen 3 Waschschrte mit 50 %igem Formamid bei 42°C, gefolgt von ebenfalls 3 Waschschrten mit 2xSSC bei gleicher Temperatur.
- Bei Einsatz des „rapid wash“ werden die OT's 2 min bei 66-68°C mit 0,4xSSC gewaschen.

Daran schließt sich für beide Waschungen eine kurze Spülung der OT's bei RT mit 4xSSCT an.

Für indirekt markierte Sonden (mit Biotin oder Digoxigenin markiert) schließt sich daran eine Probedetektion mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern an. Die direkt markierten Proben können nach einem weiteren Waschschrte mit 1xPBS für 5 min bei RT und der anschließenden Dehydrierung, Trocknung und Gegenfärbung bereits ausgewertet werden. Vor der Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe hat sich das Spülen des OT mit A. dest. bewährt, um ein Ausfallen der im PBS Puffer enthaltenen Salze zu verhindern.

## 2.6. Die Detektion der indirekt markierten Sonden

Vor der eigentlichen Detektion der Sonden erfolgt, für indirekt markierte Proben zum Abblocken unspezifischer Bindungen der Antikörper an Proteine, ein Inkubationsschrte mit 100µl SSCTM für 10-15min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Anschließend kann der OT kurz in 4xSSCT bei RT gespült werden.

Die Detektion der indirekt markierten Sonden erfolgt mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

Biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim)-gelabelte Sonden können mit folgenden, an Avidin-gekoppelten Antikörpern detektiert werden:

- |  |       |
|--|-------|
| ➤ (Strept-)Avidin-Fluorescein-Isothiocyanat (FITC),<br>(Vector Laboratories) | 1:500 |
| ➤ Streptavidin-Cy5 (Amersham)  | 1:100 |
| ➤ Avidin-Cy3 (Dianova)   | 1:200 |
| ➤ Avidin-Texas Red (Vector Laboratories)                                     | 1:500 |

Zur Intensivierung des Fluoreszenzsignals, insbesondere bei kleineren Sonden, kann eine Signalverstärkung im Sandwich-Prinzip mittels eines, gegen Avidin gerichteten, Antikörpers erfolgen.

Die Antikörper wurden in jeweils 100 µl 4xSSCTM gelöst und für 30-40 min bei 37°C inkubiert, bevor sich ein weiterer Detektionsschrte mit den bereits im ersten Schritt verwendeten Antikörpern anschließt. Es wurde folgende Konzentration verwendet:

- |  |       |
|--|-------|
| ➤ Biotinyliertes Anti-Avidin (Vector Laboratories) | 1:100 |
|--|-------|

Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim)-markierte Sonden werden mit einem dieser, gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper detektiert:

- |                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| ➤ Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Roche®) | 1:10 |
|--------------------------------------|------|

- Anti-Digoxigenin-Fluorescein (Roche) 1:10
- Anti-Digoxigenin-Cy5.5 (Roche) 1:10

(die monoklonalen Antikörper wurde vorher mit Cy5.5 *labeling kit* (Amersham) gekoppelt und über eine Auftrennung über eine Säule die gewünschte Fraktion erhalten)

- Anti-Digoxigenin-Cy3 (Dianova) 1:250

Bei Digoxigenin-*gelabelten* Sonden verwendet man zur Verstärkung einen gegen Antigene der Tierart gerichteten Antikörper, in der der fluoreszenzmarkierte Antikörper hergestellt wurde. Im unserem Falle wurde meist Cy5.5 mit

- anti-Maus-Digoxigenin (in Schaf; Chemikon) 1:10

und einem weiteren Detektionsschritt mit Anti-Digoxigenin-Cy5.5 verstärkt.

Die Antikörper werden entsprechend ihrer gewünschten Endkonzentration in 4xSSCTM-Lösung verdünnt. Nach Auftragen der Antikörper und Abdeckung mit 24x60 mm Deckgläsern folgt jeweils eine 30-40 minütige Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer gefolgt von 3 Waschungen für 3min mit 4xSSCT bei RT auf einem Schüttler. Nach dem letzten Detektionsschritt wird nach einer Waschung mit 4xSSCT weitere 5 min mit 1xPBS bei RT gewaschen, der OT kurz mit *A. dest.* gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach der Lufttrocknung der OT's werden diese mit DAPI-Lösung zur Gegenfärbung der Chromosomen eingedeckt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

## 2.7. Isolierung von PAC-, BAC- und YAC-DNA zur Herstellung von Sonden

Meist werden zur DNA-Klonierung Vektoren verwendet, die in der Bakterienzelle vermehrt, dann Replikone in einer hohen bis mittleren Kopiezahl hervorbringen.

Jedoch hat man bei der Klonierung von eukaryotischer DNA oft das Problem der Instabilität der inserierten DNA, die oft unvollständig oder strukturell verändert weitergegeben wird. So ist es oft recht schwierig, größere DNA Bereiche in Bakterien zu klonieren.

### 2.7.1. Gewinnung von *bacterial artificial chromosome* (BAC)- und P1-abgeleiteter künstlicher Chromosomen (PAC)-DNA

#### BAC-Sonden:

Die für die Untersuchungen interessanten BAC-Sonden wurden aus dem Bakterium *Escherichia coli*, das klonierte, humane genomische DNA in einem modifizierten Plasmids, dem F-Faktor, enthält, isoliert.

Die DNA-Fragmente, die auf diese Art kloniert werden können, sind in der Regel bis zu 300 kb groß und liegen in einer niedrigen Kopiezahl in der Bakterienzelle vor, weshalb nur eine relativ begrenzte Menge der humanen DNA gewonnen werden kann (Shizuya *et al.*, 1992).

#### P1 und PAC-Sonden:

Bakteriophagen, wie der Phage P1, eignen sich aufgrund ihrer Genomgröße besser zur Klonierung größerer DNA-Fragmente. In diesen Vektoren kann man ca. 100 kb große Bereiche linearer DNA einbauen, die in die Wirtszellen injiziert und nach Ringbildung in diesen amplifiziert werden kann (Sternberg, 1992).

Kombiniert man die Klonierungsprinzipien der BAC- und der P1-Methode erhält man ein sogenanntes P1-abgeleitetes künstliches Chromosom, ein PAC (Ioannou *et al.*, 1994), mit dem es möglich ist, DNA-Stücke von 130 bis 150 kb Größe zu klonieren.

#### a) Anzucht der BAC-und PAC-Sonden:

##### Verwendete lösungen:

##### *Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)*

5 g Yeast-Extrakt, 10 g Bacto-Trypton und 10 g NaCl mit *A. dest.* lösen und auf 1 l auffüllen, pH-Wert (NaOH) auf 7,0 einstellen,

Lösung vor Gebrauch autoklavieren und nach Anbruch bei 4 °C aufbewahren

#### Chloramphenicol-Lösung

Stammlösung von 34 mg/ml (Lagerung bei -20°C)  
bis zu einer Endkonzentration von 170 µg/ml zugeben

#### Kanamycin-Lösung

Stammlösung von 10 mg/ml (Lagerung bei -20°C)  
bis zu einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugeben

Die Kultivierung der Bakterienstämme erfolgte in einem gesonderten Sicherheitslabor Stufe 1 (S1). Für ein selektives Wachstum musste das verwendete LB-Medium zusätzlich mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt werden, gegen das die Plasmid-tragenden Stämme Resistenzgene hatten. Die hier verwendeten Bakterienstämme besaßen Resistenzgene gegen Chloramphenicol bzw. Kanamycin.

Das Animpfen der Bakterien erfolgte in 50 ml Falcon®-Röhrchen mit 5 ml des LB-Mediums mit dem entsprechenden Antibiotikum unter sterilen Bedingungen mittels einer Impföse oder sterilen Holz-Zahnstochern. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C auf einem Schüttler über Nacht in den nicht vollständig verschlossenen Röhrchen.

### **b) Aufarbeitung der BAC- und PAC-DNA:**

#### **Verwendete Lösungen:**

##### Puffer P2, N3 und EB

→ werden gebrauchsfertig von der Firma QIAGEN geliefert

##### Puffer PE

Vor Gebrauch werden zu 275 ml Puffer PE 220 ml absoluter Ethanol zugegeben und die Mischung anschließend bei RT gelagert.

##### Puffer P1

→ wird vor Gebrauch mit RNase (100 mg/ml) versetzt und anschließend bei 4°C gelagert

Die Isolierung der DNA erfolgte mittels des QIAGEN Miniprep kit (QIAGEN) nach Vorschrift der Firma (Sambrook *et al.*, 1989).

Nach Abschluss der Kultivierung erfolgte nach Abnahme von 100 µl Kultur für evtl. weitere Kultivierungen eine Zentrifugation der Kultur bei 2800 U/min für 10 min. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 250 µl Puffer 1 re-suspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer 2 und vorsichtigem Mischen der Lösung erfolgte die Zugabe von 350 µl des N3 Puffers. Die nun ausgeflockten Bestandteile der Lösung wurden mittels Zentrifugation für 10 min bei 5000 U/min sedimentiert und der klare Überstand anschließend auf die Säulen (QIAPrep spin colum) gegeben und ca. 1 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Zur Reinigung wurde 750 µl PE Puffer auf die Säule gegeben und wiederum zweimal bei 4000 U/min 1 min zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde 50 µl EB Puffer (60°C) oder *A. dest.* auf die Säule gegeben und nach einer Einwirkzeit von 1 min kurz bei 10000 U/min zentrifugiert.

Die so gewonnene DNA wurde in ihrer Konzentration und Spezifität überprüft und anschließend den Amplifizierungs- und Markierungsverfahren zugeführt.

→ Die nach Kultivierung entnommene Menge von 100 µl Kultur wurde mit Glycerol versetzt und konnte so bei -80°C für weitere Kultivierungen aufbewahrt werden.

→ Wichtig ist, dass die Probe nie vollständig aufgetaut wird, da das Glycerol den Mikroorganismen schadet.

### 2.7.2. Bestimmung der DNA-Gehaltes der Sonden

Die Konzentration der nach Kultivierung und Isolierung von BAC und PAC Klonen erhaltenen DNA wurde mittels eines Photometers (Uvikon 930; Contron) bestimmt.

Es wurde der Wert der Adsorption beim 260 nm als für die gewünschte DNA Fraktion spezifisch angenommen (Sambrook *et al.*, 1989). Sehr hohe Werte in anderen Wellenlängenbereichen deuten auf Verunreinigungen z.B. durch Proteine hin.

Zur Messung wurde eine Verdünnung von 5 µl Proben-DNA mit 115 µl *A. dest.* hergestellt. Der gemessene Wert musste daher mit dem Faktor 24 multipliziert werden, um die Konzentration in µg/ml zu erhalten. Da mit doppelsträngiger DNA gearbeitet wurde ergab sich zusätzlich ein Multiplikationsfaktor von 50 (da die Extinktion von 1,0 ca. einer Konzentration von 50 µg/µl entspricht), so dass sich für die Bestimmung des DNA Gehaltes folgende Formel ergab:

$$\text{gemessener Wert} \times 50 \times 24 = \text{DNA Gehalt in } \mu\text{g/ml}$$

### 2.7.3. Aufarbeitung der eingesetzten YAC-Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten YAC Sonden wurden uns bereits als isolierte DNA zur Verfügung gestellt. Es erfolgte in der Regel eine Amplifikation der DNA mittels DOP-PCR (2.7.2.) anschließend eine weitere Reamplifizierung mittels des gleichen DOP Primers und schließlich eine Markierungs-PCR (2.7.3.).

Ein Teil der Sonden wurde über eine Nick-Translation der DNA-Stocklösung markiert.

## 2.8. Mikrosezierung von Chromosomen und Chromosomenregionen

Die Methode der Mikrosezierung wurde zur Herstellung von Ganzchromosomen (*whole chromosome painting (wcp)*)-Sonden, zur Generierung von Sonden für spezielle chromosomale Bereiche, wie z. B. eine Sonde für den zentromerumgebenden Bereich der Chromsomen 5 und 6 (Midi 12) oder Chromosomen-Arm spezifischen (*partial chromosome painting (pcp)*)-Proben, sowie der für Multicolor-Bänderung und für M-FISH (siehe 1.2.3.4.) verwendeten Sonden eingesetzt. Weiterhin wurde die Methode in einigen Fällen zur Bestimmung der Herkunft chromosomalem Materials z.B. von Markerchromosomen oder nicht identifizierbaren Auffälligkeiten genutzt. Es wurde weitgehend nach dem Protokoll nach Rubtsov *et al.*, 1996 gearbeitet.

→Während der gesamten Mikrosezierung wurde steril gearbeitet, und bei den vorbereitenden Tätigkeiten wurden Handschuhe (ungepudert) getragen.

Die Mikrosezierung sollte möglichst getrennt von anderen Arbeiten, speziell solchen mit DNA, unter möglichst erschütterungsfreien Bedingungen durchgeführt werden.

#### Verwendete Lösungen:

→Die Ansätze der verwendeten Lösungen erfolgten unter einer sterilen Werkbank, um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden.

→Zur Herstellung der Lösungen wurde ausschließlich steriles, pyrogenfreies *A. dest.* (Ampuva<sup>®</sup>, Fresenius) verwendet.

#### Trypsin-Lösung:

eine Ampulle lyophilisiertes Bacto-Trypsin für eine 5 %ige Stammlösung (DIFCO) in *A. dest.* lösen, anschließend steril filtrieren und portionieren und bis zum Gebrauch bei -20°C lagern

→ vor Bänderung der Präparate 100 µl dieser Lösung in einem sterilen 50 ml-Falcon<sup>®</sup>-Röhrchen (Greiner) mit 35 ml Phosphat Puffer (pH 6,88) (Merck) verdünnen

### Giemsa-Lösung:

35 ml Phosphat-Puffer-Lösung (pH 6,88) (Merck) in einem sterilen 50-ml- Falcon®-Röhrchen (Greiner) mit 3 ml steriler Giemsa-Lösung (Merck) (in steriler Spritze) mischen und mittels Sterilfilter (Minisart, Sartorius) filtrieren um ein Ausflocken im Puffer zu vermeiden

### Collection-drop-Lösung:

Als Sammellösung diente eine Mischung aus:

- 10 mM Tris/HCl (pH 7.5) (Merck)
- 10 mM NaCl (Merck)
- und *A. dest.*

Diese Lösung wurde in einem autoklavierten und anschließend UV-bestrahlten Gefäß autoklaviert. Danach setzte man 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma) dazu, aliquotierte die Lösung und bestrahlte sie nochmals mit UV. Die Lagerung erfolgte bei RT.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden

- 0,5 mg/ml (Endkonzentration) Proteinase K (Boehringer Mannheim) und
- 50 µl Glycerol (Merck) (vorher portioniert und UV bestrahlt) zugegeben.

## **2.8.1. Vorbereitende Tätigkeiten**

### **a) Herstellen der Glasnadeln**

Die Glasnadeln zum Sammeln der Chromosomenfragmente wurden mit einem Pipettenziehgerät (Narishige, Modell PB-7) aus 10 cm langen, massiven Duranglasstäben (Schott Rohrglas GmbH) mit einem Durchmesser von 2 mm hergestellt. Zuerst wurde der Glasstab in Stufe 1 mit maximaler Heizkraft dünn ausgezogen und in Stufe 2 mit geringer Heizkraft und einem zusätzlichen Gewicht der dünne Teil des Glasstabes abgerissen. Beide Hälften konnten nun als Nadeln zum Sammeln verwendet werden.

→ Vor Gebrauch wurden die Nadeln unter UV-Licht ca. 2 h sterilisiert.

### **b) Herstellen der Sammelpipetten**

Zum Sammeln der geschnittenen Fragmente wurden Pasteurpipetten aus Glas (225 mm, Brand) verwendet. Das Ausziehen der Pipettenspitze erfolgte am gleichen Pipettenziehgerät wie die Herstellung der Glasnadeln. In Stufe 1 bei 80 %iger Heizkraft erfolgte das Ausziehen der Pipettenspitze, das endgültige Abreißen in der 2. Stufe bei mittlerer Heizkraft. Die vordere Spitze der Pipette wurde im Bereich der Heizwendel vorsichtig abgebrochen.

→ Direkt vor Benutzung der Pipetten wurden diese ca. 1 h bei UV-Licht bestrahlt, um DNA-Freiheit zu gewährleisten.

### **c) Silikonisierung der Pipetten**

Zum Teil wurde zur Reduzierung der statischen Aufladung des Glases eine Silikonisierung der Pipetten durchgeführt. Dazu wurden eine Lösung aus 99 ml Tetrachlorkohlenstoff und 1 ml Di-chlor-methylsilan hergestellt, die nach Behandlung der Pipetten mit 5 mM EDTA-Lösung neutralisiert wurde.

Die Pipetten wurden dann 1 h bei 100°C und anschließend über Nacht bei 60°C getrocknet.

### **d) Vorbereitung der Deckgläschen**

Für das Spreiten der Metaphasen wurden gut gereinigte Deckgläschen (60x24 mm) benötigt. Sie wurden vor der Mikrosezierung einige Tage in 10 %iger SDS-Lösung (Sigma) entfettet und vor Gebrauch gründlich mit sterilem *A. dest.* gespült. Zur Markierung der Schichtseite mit den Metaphasen wurde vorsichtig eine Ecke abgebrochen.

### **e) Herstellung und Bänderung der Präparate:**

Auf die noch feuchten Deckgläser wurden je nach Zelldichte 1-2 Tropfen Zellsuspension gegeben. Noch ehe das Fixativ vollständig verdunstet war, erfolgte das Nachtropfen mit frischem Fixativ, um eine bessere Spreitung der Metaphasen zu erzielen. Anschließend wurden die Präparate getrocknet und gefärbt.



Die Bänderung der vorbereiteten Metaphasepräparate erfolgte unter sterilen Bedingungen nach folgendem Schema:

- Behandlung mit Phosphat Puffer für 1 min
- Inkubation in der Trypsin-Lösung für 40-60 s
- (plasmareiche Präparate müssen meist länger trypsiniert werden)
- Färbung in Giemsa-Lösung für 2-3 min
- kurzes Spülen in sterilem *A. dest.*

Anschließend wurden die Präparate luftgetrocknet.

Zu beachten ist, dass die Chromosomen durch zu lange Trypsinierung stark quellen und dann sehr weich sind, was für das Schneiden von größeren Chromosomenbereichen und Markerchromosomen von Vorteil ist, da die Fragmente dann sehr gut an der Nadel kleben, aber für das exakte Schneiden kleinerer Chromosomenbereiche von Nachteil ist.

#### **f) Beschickung der Sammelpipette:**

Zur Ablage der geschnittenen Fragmente wurde eine Pasteurpipette verwendet. Diese wurde mit *Collection-drop*-Lösung befüllt.

### **2.8.2. Durchführung der Mikrosezierung**

(nach Rubtsov *et al.*, 1996)

→ *Beim Sammeln der Fragmente wurden keine Handschuhe getragen, um eine elektrostatische Aufladung zu vermeiden, die zu einem Verlust der Fragmente von der Nadel führen könnte.*

Die Mikrosezierung wurde an einem Inversmikroskop (Axiovert-135 oder Axiovert-10, Zeiss) durchgeführt, die mit zwei elektronisch kontrollierten Mikromanipulatoren (Merzhäuser) ausgestattet waren.

**Die Einstellung der Nadel und der Sammelpipette** erfolgte in der 10-fachen Vergrößerung (10 x Plan-Neofluar). Als Nadelhalter diente ein gewöhnlicher Minenbleistift.

→ Zu beachten war, daß ausreichend Platz zwischen dem Präparat und der Sammelpipette blieb, um jegliche Berührung der Pipette mit dem Präparat zu vermeiden !

Es wurde eine geeignete Metaphase auf dem Deckglas gesucht und mit dem 100er Objektiv (100 x Plan-Neofluar, Öl-Immersion) in die Mitte des Bildfeldes eingestellt, das zu schneidende Chromosom in die gewünschte Stellung zur Nadel gebracht und in der 10-fachen Vergrößerung kontrolliert, ob sich die Nadel im Bereich der eingestellten Metaphase befand. Diese wurde mit Kontrolle im 100er Objektiv langsam auf die Metaphase gesenkt bis sich im Bildfeld ein dunkler Schatten ausmachen ließ. Die Absenkung der Nadel nach unten erfolgte nun mittels Mikromanipulator, bis sie vor der zu schneidenden Bande auf dem Deckglas aufsetzte. Durch weiteres Absenken der Nadel und die damit verbundene Vorwärtsbewegung wurde das gewünschte Fragment aus dem Chromosom herausgeschnitten.

(Sollte dagegen ein komplettes Chromosom oder ein größerer Bereich, wie ein Chromosomenarm geschnitten werden, war es günstiger, das Chromosom durch vorsichtige Vibrationen der Nadel zusammenschieben und so als Ganzes aufzunehmen.) Zur Aufnahme der Fragmente erwies es sich als vorteilhaft, dasselbe umzudrehen, da es auf der Unterseite klebrig war und so besser an der Nadel haftete.

Die **Ablage der Fragmente in der Sammelpipette** wurde im 10er Objektiv in Höhe der Sammelpipette kontrolliert. Dazu wurde die Nadel mit dem anhaftenden Chromosomenstück in die mit Flüssigkeit gefüllte Spitze der Pipette eingeführt und leicht in der Flüssigkeit bewegt. Dadurch löste sich das Fragment von der Nadel. Für eine gute DNA-Bank wurden in der Regel mindestens 5 Fragmente benötigt.

Nach dem Sammeln der Fragmente wurde ein **Proteinverdau** mit der im *Collection-drop* (s. 2.7.1.) enthaltenen Proteinase K durchgeführt. Dafür wurde die Sammelpipette in eine

feuchte Kammer gelegt und für 2 h bei 60°C inkubiert. Die Einwirkung der Proteinase K sollte aufgrund der Spaltung der Proteine zu einer optimaleren Amplifizierung mittels DOP-PCR beitragen. Nach dem Proteinverdau wurde die DNA-Bank in die vorbereitete, erste PCR-Lösung (siehe 2.8.2.) überführt. Dazu wurde die Spitze der Sammelpipette, in der sich die geschnittenen Fragmente befanden, in der PCR-Lösung A abgebrochen und die PCR gestartet.

## 2.9. Techniken zur Amplifizierung und Markierung der DNA Sonden

### 2.9.1. Die DOP-PCR

Die DOP-PCR ist eine PCR, die mit **degenerierten Oligonukleotid-Primern** (DOP-Primern) arbeitet (Telenius *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu spezifischen Primern, die zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bekannter Sequenz verwendet werden, besitzt ein DOP-Primer an seinem 3'-Ende nach einer kurzen definierten Sequenz von 6 Basen einen Bereich von ebenfalls 6 Basen, die eine zufällige, also völlig unspezifische Abfolge haben (N). Dieser Bereich des Primers wird als „degeneriert“ bezeichnet.

Der hier ausschließlich verwendete DOP-Primer hat die Sequenz:

**5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'**

Aufgrund dieser degenerierten Oligonukleotide und der sehr niedrig gewählten *annealing* Temperatur (Renaturierungstemperatur) ist es während der sogenannten „*low temperature*“ Zyklen möglich, mit diesem Primer, DNA-Fragmente unbekannter Sequenz schnell und effektiv zu amplifizieren, da der Primer an vielen Stellen der DNA binden kann. Je niedriger die *annealing* Temperatur gewählt wird, umso unspezifischer und damit häufiger bindet der Primer an die eingesetzte Ziel-DNA. Eine Polymerase, die bei einer sehr niedrigen *annealing* Temperatur sehr gut arbeitet, ist die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sequenase.

Während der „*low temperature*“ Zyklen werden ausreichend DNA-Fragmente als Ziel-DNA für die folgenden „*high temperature*“ Zyklen synthetisiert.

Am 5'-Ende des Primers befindet sich wieder eine spezifische Sequenz von 6 Basen, die eine spezifische Amplifikation der in den ersten Zyklen synthetisierten DNA-Fragmente bei einer höheren *annealing* Temperatur ermöglicht (Telenius *et al.*, 1992).

### 2.9.2. Amplifikation der Proben-DNA

#### a) Verwendete PCR Lösungen:

Aufgrund der unspezifischen Amplifikation während der ersten Zyklen der PCR („*low temperature*“ Zyklen) ist es sehr wichtig, eine Kontamination der PCR-Lösungen mit Fremd-DNA zu vermeiden. Alle für den PCR-Ansatz verwendeten Reagenzien werden daher stets portioniert, zum Teil mit UV bestrahlt und bis zum Verbrauch bei -20°C gelagert um bei evtl. Verunreinigungen nicht die gesamte Lösung verwerfen zu müssen.

#### DOP-Primer:

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

(Zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Birch-Hirschfeld; Inst. für Virologie der FSU Jena)

→ wurde in einer Endkonzentration von 5 µM eingesetzt.

#### Nukleotide:

Aus den einzelnen Nukleotiden (GeneAmp® dNTP's; Perkin Elmer) dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 mM) wurde im Verhältnis 1:1:1:1 (Endkonzentration je 2,5 mM) eine Gebrauchslösung hergestellt.

DNA-Polymerasen und Puffer:

AmpliTa<sup>®</sup> DNA-Polymerase Stoffel Fragment (Perkin Elmer; 10 U/μl) wird zusammen mit dem dazugehörigen Stoffel Fragment Puffer (10x) und MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM) gebrauchsfertig geliefert.

Sequenase<sup>™</sup> Version 2.0 DNA-Polymerase (Amersham; 13 U/μl) wird gemeinsam mit *Sequenase Buffer* und *Sequenase Dilution Buffer* als gebrauchsfertige Lösung eingesetzt.

A. dest.:

Für alle PCR-Lösungen wird steriles, pyrogenfreies A. dest. (Ampuva<sup>®</sup>, Fresenius) verwendet.

**Anzusetzende PCR-Lösungen:**Lösung A (Endvolumen 5μl):

|                  | <b>Stammlösung</b> | <b>Endkonzentration</b> | <i>pro Ansatz</i> |
|------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|
| A. dest.         |                    |                         | 3,37 μl           |
| Sequenase Puffer | 5x                 | 0,6x                    | 0,6 μl            |
| Primer (DOP)     | 40 μM              | 5 μM                    | 0,63 μl           |
| dNTP's           | à 2,5 mM           | 200 μM                  | 0,4 μl            |

- Pro Ansatz werden ca. 100-200 ng der DNA-Probe, bzw. die Gesamtmenge der mikroseziierten DNA-Fragmente eingesetzt und das entsprechende Volumen von der Menge des einzusetzenden A. dest. Volumens abgezogen.
- Zur Durchführung aller PCR-Reaktionen wird ein PCR-Gerät (Thermocycler) mit beheiztem Deckel (PTC 200; Biozym, MG Research) verwendet.
- Werden die Versuche in einem Gerät ohne beheizten Deckel durchgeführt und die Lösungen zum Verdunstungsschutz mit Öl überschichtet, muss die Pufferkonzentration auf 1x statt 0,6x erhöht werden.
- Die PCR wird unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, die zuvor zur Zerstörung von Fremd-DNA mindestens 20 min mit UV bestrahlt wurde.

Nach Zugabe der Sonden-DNA wird die PCR mit einem Denaturierungsschritt gestartet.

Da die in den „low temperature“ Zyklen verwendete Sequenase thermolabil ist und bei 92°C inaktiviert würde, wird der Enzym-Mix erst nach diesem Schritt zugegeben.

Lösung B:

(Enzym-Mix für die „low temperature“ Zyklen)

|                                  | <b>Stammlösung</b> | <b>Endkonzentration</b> | <b>Pro Ansatz</b> |
|----------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|
| Sequenase                        | 13 U/μl            | 1,6 U/μl                | 0,25 μl           |
| <i>Sequenase Dilution Buffer</i> |                    |                         | 1,75 μl           |

- Zum Ansatz werden nach jedem Denaturierungsschritt 0,25 ml dieser Lösung zugegeben
- Die Zugabe erfolgt bei der *annealing*-Temperatur von 25°C für 2'20.
- Bei der ersten Amplifikation von mikroseziierten Sonden werden 8 „low temperature“ Zyklen mit Sequenase durchgeführt, da hier die durchschnittlich eingesetzte DNA-Konzentration im Femtogramm-Bereich liegt.
- Wird mit isolierter DNA (ca. 100-200 ng) gearbeitet, haben sich 3 „low temperature“ Zyklen als ausreichend erwiesen.

Den 3 bzw. 8 „*low temperature*“ Zyklen schließen sich 32 „*high temperature*“ Zyklen an. Zur Volumenvergrößerung wird der Probe zuerst eine Lösung ohne Enzym zugegeben und ein Denaturierungsschritt angeschlossen. Somit können die Primer nicht über ihre degenerierte Sequenz untereinander binden.

Lösung C (Endvolumen 50 µl; Zugabe 45 µl):

|                   | Stammlösung | Endkonzentration | Pro Ansatz |
|-------------------|-------------|------------------|------------|
| <i>A. dest.</i>   |             |                  | 34,22 µl   |
| Stoffel Fragment  | 10x         | 1x               | 5 µl       |
| Puffer            |             |                  |            |
| dNTP's            | à 2,5 mM    | 220 µM           | 4,4 µl     |
| Primer (DOP)      | 40 µM       | 1,1 µM           | 1,38 µl    |
| MgCl <sub>2</sub> | 25 mM       | 2,5 mM           | 5 µl       |

- Die Zugabe von 45 µl erfolgt bei einer Temperatur von 30°C für 2'20 gefolgt von einem Denaturierungsschritt bei 92°C.

Lösung D (Enzymlösung):

Zur Durchführung der „*high temperature*“ Zyklen wird die thermostabile AmpliTaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase (Stoffel Fragment) (Perkin Elmer) verwendet.

|   | Stammlösung | Endkonzentration | Pro Ansatz |
|---|-------------|------------------|------------|
| <i>A. dest.</i>                         |             |                  | 4,9 µl     |
| Stoffel Fragment                        | 10x         | 1x               | 0,7 µl     |
| Puffer                                  |             |                  |            |
| MgCl <sub>2</sub>                       | 25 mM       | 2,5 mM           | 0,7 µl     |
| AmpliTa <sup>®</sup> (Stoffel Fragment) | 10 U/µl     | 1 U/µl           | 0,7 µl     |

- Zu jedem Ansatz wird nach der Denaturierung 5 µl dieser Lösung bei einer *annealing* Temperatur von 56°C für 2'20 zugegeben.
- Da für die folgenden Zyklen eine wesentlich höhere *annealing* Temperatur gewählt wurde, werden hier die während der „*low temperature*“ Zyklen synthetisierten DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert.
- Da die verwendete Polymerase im Gegensatz zur Sequenase thermostabil ist, ist eine einmalige Zugabe im ersten der 20-30 „*high temperature*“ Zyklen ausreichend.

### **b) Ablauf der DOP-PCR :**

(Protokoll nach Rubtsov *et al.*, 1996 modifiziert nach Senger *et al.*, 1998)

| Reaktionsschritt | Temperatur                                  | Zeit     | Erläuterung  |
|------------------|---|----------|--|
| 1                | 92°C  | 5 min    | Denaturierung  |
| 2                | 25°C  | 2'20 min | <i>annealing</i> ; Zugabe Sequenase-Lösung           |
| 3                | 34°C  | 2 min    | Elongation   |
| 4                | 90°C  | 1 min    | Denaturierung  |
| 5                | Zu Schritt 2; 2x (nach Mikrosezierung → 7x) |          | Es erfolgen die weiteren 2 (bzw. 7) Sequenase-Zyklen |
| 6                | 30°C  | 2'20 min | Zugabe 45 µl Lösung C                                |
| 7                | 92°C  | 1 min    | Denaturierung  |
| 8                | 56°C  | 2'20 min | <i>annealing</i> ; Zugabe                            |

|    |                                |                 |   |
|----|--------------------------------|-----------------|---|
|    |                                |                 | Enzymlösung D   |
| 9  | 70°C                           | 2 min           | Elongation  |
| 10 | Erwärmung auf 74°C;<br>0,1°C/s |                 |   |
| 11 | 92°C                           | 1 min           | Denaturierung   |
| 12 | 56°C                           | 1 min           | <i>annealing</i>  |
| 13 | 70°C                           | 2 min           | Elongation  |
| 14 | Erwärmung auf 74°C;<br>0,1°C/s |                 |   |
| 15 | Zu Schritt 11; 31x             |                 | Es erfolgen die weiteren 31 „ <i>high temperature</i> .“ Zyklen |
| 16 | 72°C                           | 10 min          | Elongation  |
| 17 | 4°C                            | <i>for ever</i> | Ende der PCR  |

- Für die Elongation während der „*low temperature*“ Zyklen wurde der Thermocycler auf 34°C programmiert. Aufgrund des verwendeten Heizdeckels (der eine höhere Temperatur als der Thermoblock annimmt) wurde in der Probe trotzdem die erforderliche Temperatur von 37°C erreicht.
- Bei Schritt 10 und 14 soll durch die langsame Erwärmung eine Optimierung der Elongation erreicht werden.
- Es empfiehlt sich, während der Lösungszugaben die Reaktionsgefäße nicht aus dem Thermocycler zu nehmen, um die Temperatur der Probe möglichst konstant zu halten.

Die mittels DOP PCR amplifizierte Sonden werden mit EDTA (Endkonzentration 5 mM) versetzt und bei –20°C gelagert. Da ein häufiges Auftauen und wieder Einfrieren auf Dauer der DNA schadet, empfiehlt es sich, die DNA-Lösungen vor dem Einfrieren zu portionieren.

### 2.9.3. Markierung der DNA-Sonden

Die amplifizierte DNA-Sonden wurden entweder mittels einer sogenannten Nick-Translation oder über eine zweite PCR (*labeling* PCR) markiert.

Die Markierung ist sowohl mit indirekten Hapten-gekoppelten dUTP's, wie das Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Biotin-dUTP) und Digoxigenin-11-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Digoxigenin-dUTP) als auch mit sogenannten direkten, Fluorochrom-gekoppelten Nukleotiden möglich.

#### **a) Markierung mittels *labeling* PCR:**

##### **Verwendete Lösungen:**

###### Nukleotide (*label Mix*):

Es wurde eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 2 mM für dATP, dCTP, dGTP und 1 mM für dTTP hergestellt.

Das dTTP wird in einer geringeren Konzentration eingesetzt, damit das dargebotene, markierte dUTP besser in den DNA-Strang eingebaut wird.

###### DOP-Primer:

Er wurde in einer Endkonzentration von 2 µM eingesetzt.

###### DNA-Polymerase und Puffer:

AmpliTaQ<sup>®</sup> DNA-Polymerase (Perkin Elmer; 5 U/µl) wird genauso wie der dazugehörige 10x PCR Puffer (ohne MgCl<sub>2</sub>) eingesetzt wie vom Hersteller geliefert.

Die hier zur Markierung der DNA-Sonden verwendete PCR wurde mit dem gleichen (DOP-) Primer wie die Sondenamplifizierung durchgeführt. Als Enzym wurde hier die thermostabile AmpliTaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase (Perkin Elmer) verwendet.

Das PCR-Protokoll entsprach im Wesentlichen den „high temperature“ Zyklen der initialen DOP PCR.

Der Ablauf der Markierungs-PCR (Thermocycler-Protokoll) war folgendermaßen:

| Reaktionsschritt | Temperatur                       | Zeit            | Erläuterung      |
|------------------|----------------------------------|-----------------|------------------|
| 1                | 94°C                             | 3 min           | Denaturierung    |
| 2                | 92°C                             | 1 min           | Denaturierung    |
| 3                | 56°C                             | 1 min           | <i>annealing</i> |
| 4                | 72°C                             | 2 min           | Elongation       |
| 5                | Erwärmung auf 74°C;<br>0,1°C/s   |                 |                  |
| 6                | Zu Schritt 2; 19x<br>(bzw. 29x)* |                 |                  |
| 7                | 72°C                             | 5 min           | Elongation       |
| 8                | 4°C                              | <i>for ever</i> | Ende der PCR     |

\*Wählt man eine höhere Anzahl von Zyklen, wird das letztendliche Hybridisierungssignal meist stärker, es kann aber auch zur Verstärkung von unspezifischen Hintergrundsignalen kommen.

#### Ansatz für eine Markierungs-PCR:

|                       | Stammlösung | Endkonzentration | Pro Ansatz |
|-----------------------|-------------|------------------|------------|
| <i>A. dest.</i>       |             |                  | 11,88 µl   |
| 10x PCR Puffer        | 10x         | 1x               | 2 µl       |
| MgCl <sub>2</sub>     | 25 mM       | 2,5 mM           | 2 µl       |
| markierte Nukleotide* |             |                  |            |
| Biotin-/Dig-dUTP      | 1 mM        | 40 µM            | 0,8 µl     |
| dNTP's (label Mix)**  | 10x         | 1x               | 2 µl       |
| Primer (DOP)          | 40 µM       | 2 µM             | 1 µl       |
| AmpliTaq <sup>®</sup> | 5 U/µl      | 0,03 U/µl        | 0,12 µl    |

- Es wurde jeweils 1,5- 2 µl der amplifizierten DNA-Bank eingesetzt.
- Wird von einem Markiertem Nukleotid mehr als 0,8 µl eingesetzt, muß die entsprechende Menge vom Volumen des *A. dest.* abgezogen werden.

\*Die direkt, also Fluorochrom-markierten Nukleotide wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

|  | <i>Endkonzentration</i> |
|--|-------------------------|
| SpectrumGreen-dUTP (Vysis)                           | 40 µM                   |
| SpectrumOrange-dUTP (Vysis)                          | 20 µM                   |
| SpectrumRed-dUTP (Vysis)                             | 20 µM                   |
| Rhodamin110-dUTP (Perkin Elmer)                      | 40 µM                   |
| Fluorescein-12-dUTP (Roche)                          | 40 µM                   |
| TexasRed-12-dUTP (Molekular Probes)                  | 50 µM                   |
| Diethylaminocumarin-5-dUTP (DEAC)(NEN Life Sciences) | 100 µM                  |

→ Die grafische Darstellung der Absorptions- und Emissionswellenlängen für die einzelnen Fluorochrome ist im Anhang in Abb. 8.1. und 8.2. gezeigt.

\*\* Es hat sich als günstig erwiesen, zum Markieren mit DEAC ein Nukleotid-Gemisch aus  
 - jeweils 40 µl dATP, dCTP, dGTP 10 mM (Endkonzentration 200 µM)  
 - und 28 µl dTTP 10 mM (Endkonzentration 140 µM) mit  
 - 52 µl *A. dest.* (*Ampuva*<sup>®</sup>)

und zum markieren von Zentromeren mit SpectrumOrange-dUTP und SpectrumGreen-dUTP den für die Amplifikation verwendeten Nukleotid-Mix zu verwenden.

### **b) Die Nick-Translation**

Neben der eben beschriebenen PCR Methode zur Markierung von DNA-Sonden kann alternativ auch eine Nick-Translation (Rigby *et al.*, 1977) verwendet werden. Um markierte Nukleotide mittels Nick-Translation in die DNA einzubauen werden am DNA-Doppelstrang durch eine DNase I an statistisch verteilten Stellen Einzelstrangbrüche; sogenannte „nicks“ gesetzt. Die so entstehenden freien 3'- und 5'-Enden nutzt die DNA-Polymerase für die Synthese eines neuen komplementären DNA-Strangs ausgehend vom freien 3'-OH-Ende. Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der eingesetzten DNA-Polymerase ermöglicht durch den Abbau der Nukleotide in Syntheserichtung den Einbau markierter Nukleotide durch die Polymerase.

Im Unterschied zur PCR Methode wird hier für ein vergleichbar starkes FISH Signal mehr Ausgangsmenge an DNA benötigt, da während dieser Reaktion keine Amplifikation der Proben-DNA stattfindet.

In unserem Fall wurde jeweils ca. 1 µg DNA als Ausgangsmenge eingesetzt.

Es ist mittels Nick-Translation ebenfalls möglich, die DNA indirekt mit Biotin- oder Digoxigenin-dUTP zu markieren. Es sind außerdem auch Kits für eine direkte Markierung mit Fluorochromen kommerziell erhältlich. Diese kamen im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht zum Einsatz.

Es wurde hier entweder der BIO- oder der DIG-Nick-Kit der Firma Boehringer verwendet. Im Translationsmix des Kits sind bereits enthalten:

- DNA-Polymerase I
- DNase
- 0,17 mM (dTTP) bzw. 0,25 mM Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP)
- 0,08 mM Biotin-16-dUTP (oder Digoxigenin-11-dUTP)

Das Protokoll für eine Nick-Translation sah folgendermaßen aus:

#### **Pro Ansatz:**

1 µg Sonden-DNA

4 µl Biotin- bzw. Digoxigenin-Nick-Mix

> auf 20 µl mit *A. dest.* (*Ampuva*<sup>®</sup>) auffüllen

- 75 –90 min bei 15°C inkubieren
- Inaktivierung des Enzyms: 10 min auf 65°C (oder mittels Zugabe von Stop-Mix)

Verwendet man zum Stoppen der Reaktion Stop-Mix, empfiehlt es sich die überschüssigen Nukleotide über eine Sephadex-Säule zu entfernen.

Nach Inaktivierung des Enzyms 10 min bei 65°C hat sich eine anschließende Alkohol-Fällung bewährt.

#### **Mit Nicktranslation wurden folgende Sonden markiert:**

→ Zentromer- und BAC Sonden, die auf ihre Spezifität hin getestet werden sollten,

→ Zentromer 15 für das acro-cenM-FISH Sonden Set (siehe 3.1.3.2.)

Alle übrigen Sonden wurde in der Regel mittels DOP PCR amplifiziert und markiert.

#### **Nicktranslation für Zentromer 15 in Biotin:**

16µl DNA (~ 50µg/µl)

+ 4µl Biotin-Nick Translation KIT

→ 1 h und 15 min bei 15°C

→ 10 min bei 65°C Enzyminaktivierung

### 2.9.4. DNase Behandlung

Da die nach Markierung mittels DOP PCR erhaltenen Fragmentgrößen von ca. 500 bp als nicht optimal für Hybridisierung eingeschätzt wurden, schloss sich für die Sonden, die für das acro-cenM-FISH (siehe 3.1.3.2.) Sonden Set eingesetzt wurden nach der Markierung ein Verdau mit DNase an. Es wurde dadurch eine Fragmentgröße von ca. 200- 300 bp erreicht.

#### Verwendete Lösungen:

##### DNase-Lösung

DNase lösen in 1 ml H<sub>2</sub>O mit 1 ml Glycerol = Stocklösung (10 U/μl)

Gebrauchslösung: 1 μl DNase Stocklösung + 99 μl A. dest. (Ampuva®)

##### Pufferlösung

500 μl 10x PCR- Puffer (Perkin Elmer)

100 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Endkonzentration 5 mM)

#### Ansatz:

37,5 μl DNA markierte DNA

+ 150 μl Puffer (incl. MgCl<sub>2</sub>)

+ 60 μl A. dest.

+ 2,5 μl DNase (0,1 U/μl)

→ 20min bei 37°C

→ 10min bei 65°C (Deaktivierung der DNase)

Die Probe wurde anschließend wie unter 2.4.1. beschrieben gefällt.

→ *Neuere Vergleiche haben jedoch gezeigt, dass auch ohne die Enzymbehandlung sehr gute Signale ohne unspezifische Hintergrundsignale erzielt werden können.*

→ *Zur Abtrennung der übergroßen Fragmente kann die Sonde, falls notwendig, vor dem Auftragen kurz zentrifugiert werden und die gewünschte Probenmenge aus dem Überstand entnommen werden (Dr. V. Trifonov, persönliche Mitteilung)*

### 2.9.5. Reamplifizierung bereits DOP-amplifizierter Sonden

Im Anschluss an die initiale DOP-PCR wurde meist eine oder mehrere Reamplifizierungs-PCR durchgeführt, um möglichst viel Probenmaterial für Versuche zur Verfügung zu haben ohne auf die DOP-amplifizierte Originallösung zugreifen zu müssen.

Die Reamplifizierung wurde bei allen YAC-, PAC-, und BAC Proben und bei allen Sonden, die mittels Mikrosezierung gewonnen wurden, durchgeführt.

Der Ansatz erfolgte (in einem Probenvolumen von 50 μl) folgendermaßen:

|  | Stammlösung | Endkonzentration | Pro Ansatz |
|--|-------------|------------------|------------|
| A. dest.                                   |             |                  | 34,25 μl   |
| Stoffel Fragment<br>Puffer                 | 10x         | 1x               | 5 μl       |
| MgCl <sub>2</sub>                          | 25 mM       | 2,5 mM           | 5 μl       |
| AmpliTaq® Polymerase<br>(Stoffel Fragment) | 1 U/μl      | 0,1 U/μl         | 0,5 μl     |
| dNTP's                                     | 2,5 mM      | 0,2 mM           | 4 μl       |
| Primer (DOP)                               | 40 μM       | 1 μM             | 1,25 μl    |

→ *Der Ablauf der Reamplifizierungs-PCR entsprach im Wesentlichen dem der Markierungs-PCR, statt 20 „high temperature“ Zyklen wurden hier jedoch 30 Zyklen durchgeführt.*



| Reaktionsschritt | Temperatur                     | Zeit            | Erläuterung      |
|------------------|--------------------------------|-----------------|------------------|
| 1                | 94°C                           | 3 min           | Denaturierung    |
| 2                | 92°C                           | 1 min           | Denaturierung    |
| 3                | 56°C                           | 1 min           | <i>annealing</i> |
| 4                | 72°C                           | 2 min           | Elongation       |
| 5                | Erwärmung auf 74°C;<br>0,1°C/s |                 |                  |
| 6                | Zu Schritt 2; 29x              |                 |                  |
| 7                | 72°C                           | 5 min           | Elongation       |
| 8                | 4°C                            | <i>for ever</i> | Ende der PCR     |

### 2.9.6. Reinigung der markierten DNA durch Alkohol-Fällung

Nach der Markierung der DNA durch Nick-Translation oder durch eine *label*-PCR ist es notwendig, die ungebundenen Nukleotide zu entfernen. Dies erfolgt meist durch eine Alkohol-Fällung, ist jedoch auch über eine Aufreinigung über eine Sephadex-Säule möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ausschließlich die Alkohol-Fällung angewendet. Der Ablauf der Alkohol-Fällung wurde unter 2.4.1. bereits beschrieben.

## 2.10. Durchführung der Untersuchung auf uniparentale Disomie (UPD)

Zur Bestimmung des Vorliegens einer uniparentalen Disomie (UPD) wurden jeweils Mikrosatelliten-Analysen der Eltern und des Kindes durchgeführt. Abhängig von der Größe des zu testenden Bereiches (Chromosoms) kamen unterschiedliche Primer für unterschiedliche Anzahlen von Satellitenbereichen zum Einsatz.

Die Untersuchungen zur UPD wurden im Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena in der molekular-genetischen Arbeitsgruppe unter Leitung von Dr. F. von Eggeling durchgeführt.

→ Eine UPD galt als ausgeschlossen, wenn mindestens ein Mikrosatellitenmarker informativ war und eine normale Verteilung zeigte.

### 2.10.1. Isolation der DNA

Als Untersuchungsmaterial diente mit EDTA versetztes Frischblut bzw. Fibroblasten und bei ungeborenen Kindern Fruchtwasserproben, die als Frischmaterial oder als bereits fixierte Zellsuspension vorlagen.

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Isolations-Kit der Firma QIAGEN nach Vorschrift des Herstellers.

- 200 µl Probenmaterial, 200 µl Puffer AL und 20 µl Protease gut mischen und 10 min bei 56°C inkubieren
- kurz zentrifugieren bei 8000 U/min
- mit 200 µl absolutem Ethanol versetzen, gut mischen
- und nochmals kurz zentrifugieren bei 8000 U/min
- Gemisch auf Säule geben und bei 8000 U/min 1 min zentrifugieren
- Säule auf eine neues *tube* stellen und mit 500 µl Puffer AW1 waschen
- bei 8000 U/min 1 min zentrifugieren
- Säule auf eine neues *tube* stellen und mit 500 µl Puffer AW2 waschen
- 3 min bei 13000 U/min zentrifugieren und nach weiteren 5 min
- ca.100 µl AE Puffer (60°C) auf die Säule geben und 5 min bei RT inkubieren
- 1min bei 8000 U/min zentrifugieren

→ Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels Photometer wie unter 2.7.2. beschrieben.

### 2.10.2. Durchführung der PCR

In die PCR wurden jeweils 50 ng DNA von der Mutter (M), dem Vater (V) und dem Kind (K) eingesetzt.

| <u>PCR-Lösung:</u>                 | <i>Endkonzentration</i> |
|------------------------------------|-------------------------|
| 1,25 µl 10x Puffer (Eurogentec)    | 1x                      |
| 0,8 µl MgCl <sub>2</sub>           | 1,5 mM                  |
| 0,5 µl dNTP's                      | 150 µM                  |
| 0,38 µl Primer                     | 0,2 mM                  |
| 0,12 µl TaqPolymerase (Eurogentec) | 0,5 U/µl                |

→ Die Anzahl der eingesetzten Primerpaare hing im Wesentlichen von der Größe des zu untersuchenden Bereichs bzw. Chromosoms ab.

→ Es wurde jeweils mit zwei spezifischen Primern für den jeweiligen Mikrosatellitenbereich gearbeitet, die hier mit Primer *up* (*upstream*) und Primer *low* (*downstream*) bezeichnet werden.

→ Die Primer wurden markiert mit einem Infrarotfarbstoff (IRD800; MWG-Biotech).

| <b>Ansatz<br/>(in µl)</b> | M/V/K | M/V/K | M/V/K | M/V/K |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 10xPuffer                 | 1,25  | 1,25  | 1,25  | 1,25  |
| MgCl <sub>2</sub>         | 0,8   | 0,8   | 0,8   | 0,8   |
| Polymerase                | 0,12  | 0,12  | 0,12  | 0,12  |
| dNTPs                     | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   |
| Primer 1:                 |       |       |       |       |
| up                        | 0,38  |       |       |       |
| low                       | 0,38  |       |       |       |
| Primer 2:                 |       |       |       |       |
| up                        |       | 0,38  |       |       |
| low                       |       | 0,38  |       |       |
| DNA<br>50ng               |       |       |       |       |
|                           | 12,5  | 12,5  | 12,5  | 12,5  |

Der Thermocycler wurde für die PCR mit folgenden Parametern programmiert:

- 95°C            3 min
- 95°C            45 s
- 55°C            45 s
- 72°C            45 s
- Wiederholung Schritt 2-4 → 24 mal
- 4°C              *for ever*

### 2.10.3. Elektrophorese der gewonnenen PCR Produkte

#### Herstellung des Polyacrylamid-Gels

Die Glasplatten der Vorrichtung zur Halterung des Gels wurden gründlich mit *A. dest.* und Ethanol gereinigt und silanisiert mit 165 µl Silan (Stocklösung; Merck) und 5 µl 10 %iger Essigsäure.

Zur Herstellung des Gels werden benötigt:

- 20 ml Sequagel XR (Merck)
- 5 ml Sequagel *Complete* und
- 200 µl 10%iges Ammoniumpersulfat

→ Das Gel muss vor Beginn der Elektrophorese mindestens 30 min polymerisieren und wird vor Beladung mit den Proben denaturiert.

### Durchführung der Elektrophorese

#### Load Mix

|         |                    |
|---------|--------------------|
| 4,75 ml | 95% Formamid       |
| 200 µl  | 0,5 M EDTA         |
| 25 µl   | 10% Bromphenolblau |
| 25 ml   | 10% Xylencyanat    |

→ Die DNA Proben wurden 1:1 mit Formamid-haltigem *Load Mix* versetzt und vor dem Auftragen 3 min bei 80°C denaturiert.

→ Es wurde je 2 µl dieser Probemischung aufgetragen.

→ Die Elektrophorese wurde am LICOR DNA 4000 *sequencer* durchgeführt; die markierte DNA wird hier mittels Infrarot-Laserdiode detektiert.

## 2.11. Verwendete Sonden

### A) Zentromersonden:

#### kommerziell erhältliche Einzel-Sonden

Es kamen zum Einsatz folgende Sonden der Firmen

→ Firma **Vysis** → jetzt Firma **ABBOTT**,

→ Firma **ONCOR** → jetzt Firma **QBiogene**.

Zentromersonden der Einzelnen Chromosomen = vorwiegend Alphasatelliten-sonden in SpectrumGreen und/oder in SpectrumOrange markiert:

- Cep 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 18, 20, X und Y

Zentromersonden spezifisch für mehrere Chromosomen (aufgrund großer Sequenzhomologie):

- Cep 1/5/19, 13/21, 14/22

Für die Chromosomen 15, 16 kamen zusätzlich folgende Satellitenproben zum Einsatz:

- Klassische Satellitenprobe für die Zentromerregion von Chromosom 15 (D15Z1) und

Sonden für die Heterochromatinbereiche von Chromosom 16 und Y:

- Cep 16 (D16Z3) und Y satIII.

Für die Zentromerregion der Chromosomen 8, 12 und 22 wurden überwiegend selbst markierte BAC Sonden verwendet. (s.u.)

→ Die Hybridisierung der Zentromersonden erfolgte nach folgendem Schema:

| Sonden                    | Firma            | Präparation d. Sonden   | Denaturierung d. Sonden          | Detektion  |
|---------------------------|------------------|---|----------------------------------|--|
| <b>Zentromer - Sonden</b> | VYSIS (ABBOTT)   | 1 µl CEP Sonde<br>+ 2 µl Wasser<br>+ 7 µl Hybridisierungspuffer | 5 min bei 72°C<br>→ 4°C for ever | 2 min /68°C<br>in 0,4xSSC<br>1 min /RT<br>in 4x SSCT<br>Alkoholreihe     |
| <b>Zentromer - Sonden</b> | ONCOR (QBiogene) | 2 µl Sonden<br>+ 8 µl Hybridisierungspuffer                     | 5 min bei 72°C<br>→ 4°C for ever | 2 min /65- 68°C<br>in 0,4xSSC<br>1 min /RT<br>in 4x SSCT<br>Alkoholreihe |

## **B) Locus-spezifische Sonden**

### **1. kommerziell erhältliche Sonden**

Lokus-spezifische (LSI-) Sonden sind für verschiedene Genorte kommerziell erhältlich. Es gibt zahlreiche Sonden für Mikrodeletionssyndrome und Sonden für chromosomale Regionen, die Onkogene beinhalten. Im Rahmen dieser Arbeit kamen überwiegend direkt markierte Sonden der Firma VYSIS zum Einsatz, die folgendermaßen präpariert wurden:

| <b>Sonden</b>                         | <b>Firma</b>   | <b>Präparation d. Sonden</b>                        | <b>Denaturierung d. Sonden</b>                            | <b>Detektion</b>   |
|---------------------------------------|----------------|---|---|--|
| <b>LSI-Sonden</b> für Mikrodeletionen | VYSIS (ABBOTT) | 1 µl LSI Sonde<br>+ 2 µl Wasser<br>+7 µl LSI Puffer | 5 min bei 72°C<br>→ 4°C <i>for ever</i>                   | 2 min /56°C<br>in 0,4xSSC<br>1 min /RT<br>in 4xSSCT<br>Alkoholreihe  |
| <b>LSI und Zentromere</b> für UFW     | VYSIS (ABBOTT) | 8 µl Sonde entnehmen                                | <i>Keine Denaturierung</i><br>→ direkt auf OT pipettieren | 2 min /56°C<br>in 0,4xSSC<br>1 min /RT<br>in 4x SSCT<br>Alkoholreihe |

### **2. YAC-, Cosmid- und BAC-Sonden**

Neben dem Einsatz von kommerziellen Sonden ist es möglich, für Forschungszwecke auch von nahezu jeder Region im menschlichen Genom BAC-, YAC-, oder Cosmid-Sonden zu bestellen, zu isolieren und zu markieren. Auf diese Weise wurden innerhalb dieser Arbeit folgende Sonden gewonnen:

- Sonden für das YAC/BAC MCB 22 (siehe Anhang Tabelle 8.1.),
- zentromernahe YAC- und BAC Sonden zur Erstellung der subcenM-FISH Sonden Sets (siehe Anhang Tabelle 8.2.),
- Subtelomersonden (siehe Anhang Tabelle 8.7.)

#### **Subtelomersonden-Gesamtüberblick:**

Zum Nachweis der einzelnen Subtelomere und ihrer Veränderungen wurde sowohl

→ kommerziell erhältliche Subtelomersonden (SpectrumGreen; QBiogene) als auch

→ aus PACs und Cosmiden isolierte, selbst amplifizierte und markierte Sonden verwendet.

Diese wurden uns freundlicherweise von Dr. L. Kearney und Dr. H. Engels zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um die sogenannten „Sonden der 1.Generation“ (Flint *et al.*, 1996) und die der „2. Generation“ (Brown *et al.*, 2000, Knight und Flint 2000).

Die Zugehörigkeit, Herkunft und Qualität der einzelnen Sonden ist im Anhang in Tabelle 8.7. aufgelistet.

| Sonden              | Firma                | Präparation d. Sonden   | Denaturierung d. Sonden   | Detektion  |
|---------------------|----------------------|---|---|--|
| <b>Telomere</b>     | QBiogene             | 2 µl Sonde<br>+8 µl Hybridisierungspuffer + 1 µl der jeweiligen Zentromersonde. | 5 min bei 72°C<br>→ 4°C <i>for ever</i>                           | 2 min /65- 68°C,<br>in 0,4xSSC,<br>1 min /RT,<br>in 4x SSCT,<br>Alkoholreihe   |
| <b>Sub-telomere</b> | isolierte BAC Sonden | 4 µl Sonde<br>+ 25 µg Cot1DNA<br>+ 6 µl DS                                      | 5 min bei 72°C,<br>→ 4°C<br>30 min bei 37°C<br>= prähybridisieren | 3x 5 min bei 42°C,<br>50% Formamid,<br>3x 5 min 2xSSC,<br>42°C 4xSSCT RT<br>15 min blocken<br>4xSSCTM<br>Detektion 30-40'<br>5 min 4xSSCT RT<br>5 min in 1xPBS<br>Alkoholreihe |

### C) Telomersonden

Als Probe wurde hier die gebrauchsfertige Lösung des **Telomersonden-Kits** der Firma **DAKO**® verwendet.

Die Sonde ist mit FITC markiert und bindet an die Sequenz des Hexanukleotids TTTAGG, das im Telomerbereich aller Chromosomenarme mit Ausnahme der p-Arme der akrozentrischen Chromosomen vorkommt.

### D) Mikroszierungs sonden

#### whole chromosome (wcp-)/partial chromosome painting (pcp)-Sonden

Es wurden **Ganzchromosomen-Sonden** für alle menschlichen Chromosomen mittels Mikrosezierung (siehe 2.8.) von Dr. G. Senger und Dr. I. Chudoba am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena hergestellt.

→ wcp 1-22, X, Y

Es standen ebenso **Arm –spezifische Sonden** für alle Chromosomen zur Verfügung.

#### Sonden für die Herstellung der Multicolor Bänderungs (MCB) Sonden Sets

Es wurden **138 regionspezifischen Sonden** für die spätere Kombination zu Chromosomen-spezifischen MCB Sonden Sets hergestellt auf ihre Qualität und Spezifität getestet und entsprechend zu MCB Proben Sets kombiniert. An der Durchführung der Arbeiten waren neben mir selbst beteiligt: Prof. U. Claussen, Dr. A. Heller (Jena), Dr. V. Trifonov und Prof. N. Rubtsov (Novosibirsk, Rußland)

Die Zusammenstellung der jeweiligen Sonden und die Markierungsschemata sind im Ergebnisteil unter 3.1.1.1.1. gezeigt und in Mrasek *et al.*, 2001 veröffentlicht.

#### regionspezifische Sonden

Mittels Mikrosezierung wurden von Dr. G. Senger weitere für folgende chromosomale Regionen spezifische Sonden gewonnen und in dieser Arbeit eingesetzt:

| <u>→ Sonde</u> | <u>Lokalisation</u>                               | <u>Literatur</u>             |
|----------------|---|------------------------------|
| → Midi 12      | peri- und Zentromer-Bereich von Chromosom 5 und 6 | Nietzel <i>et al.</i> , 2001 |
| → Midi 18      | 9p12 bis 9q11                                     | Starke <i>et al.</i> , 2002  |
| → Midi 23      | 9p12 bis 9q22.1                                   | Starke <i>et al.</i> , 2002  |
| → Midi 36      | 9p12 und 9q13 bis 9q21.1                          | Starke <i>et al.</i> , 2002  |
| → Midi 43      | Xq11 bis q13                                      |                              |
| → Midi 54      | p-Arme akrozentrischer Chr.                       | Mrasek <i>et al.</i> , 2001  |

M-FISH Proben

Zur Herstellung des **24 Farb- oder M-FISH Sonden Sets** wurden die mittels Mikrosezierung gewonnenen *wcp* Sonden *wcp* 1-22, X und Y eingesetzt und dabei jedes Chromosom mit einer spezifischen Fluorochrom-Kombination markiert. Durch gleichzeitige Hybridisierung aller Sonden konnte mittels Software basierend auf der unterschiedlichen Markierung eine spezifische Pseudofarbe für jedes Chromosom erhalten werden (Senger *et al.*, 1998).

Zur Herstellung eines Proben Sets, das zusätzlich eine Unterscheidung der p- und q-Arme möglich macht (**25color-FISH Set**), wurde die Sonde für die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen (Midi 54) in einer zusätzlichen Farbe markiert und zum Sondenmix hinzugefügt (Mrasek *et al.*, 2001).

Hybridisierungsansätze für Sonden Sets:

| Sonden   | Firma                   | Präparation d. Sonden   | Denaturierung d. Sonden   | Detektion  |
|--|-------------------------|---|---|--|
| <b>wcp /pcp</b>  | selbst-gelabelte Sonden | 4 µl Sonde<br>+ 6 µl DS<br>auf 10µg COT1  | 5 min bei 72°C<br>→ 4°C<br>30 min bei 37°C<br>= prähybridisieren                | 2 min bei 65-68°C in<br>0,4 xSSC,<br>1 min bei RT 4x<br>SSCT, blocken 15<br>min SSCTM,<br>kurz 4x SSCT RT<br>Detektion 30-40 min<br>5 min 4xSSCTM RT<br>5min in 1xPBS,<br>Alkoholreihe   |
| <b>MCB</b><br><br><b>M-FISH/<br/>25color-<br/>FISH</b><br><br><b>subcenM-<br/>FISH</b> | selbst-gelabelte Sonden | 4 µl Sonde+<br>6 µl DS<br>auf 25 µg COT 1 DNA<br><br>→50 µg COT1 DNA<br><br>→15 µg COT1 DNA | → prähybridisieren<br><br><br>+ Zentromersonde<br>→ 5 min bei 72°C<br>→ 4°C     | 5 min bei 65-68°C<br>in 1 x SSC<br>5min RT in 4x SSCT<br>blocken 15 min<br>SSCTM<br><u>weiter siehe wcp/<br/>pcp Detektion</u><br>kann aber auch bei<br>42°C mit FA<br>gewaschen werden! |
| <b>cenM- FISH</b>  | selbst-gelabelte Sonden | CEP 5+6 mit 5 µl DS<br>eluieren<br><br>Zentromer-Mix mit 5 µl DS<br>eluieren                | → prähybridisieren<br>(10 min 37°C)<br><br>Denaturieren (s.<br>Zentromersonden) | 2 min bei 68- 70°C<br>in 0,4 x SSC<br>1 min bei RT in 4x<br>SSCTM<br><u>ohne blocken</u><br><br><u>weiter siehe wcp /<br/>pcp<br/>Detektion</u>  |
| <b>acro-cenM-<br/>FISH</b>   | selbst-gelabelte Sonden | Midi 54 mit 5 µl DS<br>eluieren<br><br>Sonden-Mix mit 5 µl DS<br>eluieren                   | → prähybridisieren<br>(10 min 37°C)<br><br>Denaturieren<br>(s. Zentromersonden) | 2 min bei 68- 70°C<br>in 0,4 x SSC<br>1 min bei RT in 4x<br>SSCTM<br><u>ohne blocken</u><br><u>weiter siehe wcp /<br/>pcp<br/>Detektion</u>  |

## III. Ergebnisse

### 3.1. Entwicklung von Verfahren zur Charakterisierung der perizentrischen Region des Menschen

Da die zu Beginn dieser Arbeit bereits etablierten FISH-Verfahren, wie bereits in der Einleitung erwähnt, in der perizentrischen Region nicht ausreichend informativ waren, wurde es zunächst notwendig, neue Techniken und/oder Sondenkombinationen zu entwickeln, mit denen es möglich war, diesen Bereich der menschlichen Chromosomen genauer zu analysieren.

#### 3.1.1. Das Multicolor-Bänderungs-Verfahren (MCB)

Zur näheren Charakterisierung von chromosomalen Aberrationen auf hoch auflösendem Niveau wurde daher zunächst das *Multicolor-Banding* (MCB), basierend auf regionspezifischen Mikrosezierungsbanken, am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena zunächst für das Chromosom 5, entwickelt (Chudoba *et al.*, 1999). Mit diesem Verfahren war es möglich, die in chromosomale Umbauten involvierten Regionen bis zu einer Genauigkeit von einigen Megabasen zu bestimmen (Liehr *et al.*, 2002b), was bis dahin mit den vorhandenen Methoden nahezu unmöglich war.

So konnten mit diesem Verfahren, nahezu unabhängig von der Länge des Chromosoms, auch kryptische, mit GTG-Bänderung nicht näher bestimmbare Aberrationen, wie Translokationen, Deletionen und Duplikationen exakt beschrieben werden (Chudoba *et al.*, 1999, Lemke *et al.*, 2001).

##### 3.1.1.1. Entwicklung von MCB Banken für den gesamten Chromosomensatz des Menschen

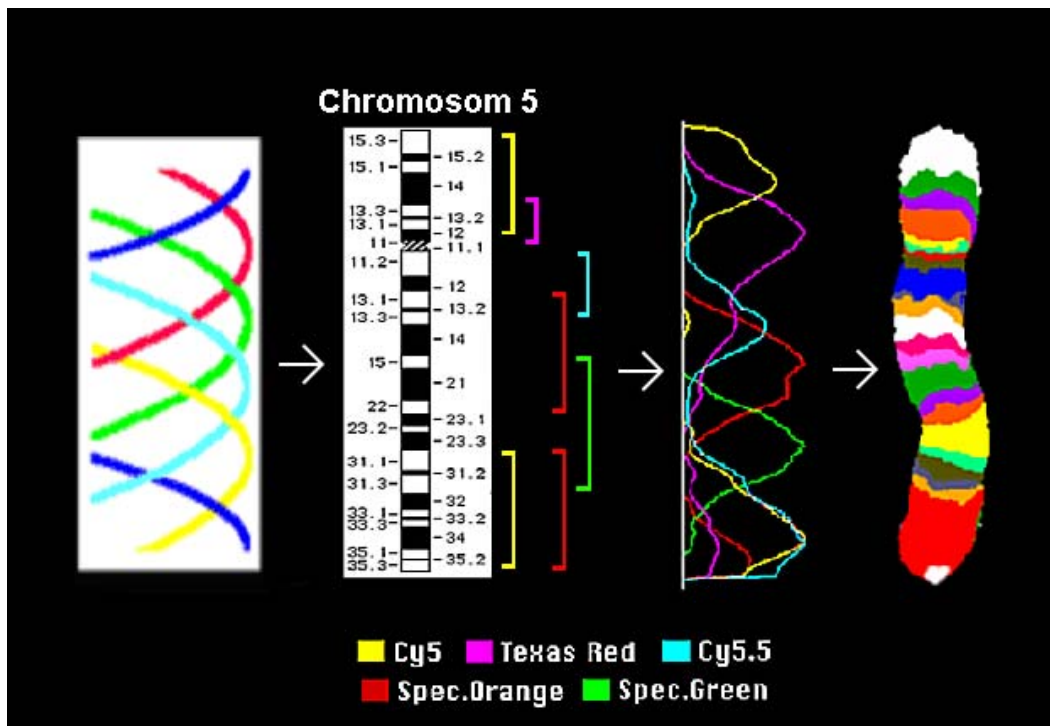
Nachdem bereits für Chromosom 5 die prinzipielle Möglichkeit der Etablierung eines reproduzierbaren hochauflösenden Bandenmusters mittels MCB-Technik gezeigt wurde, war es das Ziel, MCB Sonden Sets auch für alle übrigen menschlichen Chromosomen zu entwickeln. An dieser Arbeit sind neben mir selbst maßgeblich Dr. A. Heller, Prof. Dr. U. Claussen, Dr. V. Trifonov und Prof. Dr. N. Rubtsov beteiligt gewesen.

###### 3.1.1.1.1. Herstellung der Banken

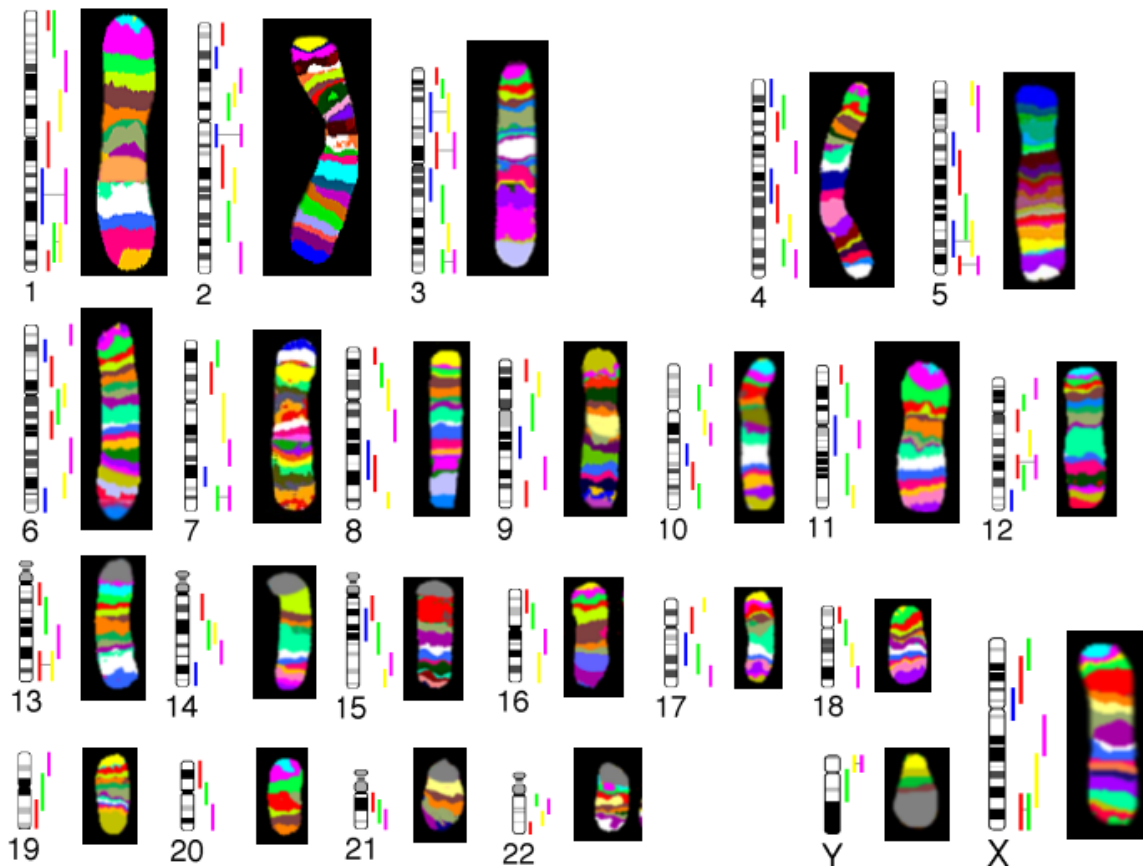
Insgesamt sind mittels Glasnadel-basierender Mikrosezierung (siehe 1.2.2.) 138 regionspezifische Banken geschnitten und mittels DOP-PCR amplifiziert und markiert worden. Es wurden pro Region für jede Mikrosezierungsbank 15-20 Fragmente gesammelt. Die Mikrosezierung ist so durchgeführt worden, dass zwischen benachbarten Regionen ein Überlappungsbereich entstand (siehe Abb.3.1.), um so ein Fluoreszenzprofil, das einer Gauß'schen Verteilungskurve nahe kommt, zu erhalten und damit eine möglichst optimale Bänderung zu erzielen (Liehr *et al.*, 2002a).

Zunächst wurde jede Bank einzeln markiert und auf ihre Spezifität und Signalstärke getestet. War ein starkes und spezifisches Signal ohne unspezifische Hintergrundsignale zu verzeichnen, folgte eine Markierung der einzelnen Banken eines Chromosoms mit unterschiedlichen Fluorochromen oder Fluorochromkombinationen und ihre Kombination zu einem Chromosom-spezifischen Sonden Set.

→ Das Markierungsschema der Sonden Sets aller Chromosomen sowie die mittels der Software über Pseudofarben erzielten Bänderungen sind in Abb.3.2. dargestellt.



**Abb. 3.1.:** Entwicklung des MCB am Beispiel des Chromosoms 5; von links nach rechts: theoretische Fluoreszenzprofile mit idealer Gauß'scher Verteilung; Ideogramm mit der Lage der Mikrosezierungsbanken ; erzielte Fluoreszenzprofile; Chromosom 5 in Pseudofarbandarstellung.



**Abb. 3.2.:** Markierungsschemata aller menschlichen Chromosomen für die jeweiligen Chromosom-spezifischen MCB Sonden Sets jeweils rechts des Ideogramms dargestellt. Daneben sind die Chromosomen nach Applikation der einzelnen Sondenmixe in Pseudofarbandarstellung zu sehen. Diese sind aus den Ergebnissen von 24 Einzelhybridisierungen zusammengestellt.

■ SpectrumGreen    ■ SpectrumOrange    ■ SpectrumRed    ■ DEAC    ■ Cy5



Mittels dieser Sonden Sets wurden bisher neben komplexen Aberrationen im Rahmen der Tumorzytogenetik (siehe Promotion A. Heller) auch verschiedene chromosomale Rearrangements im Rahmen prä- und postnataler Chromosomenanalysen durchgeführt (Liehr *et al.*, 2002a, Weise *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kam das Verfahren zur Charakterisierung der Zusammensetzung größerer Markerchromosomen (größer als 17p) (3.2.2.3.1.) und Derivatvchromosomen mit perizentrischen Rearrangements (3.2.2.1.2.) zum Einsatz.

#### **3.1.1.1.2. Möglichkeiten und Grenzen der Mikrosezierungs-basierenden MCB Sonden Sets**

Nach der Kombination der einzelnen Banken zu chromosomenspezifischen Sondenmischen und ihrer Umsetzung zu einer Bänderung mit Software-vermittelten Pseudofarben konnte in den meisten analysierten Fällen (ca. 80%; siehe Lemke *et al.*, 2001, Weise *et al.*, 2002) eine höher auflösende Bänderung als die GTG-Bänderung der Chromosomen erzielt werden (Liehr *et al.*, 2002a). Diese war in hohem Grade reproduzierbar und weitgehend unabhängig vom Kondensationsgrad der einzelnen Chromosomen, so dass eine sehr gute Anwendbarkeit auch zur Charakterisierung von Veränderungen an Chromosomen aus Knochenmark (die ja bekanntlich oft sehr kurz sind) gegeben war (siehe Promotion A. Heller).

Obwohl für die meisten Chromosomen mit diesem Verfahren eine sehr hohe Auflösung von bis zu 800 Banden pro haploiden Chromosomensatz erreicht werden konnte, zeigt das MCB insbesondere bei sehr kleinen Chromosomen, wie Chromosom 22, ein weniger auflösendes Bandenmuster der Pseudofarben von ca. 400 Banden pro haploiden Chromosomensatz. Daneben reichte die Auflösung vor allem in der zentromernahen Region oft nicht aus, um chromosomale Veränderungen auf Subbandenniveau klar zu erkennen und eine Unterscheidung der einzelnen Bereiche der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen war nicht gegeben.

Daher war es das Ziel, mittels Lokus-spezifischer Sonden basierend auf YAC- und BAC-Sonden, ein noch höher auflösendes MCB Set zu entwickeln.

#### **3.1.1.2. Entwicklung von YAC-, BAC-basierenden MCB Sonden Sets**

Aus den eben genannten Gründen entstand die Idee, eine auf YAC- und BAC-Sonden als Lokus-spezifische Sonden basierende MCB-Technik zu entwickeln, mit der es auch in Bereichen in denen das Mikrosezierungs-basierende MCB eine nur ungenügende Auflösung zeigt (wie z.B im zentromernahen Bereich der Chromosomen) möglich ist, eine genaue Aussage zu evtl. vorliegenden Veränderungen treffen zu können. Eine weitere Überlegung war, dass im Gegensatz zu den regional festgelegten durch Mikrosezierung gewonnenen MCB-Banken hier durch den Einsatz von Lokus-spezifischen Sonden die Größe und Lage der MCB-Abschnitte durch eine entsprechende Wahl der Sonden variierbar wäre.

→Es erfolgte die Zusammenstellung von YAC- und BAC-basierende MCB Sonden Sets für ein großes (Chromosom 2), ein mittelgroßes (Chromosom 13) und ein kleines menschliches Chromosom (Chromosom 22) und der Test deren Eignung im Vergleich zum Mikrosezierungs-basierenden MCB. Die Vorgehensweise wird im Folgenden am Beispiel des Chromosoms 22 dargestellt.

→Auf das YAC-und BAC-basierende MCB Sonden Set für die Chromosom 2 und 13 soll hier nicht näher eingegangen werden, da diese Arbeiten von Dr. A. Heller und Frau A. Weise durchgeführt wurden. Die Ergebnisse von Frau A. Weise wurden im Rahmen ihrer Diplomarbeit erstellt, die ich betreute. Die Ergebnisse aller 3 Untersuchungen sind in Liehr *et al.*, 2002b veröffentlicht.

### 3.1.1.2.1. Das YAC/BAC-MCB 22- Auswahl, Anzucht, Isolierung der BAC-Sonden-DNA

Die Auswahl und Zusammenstellung der gewünschten BAC und YAC Sonden erfolgte mit Hilfe des Internets unter unten genannten Adressen. Es wurde angestrebt, eine möglichst das gesamte Chromosom 22 lückenlos abdeckende Zusammenstellung von Sonden zu erhalten. Eine Auflistung aller verwendeten Sonden, ihrer Kartierung und der jeweiligen Qualität des Hybridisierungssignals ist im Anhang in Tabelle 8.1. zu finden.

**a) BAC-Sonden**, die uns von Dr. M. Rocchi <http://www.biologia.uniba.it> zur bereitgestellt wurden:

949E6  
966A8  
803G9  
768B5  
882G4  
891D12  
924C2  
765F6  
899G12  
967F10  
955E10

**b) YAC-Sonden**, die uns von Dr. J. Wirth übersandt wurden:

980H7  
374G5  
35G8  
969A9  
584H12  
920C4  
106H11  
301B10  
960C9  
226C8  
1171B8

**c) BAC Sonden** vom 2Mb BAC Set von Dr. Nigel Carter, <http://www.sanger.ac.uk> :

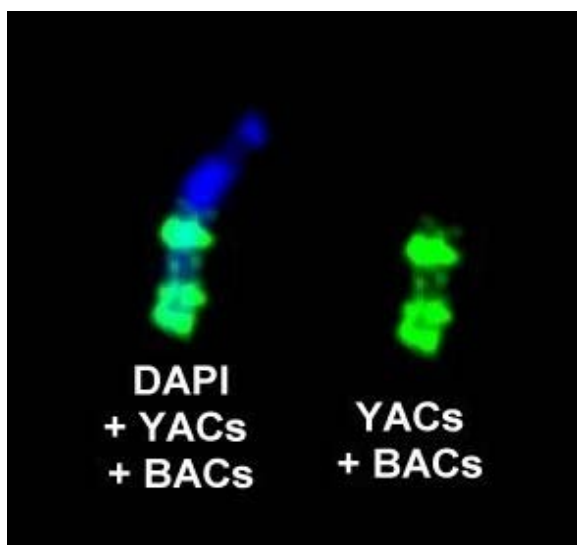
bK 115F6  
bK 154H4  
bK 433F6  
bK 526G4  
bK 322B1  
bK 221G9  
bK 150C2  
bK 229A8  
bK 250D10  
bK 397C4

### 3.1.1.2.2. Überprüfung und Kartierung der Sonden

Nach Amplifikation und Markierung wurden die Sonden einzeln auf ihre Spezifität und Signalqualität überprüft. Es sind zur Etablierung des MCB Sonden Sets ausschließlich Sonden ohne Kreuzhybridisierungen auf anderen menschlichen Chromosomen verwendet wurden. Es musste weiterhin getestet werden, ob sich mittels der genannten Sonden eine komplette Abdeckung des Chromosoms 22 erreichen lässt.

### 3.1.1.2.3. Überprüfung der Abdeckung des Chromosoms 22

Zur Überprüfung der lückenlosen Abdeckung des gesamten Chromosoms 22 durch die verwendeten Klone wurden diese zusammen auf Chromosom 22 hybridisiert. Zunächst wurde nur mit den unter a) und b) genannten Sonden gearbeitet.



**Abb. 3.3.:**

Ergebnis der Hybridisierung aller unter a) und b) aufgeführten Sonden für das Chromosom 22.

Es konnte keine vollständige Abdeckung des Chromosoms erzielt werden. Besonders große Lücken sind in 22q11.2 und in 22q13 zu finden. Die Sonden sind mit Biotin markiert und mit Avidin-FITC detektiert.

→ Da mittels des eingesetzten Sondenmixes keine ausreichende Abdeckung des Chromosoms 22 erreicht werden konnte und insbesondere im Bereich 22q11.2 und 22q13 größere Regionen ungefärbt blieben, wurden die unter c) genannten BAC-Sonden noch mit

herangezogen. Daneben wurden noch folgende, zusätzliche Sonden eingesetzt, um eine lückenlose Abdeckung zu erzielen:

- Ganzchromosomen Sonde für Chromosom 22 (*wcp 22*),
- Mikrosezierungssonde für die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen (*Midi 54*) und eine
- Zentromersonde für Chromosom 22 (*D22Z4*)

#### 3.1.1.2.4. Herstellung eines BAC basierenden MCB Sondenmixes

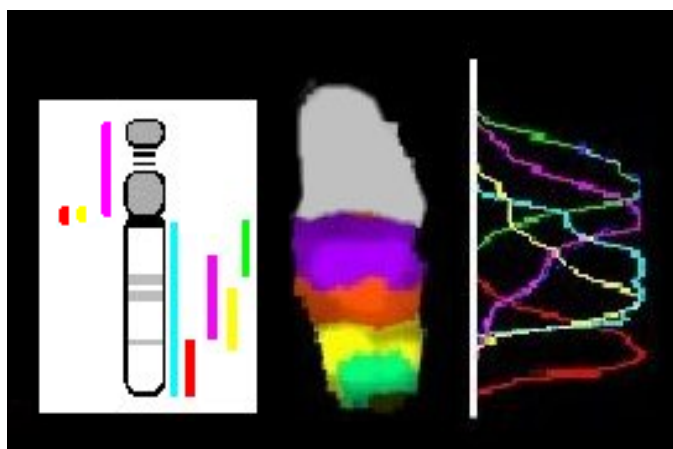
Zur Herstellung des BAC basierenden MCB Sondenmixes 22 wurden nun die YAC- bzw. BAC Sonden zu Blöcken (*contigs*) zusammengefasst und mit einem spezifischen Fluorochrom oder Hapten gelabelt. Die Sonden wurden so kombiniert, dass, ähnlich dem Mikrosezierungs-MCB, zwischen angrenzenden Blöcken Überlappungsbereiche entstehen. Dazu wurde die DNA der Sonden eines Blockes gemischt und anschließend markiert.

Folgende Sonden wurden jeweils zu einem *contig* zusammengefasst:

| <b>Block 1:</b> | <b>Block 2:</b> | <b>Block 3:</b> | <b>Block 4:</b> |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 980H7           | 374G5           | 920C4           | 960C9           |
| 966A8           | 35G8            | 891D12          | 226C8           |
| 949E6           | 969A9           | 106H11          | 1171B8          |
| 955E10          | 584H12          | 301B10          | 899G12          |
| 433F6           | 920C4           | 924C2           | 967F10          |
| 115F6           |                 | 960C9           | 250D10          |
| 221G9           |                 |                 | 397C4           |
| 374G5           |                 |                 | 229A8           |

**Markierung:** Rhodamin 110      TexasRed      Biotin      SpectrumOrange

Für eine komplette Anfärbung des gesamten Chromosoms 22 wurde noch eine *wcp 22*-Sonde zusammen mit den YAC und BAC Sonden hybridisiert. Diese wurde markiert mit Digoxigenin, welches mit anti-DIG- → **Cy 5.5** detektiert wurde. (siehe Abb. 3.4. *label*-Schema rechts des Chromosoms und dazu gehörige Profile und Pseudofarben). Eine außerdem verwendete, mittels Mikrosezierung hergestellte Sonde für die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen (*Midi 54*) wurde markiert mit → **TexasRed**. Die Zentromersonde für Chromosom 22 (*cep 22*; *D22Z4*) wurde mit Biotin und SpectrumOrange markiert und war somit mit den Farbstoffen → **Cy5** und **SpectrumOrange** belegt. (siehe Abb. 3.4.)



**Abb. 3.4.:**

Ergebnis des YAC/BAC-basierenden MCB 22 nachdem die rechts des Ideogramms dargestellten Bereiche durch Sonden abgedeckt wurden. In der Mitte ist ein markiertes Chromosom 22 in Pseudofarbendarstellung zu sehen; rechts davon die dazugehörigen Fluoreszenzprofile. Ganz links sind die Sonden dargestellt, die zur Untersuchung der Fälle mit Cat-eye-Syndrom mit herangezogen wurden.

Nach einer Hybridisierung dieses Sondenmixes konnte das Chromosom 22 weitestgehend abgedeckt und ein gleichmäßiges, spezifisches und reproduzierbares Bänderungsmuster erhalten werden, das auch im Vergleich zum Mikrosezierungsbasierenden MCB eine vergleichbare oder höhere Auflösung zeigte.

Die mittels Software erhaltenen Fluoreszenzprofile über das Chromosom 22 ließen eine gleichmäßige Verteilung der Fluorochrome erkennen (siehe Abb. 3.4.).

Mittels der erzielten Pseudofarben konnten mit diesem Sonden Set bis zu 10 unterschiedlich gefärbte Regionen differenziert werden und zur Charakterisierung von Chromosom 22-spezifischen Veränderungen wie z.B. bei Patienten mit Cat-eye-Syndrom (3.2.1.1.) herangezogen werden.

### 3.1.2. Die Methoden cenM-FISH und acro-cenM-FISH

#### 3.1.2.1. Die cenM-FISH Technik

Da die meisten kleinen Markerchromosomen, die weitestgehend stabil in der Mitose weitergegeben werden, mindestens ein Zentromer besitzen, lässt sich deren Herkunft am sichersten mittels Zentromersonden bestimmen. Zur Bestimmung dieser kleinen Fragmente wurde deshalb das sogenannte „cenM-FISH“ Verfahren entwickelt (Nietzel *et al.*, 2001), was es möglich macht, in einem Hybridisierungsschritt fast alle menschlichen Zentromerregionen unterschiedlich anzufärben.

Die Arbeiten zur Entwicklung dieser Technik wurden im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Frau Dr. A. Nietzel durchgeführt (Nietzel *et al.*, 2001), die von mir mit betreut wurde.

#### Zusammenstellung der Sonden für cenM-FISH

Da für jedes Zentromer eine spezifische Farbkombination gewählt werden musste, war es notwendig, auf den Einsatz der kommerziell erhältlichen Sonden zu verzichten, die im Anhang in Tabelle 8.3. aufgeführten Sonden zu verwenden und mit den entsprechenden Farbkombinationen über eine DOP-PCR zu markieren. Die zentromerspezifischen DNA-Sonden wurden uns freundlicherweise von Dr. M. Rocchi, Universität Bari, Italien, zur Verfügung gestellt.

Die Fluorochrome bzw. Fluorochromkombinationen, die zur Markierung der einzelnen Sonden verwendet wurden, sind in Abb. 3.5. schematisch dargestellt.

→ Eine Unterscheidung der Zentromerregionen der Chromosomen 1, 5 und 19 wurde mittels einer Mikrosezierungssonde, die die „Zentromerregion“ der Chromosomen 5 und 6 (Midi 12) anfärbt, realisiert.

→ Zur Differenzierung der Chromosomen 1 und 19 wurde eine Sonde für den heterochromatischen Bereich 1q12 (pUC 177) (von Dr. M. Rocchi) eingesetzt. Die Eingesetzte Zentromersonde 1/5/19 (pUC 13) färbte nur die Zentromere 5 und 19 deutlich an.

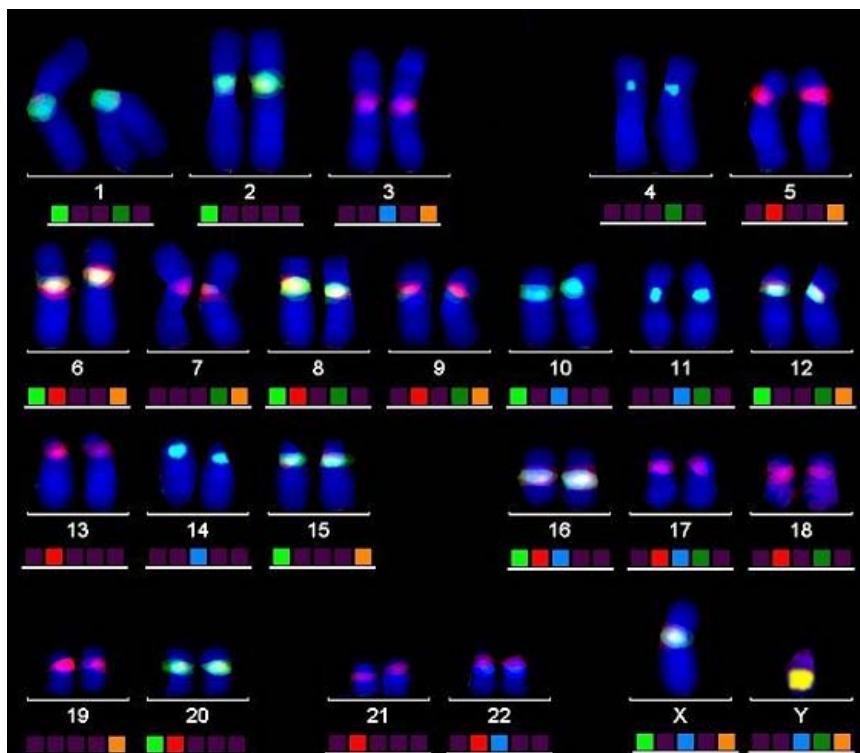
→ Die Unterscheidung der Zentromere der Chromosomen 14 und 22 wurde durch Anwendung einer Zentromersonde 22 (D22Z4) möglich.

Um den Aufwand und die Zeit zur Herstellung des Sonden Sets zu minimieren, wurden die Zentromersonden nicht einzeln markiert, sondern die DNA der Einzelzentromere, die mit gleichen Farbstoffen markiert waren, wurde gemischt und reamplifiziert. Anschließend wurde mit dieser Stocklösung bei den Markierungen gearbeitet.

Die für diese Stocklösung eingesetzten DNA-Mengen sind im Anhang in Tabelle 8.4. dargestellt. Das Ergebnis einer Hybridisierung mit dem cenM-FISH Sonden Set ist in Abb. 3.6. gezeigt.

| Zentromer   | Fluorochrome  | SG | SO | SR | BIO | DAC |
|-------------|---------------|----|----|----|-----|-----|
| 1 (1q12)    | SG/SO         | ■  | ■  |    |     |     |
| 2/20        | SG            | ■  |    |    |     |     |
| 3           | SG/SO/BIO     | ■  | ■  |    | ■   |     |
| 4           | SR            |    |    | ■  |     |     |
| 5/6(midi12) | SR/BIO/DAC    |    |    |    | ■   | ■   |
| 6           | SO/SR/BIO/DAC |    | ■  | ■  | ■   | ■   |
| 7           | SG/SO/SR      | ■  | ■  | ■  |     |     |
| 8           | SG/SO/DAC     | ■  | ■  |    |     | ■   |
| 9           | SG/SR/DAC     | ■  | ■  | ■  |     | ■   |
| 10          | SO/SR/BIO     |    | ■  | ■  | ■   |     |
| 11          | SO/BIO/DAC    |    | ■  |    | ■   | ■   |
| 12          | SR/BIO        |    |    | ■  | ■   |     |
| 13/21       | SG/DAC        | ■  |    |    |     | ■   |
| 14/22       | BIO           |    |    |    | ■   |     |
| 15          | SG/BIO/DAC    | ■  |    |    | ■   | ■   |
| 16          | SO/SR         |    | ■  | ■  |     |     |
| 17          | SO/DAC        |    | ■  |    |     | ■   |
| 18          | SR/DAC        |    |    | ■  |     | ■   |
| 5/19        | DAC           |    |    |    |     | ■   |
| 20          | SG/SR         | ■  |    | ■  |     |     |
| 22          | SO/BIO        |    | ■  |    | ■   |     |
| X           | BIO/DAC       |    |    |    | ■   | ■   |
| Y(q12)      | BIO/SG        | ■  |    |    | ■   |     |

**Abb. 3.5.:** Markierungsschema der einzelnen Sonden für cenM-FISH: Zur Markierung wurden Kombinationen der folgenden Fluorochrome eingesetzt: SpectrumGreen (SG), SpectrumOrange (SO), SpectrumRed (SR), Biotin (BIO) und Diethylaminocumarin (DAC).



**Abb. 3.6.:** Ergebnis einer Hybridisierung mit dem cenM-FISH Sondenmix auf eine Metaphase (männlicher Karyotyp). Die Zentromere sind in einer Mischung aller Echtfarben (Fluorochrome; siehe Labelschema) dargestellt und die Chromosomen mit DAPI gegengefärbt. Die Chromosomen 1 und Y zeigen statt der Färbung des Zentromers eine Anfärbung der heterochromatischen Regionen in 1q12 und Yq12.

Das cenM-FISH Sonden Set kam im Rahmen dieser Arbeit zur Identifizierung der Herkunft überzähliger Markerchromosomen zur Anwendung. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind unter 3.2.2.3. dargestellt.

### 3.1.2.2. Das acro-cenM-FISH

Zur gezielten Untersuchung von akrozentrischen Chromosomen wurde ein weiteres Sonden Set, das acro-cenM-FISH Set etabliert (Trifonov *et al.*, 2003). An den Arbeiten zu diesem Sondenmix waren neben mir und Frau Dr. A. Nietzel auch Dr. M. Oliver Bonet (Barcelona, Spanien) beteiligt.

Folgende Sonden kamen zur Erstellung dieses Proben Sets zum Einsatz:

- Zentromersonden spezifisch für Chromosomen 13/21, 14/22, 15 und 22,
- Sonde für die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen (Midi 54),
- NOR Sonde (dj1174A5) und eine
- Sonde für den Bereich Yq12 (plaY 113.5)

(Für nähere Informationen zu den beiden letztgenannten Sonden siehe <http://www.biologia.uniba.it> )

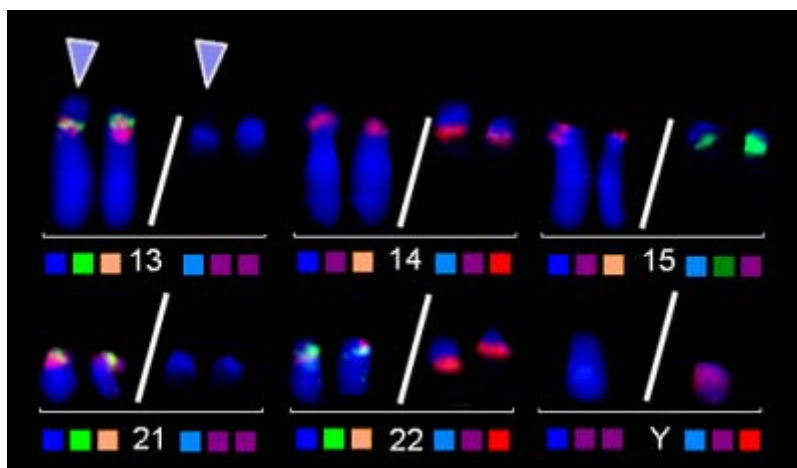
| Zentromer                              | SG | SO | SR | BIO | DAC |
|--|----|----|----|-----|-----|
| 13/21                                  | ■  |    |    |     |     |
| 14/22                                  |    |    | ■  |     |     |
| 15                                     |    |    |    | ■   |     |
| 22                                     | ■  |    | ■  |     |     |
| Yq12                                   |    |    | ■  |     | ■   |
| NOR Sonde (Satellitenregion)           |    | ■  |    |     | ■   |
| Midi 54 (p-Arme akrozentr. Chromsomen) |    |    |    |     | ■   |

**Abb. 3.7.:**

Markierungsschema der Sonden für das acro-cenM-FISH Sonden Set: Es wurden die Fluorochrome SpectrumGreen (SG), SpectrumOrange (SO), SpectrumRed (SR) und Diethylaminocumarin (DAC) verwendet. Die Zentromersonde für das Chromosom 15 wurde mit Biotin markiert.

Die Markierung der Sonden erfolgte mittels DOP-PCR. Eine Ausnahme bildete die Zentromersonde 15, die mittels Nicktranslation *gelabelt* wurde. Die Protokolle zur Markierung und mengenmäßigen Zusammenstellung der einzelnen Sonden sind im Anhang unter 8.6. zu finden.

Das Ergebnis der Hybridisierung des acro-cenM-FISH ist in Abb. 3.8. an einem Fall mit einem aberranten Chromosom 13 demonstriert.



**Abb. 3.8.:**

Ergebnis der Hybridisierung mit dem acro-cenM-FISH Mix am Beispiel eines Falles mit 13p+ (siehe 3.2.3.3.; Fall 382-00)

Auf der linken Seite sind jeweils die homologen Chromosomen mit den Signalen in SpectrumGreen und SpectrumOrange mit DAPI unterlegt zu sehen.

Auf der rechten Seite sind die Farben SpectrumRed, Cy5 und DEAC dargestellt.

Unter den Chromosomen ist die theoretische Farbbelegung aufgezeigt.

Das acro-cenM-FISH Sonden Set wurde zur Analyse von satellitischen Markerchromosomen und zur Charakterisierung von Veränderungen der kurzen Arme der akrozentrischen menschlichen Chromosomen angewendet. Beispielfälle sind unter 3.2.2.2. näher beschrieben.

### 3.1.3. Das subcenM-FISH zur Untersuchung der zentromernahen Region

Zur Charakterisierung von weiteren Veränderungen in der perizentrischen Region der menschlichen Chromosomen, wie Inversionen, Duplikationen und/oder Deletionen der unmittelbar ans Zentromer angrenzenden, euchromatischen Bereiche wurde ein Sonden Set entwickelt, das es möglich machte, auch diese Regionen genau zu charakterisieren. Des Weiteren wurde ein Sonden Set benötigt, um im Falle des Vorliegens eines Markerchromosoms exakte Aussagen zum Vorhandensein von euchromatischem Material zu treffen.

#### 3.1.3.1. Entwicklung der subcenM-FISH Sonden Sets

##### 3.1.3.1.1. Die Auswahl der Sonden

Die Auswahl der Sonden erfolgte in den zugänglichen Datenbanken der YAC und BAC-Ressourcen-Zentren:

→ der Universität Bari <http://www.biologia.uniba.it> und

→ BACPACResources Oakland <http://www.chori.org/BACPAC>

Es wurde jeweils eine Sonde für die zentromernahe Region jedes Chromosoms für p- und q-Arm ausgewählt, die möglichst nah am Zentromer lokalisiert war, möglichst bereits sequenziert war und wenig Homologien mit anderen Bereichen des Genoms zeigte. (Stand der Informationen von 2001!)

Größtenteils wurde mit BAC-Sonden gearbeitet, da hier bessere Informationen zur Verfügung standen. Eine Ausnahme bildeten die Sonden für die perizentrische Region der Chromosomen 2 und 13; hier wurde zunächst mit den zur Etablierung des YAC/BAC MCBs bereits vorhandenen YAC Sonden gearbeitet.

Eine Auflistung aller verwendeten Sonden, ihrer Signalqualität und evtl. aufgetretener Kreuzhybridisierungen sind im Anhang in Tabelle 8.2. zu finden.

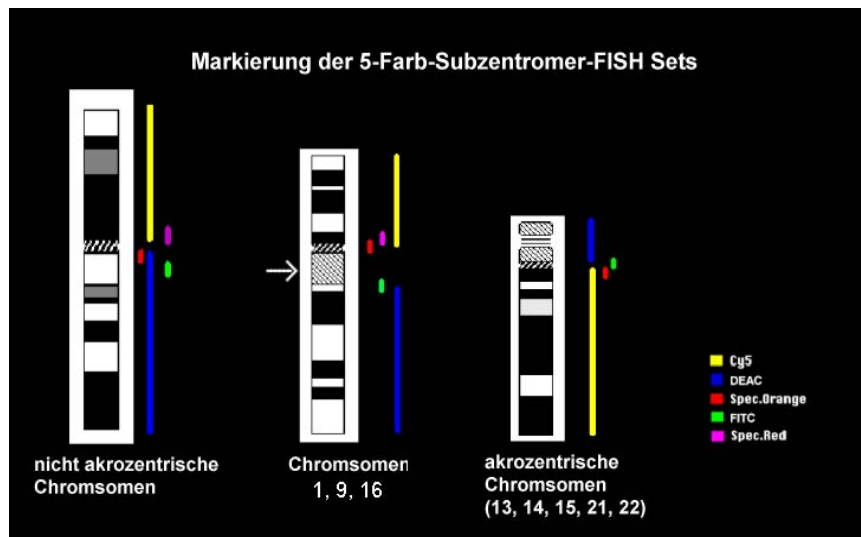
→ *Bei den pcp-Sonden handelt es sich um in unserem Hause mittels Mikrosezierung hergestellte Sonden.*

##### 3.1.3.1.2. Erstellung von 5-Farben-Sonden Sets zur Untersuchung zentromernaher Veränderungen

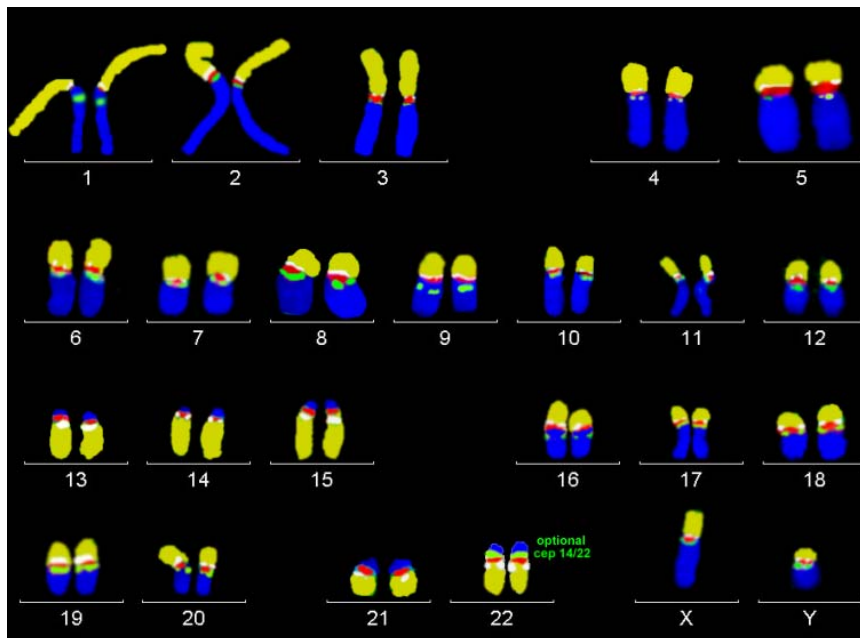
Zur Optimierung der Untersuchungen im Hinblick auf die Zeit der Analyse und der Erfassung aller chromosomalen Bereiche wurden zunächst 5-Farb-Sonden Sets unter Einbeziehung der pcp -Sonden für die p- und q-Arme der Chromosomen und einer Zentromersonde zu den unterschiedlich markierten zentromernahen YAC- und BAC-Sonden entwickelt.

Die Markierung der einzelnen Sonden erfolgte nach dem in Abb. 3.9. dargestellten Markierungsschema.

Die eingesetzten Zentromersonden waren zumeist kommerziell erhältliche Alpha-Satelliten-Sonden (VYSIS), die in SpectrumGreen markiert geliefert wurden. Die restlichen Sonden wurden einzeln mittels DOP-PCR markiert, gemeinsam gefällt und in DS re-suspendiert und in einem Hybridisierungsschritt eingesetzt. Das Ergebnis der Hybridisierung ist für alle Chromosomen in Pseudofarbendarstellung in Abb. 3.10. gezeigt.

**Abb. 3.9.:**

Markierungsschemata für die subcenM-FISH Sondenmixe: Die p-Arme wurden jeweils mit Biotin markiert (bei den akrozentrischen Chromosomen die Midi 54 Sonde in DEAC) Die q-Arme wurden bis auf die der akrozentrischen Chromosomen (markiert mit Biotin) in DEAC gelabelt. Die (kommerziellen) Zentromer-Sonden waren rot markiert und die zentromernahen BAC -Sonden mit FITC und oder TexasRed. Die heterochromatischen Bereiche der Chromosomen 1, 9 und 16 blieben zunächst ungefärbt.

**Abb. 3.10.:**

Zusammenstellung der subcenM-FISH Sonden Sets für alle Chromosomen zusammengestellt aus Einzelhybridisierungen. Gezeigt ist hier die Anfärbung der Chromosomen mit Pseudofarben: Das Zentromer ist jeweils in rot dargestellt, die Zentromernahen YAC- oder BAC-Sonden in weiß und grün und die Arm-spezifischen Sonden in gelb und blau.

Mit diesen Sonden Sets war es möglich, in einem Hybridisierungsansatz sowohl eine Aussage über die Anwesenheit und die Lage von zentromernahen euchromatischen Regionen, als auch über die das Vorhandensein von größeren oder weiter distal gelegenen euchromatischen Regionen zu treffen.

Mit den beschriebenen 5-Farben-Sonden Sets wurden bisher ca. 75 Fälle (siehe Tabelle 8.9. im Anhang) mit Marker- oder Ringchromosomen und 27 Fälle mit Derivatvchromosomen (siehe 3.2.2.1.) untersucht.

### 3.1.3.1.3. Erstellung eines Sonden Sets zur gleichzeitigen Untersuchungen der perizentrischen Region aller Chromosomen

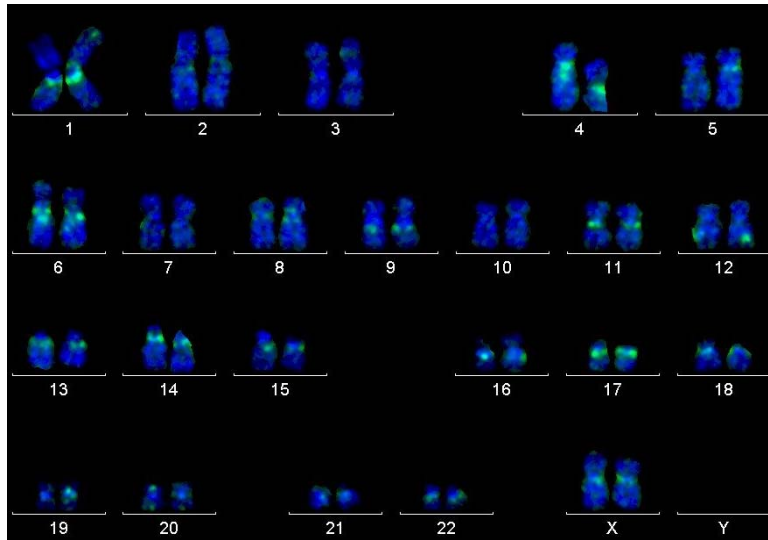
Zur gleichzeitigen Erfassung von Veränderungen im zentromernahen Bereich aller Chromosomen wurde ein Zweifarben-Sonden Set zusammengestellt, wobei alle zentromernahen Sonden der p-Arme in einer Farbe, die der q-Arme der Chromosomen in einer anderen Farbe markiert wurden.

Ziel war es, mit dieser *Screening-Methode* in der Literatur beschriebene (Horvath *et al.*, 2001, Eichler *et al.*, 1996, Jackson *et al.*, 1999) Inversionen sowie Duplikationen und



Deletionen zu erkennen und anschließend eventuell mit weiteren Chromosomen-spezifischen Sonden näher analysieren zu können.

Das Ergebnis der Hybridisierung aller Sonden für die q-Arme der menschlichen Chromosomen ist in Abb. 3.11. dargestellt.



**Abb. 3.11.:**

Ergebnis der gleichzeitigen Hybridisierung aller Sub-Zentromer Sonden für die q-Arme aller menschlichen Chromosomen. Es sind alle Sonden nachweisbar, jedoch ist klar zu erkennen, dass die Signalstärke der Einzelsonden unterschiedlich ist. Durch den Einsatz unterschiedlicher DNA Konzentrationen wurde dies im endgültigen Sonden Set ausgeglichen.

Im endgültigen Sonden Set wurden die Sonden der p-Arme mit SpectrumRed markiert, die der q-Arme in SpectrumGreen.

### Überprüfung der Spezifität der Sondenmixe

Zur Überprüfung der Spezifität des erstellten Sonden Sets wurden zunächst Hybridisierungen an Metaphaseplatten von Patienten mit bekannten Veränderungen der zentromernahen Region durchgeführt.

Dazu wurden folgende Fälle untersucht:

- Fall mit Vergrößerung der heterochromatischen Region des Chromosoms 1
- zwei Fälle mit Duplikation des Bereichs 9p12 bis 9q12
- Fall mit einer Duplikation in 16q11.2 bis q13 (Tabelle 8.9. im Anhang; Fall 391-02)

→ Nach Anwendung des entwickelten Zweifarben-Sondenmixes konnten die bekannten Veränderungen eindeutig erkannt werden.

→ Die Untersuchungen an Patienten mit normalem Karyotyp nach GTG-Bänderung sind noch nicht abgeschlossen, weshalb auf diese Ergebnisse nicht näher eingegangen werden soll.

### 3.1.3.2. Sonden Sets zur Untersuchung von Veränderungen der perizentrischen Region des Chromosoms 9

Obwohl mit der Entwicklung der FISH Technik neue Möglichkeiten auch zur Charakterisierung von Heteromorphismen zur Verfügung standen, wurden bisher nur wenige umfangreiche Studien mittels dieser Technik publiziert.

Da das Chromosom 9 neben den akrozentrischen Chromosomen beim Menschen am häufigsten Veränderungen, wie Inversionen, Duplikationen und Deletionen des heterochromatischen Bereichs zeigt, und einen großen Teil der mittels GTG-Bänderung nachgewiesenen Veränderungen darstellt, war es von großem klinischen wie auch wissenschaftlichen Interesse, diese Region mit den zur Verfügung stehenden Sonden näher zu charakterisieren.

### Zusammenstellung der Sonden

Zur Untersuchung der Veränderungen am Chromosom 9 wurden zwei verschiedene Sonden Sets verwendet, die im Folgenden näher beschrieben werden.

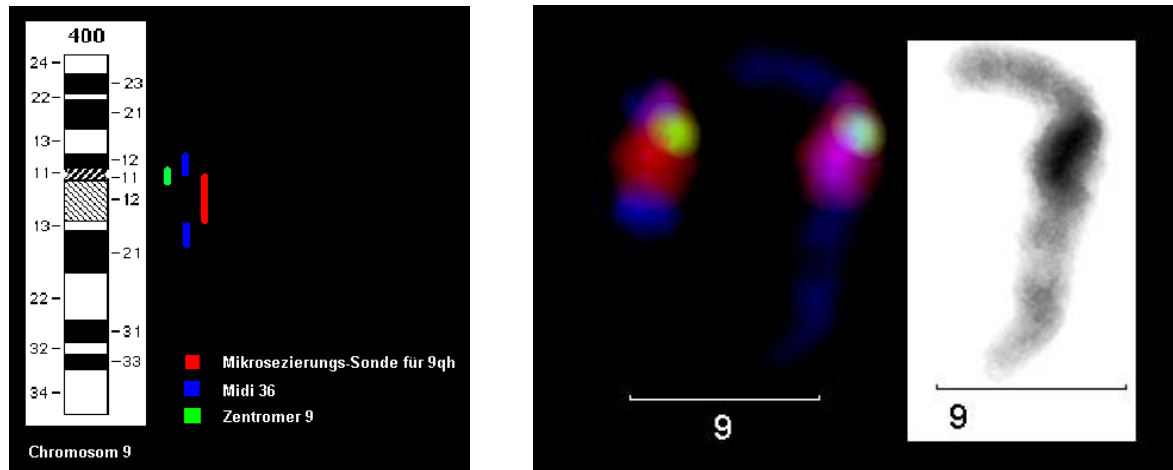
Die **Sondenkombination 1** setzte sich aus folgenden Einzelsonden zusammen:

→ Zentromersonde für Chromosom 9 (= Alpha-Satellit) (VYSIS, SpectrumGreen),

→ Sonde für den Heterochromatin-Bereich in 9q12

(zunächst ONCOR klassische Satelliten-Sonde 9, später Sonde von Dr. M. Rocchi (pUC 177) detektiert mit Rhodamin

→ Mikrosezierungssonde für die Bereiche 9p12 und 9q13 bis 9q21.1 (Midi 36) markiert mit DEAC



**Abb. 3.12.:**

Linkes Bild: Markierungsschema der Sonden für die Sondenkombination 1 des Chromosoms 9. Als Fluorochrome kamen zum Einsatz SpectrumOrange (SO,rot), SpectrumGreen (SG,grün) und DEAC (blau).

Rechtes Bild: Darstellung eines Hybridisierungsergebnisses; links Farbkanäle DEAC, SO und SG dargestellt, in der Mitte SO und SG mit DAPI und rechts davon invertiertes DAPI-Bild

Neben diesem Sonden Set kamen abhängig von der jeweiligen Veränderung noch folgende weitere Proben zum Einsatz:

- MCB Sonden Set für Chromosom 9 (= 6 *pcp* Proben)
- Mikrosezierungssonde für die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen (Midi 54)
- Zentromerprobe für alle menschlichen Zentromere (QBiogene)
- *wpc* Sonde 9 und *pcp* Sonden für 9p und 9q

→ Da mit der Sondenkombination 1 keine Unterscheidung der Regionen 9p12 und 9q13 bis 21.1 möglich war, wurde weiteren Differenzierung der Veränderungen dieser Regionen ein weiteres Sonden Set (Sondenkombination 2) entwickelt. Bei einigen Patienten schloss sich eine zusätzliche Analyse mit diesem Sonden Set an:

**Sondenkombination 2 (= subcenM-FISH Sonden Set für Chromosom 9)** stellte eine Kombination folgender Sonden dar

→ Zentromersonde für Chromosom 9 = Alpha-Satellit (VYSIS, SpectrumGreen),

→ *partial chromosome painting (pcp-)* Sonden für

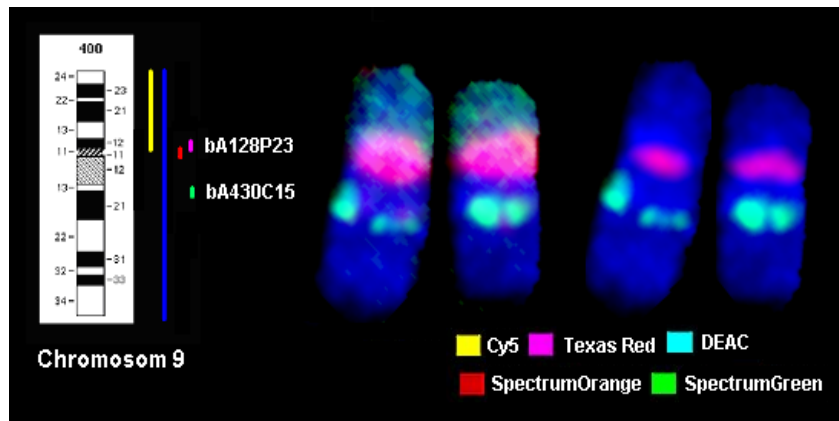
- 9p (Biotin)
- 9q (DEAC)

→ BAC Sonden für die Zentromernahe Region des Chromosoms 9

- BAC 128P23 (9p12 und 9q13) (SpectrumRed)
- BAC 430c15 (9q13) (SpectrumOrange)

→ Diese Sondenkombination wurde erst später entwickelt und kam deshalb nur bei einem geringen Teil der untersuchten Patienten zum Einsatz. Die Ergebnisse gingen daher nicht in die Auswertung des gesamten, in Tabelle 8.8. im Anhang dargestellten, Untersuchungskollektivs mit ein.

→ Mittels diesem Sonden Set wurde eine weitere Differenzierung von Duplikationen, die die beiden Regionen betrafen in der die Midi 36 Sonde bindet (9p12 und 9q13-21.1) möglich.



**Abb. 3.13.:**

Sonden Set 2 (subcenM-FISH Set) für Chromosom 9: Links das Ideogramm mit dem Markierungsschema. In der Mitte Echtfarben-Darstellung der Farbkanäle Cy5, Spectrum Orange und SpectrumGreen mit DAPI unterlegt. Rechts im Bild sind die Farben DEAC, Texas Red und SpectrumGreen zu sehen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels Sondenkombination 1 an 62 Fällen mit Heteromorphismen der perizentrischen Region des Chromosoms 9 sind im Abschnitt 3.2.1.2. detailliert dargestellt.

### 3.2. Untersuchung perizentrischer Chromosomenveränderungen- FALLBEISPIELE

#### 3.2.1. Einzelanwendungen der entwickelten Verfahren

##### 3.2.1.1. Untersuchung von Patientenproben mit YAC/BAC-MCB 22

**Das Cat-eye-Syndrom (CES)**, auch unter dem Namen Schmid-Fraccaro-Syndrom oder Katzenaugensyndrom bekannt, wurde bereits 1879 erstmals von Haab (Haab, 1879) beschrieben (OMIM NR. #115470). Charakteristisch für dieses Syndrom ist das Auftreten eines Extrachromosoms 22 (Mattei *et al.*, 1985), das meist den Bereich 22p terminal bis 22q11 invertiert dupliziert enthält (z.B. McTaggart *et al.*, 1998).

→Die hier durchgeführten Untersuchungen wurden größtenteils an archiviertem Material (fixierte Zellsuspension) von Patienten mit bereits bekanntem Cat-eye-Syndrom durchgeführt (Patienten 1-4 und 6). Diese wurden bereits mittels Zentromerprobe 14/22, einer *wcp* 22 Sonde und verschiedener regionspezifischer Proben (Liehr *et al.*, 1992) untersucht. Material von Patient 5 wurde im Rahmen einer zytogenetischen Routine-Untersuchung eingesandt. Es war das Ziel, die jeweils auftretenden Markerchromosomen in ihrer Zusammensetzung näher zu analysieren.

##### Hybridisierungsergebnisse:

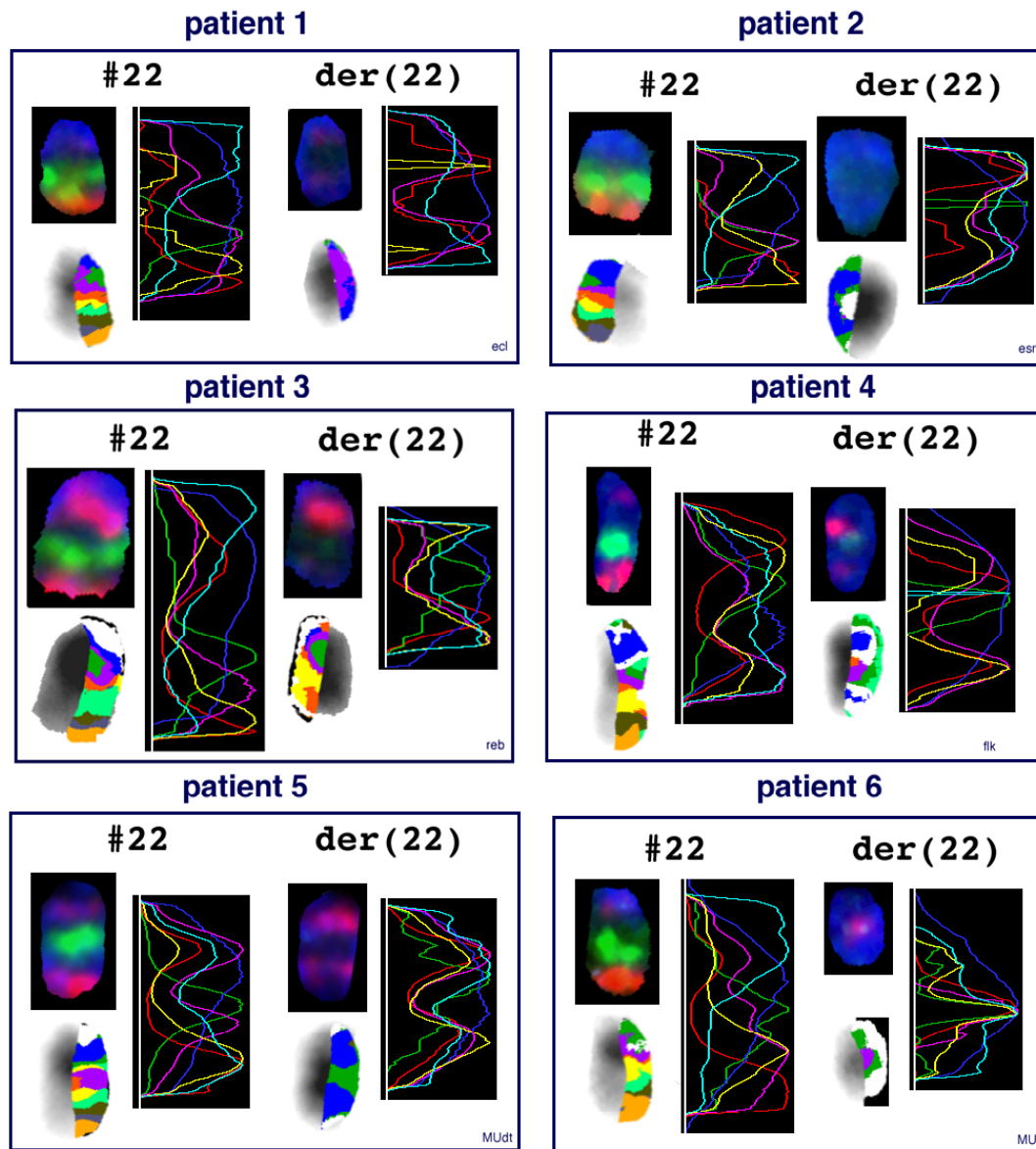
Die klinische Symptomatik der einzelnen Patienten und damit die Einteilung in ein typisches (Patienten 1 und 2) und atypisches CES (Fall 3-6), der Karyotyp vor Analyse mit dem MCB Sonden Set und der ermittelte Karyotyp nach Untersuchung mit dem BAC basierenden MCB 22 sind in Tabelle 3.1. zusammengefasst.

| Patient | Bemerkung  | Karyotyp vor MCB        | Ergebnis nach MCB   |
|---------|--|-------------------------|---------------------|
| 1 (ecl) | klinisch typisches CES mit <b>dizentrischem, bisatellitischen</b> Extrachromosm 22                             | inv dup (22)(q11.1)     | inv dup (22)(q11.1) |
| 2 (esr) | klinisch typisches CES mit <b>dizentrischem, bisatellitischen</b> Extrachromosm 22                             | inv dup (22)(q11.1) mos | inv dup (22)(q11.?) |
| 3 (reb) | klinisch atypisches CES mit <b>dizentrischem, monosatellitischen</b> Extrachromosm 22; Zentromerpolymorphismus | inv dup (22)(q11.1)     | inv dup (22)(q11.2) |
| 4 (flk) | klinisch atypisches CES mit <b>dizentrischem</b> Extrachromosom 22 auf dem beide Satellitenregionen fehlen     | inv dup (22)(q11.?)     | inv dup (22)(q11.2) |
| 5 (MU)  | <b>kein klinisches Bild eines CES</b> aber <b>monozentrisches, bisatellitisches</b> Extrachromosom 22          | inv dup (22)(q11.?)     | inv dup (22)(q11.1) |
| 6 (mdt) | klinisch atypisches CES mit <b>dizentrischem, bisatellitischen</b> Extrachromosm 22                            | inv dup (22)(q11.?)     | inv dup (22)(q11.2) |

**Tabelle 3.1.:**

Zusammenstellung der klinischen Daten der untersuchten Patienten mit CES, des bereits bekannten Karyotyps und des nach Anwendung des BAC-MCB 22 ermittelten Karyotyps mit den neu definierten Bruchpunkten des Extrachromosoms.

Nach Hybridisierung des oben beschriebenen Sonden Sets auf Metaphaseplatten (MPP) der jeweiligen Patienten wurden die in Abb. 3.14. dargestellten Ergebnisse erzielt. Im Falle der Patienten 1 und 5 konnten nach MCB anhand der erzielten Pseudofarben und der Fluorochromprofile die Bruchpunkte in 22q11.1 definiert werden. Bei allen anderen Patienten (2, 3, 4, 6) lagen die Bruchpunkte dagegen in der euchromatischen Bande 22q11.2.



**Abb. 3.14.:**

Hybridisierungsergebnis des YAC/BAC MCB22 auf 6 Fälle mit CES:

Jeweils linke Hälfte des Teilbildes → normales Chromosom 22 in Echtfarben (links oben), daneben die dazugehörigen Fluoreszenzprofile und darunter Ergebnis der GTG-Bänderung mit Pseudofarben. Auf der rechten Bildhälfte ist das Extrachromosom 22 der gleichen Metaphase in gleicher Weise analysiert.

### **3.2.1.2. Untersuchungen von Heteromorphismen des Chromosoms 9**

#### **3.2.1.2.1. Auswahl des Untersuchungskollektivs**

In die Untersuchungen gingen 62 Patienten ein, bei denen in der konventionellen Zytogenetik mittels GTG-Bänderung Auffälligkeiten in der perizentrischen Region des Chromosoms 9 festgestellt wurden. Dies waren neben Verlusten oder Zugewinnen des Heterochromatins auch perizentrische Inversionen und Veränderungen der perizentrischen, euchromatischen Regionen 9p12 und 9q13-21.1.

Alle untersuchten Personen waren phänotypisch unauffällig (N) und nicht miteinander verwandt. Bei einem Teil der Patienten (siehe Tabelle 8.8. im Anhang) war die Indikation zur Chromosomenanalyse Störungen der Fruchtbarkeit (F) oder mentale Retardierung (MR).

#### **Kontrollen:**

Als Kontrollen dienten Metaphaseplatten von 5 Kontrollpersonen, die phänotypisch und mental unauffällig waren und bei denen keine Fertilitätsstörungen bekannt waren:

→ Fälle 1-5

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 62 Patienten durchgeführt, von denen uns Material zur zytogenetischen Untersuchung zugeschickt wurde.

#### **Patientenkollektiv:**

Das Patientenkollektiv setzte sich wie folgt zusammen:

- 34 Patienten die keinerlei Symptomatik zeigten (N),
- 18 Patienten mit Fertilitätsstörungen (F),
- 7 Patienten mit mentaler Retardierung (MR),
- 2 Patienten waren kleinwüchsig und bei
- einem Patienten war die Verdachtsdiagnose ein Fragiles X-Syndrom

#### **3.2.1.2.2. Durchführung der Untersuchungen von auffälligen Varianten des Chromosoms 9**

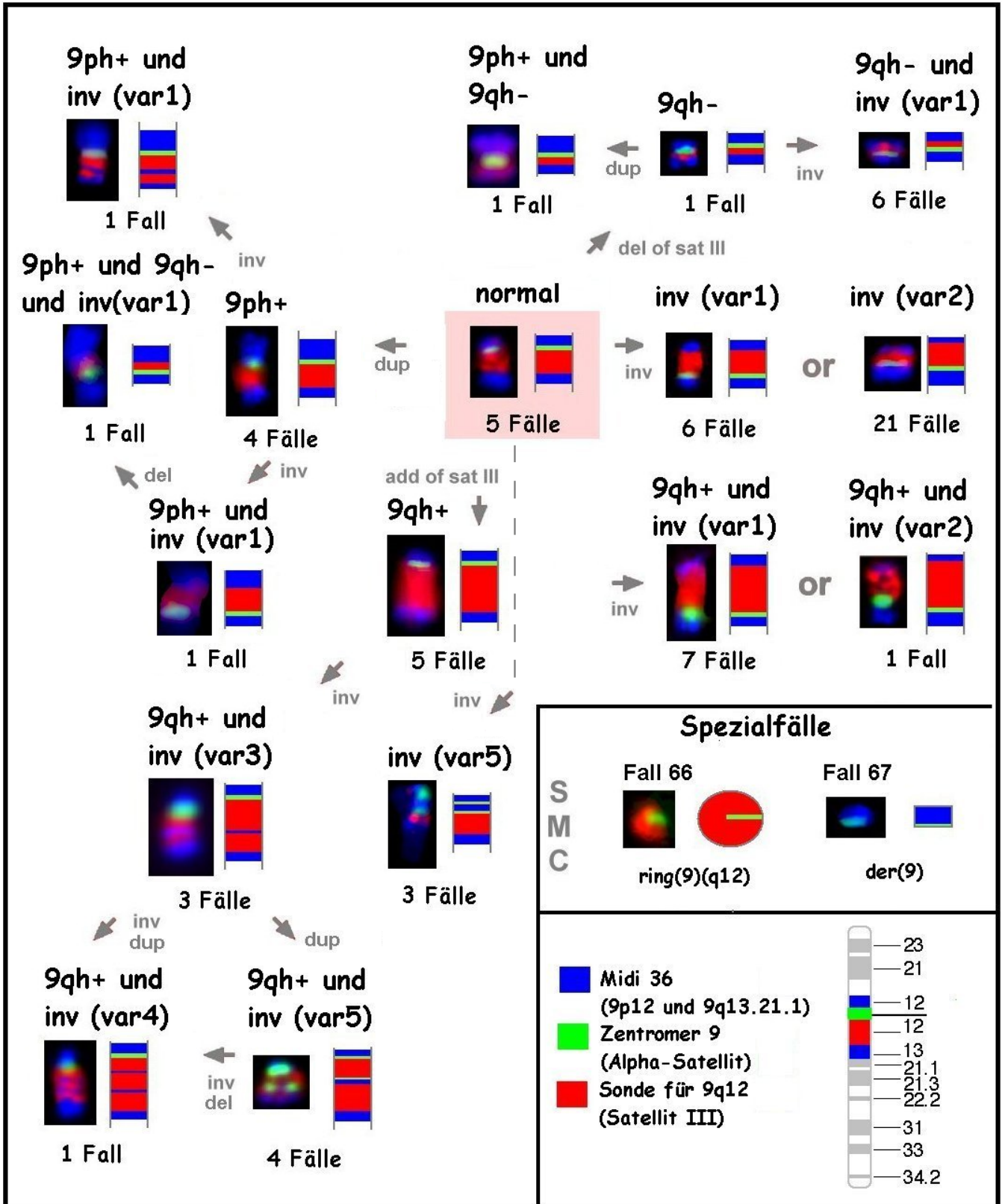
Vor Untersuchungsbeginn wurde zur Charakterisierung der Veränderung neben der GTG- auch eine CBG-Bänderung durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Als Untersuchungsmaterial dienten Metaphaseplatten aus peripherem Blut oder Fruchtwasserproben der Patienten.

#### **3.2.1.2.3. Untersuchungsergebnisse**

Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels Sonden Set 1 (siehe 3.1.2.2.) sind im Anhang in Tabelle 8.8. dargestellt.:

Eine Übersicht über alle, mit Sonden Set 1 nachgewiesenen, Veränderungen und der Anzahl der identifizierten Fälle (diese Zahlen widerspiegeln nicht die Häufigkeit der jeweiligen Veränderung!!) ist in Abb. 3.15. gezeigt.



**Abb. 3.15.A: (Schema modifiziert nach Starke et al., 2002)**  
Darstellung aller nachgewiesenen Varianten des perizentrischen Bereiches des Chromosoms 9. Es ist jeweils die Art der Veränderung, eine schematische Darstellung dieser und ein Hybridisierungsbild des veränderten Chromosoms 9 gezeigt. Darunter ist die Anzahl der untersuchten Fälle mit dieser Variante angegeben. Die Pfeile zeigen mögliche Entstehungsmechanismen an. Daneben sind zwei Fälle mit Markerchromosomen abgebildet, die ebenfalls mit der Sondenkombination 1 untersucht wurden. Rechts unten ist die Lage und Markierung der eingesetzten Sonden innerhalb des Chromosoms 9 dargestellt.

## Legende

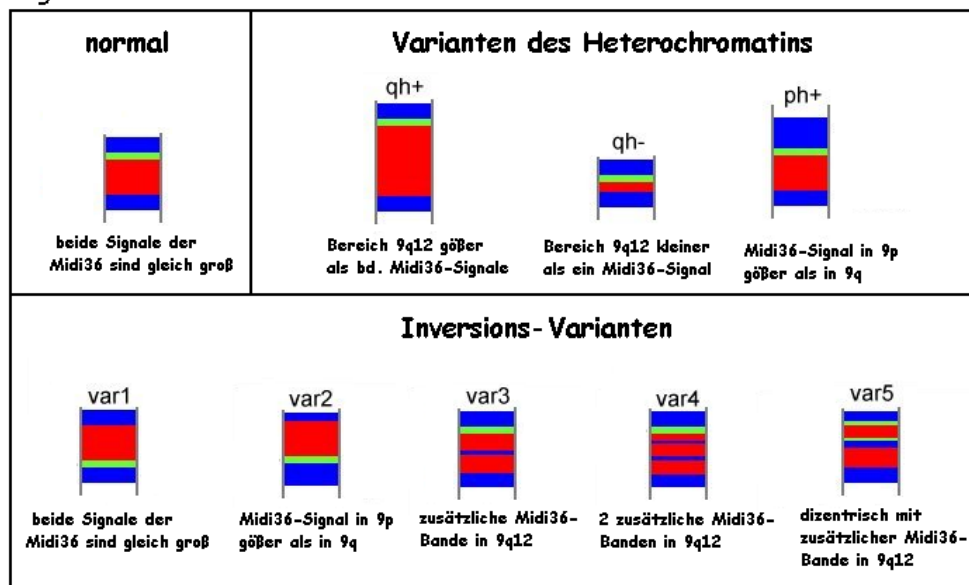


Abb. 3.15.B

Definition der in Abbildung 3.15.A abgebildeten Varianten des Chromosoms 9. Oben links ist die normale Signalverteilung dargestellt. Rechts daneben sind die nachgewiesenen Variationen in den heterochromatischen Regionen des Chromosoms 9 gezeigt. In der unteren Reihe sind alle 5 beobachteten Inversionsvarianten mit ihren jeweiligen Signalkonstellationen schematisch dargestellt.

## 3.2.2. Kombinierte Anwendungen der verschiedenen Verfahren

## 3.2.2.1. Untersuchungen von Derivatvchromosomen mit Veränderungen im zentromernahen Bereich

## 3.2.2.1.1. Gesamtüberblick der untersuchten Fälle

Eine Zusammenstellung aller Ergebnisse der FISH Untersuchungen von Fällen mit Derivatvchromosomen, die Veränderungen in der zentromernahen Region zeigten, sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 3.2.) zusammengefasst.

| Chr. | Fall                  | Klinik | Material | Vererbung | GTG-Ergebnis                                | FISH-Ergebnis   | UPD  | Literatur                           |
|------|-----------------------|--------|----------|-----------|---|---|------|-------------------------------------|
| X    | 125/03                | F      | fibro    | de novo   | 45,X[14]/46,X,der(X)[6]                     | idic(X)(p11.21 or 11.22)  | n.a. | n.a.                                |
| 1    | 26-03                 | US     | FW       | maternal  | 46,inv(1)                                   | inv(1)(p12;21.1)  | n.a. | n.a.                                |
| 2    | 412-00                | P      | Blut     | de novo   | 46,XY,inv(2)(p11?2 q?12)[6], 46,XY[9]       | inv(2)(p11.2q11.2)  | n.a. | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall I  |
| 4    | 427/02                | O      | Blut     | de novo   | ?dup(4)                                     | inv dup(4)(p11p16)  | n.a. | n.a.                                |
| 5    | 72/02;                | P/ MR  | Blut     | de novo   | 46,XY,der(5)                                | dup(5)(pter->q11.1::p12 ->qter)   | n.a. | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall II |
| 5;6  | 082/03                | N      | FW       | maternal  | 46,XY,t(5;6)(p?10;p?10)                     | t(5;6)(p11-12;q11.2)  | n.a. | n.a.                                |
| 6    | 107/03                | N      | FW       | n.a.      | 46,XY,?del(6)(p11.2)                        | Zentromerpolymorphismus   | n.a. | n.a.                                |
| 10   | 53-03.                | P      | Blut     | n.a.      | 46,XX,inv(10)(p11.1q21)                     | 46,XX,inv(10)(p11.1q21.1)   | n.a. | n.a.                                |
| 10   | 448/03                | ?      | FW       | n.a.      | 46,XY,inv(10).rev ish ?del(10)(q11.21q21.2) | inv(10)(q11.1p11.21)  | n.a. | n.a.                                |
| 10   | 248-03<br>2004<br>019 | F      | Blut     | n.a.      | 46,XX,inv(10)(p11.2 q21.2)                  | der(10)(pter ->p11.21::q21.2 ->q11.23::p11.1 ->q11.23::p11.1 ->p11.21::q21.2->qter) | n.a. | n.a.                                |
| 15   |                       | F      | Blut     | n.a.      | 46,XY,der(15)                               | 15pstkpstkpstktk  | n.a. | n.a.                                |



| Chr.      | Fall                      | Klinik                       | Material | Vererbung                          | GTG-Ergebnis                | FISH-Ergebnis  | UPD                       | Literatur                            |
|-----------|---------------------------|------------------------------|----------|------------------------------------|-----------------------------|--|---------------------------|--------------------------------------|
| 15;<br>20 | 294-03                    | ?                            | FW       | maternal                           | 46,XY,der(20)t(15;20)       | der(20)t(15;20)<br>(15q1?2;20q11.2)  | ?                         | n.a.                                 |
| 16;<br>22 | 133/02                    | N                            | Blut     | In der Familie über 3 generationen | 46,XX,der(16)t(14 or 22;16) | dic(16;22)(16pter ->16q24.3::22q11.22 ->22pter)  | n.a.                      | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall III |
| 16        | 391/02                    | P/ MR                        | Blut     | de novo                            | 46,XX,ins(16)(q12.1;?)      | dup(16)(q11.2q13)  | n.a.                      | n.a.                                 |
| 18        | 281/03                    | P/ MR                        | Blut     | n.a.                               | 45,XX,der(18)t(18;21),-21   | der(18)t(18;21)(18qter ->18p11.1::21q11.1 ->21qter)  | n.a.                      | n.a.                                 |
| 18        | 413/03                    | N                            | Blut     | n.a.                               | 46,XY,?inv(18)              | Zentromerpolymorphismus  | n.a.                      | n.a.                                 |
| 19        | 004/03                    | N                            | Blut     | n.a.                               | 46,XY,der(19?)              | inv(19)(p13.11q13.12 -q13.13)  | n.a.                      | n.a.                                 |
| 20        | 122/03                    | N                            | FW       | paternal                           | 46,XY,?inv(20)(q11.2;p11.1) | Zentromerpolymorphismus  | n.a.                      | n.a.                                 |
| 21        | 104-02                    | N                            | FW       | de novo                            | 46,XX,der(21)?o. r(21)?     | der(21)(:q21-q22.1 ->p11.2::q21-q22.1->qter)   | n.a.                      | n.a.                                 |
| 21        | 159/03                    | P/ MR                        | Blut     | de novo                            | 46,XY,der(21)               | der(21)(p13->p12-13::q13.33->q13.32::q11.21->p12-13::q11.21-11.22 ->(?)q13.32::p13->p13)     | n.a.                      | n.a.                                 |
| 22        | 008-03                    | CES                          | Blut     | n.a.                               | 46,XX,dup(22)(q11.2q11.1)   | dic(22)(p11.3->q11.22 or q11.23::p11.1->q11.22 or q11.23)                                    | n.a.                      | n.a.                                 |
| 22        | 141-03<br>FW<br>126-03    | N                            | Blut     | n.a.                               | 46,XY,der(22)               | dic(22)(pter->q11.21::p11.2->qter)   | n.a.                      | n.a.                                 |
| 22        | 462/03                    | (Kind)<br>P<br>(Mutter)<br>N | FW       | maternal                           | 46,XY,der(22)               | der(22)t(15;15;22)(15pter ->15q11.1~11.2::15q11.1~11.2->15p11.1~11.2::22p11.1~11.2 ->22qter) | no<br>UPD<br>15 or<br>22; | n.a.                                 |
| 22        | 392-03<br>Vater<br>377-03 | N                            | FW       | paternal                           | 46,XY,add(22)(q13.3)        | der(22)t(22;acro)(22pter ->22q13.33::acrop11.2 ->acropter)                                   | n.a.                      | n.a.                                 |
| 5;22      | 207-03                    | F                            | Blut     | n.a.                               | 46,XY,t(5;22)(q?22;q11.2)   | t(5;22)(q21.2;q11.21)  | n.a.                      | n.a.                                 |

**Tabelle 3.2.:**

Die hier vorgestellten Fälle wurden klinisch eingeteilt in:

- |  |      |                              |      |
|--|------|------------------------------|------|
| →normal (ohne jegliche Symptomatik)  | → N  | →mit Organfehlbildungen      | → O  |
| →phänotypisch auffällig  | → P  | →mit mentaler Retardierung   | → MR |
| →auffälliger Ultraschallbefund   | → US | →Patient mit Cat-eye-Syndrom | →CES |
| →phänotypisch unauffällig; aber mit Fertilitätstörungen in der Partnerschaft | → F  |                              |      |

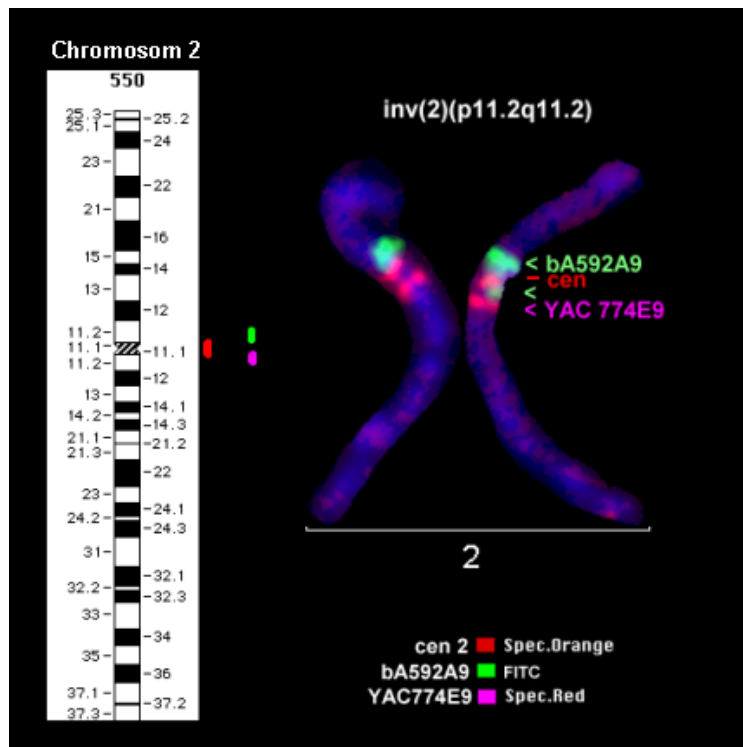
Im Anschluss soll auf einige dieser Fälle in Form einer Falldarstellung näher eingegangen werden.

### 3.2.2.1.2. Fallbeispiele von Derivatvchromosomen mit Veränderungen im perizentrischen Bereich

#### Fall 412/00

Der erste, hier ausführlicher dargestellte Fall (412/00) ist ein Fall aus der postnatalen Diagnostik. Es handelt sich um einen im Juni 2000 geborenen Jungen mit verschiedenen Auffälligkeiten, wie craniofaciale Dismorphien und supravulvulärer Pulmonalstenose, von dem Blut zur Chromosomenanalyse eingesandt wurde. Bei einem sonst unauffälligen männlichen Karyotyp fiel zunächst in einigen MPP an einem Chromosom 2 eine leichte Verschiebung des Zentromerindexes auf.

Daneben erschien der kurze Arm jeweils eines Chromosoms 2 vergrößert. Der fragliche Bereich konnte mit der Sonde für die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen (Midi 54) vollständig angefärbt werden (Daten nicht dargestellt).



**Abb. 3.16.:**

Fall 412/00 (siehe Tabelle);  
Mittels einer zentromernahen YAC- und einer BAC-Sonde zusammen mit der Zentromersonde für Chromosom 2 konnte eine Inversion des Bereiches 2p11.2 bis 2q11.2 nachgewiesen werden.

Der Bruchpunkt-überspannende BAC Klon bA592A9 zeigt ein aufgrund der Inversion ein geteiltes Signal auf dem veränderten Chromosom 2 (rechts) während auf dem normalen Chromosom 2 nur jeweils ein Signal mit den eingesetzten Sonden zu sehen ist.

Auf der linken Bildhälfte ist ein Ideogramm des Chromosoms 2 und die Lage der verwendeten Sonden aufgezeigt.

Zur Abklärung der vermuteten Inversion 2 wurde das Mikrosezierungs-basierende MCB Sonden Set für das Chromosom 2 eingesetzt, das jedoch keinen Hinweis auf das Vorliegen einer solchen Veränderung erbrachte.

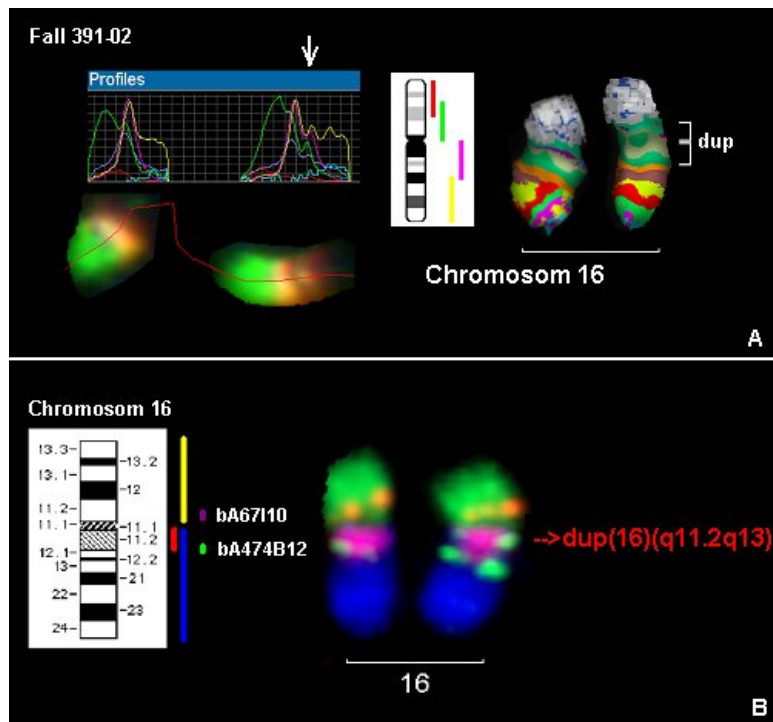
Durch Hybridisierung der zentromernahen Sonden bA592A2 (BAC-Klon; 2p11.2) und 774E9 (YAC-Klon; 2q12) zusammen mit einer Zentromer 2-spezifischen Sonde (D2Z) konnte in ca. 40% der untersuchten Zellen eine

➔ **Inversion des Bereiches 2p11.2 bis 2q11.2** nachgewiesen werden.

#### Fall 391-02

Bei der Patientin handelt es sich um ein 2001 geborenes Mädchen, bei dem in der GTG-Analyse (durchgeführt in Lohne) ein abnorm erscheinendes Chromosom 16 auffiel. Zur Abklärung dieser Veränderung wurde zunächst das MCB Sonden Set für das Chromosom 16 eingesetzt, das deutlich eine Duplikation im zentromernahen Bereich von 16q erkennen ließ. Zur exakten Bestimmung der involvierten Bruchpunkte wurde der subcenM-FISH Sondenmix für das Chromosom 16, bestehend aus den armspezifischen Sonden, einer Sonde für 16q11.2 („cep16“; VYSIS) und den im perizentrischen Bereich lokalisierten BAC Sonden bA67110 (16p11.2) und bA474B12 (16q12.1) verwendet. Zur Klärung, ob es sich bei dem aberranten Chromosom 16 um ein dizentrisches Chromosom handelt, wurde eine Alpha-Satelliten Sonde (D16Z2) hybridisiert, die nur ein Signal auf dem veränderten Chromosom 16 zeigte (Daten nicht gezeigt). Das auffällige Chromosom 16 konnte nach FISH mit den erwähnten Sonden als

➔ **.ish dup(16)(q11.2q13)** beschrieben werden.

**Abb. 3.17.:**

**Bild A:** Ergebnis der Analyse mit MCB Sondenmix 16; Sowohl die links dargestellten Fluoreszenzprofile (zusätzlicher *peak* siehe Pfeil) als auch die rechts gezeigten Pseudofarben lassen deutlich eine Duplikation in 16q erkennen.

**Bild B:** Nach Hybridisierung mit dem subcenM-FISH Sonden Set für Chromosom 16 konnte die Duplikation auf den Bereich 16q11.2 bis 16q13 eingegrenzt werden. Der innerhalb der duplizierten Region (16q12.1) lokalisierte BAC Klon 474B12 zeigt deutlich zwei Signale auf dem aberranten Chromosom 16. Die Chromosomen 16 sind in einer Mischfärbung aus allen Fluorochromen dargestellt; links davon ist das Markierungsschema der Sonden zu sehen.

### 3.2.2.2. Fälle mit auffälligen p-Armen der akrozentrischen Chromosomen

#### Fall 382-00

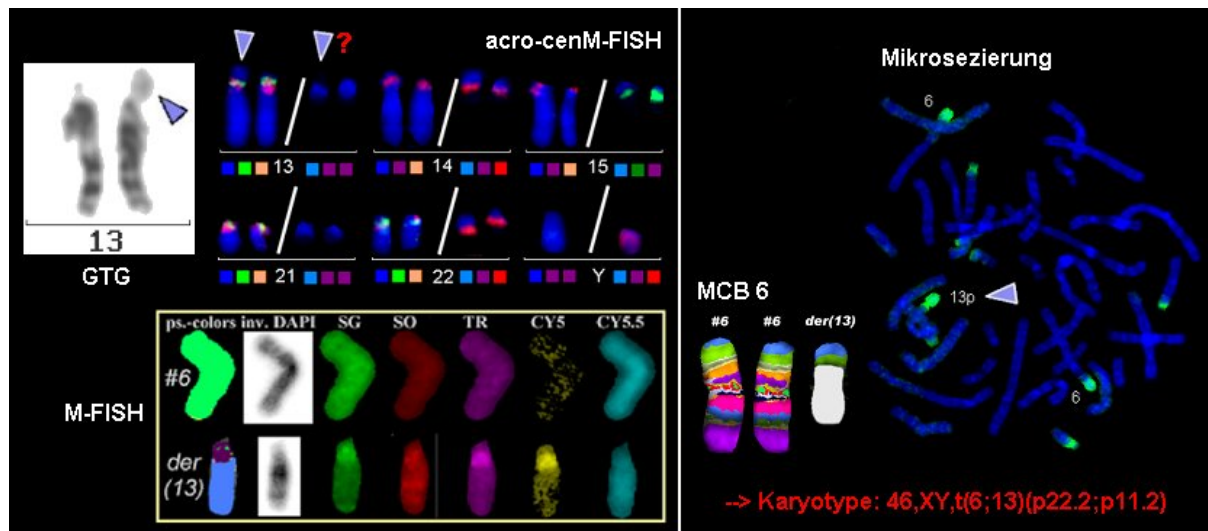
Im vorliegenden Fall wurde bei einem im Jahre 2000 2-jährigen Jungen aufgrund verschiedener phänotypischer Auffälligkeiten, wie einer zu geringen Körperhöhe, Entwicklungsverzögerungen, Mikrocephalie und Klinodaktylie eine Chromosomenanalyse durchgeführt. In der GTG-Bänderung fiel eine Vergrößerung des kurzen Armes von Chromosom 13 auf. Zum Ausschluss einer Translokation unter Beteiligung weiterer Chromosomen wurde eine M-FISH Analyse durchgeführt, die keine eindeutige Anfärbung im fraglichen Bereich des 13p+ erbrachte.

Da jedoch die Untersuchung mit dem acro-cenM-FISH Sonden Set keine vollständige Anfärbung des vergrößerten p-Armes mit der Midi 54 Sonde zeigte und somit eine Normvariante des kurzen Armes weitestgehend ausgeschlossen werden konnte, wurde zur Klärung der Identität der Veränderung eine Mikrosezierung des Bereiches durchgeführt. Bei Hybridisierung der Mikrosezierungsbank auf normale Metaphasen wurde neben den erwarteten Signalen auf allen kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen ein deutliches Signal in 6p nachgewiesen.

Dieses Ergebnis wurde durch eine weitere FISH-Analyse mit *pcp* Sonden für 6p und einer Subtelomersonde für 6p bestätigt (siehe Trifonov *et al.*, 2003).

Durch Einsatz des MCB-Sondenmixes für Chromosom 6 konnte der involvierte Bereich von 6p auf 6p22.2 bis 6pter eingegrenzt werden, für den in diesem Falle somit eine Trisomie bei dem Patienten vorliegt. Der endgültige Karyotyp konnte somit als

→ **46,XY,t(6;13)(p22.2; p11.2)** beschrieben werden.



**Abb. 3.18.:** FISH Ergebnisse Fall 382-00:

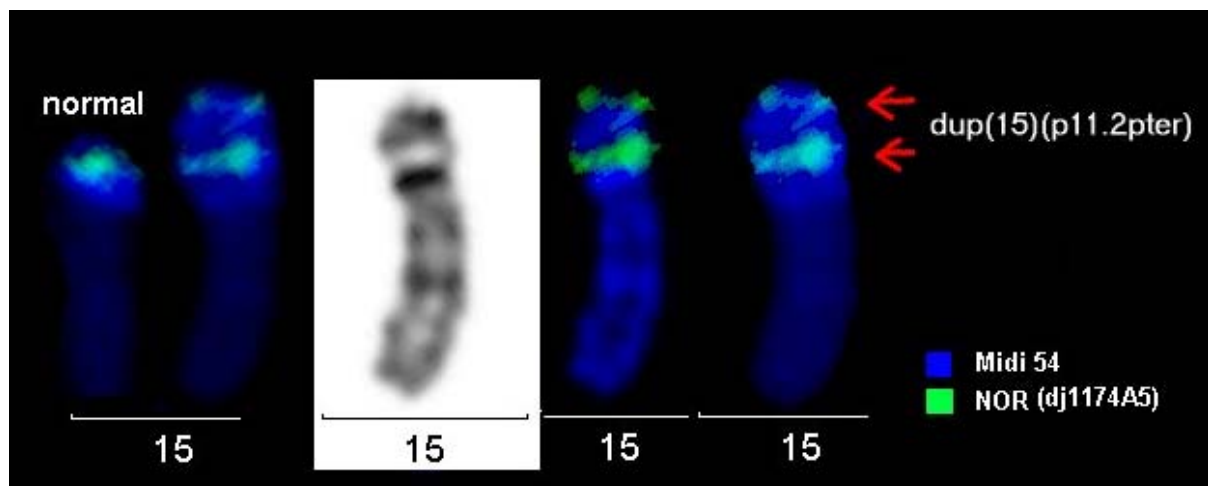
Linke Bildhälfte: obere Reihe links->das Ergebnis der GTG-Bänderung: 13p+; Im acro-cenM-FISH (rechts daneben) fällt eine unvollständige Anfärbung des 13p+ mit der Sonde Midi 54 auf. Die M-FISH-Analyse (links unten) gibt keinen Hinweis auf eine Translokation.

Rechte Bildhälfte: Eine Hybridisierung der Mikrosezierungssonde des fraglichen Bereiches auf MPP des Patienten zeigt eine Anfärbung des 13p+ selbst, der kurzen Arme aller akrozentrischen Chromosomen und in 6p. Die Analyse mit MCB 6 (links daneben) zeigt deutlich eine Trisomie für den Bereich 6p22.2 bis 6pter.

### Fall 81-03

In diesem Fall lag eine Vergrößerung des kurzen Armes eines Chromosoms 15 bei einem Jungen mit sehr milden phänotypischen Auffälligkeiten und seinem völlig unauffälligen Vater vor. Zur Charakterisierung der Veränderung in 15p wurde der acro-cenM-FISH Sondenmix eingesetzt. Dabei färbte sich der vergrößerte kurze Arm des Chromosoms 15 vollständig mit der Sonde für die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen (Midi 54) an. Die gleichzeitig mit hybridisierte Sonde für die NOR Region dieser Chromosomen zeigte zwei Signale im 15p+, so dass hier eine

➔ **direkte Duplikation 15p11.2 bis 15pter** nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 3.19.:** ( Fall 81-03)

FISH Ergebnisse mit dem acro-cenM-FISH Mix->links im Bild sind beide Chromosomen 15 gefärbt mit der NOR Sonde und der Midi 54 Sonde dargestellt: der kurzen Arm des rechten Chromosoms ist stark vergrößert, was auch im GTG Bild (rechts daneben) zu erkennen ist. Die Darstellung der NOR Sonde mit der DAPI-Färbung (rechts davon) zeigt ein doppeltes Signal mit der NOR Sonde. Der fragliche Bereich ist außerdem mit der Midi 54 Sonde vollständig angefärbt und lässt somit eine direkte Duplikation 15p11.2 bis 15pter erkennen.

### 3.2.2.3. Untersuchungen zur Herkunft und Zusammensetzung von Markerchromosomen

Alle 140 bisher in unserem Hause untersuchten Fälle mit Markerchromosomen sind im Anhang in Tabelle 8.9. dargestellt. An dieser Stelle soll nur auf einige ausgewählte Fälle in Form von Fallbeispielen näher eingegangen werden.

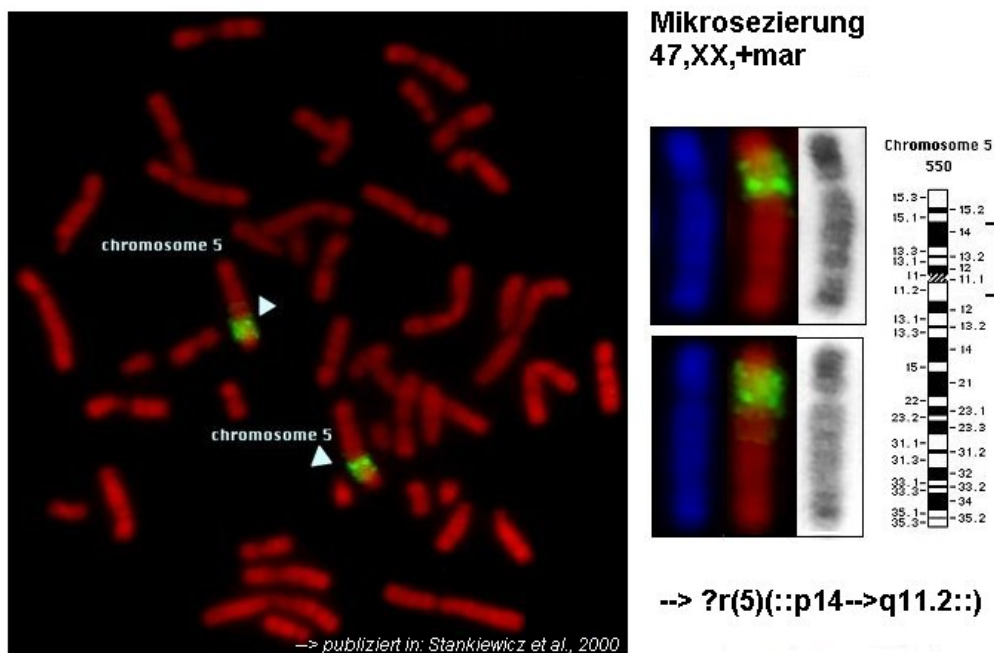
#### 3.2.2.3.1. Untersuchung von großen Markerchromosomen mittels Mikrosezierung und MCB Analysen

##### Fall Midi 114

Der vorliegende Fall (siehe Tabelle 3.3.;Midi 114) wurde von Dr. Stankiewicz , Warschau zur weiteren Abklärung eines Markerchromosoms unbekannter Herkunft im Blut der Patientin eingesandt. Es handelte sich um eine 27-jährige Frau, bei der milde faciale Dysmorphien und einer leichte mentale Retardierung vorlag.

Zur Bestimmung des Ursprungs des Markerchromosoms wurde zunächst eine Mikrosezierung des Markers und ein *reverse painting* durchgeführt. Nach Hybridisierung der Mikrosezierungsbank auf normale menschliche Metaphaseplatten konnte die Herkunft des Markers als aus der Region 5p14 bis 5q11.2 bestimmt werden (Stankiewicz *et al.*, 2000). Das Ergebnis dieser Hybridisierung ist in Abb. 3.20. dargestellt.

Der Marker zeigte in einigen Metaphaseplatten ein ringartige Struktur. Zur Klärung, ob es sich bei dem derivativen Chromosom 5 um ein Ringchromosom handelt, wurde daher eine weitere Hybridisierung mit einer Telomersonde für alle menschlichen Chromosomen (DAKO®) angeschlossen. In dieser Analyse konnte kein Signal auf dem „Marker“ nachgewiesen werden, was eine Ringstruktur wahrscheinlich werden lässt.



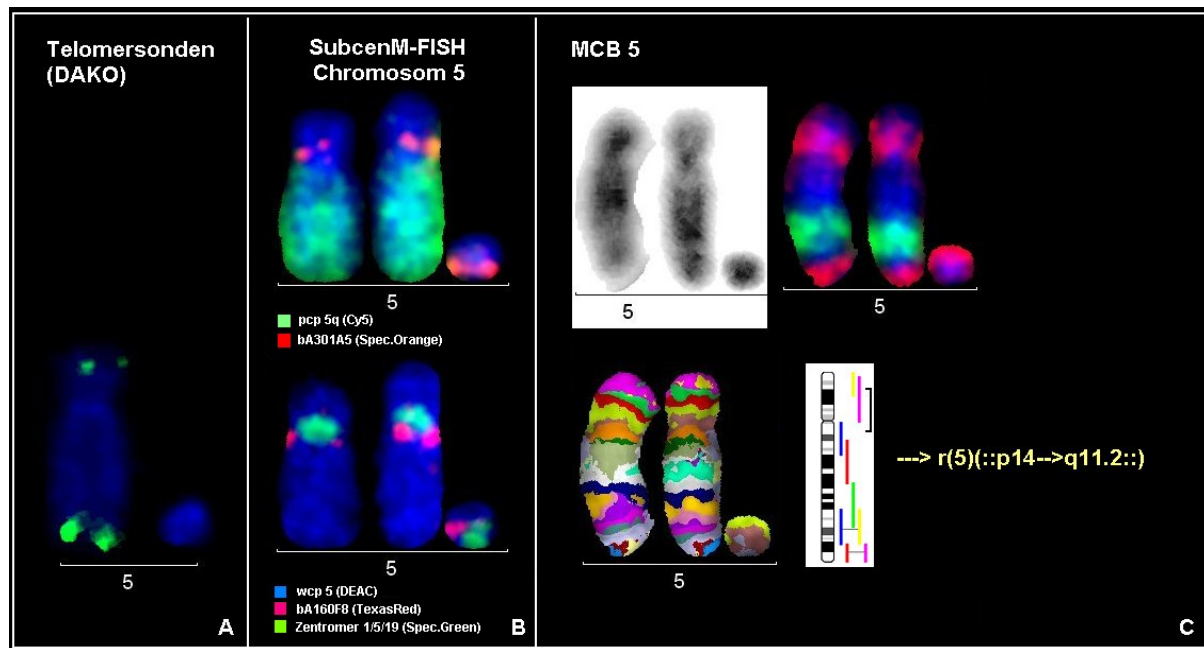
**Abb. 3.20.:**

Ergebnis der Hybridisierung der Mikrosezierungsbank des Markers auf normale menschliche Metaphasen. Die auf den Chromosomen 5 angefärbte Region ist in grün markiert: links in der Metaphase zu sehen, rechts auf den Chromosomen der gleichen Zelle mit DAPI Färbung und der invertierten DAPI-Bänderung. Das Signal deckt den Bereich 5p14 bis 5q11.2 ab (siehe rechts→ Darstellung im Ideogramm des Chromosoms 5).

Zur Verifizierung des Mikrosezierungsergebnisses wurde eine weitere Analyse mit dem MCB Sondenmix für Chromosom 5 durchgeführt, wobei das Ergebnis der Mikrosezierung bestätigt werden konnte.

Zur näheren Bestimmung der Bruchpunkte des Ringchromosoms, vor allem in 5q, wurde das subcenM-FISH Sonden Set für Chromosom 5 eingesetzt. Es konnten erwartungsgemäß Signale mit der Zentromersonde 1/5/19 (D5Z2), mit der Ganzchromosomensonde (*wcp*) 5 und mit der zentromernahen BAC Sonde bA301A5 in 5p12 aber auch mit der in 5q11.2 lokalisierten BAC Sonde bA160F8 nachgewiesen werden. Die *pcp*-Sonde für 5q zeigte ein kaum erkennbares Signal auf dem Ring. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 3.21. dargestellt. Nach Durchführung aller Analysen konnte im vorliegenden Fall der Karyotyp als:

→ **47,XX,+r(5)(::p14→q11.2::)** beschrieben werden.



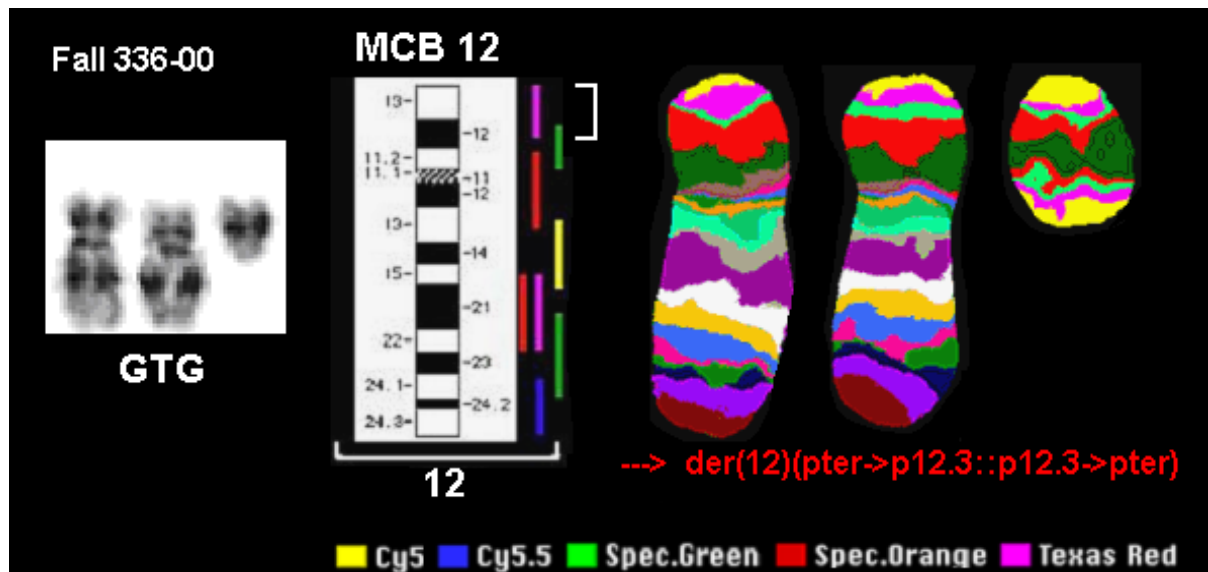
**Abb. 3.21.:**

Darstellung der weiteren Untersuchungen des Markerchromosoms: links: Ergebnis der Hybridisierung der Telomersonde (DAKO®) → Das Fehlen des Signals auf dem „Marker“ deutet auf eine Ringstruktur hin. Mitte: Mit dem subcenM-FISH Mix für Chromosom 5 konnten Signale mit allen eingesetzten Sonden mit Ausnahme der 5q-spezifischen Sonde nachgewiesen werden. rechts: Die Analyse mit der MCB Sonde 5 konnte das Vorliegen eines r(5)(p14q11.2) bestätigen. In der oberen Hälfte ist das invertierte DAPI-Bild und die Echtfarbandarstellung (3 Farbkanäle) zu sehen. Darunter sind die Chromosomen in Pseudofarben und das Markierungsschema gezeigt.

### Fall 336-00

Bei diesem Fall handelte es sich um ein 10jähriges Mädchen, das durch multiple Anomalien auffiel, die auf das Vorliegen eines Pallister-Killian-Syndromes (OMIM NR. #601803) hin deuteten. In der in Tübingen durchgeführten GTG-Analyse fand sich in einer von 76 untersuchten MPP aus peripherem Blut und in 34 von 75 analysierten Zellen aus Fibroblastenkultur ein überzähliges Markerchromosom, was eine dem kurzen Arm von 12p ähnliche Bänderung zeigte. Zur Bestätigung dieses Verdachtes wurden FISH Analysen mit der Ganzchromosomensonde für Chromosom 12 und einer Subtelomersonde 12p durchgeführt, die beide Signale auf dem Marker zeigten (siehe Dufke *et al.*, 2001). Die Zentromersonde für Chromosom 12 (D12Z3) ergab hingegen kein Signal auf dem Marker. Zur Eingrenzung des Bereiches von 12p auf dem Derivatvchromosom, wurde eine weitere FISH mit dem MCB Sondenmix für Chromosom 12 durchgeführt, die klar den invertiert vorliegenden, duplizierten Bereich 12pter bis 12p12.3 auf dem Marker erkennen ließ (siehe Abb. 3.22.). Somit konnte hier der Karyotyp als

→ **47,XX,+der(12)(pter→p12.3::p12.3→pter)** bestimmt werden.

**Abb. 3.22.:**

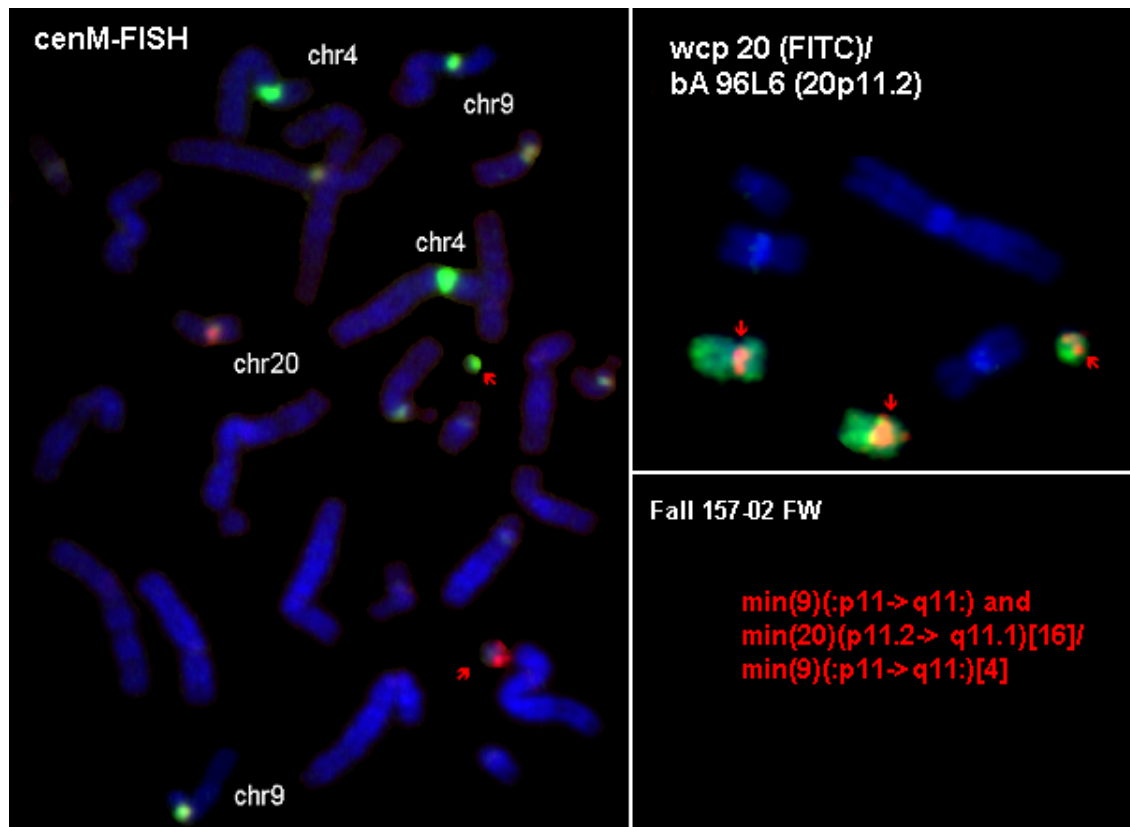
Untersuchungsergebnisse im Fall 336-00; Links im Bild das Ergebnis der GTG-Bänderung der Chromosomen 12 und des Markers; rechts daneben das Markierungsschema für den MCB-Sondenmix 12 und das Ergebnis der Analyse dargestellt in Pseudofarben; Das MCB 12 lässt eindeutig die partielle Tetrasomie des Bereiches 12p12.3 bis 12pter erkennen, der invertiert dupliziert auf dem Derivativchromosom vorliegt.

### 3.2.2.3.2. Untersuchungen zur Herkunft und Zusammensetzung von kleinen Markerchromosomen (SMCs) mittels Zentromer- und zentromernaher Sonden

#### Identifikation mehrerer Marker mittels cenM-FISH- Fall 157-02

Der vorliegende pränatale Fall wurde zur weiteren Abklärung eines Karyotyps von 47,XX,+mar /48,XX,+mar,+mar nach GTG-Analyse aus Chorionzottenbiopsie eingesandt. Zur Bestimmung der Herkunft der Markerchromosomen wurde das cenM-FISH Sonden Set eingesetzt, was in 16 von 20 analysierten Zellen deutlich zwei unterschiedlich gefärbte Marker erkennen ließ (Abb. 3.23.). Die Herkunft der beiden Marker konnte als von den Chromosomen 9 und 20 stammend identifiziert werden. Dieses Ergebnis wurde in einer Zweifarben-FISH-Analyse mit den Chromosom 9- und Chromosom 20-spezifischen Zentromersonden bestätigt (Daten nicht gezeigt). Zur Bestimmung der Bruchpunkte auf dem größeren der beiden Marker, der vom Chromosom 20 stammte, wurde eine *wcp* Sonde für Chromosom 20 zusammen mit den zentromernahen BAC-Sonden 96L6 (20p11.2) und 243J16 (20q11.2) hybridisiert. Dabei zeigte sowohl die *wcp*-Sonde als auch die BAC Sonde für 20p11.2 Signale auf dem Markerchromosom, so dass im vorliegenden Fall eine partielle Trisomie für den Bereich 2p11.2 vorlag. Das vom Chromosom 9 stammende Markerchromosom wurde nicht mit Lokus-spezifischen Sonden untersucht, da er sich vollständig mit der Zentromersonde 9 anfärbte. Es wurde in den 20 untersuchten Zellen auch 4 MPP nachgewiesen, die ausschließlich den vom Chromosom 9 stammenden Marker aufwiesen. Der Karyotyp nach FISH konnte folgendermaßen beschrieben werden:

→ 48,XX,+min(9)(:p11→q11:),+min(20)(:p11.2→q11.1)/  
47,XX,+min(9)(:p11→q11:).



**Abb. 3.23.:** (Fall 157-02FW)

Das Hybridisierungsergebnis mit dem cenM-FISH-Proben Set (links) lässt zwei unterschiedlich gefärbte Markerchromosomen erkennen. Rechts ist das Ergebnis der Untersuchung mit einer *wcp* Sonde für Chromosom 20 und der BAC Sonde 96L6 (20p11.2) zu sehen, die beide Signale auf dem vom Chromosom 20 stammenden Marker zeigten.

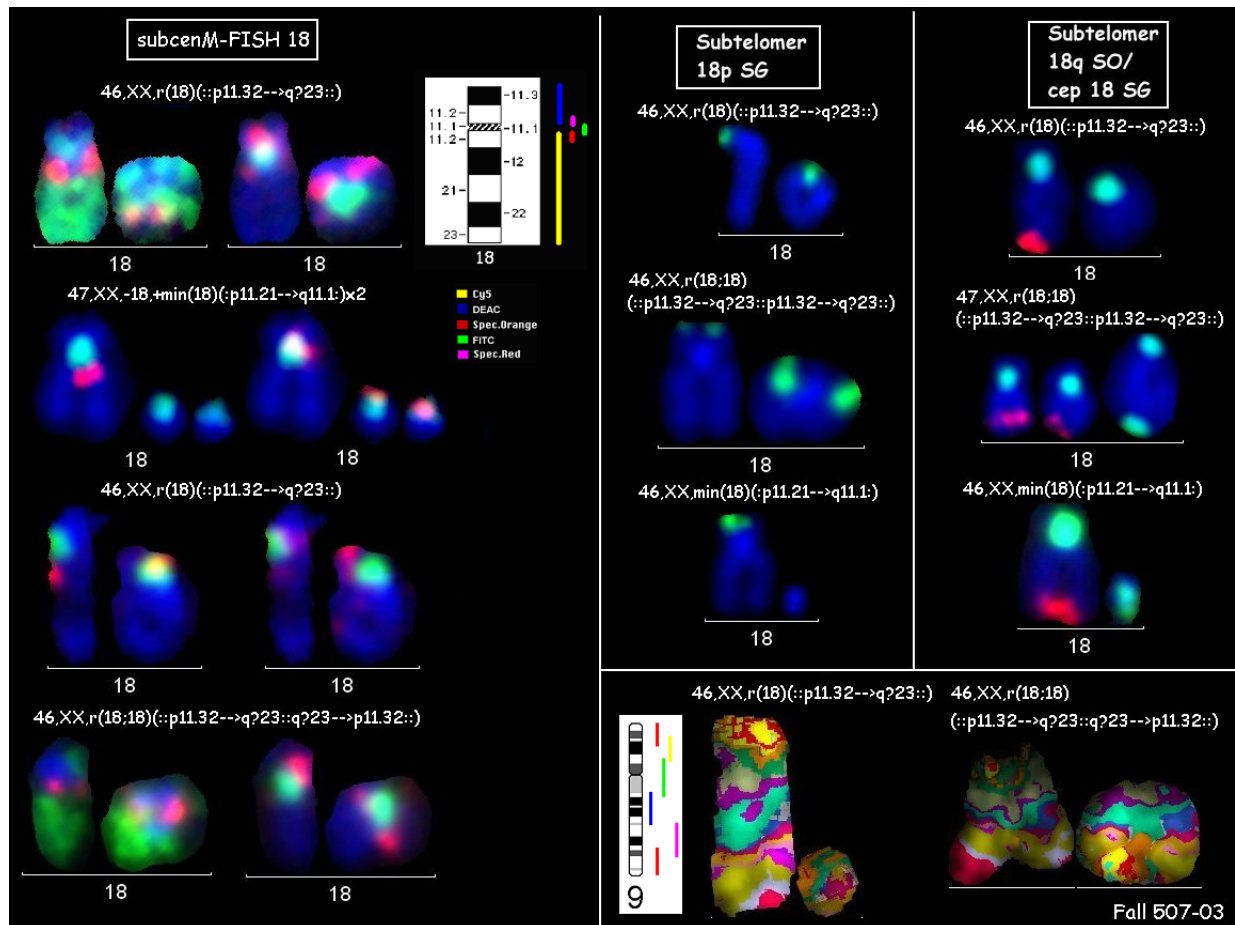
### Untersuchungen von Ringchromosomen mit subcenM-FISH Sonden- Fall 507-03

Es handelt sich hier um einen Fall, bei dem in der GTG-Analyse von Fruchtwasserzellen Zellen mit einer Monosomie 18 MPP und einem Ringchromosom 18 anstelle eines Chromosoms 18 und MPP mit einem zusätzlichen Ringchromosom 18 nachgewiesen wurden. Die weitere Abklärung erfolgte mittels FISH unter Einsatz eines MCB Sondenmixes und des subcenM-FISH Sonden Sets für Chromosom 18. Nach Hybridisierung des MCB 18 konnte festgestellt werden, dass die unterste Bande in 18q23 im Ringchromosom zum Teil deletiert ist. Daher wurden zur weiteren Analyse neben der Zentromersonde 18 Subtelomersonden für 18p und 18q eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass weder auf dem Ringchromosom 18 noch auf den ebenfalls nachgewiesenen Doppelringen und dem Abbauprodukt des Ringchromosoms, dem *minute* Chromosom 18, ein Signal mit der Subtelomersonde 18q nachgewiesen werden konnte. Ein Signal für die Subtelomerregion in 18p konnte zwar auf den einfachen und doppelten Ringen, nicht jedoch auf dem *minute* Chromosom 18 detektiert werden. Mit dem subcenM-FISH Sonden Set für Chromosom 18 konnte auf diesem neben einem Signal mit der Zentromersonde 18 auch Signale für 18p11.21 (bA151D11) erzielt werden. Auf den Ringchromosomen und dizentrischen Doppelringen, die den Bereich des Ringchromosoms direkt oder invertiert dupliziert enthielten, wurden Signale mit beiden zentromernahen Sonden bA151D11 (18p11.21) und bA59E12 (18q11.2) nachgewiesen werden.

Insgesamt liegt in diesem Falle in allen Zellen eine vollständige oder partielle Monosomie 18 vor. Daneben haben die Zellen mit den Doppelringen und die Zelle mit den beiden *minute* Chromosomen 18 eine partielle Trisomie 18. (siehe De Grouchy-Syndrom, OMIM NR. 601808, 607500). Der Karyotyp konnte nach FISH als:



→ 46,XX,r(18)(::p11.32→q?23::)/46,XX,r(18;18)(::p11.32→q?23::q?23→p11.32::)/  
 46,XX,r(18;18)(::p11.32→q?23::p11.32→q?23::)/46,XX,min(18)(:p11.21→q11.1:)/  
 47,XX,-18,+min(18)(:p11.21→q11.1:)x2/47,XX,-18,+min(18)(:p11.1→q11.1:)x2  
 bestimmt werden.



**Abb. 3.24.:**

Links: Ergebnisse der Hybridisierung des subcenM-FISH Mixes 18 auf die einzelnen Varianten des Ringchromosoms. Auf den einfachen und doppelten Ringen zeigen alle euchromatischen Sonden Signale, auf den *minute* Chromosomen dagegen nur die Zentromersonden und der BAC 151D11. Mitte: Subtelomersignale für 18q fehlen auf dem *minute* Chromosom 18. Rechts: Die Subtelomersonde für 18q fehlt auf allen nachgewiesenen Ringchromosomen und deren Unterformen. Rechts unten: MCB 18 lässt sowohl auf dem einfachen Ringchromosom als auch auf dem Doppelring das teilweise Fehlen der Region 18q23 erkennen.

### 3.2.2.4. Anwendung zusätzlicher Verfahren zur Analyse der Struktur und Zusammensetzung von Markerchromosomen

#### 3.2.2.4.1. Untersuchungen der Telomerregion von Marker- und Ringchromosomen

In den Fällen mit Markerchromosomen, die eine fragliche Ringstruktur aufwiesen und/oder in denen der Marker eine unterschiedliche Größe und Struktur in den Zellen zeigte (siehe Tabelle 8.9. im Anhang), wurde zur Aufklärung der Struktur zusätzlich eine Untersuchung der Telomerregion durchgeführt. Insgesamt wurden mit dem Telomersondenmix für alle menschlichen Telomere (DAKO®) bisher 26 Fälle hybridisiert.

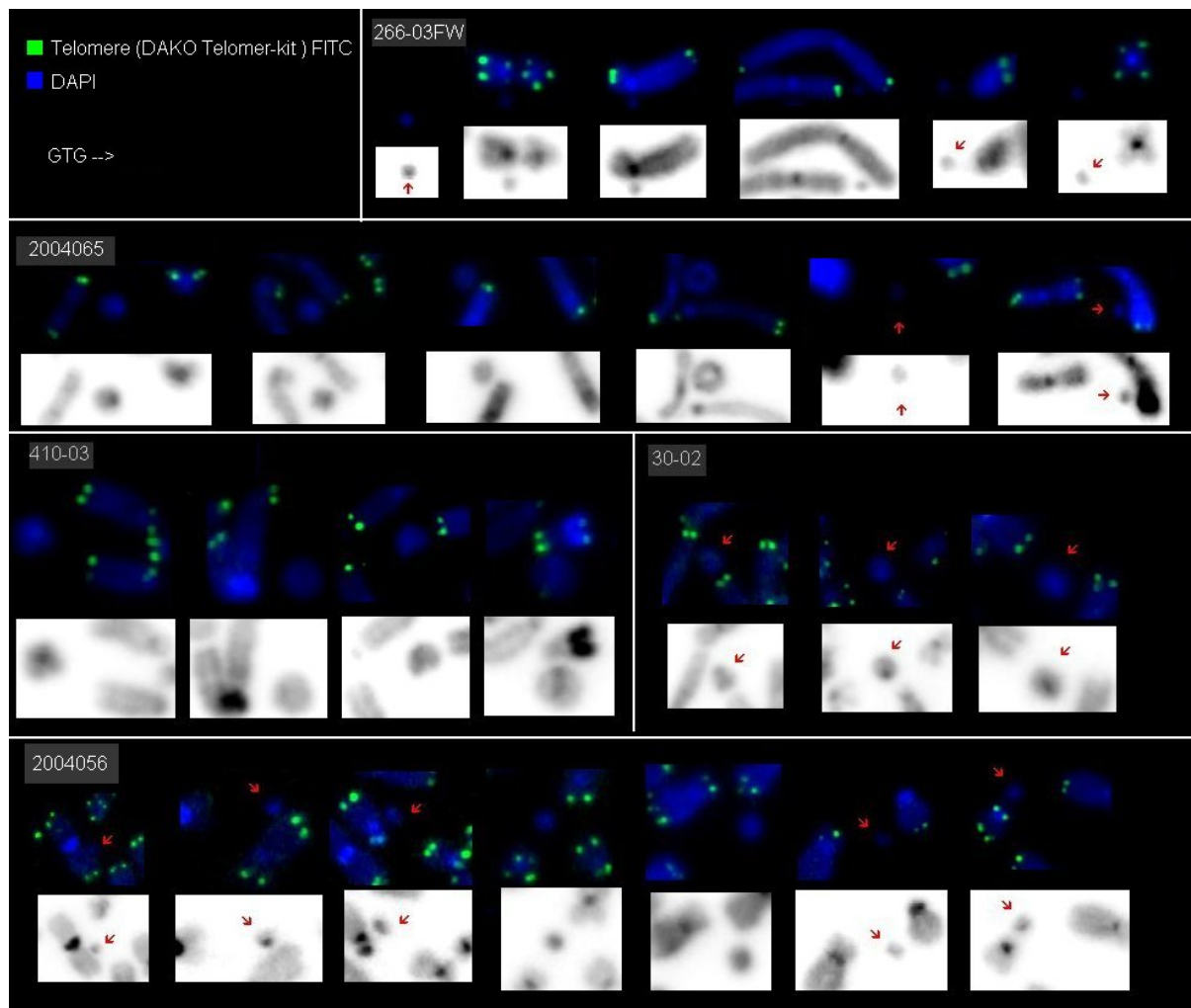
| Fall   | ErgebnisFISH und/oder GTG   | Telomer-Signal                   |
|--|---|----------------------------------|
| 127-01   | r(x)(p11.1q24)  | -                                |
| 194-03   | r(Y)::p11.3->q11.2(?)3::q11.2(?)3->p11.3::)   | -                                |
| 202-01   | r(2)::p11.2->q11.1::)   | -                                |
| 338-99   | r(8)::p11.21->q11.1::)  | -                                |
| 76-03  | r(15)(pter->q13.3-q21.1)  | -                                |
| 115-03   | r(15)::p11.1->q11.1::)  | -                                |
| 413-03FW                                       | r(19)::p13.11->q13.11-12::)[16]/r(19;19)<br>(::p13.11->q13.11-12::p13.11->q13.11-12::)[2]/<br>min(19)::p13.11->q13.11-12::)[5]  | -                                |
| Midi 12  | r(5)(p?11->p13.2), min(6)(p11.2->q12)   | -                                |
| Midi 43  | r(X)(q?10q13)   | -                                |
| 507-00   | min(12)::p?11->q11::)   | -                                |
| Midi 114                                       | r(5)::p14->q11.2::)   | -                                |
| 342-98/midi115                                 | min(1)::p12->q12::)   | -                                |
| BD<br>(Mackie Ogilvie<br><i>et al.</i> , 2001) | ?inv dup(?)   | +                                |
| 368-99FW                                       | inv dup(22)(q11)  | +                                |
| 218-02   | r(12)::p?11.2->q11::), r(12;12)::p?11.2->q11:: p?11.2<br>->q11::), r(12;12)( )::p?11.2->q11::q11->p?11.2::)   | -                                |
| 329-03   | r(6)(p11->q11.2), +mar, 6cenh-  | -                                |
| 01-4812  | r(X)  | -                                |
| 02-00194                                       | r(10), 2x mar?  | -                                |
| 93-2013  | r(X), mar(X)  | -                                |
| 2004056  | 47 Chromosomen: mar 1: min(20)::20p11.21<br>->20q11.21::)[5]/mar 2: min(20)::20p11.1->20q11.21::)<br>[1]/ma 3: r(20)::20p11.1->20q11.21::)[1]/mar 4:<br>r(20)::20p11.1->20q11.21::20p11.1->20q11.21::)[5]/mar 5:<br>min(20)::20p11.1->20q11.21::20p11.21->20q11.1::)[7]/mar 6:<br>inv dup(20)::20p11.1->20q11.21::20q11.21<br>->20p11.1::20p11.1->20q11.21::20p11.21<br>->20q11.1::)[1]/mar 7: inv dup(20)::20q11.1<br>->20q11.21::20p11.21->20q11.1::20q11.1<br>->20p11.21::)[1]/mar 8: inv dup(20)::20q11.1<br>->20q11.21::20p11.21->20q11.1::20q11.1->20p11.1::)[1] 48<br>Chromosomen: mar 9: min(20)::20q11.1<br>->20p11.21::20q11.21->20q11.1::) plus mar 4: r(20)::20p11.1<br>->20q11.21::20p11.1->20q11.21::)[1] | -                                |
| 30-02  | r(X)::p11.3->q21.1::)[2]/der(X)::p11.3<br>->q21.1::)[3]/der(X)::p11.21->q11.2::)[2]/ 45,X[93]   | -<br>(nur Ringe<br>untersucht !) |
| 410-03   | r(10)::11.2->q11.1::)   | -                                |
| 507-03   | 46,XX,r(18)::p11.32->q?23::)[16]/<br>46,XX,r(18;18)::p11.32->q?23::q?23<br>->p11.32::)[12]/46,XX,r(18;18)::p11.32->q?23::p11.32<br>->q?23::)[4]/<br>46,XX,min(18)::p11.21->q11.1::)[5]/47,XX,<br>-18,+min(18)::p11.21->q11.1::)x2[1]/47,XX,<br>-18,+min(18)::p11.1->q11.1::)x2[1]   | -                                |
| 2004065  | min(8)::p21->q11.21::)[4]/r(8)::p21->q11.21::)[8]/r(8)::p21<br>->q11.21::p21->q11.21::)[3]/min(8)::p21<br>->q11.21::),min(8)(p21->q10::q10->p21)[1]   | -                                |
| 266-03 FW                                      | min(6)::p11.1->q11.21::)  | -                                |
| 124-99   | i(13or21)(q11.1)  | +                                |

Tabelle 3.3.:

Auflistung aller, mit Telomersonden untersuchten, Fälle mit Markerchromosomen. In der Mitte ist das Ergebnis der Chromosomenanalyse nach GTG-Bänderung und FISH gezeigt. Rechts ist das Ergebnis der Untersuchung mit dem Telomersonden-kit (DAKO®) zu sehen.

In 17 Fällen davon wurde mittels GTG- und FISH-Analysen das Vorliegen eines Ringchromosoms diagnostiziert, in 8 Fällen wurden kleine (*minute*) Marker ohne Ringschluss diagnostiziert. In 9 der Fälle mit Ringchromosomen wurden neben dem ursprünglichen Ring auch Abbaustufen und Fragmente des jeweiligen Ringes nachgewiesen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob diese entstandenen Abbauprodukte nachweisbare Telomersequenzen besitzen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3.3. aufgelistet.

→ In keinem der 17 Fälle mit Ringchromosomen konnte ein eindeutiges Signal mit der Telomersonde auf dem jeweiligen Ringchromosomen diagnostiziert werden. Jedoch wurden ebenfalls keine Signale auf den Abbauprodukten der Ringe, den homologen *minute* Markern nachgewiesen, die wahrscheinlich keine Ringstruktur zeigten (Tabelle 3.3., rot unterlegt). In Abb. 3.25. sind die Untersuchungsergebnisse von 5 Fällen dargestellt. Es sind jeweils Ausschnitte aus verschiedenen Zellen mit Markerchromosom und darunter zur besseren Erkennung der Struktur des Markers das invertierte DAPI-Bild des gleichen Bereichs zu sehen. In keinem der dargestellten Fälle konnte ein Telomersignal auf dem Marker- oder Ringchromosom nachgewiesen werden.



**Abb. 3.25.:**

Hybridisierungsergebnisse der Analysen mit der Telomersonde (DAKO®) auf MPP von 4 Patienten mit Ringchromosomen und deren Abbaustufen und einem Fall mit einem *minute* Chromosom 6 (266-03). Dargestellt sind Ausschnitte verschiedener MPP mit DAPI-Färbung und Telomersignal und darunter der gleiche Ausschnitt im invertierten DAPI-Bild

**3.2.2.4.2. Untersuchungen mit Lokus-spezifischen Sonden zur Bruchpunktbestimmung von Fällen mit Markerchromosomen vom Chromosom 12**

Zur exakten Bestimmung der Bruchpunktregionen und damit zur evtl. Eingrenzung von klinisch relevanten Genen in der unmittelbar dem Zentromer 12 angrenzenden Region wurden 4 Fälle mit vom Chromosom 12 stammenden Markerchromosomen untersucht.

Die Untersuchungen wurden am Universitätsklinikum Leuven (Belgien) in Zusammenarbeit mit Dr. J.P. Vermeesch durchgeführt. Die verwendeten Sonden und die Hybridisierungsergebnisse in allen vier Fällen sind in Abb. 3.26. zusammengefasst.

Die eingesetzten unmittelbar dem Zentromer 12 angrenzenden Sonden (rot markiert) wurden dort etabliert und sequenziert (siehe Vermeesch *et al.*, 2003). Daneben wurden Klone des 1Mb Klon Sets des Sanger Centers (<http://www.sanger.ac.uk>) (grün markiert) und die Sonden des subcenM-FISH Sonden Sets für Chromosom 12 verwendet.

Die Fälle BK und HY sind in Belgien bereits zytogenetisch untersucht worden. Nähere Informationen zu Fall HY sind in Vermeesch *et al.*, 1999 zu finden. Bei den Fällen MR und HS handelt es sich um Patienten die zur Chromosomenanalyse nach Jena überwiesen wurden (Tabelle 8.9. im Anhang; Fälle 218-02 und 507-00).

Der Fall HS ist in Von Eggeling *et al.*, 2002 veröffentlicht.

| BK | HY |                     | MR  | HS |
|----|----|---------------------|-----|----|
|    |    | <b>12pter</b><br>▼  |     |    |
|    |    | RP11-230B21         | ?   |    |
|    |    | RP11-310J24         | +   |    |
|    |    | RP11-59L15          | +   |    |
|    |    | RP11-77J22          | +   |    |
|    |    | RP11-388G12         | +   |    |
| -  |    | bA517B23 (12p11.21) | +   | -  |
|    |    | 1144I10             |     | +  |
|    |    | 1037C6*             |     | +  |
|    |    | 1200M16             |     | +  |
|    |    | 928F20              |     | +  |
|    |    | 876C13              |     | +  |
|    |    | <b>Zentromer</b>    |     |    |
| +  | +  | 903K5               | -   | +  |
|    | +  | 931P23              | -   |    |
| +  | +  | 188K6               |     |    |
|    | +  | 986c8*              | (+) |    |
| +  | +  | 967P3*              | (+) | +  |
| -  | +  | 836L17              | -   | +  |
| -  | -  | bA152M7 (12q12)     | -   | +  |
|    | -  | RP11-115F18         | -   | -  |
|    |    | RP11-510P12         | -   | -  |
|    |    | ▼<br><b>12qter</b>  |     |    |

**Abb. 3.26.:**

Anordnung der eingesetzten Klone und die auf den 4 Fällen auf dem Markerchromosom erzielten Ergebnisse. Die Sonden sind unterteilt in

- Rot → Sonden der Arbeitsgruppe Dr. Vermeesch (Vermeesch *et al.*, 2003)
- Grün → Sonden des Subzentromer-Sonden Sets (siehe Tabelle im Anhang)
- Schwarz → Sonden des 1 Mb Klon-Sets des Sanger Center (<http://www.sanger.ac.uk>)

→ Nach Durchführung der Untersuchungen konnte in den Fällen BK, HY und HS eine Eingrenzung des betroffenen Bereiches bis auf einen Bereich von einigen Hundert Kb

---

erfolgen, im Fall BK sogar darunter und somit eine weitere Eingrenzung der involvierten Gene getroffen werden.

→ Es konnte der Nachweis von Sequenzhomologien einiger Sonden in 12p und 12q auf molekular-zytogenetischer Ebene erbracht werden:

Die Sonden 986c8\* und 967P3\* (kartiert in 12q) zeigten im Fall HY, der ausschließlich Material des Zentromerbereiches und aus 12q enthält die erwarteten Signale. Jedoch konnten auch Signale im Fall MR nachgewiesen werden, der höchstwahrscheinlich nur Anteile von 12p hat.

Mit der Sonde 1037c6\* konnte im Fall HS im Interphasekern doppelte Signale nachgewiesen werden.

*Diese Daten korrelieren auch mit den Sequenzierungsdaten dieser Klone (Vermeesch et al., 2003).*

→ Der Versuch einer Korrelation der Bruchpunkte bzw. im Marker enthaltenen Regionen mit der Klinik gestaltet sich schwierig, da

- Die Anzahl der untersuchten Fälle sehr niedrig ist,
- Im Fall HY mehrere Marker vorhanden sind, die für klinische Auffälligkeiten ursächlich sein können (Vermeesch *et al.*, 1999),
- In jedem Fall ein anderer Bereich des Chromosoms 12 auf dem Marker vorhanden ist.

## IV. Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich die, schon in der Einleitung erwähnten, FISH Methoden, wie die FISH mit Lokus-spezifischen Sonden, mit Zentromersonden und *painting*-Sonden etabliert. Es wurden Ein- bis Dreifarben-FISH Analysen mit diesen Sonden standardmäßig durchgeführt. Des Weiteren stand die Mikrosezierungstechnik und das Multicolor-FISH Verfahren unter Verwendung von *wcp* Sonden zur Verfügung.

Neben den Sonden für bekannte Mikrodeletionssyndrome fehlten jedoch Methoden, mit denen Veränderungen sehr kleiner chromosomaler Bereiche (kleiner als eine GTG-Subbande) erfasst werden konnten, sowie Analysetechniken für die perizentrische Region des Menschen.

Die Etablierung geeigneter Techniken zur Untersuchung dieser Bereiche und deren Einsatz zur Charakterisierung von entsprechenden Veränderungen war Inhalt dieser Arbeit. Im ersten Teil der Diskussion soll auf die hier entwickelten Techniken und im zweiten Teil auf die eigentlichen Untersuchungsergebnisse eingegangen werden.

### 4.1. Verfahren zur Analyse der perizentrischen Region im menschlichen Genom

#### 4.1.1. Die Vielfarben-Bänderungstechniken

Zur Charakterisierung von inter- und intrachromosomalen Veränderungen auf (GTG-) Subbandenniveau wurde zunächst die Multicolor-Bänderungstechnik (MCB) entwickelt. Dabei wurden zwei verschiedenen Ansätze verfolgt. Zum Einen das MCB auf der Basis von Mikrosezierungs sondens und zum Anderen das YAC/BAC basierende MCB.

##### 4.1.1.1. Das Mikrosezierungs-basierende MCB für das menschliche Genom

Es wurden für alle menschlichen Chromosomen Mikrosezierungs-basierende MCB Sonden Sets entwickelt, die im Ergebnisteil unter 3.1.1.1. näher beschrieben sind. Diese wurden aus insgesamt 138, in den Grenzbereichen überlappenden, regionspezifischen Mikrosezierungsbanken zusammengestellt. Die beim Schneiden entstehende „Ungenauigkeit“, die zur Überlappung der Banken und damit ihrer Fluorochromprofile führt, ist hier erwünscht und entscheidend für die hohe Auflösung. Dadurch können in diesen Regionen durch dort entstehende Mischungsverhältnisse der Farbstoffe mittels Software zusätzliche Pseudofarben zugeordnet werden. Eine optimale Bänderung wird erzielt, wenn die Fluorochromprofile einer Gauß'sche Verteilungskurve entsprechen (Chudoba *et al.*, 1999, Liehr *et al.*, 2002b).

Mit diesen Chromosomen-spezifischen Sondenmischen konnte für alle Chromosomen ein Genom-weites, hochauflösendes und reproduzierbares Bandenmuster erzielt werden (siehe Abb. 3.2.). Diese Bänderung ist weitgehend unabhängig vom Kondensationsgrad der untersuchten Chromosomen, wie vergleichende Hybridisierungen an Chromosomen aus Blut oder Fruchtwasser und auch an relativ dekondensierten Chromosomen von Patienten mit Tumorerkrankungen zeigten (z.B. Chudoba *et al.*, 1999, Lemke *et al.*, 2001, Starke *et al.*, 2001b).

Mit den etablierten Sondenmischen war eine lückenlose Abdeckung der euchromatischen Bereiche der einzelnen Chromosomen gewährleistet, die eine Charakterisierung von Aberrationen bis auf Subbandenniveau erlaubte. Es ist mit dieser Technik möglich, sowohl interchromosomale als auch intrachromosomale Umbauten und ihre Bruchpunktregionen exakt zu beschreiben. Dabei ist neben einer Aussage über die Größe des veränderten Bereiches bei Insertionen, Duplikationen und Translokationen auch eine Bestimmung der Orientierung der veränderten Region möglich (Liehr *et al.*, 2002a).

#### 4.1.1.2. Grenzen dieser MCB Technik

Bei der Anwendung dieser Mikrosezierungs-basierenden MCB Technik wurde bisher in 8 von ca. 200 mittels MCB untersuchten Fällen beobachtet, dass die zugeordneten Pseudofarben nicht immer verlässlich auf die Herkunft des Bereiches schließen lassen. Entstehen z.B. durch chromosomale Umbauten in den dann benachbarten Regionen Fluorochromverhältnisse, wie in einem anderen Bereich des Chromosoms, werden dort die gleichen Pseudofarben zugeordnet. So kann es zu Fehlinterpretationen kommen, da die Herkunft der neu entstehenden Pseudofarben falsch interpretiert werden kann (siehe Abb. 8.6. im Anhang; Starke *et al.*, 2001a). Deshalb ist es wichtig, neben den Pseudofarben auch stets die einzelnen Fluorochromprofile zu betrachten, die in diesen Fällen eine verlässliche Aussage zulassen (z.B. Weise *et al.*, 2002).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bänderung mittels Pseudofarben doch zu einem gewissen Anteil abhängig vom Dekondensationsgrad der untersuchten Chromosomen ist (Lehrer *et al.*, 2004). So konnte beobachtet werden, dass insbesondere bei Anwendung sehr hoch auflösender Pseudofarb-Dateien (ca. 80 Pseudofarben) auf kürzeren Chromosomen weniger Farbbanden zu sehen sind als auf sehr langen Exemplaren des selben Chromosoms.

Bisher (bis zum Jahre 2003) wurden gleichzeitig ein bis maximal drei MCB Sonden Sets in einer Hybridisierung eingesetzt, da sich aufgrund der begrenzten Anzahl der verfügbaren Fluorochrome auch die mittels Software zugewiesenen Pseudofarben wiederholen, und so beim Einsatz von mehreren MCB Mixen keine eindeutige Zuordnung mehr erlauben. Kombiniert man jedoch MCB mit Multicolor-FISH, ist es möglich, auch hochkomplexe Karyotypveränderungen, die mittels MFISH bereits erfasst wurden, mit einer Hybridisierung aller MCB-Mixe in einem M-MCB Set (*Multitude-FISH*; Weise *et al.*, 2003) in ihren Bruchpunkten genau zu charakterisieren. Voraussetzung ist jedoch, dass komplexe Veränderungen vorher mit der Multicolor-FISH Technik bereits erkannt und eingegrenzt wurden. Diese Methodenkombination von M-FISH und MCB eignet sich besonders zur Untersuchung von Zelllinien mit hochkomplexen Veränderungen.

#### 4.1.1.3. Entwicklung von YAC-, BAC- basierenden MCB Sonden-Sets

Für die Chromosomen 2, 13 und 22, also ein sehr langes, ein mittelgroßes und ein sehr kleines menschliches Chromosom, wurden MCB Sonden Sets entwickelt, die auf lokusspezifischen YAC- und BAC- Sonden basierten (Liehr *et al.*, 2002b).

Für das Chromosom 22 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Entwicklung eines MCB Sondenmixes auf Basis von Einzelsonden möglich ist und zu guten Bänderungsergebnissen führt (Liehr *et al.*, 2002b).

Dieses MCB, basierend auf Einzelsonden, hat den Vorteil, dass eine Bestimmung der Bruchpunkte auf Basis der physikalischen Kartierung der eingesetzten Sonden erfolgen kann, während bei dem Mikrosezierungs-basierenden MCB eine Bestimmung auf (GTG) Banden- oder Subbanden-Niveau erfolgt. Allerdings ist auch hier beim Chromosom 22 eine wirklich lückenlose Abdeckung mit diesen, nur sehr kleine Bereiche des Genoms abdeckenden, Sonden kaum möglich, so dass bei seiner Anwendung zur Charakterisierung chromosomaler Veränderungen Regionen der Analyse entgehen können. Eine vollständige Abdeckung ganzer Chromosomen mittels Einzelsonden ist umso schwieriger bis unmöglich (siehe YAC/BAC- basierendes MCB für Chromosomen 2 und 13), wenn größere Chromosomen abgedeckt werden sollen (Liehr *et al.*, 2002b). Eine Ursache dafür kann zum Einen sein, dass die verfügbaren Klone und deren Sequenzierungsdaten immer noch einem ständigen Fluss unterliegen und so eine gezielte Zusammenstellung der Klone für eine Bandendarstellung erschweren. Zum Anderen sind Klone, die repetitive Sequenzen im Genom markieren, oft nicht sequenziert und würden auch durch den durchgeführten *blocking*-Schritt vor der Hybridisierung (Lichter *et al.*, 1988) kein spezifisches Signal zeigen. So sind zum Beispiel keine spezifischen Klone für die repetitive Region in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen und für die Telomerbereiche verfügbar (Bailey *et al.*, 2001, Horvath *et al.*, 2001). Es konnte daher insbesondere bei der Hybridisierung auf sehr langen Chromosomen, wie dem Chromosom 2, eine nur unvollständige, einer „Bänderung“

ähnliche Abdeckung (siehe Abb. 8.7. Im Anhang) erzielt werden. Dies führte zu keiner Gauß'schen Verteilung der Fluorochrome bei den Chromosomen 2 und 13 und damit zu keiner gleichmäßigen Verteilungskurve der Fluorochromprofile. Deshalb konnte auch mit Pseudofarben keine gleichmäßige Bänderung erzielt werden. Die deutlich besseren Ergebnisse bei der Etablierung des YAC/BAC MCB 22 haben ihre Ursache wahrscheinlich darin, dass aufgrund der geringeren Größe dieses Chromosoms, eine weitaus bessere Abdeckung mit Einzelbanken möglich ist. Zum Zeitpunkt der Entwicklung des Sondenmixes waren allerdings auch zum Chromosom 22 wesentlich besser charakterisierte Klone erhältlich als dies für die Chromosomen 2 und 13 der Fall war, so dass hier eine gezieltere Auswahl an Klonen für die jeweiligen Regionen des Chromosoms getroffen werden konnte.

#### 4.1.1.4. Vergleich der Vielfarb-Bänderungstechniken

Die Etablierung eines YAC/BAC-Sondenmixes, wie er für die Chromosomen 2, 13 und 22 entwickelt wurde, ist vor allem bei größeren Chromosomen mit einem sehr hohen Aufwand verbunden. Ein Mikrosezierungs-basierendes MCB dagegen lässt sich vergleichsweise leicht erstellen. Dies ist wahrscheinlich auch ein Grund, weshalb bisher nur wenige Versuche einer Bänderung mittels Einzelsonden durchgeführt wurden. Die Arbeitsgruppe um Lengauer hat 1993 die Entwicklung einer YAC- basierenden *bar codes* beschrieben, bei dem allerdings zur vollständigen Abdeckung auch *wcp* Sonden mit zum Einsatz kamen (Lengauer *et al.*, 1993). Weitere Untersuchungen zum „*chromosome barcoding*“ wurden u.a. veröffentlicht von Lichter *et al.*, 1991, Weier *et al.*, 1996, Henegariu *et al.*, 1998, Gisselsson *et al.*, 1999 und Speicher *et al.*, 2000, wobei aber in jedem Fall das Problem der vollständigen Abdeckung des/der markierten Chromosomen bestand. Andere, in den letzten Jahren entwickelte, Bänderungsverfahren sind zum Einen der „*chromosome bar code*“ (Müller *et al.*, 1997) und das Rx-FISH („*cross species color banding*“, Müller *et al.*, 1998), bei dem als Sonden Ganzchromosomensonden vom Gibbon zur Hybridisierung auf menschliche Chromosomen verwendet werden. Durch die evolutionär bedingten Abweichungen im Karyotyp zwischen Mensch und Gibbon kommt es zur Anfärbung von Teilbereichen auf den jeweiligen homologen menschlichen Chromosomen. Es wird so eine „Bänderung“ der Chromosomen erzeugt. Allerdings werden hier nur 3 Fluorochrome eingesetzt und es können nur ca. 80-100 Teilbereiche unterschieden werden. Durch eine Kombination von Rx-FISH und „*chromosome bar code*“ konnte eine Differenzierung zwischen ca. 160 Banden erzielt werden (Müller und Wienberg, 2000). Dies entspricht einer Auflösung von ca. 400 Banden pro haploiden Chromosomensatz, welche jedoch für die meisten Chromosomen immer noch deutlich unter der bereits nach GTG-Bänderung erzielten Auflösung liegt.

Eine Methode, die die Verfahren der Bänderungszytogenetik und des M-FISH kombiniert, ist das IPM-FISH (IRS-(*interspersed*)-PCR-M-(*multiplex*)-FISH) (Aurich Costa *et al.*, 2001), das jedoch vor allem bei sehr kondensierten Chromosomen und hochkomplexen Chromosomen-Veränderungen nur eine niedrige Auflösung im Vergleich zur MCB Technik zeigt.

Auch auf Mikrosezierungssonden basierend ist die Bänderungstechnik des SCAN („*Spectral color banding*“) (Kakazu *et al.*, 2003), welches für die Chromosomen 3 und 10 entwickelt wurde. Da hier mit nicht überlappenden Banken gearbeitet wurde, ist neben der Einschränkung, dass es nicht für alle Chromosomen verfügbar ist, auch eine vollständige Abdeckung der markierten Chromosomen nicht gewährleistet. Die erzielte Auflösung ist durch die Größe der geschnittenen Banken festgelegt.

Insgesamt bietet das Mikrosezierungs-basierende MCB mit seiner vollständigen Abdeckung der Chromosomen, seiner hohen Auflösung, seiner Verfügbarkeit für alle menschlichen Chromosomen erhebliche Vorteile gegenüber allen genannten Bänderungstechniken. Es ist mit den zuvor beschriebenen Einschränkungen (siehe 4.1.1.2.) für den Einsatz in der Routine-Diagnostik hervorragend geeignet, wie bereits zahlreiche Veröffentlichungen belegen (Chudoba *et al.*, 1999, Lemke *et al.*, 2001, Starke *et al.*, 2001a und b, Liehr *et al.*, 2002a, Weise *et al.*, 2002).

So gut sich die MCB Methode auch eignet um Veränderungen von euchromatischen Bereichen im Genom zum beschreiben, so wenig aussagekräftig ist sie, wenn Variationen in heterochromatischen Regionen und *repeat*-reichen Bereichen untersucht werden sollen. Bei der CISS-Hybridisierung (Lichter *et al.*, 1988) werden derartige Bereiche, wie



Zentromerregionen, die DNA der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen und auch die der Telomerregionen, abgeblockt und somit nicht spezifisch angefärbt. Damit ist es nicht möglich, Veränderungen dieser Bereiche zu erfassen. Auch die Charakterisierung der Zusammensetzung sehr kleiner Markerchromosomen, die oft größtenteils aus Zentromermaterial bestehen, ist mittels MCB nicht möglich. Zur exakten Charakterisierung dieser Veränderungen wurden daher für die vorliegenden Studien andere FISH Methoden entwickelt.

Um die Vorteile beider entwickelten MCB Verfahren nutzen zu können, bietet sich, als ideal erscheinende Kombination, der Einsatz von Mikrosezierungs-basierenden MCB Sonden Sets in Verbindung mit einzelnen YAC- oder BAC Sonden der fraglichen Region an (Weise *et al.*, 2002). So wurden inzwischen zu einigen Mikrosezierungs-basierenden MCB Mixen die Subtelomersonden der jeweiligen Chromosomenarme in zusätzlichen Farbkombinationen hinzugefügt. Andererseits kann auch eine Hybridisierung mit dem Mikrosezierungs-basierenden MCB zur Eingrenzung der betroffenen Region auf Subbanden-Niveau gefolgt von einer FISH mit Einzel-YAC oder BAC-Sonden zu einer exakten Charakterisierung von Bruchpunkten genutzt werden.

#### **4.1.2. Methoden zur Bestimmung von Veränderungen der Zentromerregion und angrenzender Bereiche**

##### **4.1.2.1. Die Technik des cenM-FISH**

Da zu Beginn dieser Arbeit zur Anfärbung von Zentromerregionen im Höchsthalle mit drei Fluorochromomen gearbeitet werden konnte, war eine Darstellung mehrerer Zentromerregionen nur in begrenztem Umfang möglich. Mit Hilfe der entwickelten cenM-FISH Technik (Nietzel *et al.*, 2001) können nun, in einem Hybridisierungsschritt, fast alle menschlichen Zentromerregionen, die jeweils mit unterschiedlichen Farbkombinationen markiert sind, spezifisch angefärbt werden. Ein ähnliches Verfahren, das CM-FISH („centromeric multiplex FISH“) wurde im gleichen Jahr von der Arbeitsgruppe um Henegariu beschrieben (Henegariu *et al.*, 2001).

So ist es mit der cenM-FISH Technik möglich, innerhalb von 24 Stunden die Herkunft fast jedes kleinen Markerchromosoms (mit Ausnahme analphoider Marker) sicher zu bestimmen. Dies ist die Voraussetzung für gezielte, weitergehende Untersuchungen. Dies sind z.B. Analysen der perizentrischen, euchromatischen Regionen von größeren Markerchromosomen (größer als 17p), z.B. mit Hilfe des MCB oder mittels subcenM-FISH zur Detektion euchromatischer Bereiche auf kleineren (*minute*) Markern. Einen großen Vorteil bringt das cenM-FISH auch in den seltenen Fällen, in denen mehrere Marker von verschiedenen Chromosomen vorkommen. Hier ist eine gleichzeitige und exakte Identifizierung aller auftretenden SMCs möglich.

Daneben ist das cenM-FISH Sonden Set auch bei der Analyse der meiotischer Rekombinationen einsetzbar, wie Untersuchungen in menschlichen Spermatozyten zeigten (Oliver-Bonet *et al.*, 2003, Sun *et al.*, 2004). Weiterhin ist das Verfahren sehr nützlich bei der Charakterisierung multizentrischer Chromosomen, wie sie in Tumorzelllinien vorliegen können (Nietzel *et al.*, 2001).

##### **4.1.2.1.1. Das Problem der Sequenzhomologien der einzelnen Zentromerbereiche**

Nicht völlig getrennt dargestellt werden können Zentromere, die gleiche oder sehr ähnliche Alpha-Satelliten-Subfamilien enthalten und somit eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. Dies sind z.B. die Zentromerregionen der Chromosomen 4 und 9 (D4Z1), der Chromosomen 2 und 20 (D2Z1) und der Chromosomen 14 und 22 (D14/22Z1). Eine Unterscheidung dieser ähnlichen Zentromer-Anteile war jedoch durch den jeweiligen Einsatz von spezifischen Sonden für die Zentromere 9, 20 und 22 möglich. (siehe Tabelle 8.3. im Anhang). Nicht unterschieden werden konnten die Zentromerregionen der Chromosomen 13 und 21, da hier die Sequenzhomologie fast 100%ig ist (Maratou *et al.*, 1999). Die Zentromersonde der Chromosomen 1, 5 und 19 (D1Z7), die ebenfalls gleiche Subfamilien enthalten (z.B. Choo, 1991), zeigte jedoch (auch bei Hybridisierung ohne COT1-DNA) keine erkennbaren Signale

in der Zentromerregion des Chromosoms 1, so dass diese Sonde hier als Zentromersonde 5/19 eingesetzt werden konnte.

Eine Unterscheidung zwischen Chromosom 5 und 19 erfolgte durch die Verwendung einer Mikrosezierungssonde (Midi 12), die die „Zentromerregionen“ der Chromosomen 5 und 6 anfärbt. Bei genauer Analyse dieser Sonde fällt jedoch auf, dass die DNA der Zentromerregion des Chromosoms 5 nur zu einem sehr geringen Teil in der Sonde enthalten ist, und (vor allem beim Einsatz von COT1-DNA) das Zentromer 5 nicht anfärbt. Dies erschwert eine Identifizierung von kleinen, Markern, die sich ausschließlich aus Material des Zentromers 5 zusammensetzen. Hybridisiert man jedoch diese Sonde ohne vorherigen „*blocking*-Schritt“, erhält man Signale im Zentromerbereich der Chromosomen 1, 5, 6 und 19. Insgesamt ist also eine sichere Unterscheidung der Zentromere 5 und 19 mit den verwendeten Sonden nicht erreichbar.

Allerdings wäre es mit diesem Wissen nun möglich, eine „spezifische“ Anfärbung des Zentromers 1 über eine Kombination der Zentromersonden 5/19, 6 (Midi12; mit COT1 DNA geblockt) und 1/5/6/19 (Midi 12; ohne *blocking*) zu erzielen, was bis dato ebenso wie beim Y-Chromosom mittels einer Sonde für den heterochromatischen Bereich 1q12 erfolgte. Daneben wäre es denkbar, das Spektrum der mittels dieses Verfahrens erfassbaren zentromerischen und auch perizentromerischen, heterochromatischen Veränderungen zu erweitern, indem man weitere heterochromatische Sonden z.B. der Regionen 9q12 und 16q11.2 in einer spezifischen Farbkombination mit in den Sondenmix integriert.

#### **4.1.2.1.2. Möglichkeiten und Grenzen des cenM-FISH**

Mit diesem Verfahren ist es nun möglich, mittels einer Hybridisierung bereits innerhalb eines Tages die Herkunft fast jedes Markers sicher zu bestimmen. Einschränkungen sind hier aufgrund der bereits genannten Homologien der einzelnen Zentromere gegeben. Daneben ist eine cenM-FISH Analyse an MPP meist sehr gut durchführbar, jedoch im Interphasekern ist bisher eine exakte Zuordnung aller Zentromersignale schwer möglich, da es aufgrund der räumlichen Begrenzung zu weitaus mehr Überlagerungen der Signale kommt als das in Mitosen der Fall ist. Allerdings ist es denkbar, dass mit Weiterentwicklung der FISH-basierenden dreidimensionalen Darstellungstechniken (Steinhaeuser *et al.*, 2002) auch dieses Problem gelöst wird und die cenM-FISH Technik im Interphasekern Anwendung finden kann.

Die im cenM-FISH Verfahren verwendeten Sonden sind zwar zum Nachweis „normaler“ primärer Zentromere, die Alpha-Satelliten DNA enthalten, gut geeignet, zum Nachweis von sekundär gebildeten Neozentromeren sind sie dagegen nicht einsetzbar, da diese keine nachweisbare Alpha-Satelliten DNA besitzen. (z.B. Koch, 2000, Barbi *et al.*, 2003, Spiegel *et al.*, 2003). Auch kann der Anteil an Alpha-Satelliten DNA in den menschlichen Zentromeren so stark variieren, dass deren Nachweis mit Zentromersonden bei sehr geringen Anteilen alpha-satellitischer DNA erschwert ist (z.B. Liehr *et al.*, 1998 und 2003).

#### **4.1.2.2. Das acro-cenM-FISH Sonden Set**

Zum effektiven und gezielten Einsatz von Sonden zur Analyse von Satelliten-tragenden Markerchromosomen und von Veränderungen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen wurde das acro-cenM-FISH entwickelt (Trifonov *et al.*, 2003). Mit diesem Sondenmix ist es möglich, in einer Hybridisierung sowohl die Herkunft eines satellitischen Markerchromosoms als auch seine Zusammensetzung bezüglich der einzelnen DNA-Fractionen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen zu bestimmen.

Für ca. 81% aller Markerchromosomen ist eine Herkunft von den akrozentrischen Chromosomen beschrieben (Warburton, 1991). Somit bietet dieses Sonden Set, ebenso, wie ein weiteres, von einer anderen Arbeitsgruppe parallel entwickeltes Verfahren, das AcroM-FISH (Langer *et al.*, 2001) die Möglichkeit, die meisten Markerchromosomen mit geringem Sonden-Aufwand zu identifizieren. Voraussetzung ist jedoch die vorherige Einschätzung des Markers in der GTG-Bänderung als „*satellited marker*“.

Daneben ist das acro-cenM-FISH Set hervorragend zur Charakterisierung von Veränderungen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen und des Heterochromatin-Bereiches des Chromosoms Y geeignet. Da aus der Literatur bekannt ist,

dass auch häufig in Translokationen mit akrozentrischen Chromosomen der heterochromatische Bereich Yq12 involviert ist (Eliez *et al.*, 1997, Yoshida *et al.*, 1997, Fukada *et al.*, 1999, Kuhl *et al.*, 2001), wurde eine entsprechende Sonde zur Erfassung dieser Veränderungen mit einbezogen. Mittels dieses Sondenmixes ist weiterhin eine Differenzierung zwischen den oft diskutierten Heteromorphismen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen (Wyandt und Tonk; 2004) und Translokationen dieser Chromosomen mit euchromatischen Bereichen anderer menschlicher Chromosomen möglich (siehe Ergebnisteil 3.2.2.2.).

Die Schwierigkeiten der Differenzierung von derartigen Translokationen und Normvarianten wurden in der Literatur schon oft beschrieben. Die Arbeitsgruppe Benzacken *et al.*, 2001 veranschaulichte dies am Beispiel eines Falles mit einer kryptischen Translokation t(11;14). Das entwickelte acro-cenM-FISH bietet hier eine schnelle Möglichkeit der Differenzierung. Grundsätzlich ist jedoch eine Abklärung nicht eindeutiger Fälle mit mehreren FISH Methoden empfehlenswert.

#### 4.1.2.3. Das Verfahren des subcenM-FISH

Neben der Charakterisierung der zentromerischen Satellitenregionen ist die Analyse von zentromernahen, euchromatischen Regionen und ihrer Veränderungen sowohl von wissenschaftlichem als auch von klinischem Interesse. Zur Untersuchung dieser Regionen im menschlichen Genom wurde daher das Verfahren des subcenM-FISH entwickelt.

Zur Etablierung dieser Methode wurden zentromernahe YAC- oder BAC-Sonden, je eine geeignete Sonde für jeden Chromosomenarm aller menschlichen Chromosomen und eine Zentromersonde miteinander kombiniert. Mit Hilfe dieser Sonden war es möglich, gezielt die perizentrische Region von Derivatvchromosomen und Markerchromosomen zu untersuchen, Veränderungen dieser Bereiche zu erfassen und sichere Aussagen über das Vorhandensein von euchromatischen Bereichen auf Markerchromosomen zu treffen. Unter Einsatz von zentromernah gelegenen YAC- und BAC-Sonden wurde zur Optimierung der Untersuchungen ein Chromosomen-spezifischer 5-Farben-Sondenmix zusammengestellt. Mittels dieser Sonden Sets gelang es, nicht nur Euchromatin in unmittelbarer Zentromernähe, sondern durch den Einsatz von *pcp*-Sonden, auch weiter distal lokalisiertes, euchromatisches Material nachzuweisen.

In Kombination mit dem cenM-FISH zur Identifizierung kleiner Marker ist man mit dem subcenM-FISH erstmals in der Lage, innerhalb von zwei Tagen ein Markerchromosom hinsichtlich seiner Herkunft und Zusammensetzung exakt zu charakterisieren.

##### 4.1.2.3.1. Möglichkeiten und Grenzen der Methode des subcenM-FISH- Das Problem der zentromernahen Homologien

Bei Anwendung der zentromernahen Sonden für die aufgeführten Untersuchungen wurde beobachtet, dass einige der BAC Klone auch Signale auf anderen menschlichen Chromosomen zeigten (siehe auch Tabelle 8.2. im Anhang). Dies kann dadurch begründet sein, dass gerade in der perizentrischen Region auch *repeat*-Sequenzen zu finden sind (z.B. Jackson *et al.*, 1999, Vermeesch *et al.*, 2003), die über das gesamte menschlich Genom verteilt auftreten und somit zu unspezifischen Signalen mit den Subzentromersonden führen können.

Wie bereits erwähnt, weist die **perizentrische Region** häufig (innerhalb des jeweiligen Chromosoms) duplizierte Bereiche auf (z.B. Horvath *et al.*, 2001, Eichler *et al.*, 1996, Jackson *et al.*, 1999). Duplikationen können aber ihren Ursprung auch in anderen menschlichen Chromosomen haben (z.B. Eichler *et al.*, 1997). Diese Tatsache könnte eine Erklärung für die auftretenden Kreuzhybridisierungen sein.

Oft sind in der perizentrischen Region auch Inversionen in Verbindung mit Anhäufung von Duplikationen nachgewiesen. So zum Beispiel in der perizentromerischen Region des Chromosoms 10, in der im Verlaufe der Evolution eine perizentrische Inversion gefolgt von einer Duplikation im Bereich des *KOX zinc finger gene clusters* stattgefunden hat (Tunnacliffe *et al.*, 1993). Eine palindromische Struktur dieser Region war die Folge. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich beiderseits des Zentromers 10 Duplikons befinden (Jackson *et al.*; 1999) und größere duplizierte Bereiche auch in der

zentromernahen Region der Chromosomen 1, 2 und 9 auftreten (Tunnacliffe *et al.*, 1993, Hardas *et al.*, 1994, Edwards *et al.*, 1995, Maresco *et al.*, 1996, Nothwang *et al.*, 1998). Daneben gibt es ähnliche Untersuchungen der zentromernahen Region im X-Chromosom (Eichler *et al.*, 1996 und 1997), im Chromosom 7 (Wevrick *et al.*, 1992) und im Chromosom 16 (Eichler *et al.*, 1996, Horvath *et al.*, 2000). Einige akrozentrische Chromosomen, wie Chromosom 21 und 22, zeigen ebenfalls eine große Anzahl inter- als auch intrachromosomal duplizierter Regionen (Dunham *et al.*, 1999, Hattori *et al.*, 2000, Bailey *et al.*, 2002, Bridgland *et al.*, 2003). So ist bekannt, dass vor allem das Chromosom 22 besonders viele Regionen mit *low copy repeats* (LCR) besitzt. Bei Untersuchungen von Familien mit Translokation t(11;22) (in Verbindung mit dem Auftreten eines „*supernumerary der(22)*“-Syndromes bei den Nachkommen) konnte festgestellt werden, dass die Bruchpunkte sowohl in Chromosom 11 als auch in Chromosom 22 in besonders AT-reichen *repeat*-Sequenzen nachzuweisen sind. Diese liegen als palindromische DNA Sequenzen vor (Kurahashi *et al.*, 2000). Die genannten Palindrome führen wahrscheinlich zur Ausbildung von instabilen Haarnadel-artigen Strukturen, in denen bevorzugt Bruchereignisse stattfinden. Neben der Translokation t(11;22) (Shaikh *et al.*, 1999) sind Rearrangements der zentromernahen Region des Chromosoms 22 ursächlich an verschiedenen malignen Erkrankungen beteiligt, wie dem Ewing Sarkom (Aurias *et al.*, 1984) und der chronisch myeloischen Leukämie (CML) sowie von verschiedenen Entwicklungsstörungen, wie dem Cat-eye-Syndrom (CES, z.B. Mattei *et al.*, 1985), dem DiGeorge- und dem velocardiofacialen Syndrom (DGS/VCFS, z.B. Budarf und Emanuel, 1997).

So scheint der perizentrische Bereich eine prädisponierte Region für chromosomale Umbauten zu sein. Aber nicht nur die häufig beobachteten Duplikationen, sondern auch andersartige Umbauten, wie Inversionen, Transpositionen und Deletionen, wurden für die perizentrische Region verschiedener Chromosomen beschrieben (z.B. Jackson *et al.*, 1999). Einige Sonden, wie zum Beispiel die BAC Sonde für 15q11.2 (bA26F2), zeigten bei den, im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen, auch mehrere Signale auf dem Chromosom, auf dem sie kartiert wurden. So wurden in einigen Hybridisierungen mit dieser Sonde, insbesondere auf sehr langen Chromosomen 15, je zwei Signale pro Chromatide in der perizentrischen Region detektiert, was zu Fehlinterpretationen (im Sinne einer Duplikation) führen könnte. Diese zusätzlichen Signale kann man wahrscheinlich auf das Vorliegen einer evolutionär bedingten duplizierten Sequenz in den betroffenen Chromosomen zurückführen.

Ein besonderes Problem bezüglich solcher duplizierter Regionen stellen die Chromosomen 1 und 9 dar, bei denen aufgrund der sehr hohen Sequenzhomologien in p- und q-Arm kaum Chromosomenarm-spezifische Klone erhältlich sind. So weisen die Bereiche 9p12 und 9q13-q21.1 eine sehr hohe Übereinstimmung in der Sequenz auf (Park *et al.*, 1998, Senger *et al.*, 1999), die dazu führt, dass auch BAC Klone aus dieser perizentrischen Region stets Signale in beiden homologen Regionen zeigen.

Ähnliche Schwierigkeiten treten beim Chromosom 1 auf, bei dem der Bereich 1q21.1 durch Umbauten im Zuge der Evolution des Chromosoms 1 des Menschen Homologien in 1p12 und 1p36.1 zeigt (Weise *et al.*, 2004). Eine Unterscheidung der in p- und q-Arm gelegenen Bereiche wurde durch zusätzliche BAC Sonden realisiert, die außerhalb der homologen Regionen lokalisiert sind.

Insgesamt ist bei der Auswahl der perizentrischen Sonden stets ein Kompromiss notwendig, da man bestrebt ist, möglichst nahe am Zentromer gelegene Sonden zu verwenden, diese aber zumeist viele *repeat*-Sequenzen enthalten. Verwendet man dagegen weiter entfernt gelegene Sonden, umgeht man zwar dieses Problem, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass sehr zentromernah gelegene, euchromatische Regionen der Analyse entgehen.

#### **4.1.2.4. Methoden zur Untersuchung von Veränderungen im Chromosom 9**

Zur Untersuchung von Veränderungen im zentromernahen Bereich des Chromosoms 9 wurden zwei Sondenkombinationen entwickelt, mit denen es möglich ist, sowohl Bruchpunktereignisse in unmittelbar dem Zentromer angrenzenden Regionen als auch Veränderungen in distaleren Bereichen zu erfassen. Mit der Sondenkombination 1, bestehend aus der Zentromersonde 9, einer Sonde für den heterochromatischen Bereich

9q12 und einer Mikrosezierungssonde für die Bereiche 9p12 und 9q13 bis 21.1 konnten Varianten des Chromosoms 9 exakt beschrieben werden.

Zur weiteren Analyse von perizentrischen Umbauten und zur Charakterisierung von Marker- und Derivatchromosomen des Chromosoms 9 wurde für das Chromosom 9 ein subcenM-FISH Sonden Set entwickelt, welches in Einzelfällen zur näheren Differenzierung herangezogen wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 8.8. im Anhang und im Ergebnisteil unter 3.2.1.2. aufgeführt.

#### **4.1.2.4.1. Grenzen der eingesetzten Sondenkombinationen für Chromosom 9**

Da die Bereiche 9p12 und 9q13-q21.1 (Midi 36) eine sehr hohe Übereinstimmung in der Sequenz aufweisen (Senger *et al.*, 1999), die dazu führt, dass auch BAC Klone aus dieser perizentrischen Region stets Signale in beiden homologen Regionen zeigen, ist eine Unterscheidung von Veränderungen dieser beiden Regionen kaum möglich. Zur weiteren Differenzierung von Veränderungen in diesem Bereich wurde daher eine weitere Sonde für 9q verwendet, die außerhalb dieses Bereich lokalisiert ist und ausschließlich Signale in 9q13 zeigte.

Mittels dieser Sonde und ihrem Einsatz innerhalb des subcenM-FISH Sondenmixes für Chromosom 9 wurde eine Unterscheidung von Duplikationen, die die beiden Regionen betrafen, in der die Midi 36 Sonde bindet (9p12 und 9q13-21.1), besser möglich. Eine absolute Sicherheit in dieser Beziehung bietet diese Sonde jedoch nicht, da auch eine Duplikation die ausschließlich den Bereich 9q13 proximal dieser Sonde betrifft, zur gleichen Signalkonstellation führt, wie eine Duplikation des Bereiches 9p12. Jedoch können Materialzugewinne im Bereich dieser Sonde von Duplikationen in 9p12 unterschieden werden.

## **4.2. Charakterisierung von Veränderungen der zentromernahen Regionen der menschlichen Chromosomen**

### **4.2.1. Untersuchung von Veränderungen der perizentrischen Region des Chromosoms 9**

Neben den akrozentrischen Chromosomen zeigt das Chromosom 9 des Menschen mit die höchste Rate an chromosomalen Umbauten (Verma, 1999). Am häufigsten findet man die als Heteromorphismen oder Normvarianten bezeichneten Verluste und Zugewinne in der heterochromatischen Region 9q12 und die perizentrische Inversion des Bereiches p11 bis q13 (Gardner und Sutherland, 1996). Daneben treten noch eine Vielzahl weiterer Veränderungen im Chromosom 9 auf, die ihre Bruchpunkte auch außerhalb der genannten Bereiche haben.

Obwohl heute mit Hilfe der 1981 eingeführten FISH Technik (Langer *et al.*, 1981) eine weitaus genauere Charakterisierung solcher Veränderungen möglich ist, sind nur wenige größere Arbeiten zu diesem Thema erschienen, die zumeist die Inversionen 9 zum Inhalt haben (z.B. Luke und Verma 1993).

#### **4.2.1.1. Charakterisierung von Veränderungen mittels der einzelnen Sondenkombinationen für das Chromosom 9**

Zu weiteren Normvarianten am Chromosom 9 wurden mittels FISH-Technik bisher nur wenige Studien durchgeführt. Darunter sind zwei umfangreiche Untersuchungen von den Arbeitsgruppen um Ramesh (Ramesh und Verma, 1996) und Samonte (Samonte *et al.*, 1996), die mit einer Dreifarb-Kombination von FISH Sonden arbeiteten. In diesen Analysen kamen eine pan-Zentromersonde, spezifisch für alle menschlichen Zentromere, eine  $\beta$ -Satellitensonde und eine Sonde für den Satellit III-Bereich des Chromosoms 9 (9q12) zum Einsatz (siehe Anhang Abb. 8.4.). Bereits von diesen Autoren wurden weitere verschiedene Varianten des Chromosoms 9, wie einfache und komplexe Inversionen mit verschiedenen Bruchpunkten im Bereich 9q12 und im  $\beta$ -Satellitenbereich beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Charakterisierung des Untersuchungskollektivs (siehe Ergebnisteil unter 3.2.1.2.3. und im Anhang in Tabelle 8.8.) zunächst ausschließlich die Sondenkombination 1 eingesetzt. Sondenkombination 2 kam nur in Einzelfällen zur Anwendung und das Ergebnis dieser Untersuchung floss nicht in die dargestellten Ergebnisse mit ein. Im Vergleich zu bisher durchgeführten Analysen mittels FISH Technik (Samonte *et al.*, 1996, Ramesh und Verma, 1996) war es möglich, weitere, bisher nicht beschreibbare Veränderungen zu erfassen.

Insgesamt wurden 67 Fälle mit Veränderungen der perizentrischen Region untersucht. Es konnten neben Verlusten und Zugewinnen im Heterochromatischen Bereich und im Bereich der Midi 36 Sonde (9p12 und 9q13-21.1 ) auch insgesamt 5 verschiedene Formen der Inversion 9, zum Teil kombiniert mit heterochromatischen Varianten, identifiziert und beschrieben werden (Starke *et al.*, 2002). Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die Bruchpunktregionen überdurchschnittlich oft im Bereich der Sonde Midi 36 lagen. Eine Erklärung hierfür könnte im strukturellen Aufbau dieser Region und der enthaltenen *repeat*-Sequenzen liegen. Ein Schema der theoretischen Möglichkeiten der Entstehung der einzelnen Veränderungen ist im Anhang unter 8.3. zu finden.

#### **4.2.1.2. Besonderheiten der verwendeten Sonden**

Es konnte bereits in vorhergehenden Untersuchungen (Mrasek *et al.*, 2001) gezeigt werden, dass die Sonde Midi 36 (9p12 und 9q13-21.2) neben ihrer Homologie innerhalb des Chromosoms 9 auch eine große Sequenzübereinstimmung mit den Bereichen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen zeigte. Von Park *et al.* wurden bereits 1998 Analysen der homologen Sequenzen in 9p12 und 9q13 anhand von YAC Sonden dieser Region durchgeführt, welche dies bestätigten.

Diese Homologie könnte auf einen gleichen Ursprung dieser Regionen innerhalb der menschlichen Karyotypevolution hindeuten. So konnte von Mrasek *et al.* 2001 mittels MCB

gezeigt werden, dass Homologien des kurzen Armes von Chromosom 13 von *Gorilla gorilla*, dem Homologen zum menschlichen Chromosom 9, sowohl zu den kurzen Armen der akrozentrischen menschlichen Chromosomen als auch zu den perizentrischen Regionen 9p12 und 9q13-21.1 des Menschen vorhanden sind.

Diese Beobachtung wird auch dadurch unterstützt, dass die Bereiche der p-Arme der akrozentrischen menschlichen Chromosomen sehr häufig Veränderungen aufweisen und einem ständigen Umbau unterliegen. Bereits sehr früh wurde schon der Zusammenhang der strukturellen Variabilität des menschlichen Chromosoms 9 in Zusammenhang mit der menschlichen Karyotypevolution hergestellt (Hansmann, 1976). Aus der Literatur ist bekannt (z.B. Eichler *et al.*, 1997, Jackson *et al.*, 1999, Ji *et al.*, 2000), dass perizentrische Regionen oft *repeat*-Sequenzen beinhalten. Sie sind bevorzugte Stellen für genetische Umbauten, wie Inversionen und Duplikationen, und stellen damit innerhalb der Evolution eine Region dar, die eine Anpassung durch Veränderung ermöglicht (Spinelli, 2003). Dabei ist die Anordnung von verschiedenen Fraktionen von *repeat*-Sequenzen, wie sie in der perizentrischen Region enthalten sind, wahrscheinlich als ursächlich für deren Heterogenität zu sehen (Choo *et al.*, 1991, Tyler-Smith und Willard, 1993). Weitere Untersuchungen belegen, dass Sequenzen von Satelliten-DNA innerhalb einer *species* sehr instabile Bereiche des Genoms darstellen (Samonte *et al.*, 1996). Dies kann als Ursache für die individuelle Variabilität dieser Region und der Häufigkeit und Vielfältigkeit der nachgewiesenen Veränderungen angesehen werden. Sie unterliegen jedoch auch während der Evolution zahlreichen Umbauten, wie Mutationen und Amplifikationen innerhalb einer oder verschiedener *repeat* Familien (Samonte *et al.*, 1996).

#### **4.2.1.3. Mögliche Zusammenhänge zwischen den detektierten Veränderungen von Chromosom 9 und Fertilitätsstörungen**

Von den Anfängen der Analyse der Varianten des Chromosoms 9 (z.B. Fryns *et al.*, 1985, Eiben *et al.*, 1987, Verma, 1988) bis heute (z.B. Sasagawa *et al.*, 1998) wird immer wieder der Zusammenhang zwischen Veränderungen des Chromosoms 9 und Infertilität diskutiert. In der Analyse der Arbeitsgruppe Eiben *et al.*, 1987 fiel z.B. bei 25% der untersuchten Männer mit Teratozoospermie ein Veränderung in der heterochromatischen Region in 9q auf.

Auch in den Untersuchungen dieser Arbeit war eine überdurchschnittliche Beteiligung von Patienten erkennbar, die im Zuge einer geplanten intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) untersucht wurden oder in deren Partnerschaft vermehrt habituelle Aborte auftraten. Insgesamt wurden bei 17 von den insgesamt 62 untersuchten Personen mit Heteromorphismen des Chromosoms 9 Fertilitätsprobleme beschrieben. Es ist jedoch einschränkend zu sagen, dass diese Analysen hier an einer sehr kleinen Zahl von Patienten durchgeführt wurden und somit keine statistische Auswertung möglich war.

Als Ursache der klinischen Konsequenzen der perizentrischen Veränderungen können Positionseffekte diskutiert werden.

Die Zentromere der menschlichen Chromosomen sind oft assoziiert mit mehr oder weniger großen Bereichen von Heterochromatin; also Bereichen ohne oder mit sehr geringer genetischer Aktivität (Horvath *et al.*, 2001). Wie schon erwähnt, setzt sich dieses Heterochromatin aus verschiedenen Anteilen *repeat*-reicher Satelliten-DNA zusammen, die gewissermaßen den Übergang zwischen der Zentromerregion und den genreichen euchromatischen Bereichen der Chromosomenarme darstellt.

Sind in diesen Regionen auch so gut wie keine exprimierten Gene lokalisiert, so werden doch seit einiger Zeit sogenannte *Silencing*-Effekte auf angrenzende genetisch aktive Bereiche diskutiert (Henikoff 1990, Karpen und Allshire, 1997). Es gibt Hinweise, dass Sequenz-Wiederholungen an sich die Transkription in menschlichen Zellen hemmen können (Milot *et al.*, 1996, Garrick *et al.*, 1998). Derartige Phänomene wären auch eine Erklärung dafür, dass doch Veränderungen in der perizentrischen, heterochromatischen Region zu klinischen Konsequenzen führen. Dies ist zum Beispiel bei bestimmten Syndromen, wie dem ICF-Syndrom, einem Syndrom mit gestörter Immunfunktion (Sawyer *et al.*, 1995) und dem Robert's Syndrom (Barbosa *et al.*, 2000) der Fall.

Auch bei der Karyotypisierung verschiedener Tumore sind häufig Veränderungen der Heterochromatin-Regionen beschrieben worden. So wurden z. B. von Liehr *et al.*, 1997 und Le Baccon *et al.*, 2001 gehäuft Veränderungen der heterochromatischen Regionen in verschiedenen menschlichen Tumoren beschrieben. Aberrationen im Bereich 1q12 scheinen bei Lymphomen mit einer ungünstigen Prognose assoziiert zu sein (Le Baccon *et al.*, 2001). Derartige *Silencing*-Effekte der aufgrund von Inversionen und Duplikationen umgebauten heterochromatischen Region auf angrenzende Gen-reiche, euchromatische Bereiche sind bereits vielfach in der Literatur beschrieben und diskutiert worden (Islam *et al.*, 1993, Le Baccon *et al.*, 2001). Dabei sind ihre phänotypischen Auswirkungen jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Gerade am Chromosom 9 scheinen solche Inaktivierungen von Genen auch z.T. völlig ohne Konsequenzen zu sein (z.B. Macera *et al.*, 1995), wofür die hohe Anzahl an Normalpersonen mit Veränderungen dieser Region spricht. Insgesamt bleiben Aussagen zur Prognose der beschriebenen Veränderungen im Perizentromerbereich 9 sehr schwierig, da ebenfalls zu bedenken ist, dass - wie in der vorliegenden Arbeit - oft ein vorselektiertes Kollektiv untersucht wird und bisher keine vergleichenden Studien in der Population durchgeführt wurden. Eine Ausweitung der Studien auch auf Normalpersonen wäre für eine Phänotyp-Genotyp-Korrelation dieser Veränderungen daher sehr von Nutzen.

#### **4.2.2. Charakterisierung von weiteren Derivatvchromosomen mit Veränderungen im zentromernahen Bereich**

Bis zur Erstellung dieser Arbeit war eine molekular-zytogenetische Charakterisierung von Veränderungen der zentromernahen Regionen, wie Duplikationen, Deletionen und Inversionen nicht möglich. In der Literatur sind diese Fälle daher bisher nur sehr selten beschrieben. Größere Studien fehlen und prognostische Aussagen bei Auftreten derartiger Veränderungen sind schwer möglich.

Molekulargenetische Untersuchungen weisen darauf hin, dass aber gerade die perizentrische Region aufgrund der hier lokalisierten *repeat*-Sequenzen gehäuft Umbauten unterliegt.

##### **4.2.2.1. Perizentrische Inversionen und Duplikationen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der entwickelten subcenM-FISH Technik und dem bereits beschriebenen MCB 25 Fälle mit Derivatvchromosomen mit Rearrangements der perizentrischen Region analysiert (siehe Tabelle 3.2.2.1.1.). Es hat sich dabei herausgestellt, dass, wie bereits diskutiert, die Auflösung der MCB Technik vor allem in der unmittelbar dem Zentromer angrenzenden Region oft für eine exakte Bruchpunktbestimmung nicht ausreichend ist. Insbesondere die Polymorphismen der Zentromerregionen, wie sie in drei Fällen nachgewiesen werden konnten, sind mit der MCB Technik nicht zu erfassen, da diese Regionen mit den eingesetzten Sonden nicht oder nur unspezifisch angefärbt werden.

Aber auch Inversionen oder Duplikationen sehr kleiner Bereiche der perizentromerischen Region konnten nicht in jedem Fall mit MCB detektiert werden, wie das Beispiel des Falles 412/00 zeigte. Hier konnte nur das Verfahren des subcenM-FISH klar die vorliegende Inversion zeigen. Anhand von folgenden zwei Beispielfällen wurden die Schwierigkeiten der Erfassung perizentrischer Aberrationen gezeigt:

Im Fall 412/00 (siehe Abb. 3.16.) konnte mittels der zentromernahen Sonden eindeutig eine Inversion des Bereiches 2p11.2 bis 2q11.2 in ca. 40 % der untersuchten Metaphaseplatten nachgewiesen werden. Da diese Inversion nur zu einer sehr geringen Verschiebung des Zentromerindexes führte, konnte diese Veränderung mit Hilfe der GTG-Bänderung und mit der MCB Technik nicht sicher erkannt werden. Neben diesem Fall mit einem extrem kleinen invertierten Bereich konnten noch 5 weitere Fälle mit Inversionen der perizentrischen Region und der Fälle mit Duplikationen der unmittelbar dem Zentromer angrenzenden Regionen charakterisiert werden. In dem unter 3.2.3.2.2.vorgestellten Fall (siehe Abb. 3.17.) war die duplizierte Region so groß, dass sie auch in der MCB Analyse nachgewiesen werden konnte, jedoch ohne eine genaue Angabe der Bruchpunkte. Diese wurde mit Hilfe des subcenM-FISH ermittelt. Des Weiteren konnten in 8 Fällen mit reziproken Translokationen



die im zentromernahen Bereich lokalisierten Bruchpunkte mit den jeweilige subcenM-FISH Sondenmixen exakt bestimmt werden.

In der Literatur sind bisher keine Fälle mit vergleichbaren kleinen Inversions- oder Duplikationsbereichen beschrieben. Somit sind im Moment auch noch keine sicheren Aussagen zu klinischen Konsequenzen derartiger Rearrangements möglich. Vermutlich liegt die Rate derartiger Veränderungen aber wesentlich höher als bisher angenommen. Jedoch war es mit den üblichen FISH-Techniken bis dato nicht möglich, diese Aberrationen exakt nachzuweisen. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten subcenM-FISH Sonden Sets sind nun erweiterte Studien der Umbauten in der perizentrischen Region möglich. Umfangreiche vergleichende Untersuchungen von Normalpersonen, die derzeit noch nicht abgeschlossen und daher in dieser Arbeit nicht ausführlich besprochen sind, sollen Aussagen zur Häufigkeit von perizentrischen Veränderungen ohne phänotypische Auswirkungen möglich machen.

#### **4.2.2.2. Charakterisierung von Auffälligkeiten der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen**

Zur Charakterisierung von Veränderungen der kurzen Arme der Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 und zur Untersuchung von satellitischen Markerchromosomen kam innerhalb dieser Arbeit das acro-cenM-FISH Sonden Set zum Einsatz. Durch die gewählte Sondenkombination kann eine Unterscheidung von Translokationen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen mit anderen Chromosomen von einer Vergrößerung des kurzen Armes eines akrozentrischen Chromosoms z.B. aufgrund einer Duplikation dieser Region erfolgen.

Eine derartige Differenzierung ist von großer Bedeutung für die Erforschung der ursächlichen Zusammenhänge zu evtl. phänotypischen Auffälligkeiten des Trägers und auch für die Bewertung des Risikos für klinische Konsequenzen bei den Nachkommen. In der Literatur ist die Schwierigkeit der Charakterisierung derartiger Veränderungen schon oft beschrieben worden (Benzacken *et al.*, 2001).

Während Vergrößerungen des p-Armes der akrozentrischen Chromosomen in der Literatur häufig als Normvarianten beschrieben werden (Wyandt und Tonk, 2004), die ohne phänotypische Konsequenzen für den Träger sind, ist im Falle einer Translokation, die zu einer unbalancierten Situation (partielle Monosomie und partielle Trisomie) bei den Nachkommen führt, zumeist mit Auffälligkeiten zu rechnen.

Beispiele für die Schwierigkeiten der klaren Differenzierung dieser beiden Veränderungen mittels etablierter Methoden, wie dem M-FISH, und Analysemöglichkeiten sind anhand der zwei unter 3.2.3.3. vorgestellten Beispielfälle demonstriert. Im ersten Fall (Fall 382-00) war der Nachweis der Translokation letztendlich nur mit Anwendung mehrerer verschiedener FISH Techniken möglich. Eine genaue Angabe der in die Translokation involvierten Regionen konnte mit dem MCB Sonden Set für Chromosom 6 erfolgen, nachdem mittels des acro-cenM-FISH Sondenmixes eine Normvariante des kurzen Armes von Chromosom 13 ausgeschlossen worden war. In diesem Fall konnte somit eine partielle Trisomie 6 nachgewiesen werden, die aufgrund der beim Patienten und in der Literatur beschriebenen Symptomatik (Giardino *et al.*, 2002) als ursächlich für die klinischen Auffälligkeiten angesehen werden kann. So konnte aufgrund der exakten Charakterisierung der Translokation die Ursache der klinischen Symptomatik nachgewiesen und die betroffene Gen-Region eingegrenzt werden (Trifonov *et al.*, 2003).

Eine andersartige Veränderung, eine Duplikation des kurzen Armes des akrozentrischen Chromosoms 15, und somit eine als Normvariante beschriebene Aberration, konnte im zweiten Fall (81-03; Abb. 3.19) sicher nachgewiesen werden. Es handelt sich hier um eine direkte Duplikation des Bereiches 15p11.2 bis 15pter. Die beim Patienten aufgetretenen Auffälligkeiten stehen wahrscheinlich nicht mit der Karyotypveränderung in unmittelbarem Zusammenhang, da keine euchromatischen Regionen involviert waren. Allerdings sind noch weitreichende Studien zu derartigen Heteromorphismen in Zukunft notwendig, um hier sichere Aussagen zur prognostischen Bedeutung treffen zu können. Das entwickelte acro-cenM-FISH Sonden Set bietet hier in Verbindung mit weiteren Verfahren, wie z.B. dem subcenM-FISH eine schnelle und sichere Möglichkeit der Analyse.

### 4.2.3. Identifizierung und Charakterisierung von Markerchromosomen

#### 4.2.3.1. Markerchromosomen

Markerchromosomen treten mit einer Häufigkeit von 0,14-0,72 auf 1000 Neugeborene auf (Jacobs *et al.*, 1974, Hamerton, 1975, Nielsen und Wohlert, 1991). In der Pränataldiagnostik werden sie in 0,65-1,5 von 1000 Feten beobachtet (Ferguson-Smith und Yates, 1984, Warburton, 1984, Hook und Cross, 1987, Warburton, 1991). Von einem familiären Auftreten geht man in ca. 0,3-0,4 von 1000 aus, während 0,4-0,5/1000 *de novo* entstehen (Blennow *et al.*, 1994).

Die Größe der Markerchromosomen kann sehr stark variieren; von sehr kleinen, zumeist nur aus Zentromermaterial bestehenden, sogenannten *minute* Markern bis zu sehr großen, oft komplex aufgebauten Marker-Chromosomen, die die Größe der normalen menschlichen Chromosomen sogar übersteigen können. So wie die Größe der Markerchromosomen variieren kann, so unterschiedlich sind auch die nomenklatorischen Bezeichnungen der Markerchromosomen in der Literatur. So wird neben dem Begriff *supernumerary marker chromosome* (SMC) (oft auch als Abkürzung für „*small marker chromosome*“ verwendet) synonym häufig auch die Bezeichnung *extra structurally abnormal chromosome* (ESAC) für kleine Markerchromosomen verwendet. Diese sind in der Regel kleiner als der kurze Arm von Chromosom 17 des Menschen (Liehr *et al.*, 2004). Sie bestehen zumeist aus Material eines einzigen Chromosoms und sind mittels FISH Techniken, wie dem MCB nicht eindeutig charakterisierbar (Liehr *et al.*, 2002c, Starke *et al.*, 2003a).

Kleinere Markerchromosomen treten mit einer Häufigkeit von 0,05% in der Bevölkerung auf. Sie sind sowohl von ihrer Entstehung her als auch von ihrer klinischen Relevanz äußerst interessant. Um Aussagen zur phänotypischen Auswirkung eines Markers treffen zu können, ist es wichtig, dessen Herkunft und Zusammensetzung zu kennen. So ist die Relevanz eines Markerchromosoms unter anderem abhängig von seiner Herkunft, seiner Größe und dem Vorhandensein von genetisch aktivem, chromosomalem Material (Euchromatin). Bisher sind Markerchromosomen von jedem menschlichen Chromosom in unterschiedlicher Häufigkeit beschrieben worden. Im Folgenden soll insbesondere auf kleine, überzählige Markerchromosomen (SMC) eingegangen werden.

#### 4.2.3.2. Identifizierung von satellitischen Markerchromosomen

Für ca. 81% aller SMC ist eine Herkunft von den akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21, und 22 beschrieben (Warburton, 1991), davon stammt der überwiegende Teil vom Chromosom 15 ab (Blennow *et al.*, 1994). Diese, vom Chromosom 15 stammenden, Marker tragen meist Satelliten an einem oder beiden Enden und werden als „*bisatellited marker chromosomes*“ bezeichnet (Crolla *et al.*, 1995, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, im Falle dass in der GTG-Bänderung ein „satellitischer Marker“ nachweisbar war, die Herkunft dieses Markerchromosoms gezielt mit dem acro-cenM-FISH Sonden Set untersucht, ohne dass alle menschlichen Zentromersonden in Form des cenM-FISH Sets eingesetzt werden mussten.

Dieser acro-cenM-FISH Sondenmix bietet für die Mehrzahl der kleinen Markerchromosomen eine schnelle und effektive Identifizierungsmöglichkeit, die mit weniger Aufwand und Kosten verbunden ist, als der Einsatz des cenM-FISH. Insgesamt konnten unter den ca. 140 untersuchten Fällen mit Markerchromosomen über 66 Fälle mit SMCs von einem akrozentrischen Chromosom nachgewiesen werden. In 25 dieser Fälle erfolgte die Feststellung der Identität mittels acro-cenM-FISH Sonden Set festgestellt. In 41 zugesandten Fällen war nach GTG Färbung die Beschreibung als „satellitischer Marker“ nicht gegeben oder das acro-cenM-FISH noch nicht etabliert, so dass zur Identifizierung das cenM-FISH Sonden Set eingesetzt werden musste.

Eine Beschreibung eines überzähligen Markers als (bi-) satellitisch, der sich mit der Sonde für den kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen vollständig anfärbt, ist deshalb von so großer Wichtigkeit, weil diese Markerchromosomen in der Literatur als meist nicht mit phänotypischen Konsequenzen einhergehend eingestuft werden (Eggermann *et al.*, 2002, Viersbach *et al.*, 1998). Zum Teil werden sie aber mit dem gehäuften Auftreten von Infertilität

in Verbindung gebracht (Eggermann *et al.*, 2002). Auch hier sind für eine Phänotyp-Genotyp Korrelation noch erweiterte Studien notwendig.

#### **4.2.3.3. Bestimmung der Herkunft und Zusammensetzung von nicht satellitischen Markerchromosomen**

Da die meisten kleinen Markerchromosomen, die weitgehend stabil in der Mitose weitergegeben werden, mindestens ein Zentromer besitzen, lässt sich deren Herkunft am sichersten mittels Zentromersonden bestimmen. Zur Bestimmung dieser kleinen Fragmente wurde deshalb das so genannte „cenM-FISH“ Verfahren entwickelt (Nietzel *et al.*, 2001), mit dem in einem Hybridisierungsschritt alle menschlichen Zentromere verschiedenfarbig dargestellt werden können.

Bis zu Beginn dieser Arbeit wurden diese kleinen Marker durch eine sukzessive Hybridisierung von einzelnen Zentromersonden in ihrer Herkunft bestimmt, wenn keine Mikrosezierung und *reverse painting* etabliert waren und der Marker aufgrund seiner Größe nicht mittels CGH oder M-FISH identifiziert werden konnte. Hatte man aufgrund der Struktur des Markers (in der GTG-Bänderung) keinen Hinweis auf dessen Ursprung (z.B. satellitischer Marker → Eingrenzung auf die akrozentrischen Chromosomen), war man gezwungen, alle menschlichen Zentromere einzeln oder in maximal 3-Farb-FISH Analysen zu testen (Rauch *et al.*, 1992; Plattner *et al.*, 1993, Starke *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2000). Dies war zum einen sehr kosten- und zeitintensiv und zum anderen benötigte man sehr viel Material zur Untersuchung. Aber gerade in der pränatalen Diagnostik ist die Menge des zur Verfügung stehenden Materials oft begrenzt.

Die Identifizierung der Herkunft kleiner Markerchromosomen ist mit dem cenM-FISH Proben Set in den meisten Fällen innerhalb von 24 Stunden möglich, wie sein Einsatz in der Diagnostik von SMCs in der Tumorzytogenetik und auch in prä- und postnatalen Analysen (Nietzel *et al.*, 2001) gezeigt hat.

Einen großen Vorteil bringt diese Methode auch in den sehr seltenen Fällen, in denen mehrere Marker von verschiedenen Chromosomen vorkommen. Hier ist es selbst mit Mikrosezierung und *reverse painting* sehr schwierig, die einzelnen Marker in ihrer Zusammensetzung klar zu bestimmen, vor allem wenn diese eine ähnliche Struktur in der Giemsa-Färbung zeigen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten in ca. 140 Fällen die SMC in ihrer Herkunft und Zusammensetzung charakterisiert werden. Insgesamt wurden innerhalb dieser Untersuchungen Markerchromosomen von allen menschlichen Chromosomen nachgewiesen, wobei Marker der Chromosomen 6 und 17 mit je einem Fall die am seltensten auftretenden waren.

Wie auch in der Literatur beschrieben (Warburton, 1991, Crolla *et al.*, 1995 und 1998), hatte die Mehrzahl der Markerchromosomen (66) ihren Ursprung in einem der akrozentrischen menschlichen Chromosomen. Erwartungsgemäß (Blennow *et al.*, 1994) stammte davon der größte Teil (24 Fälle) vom Chromosom 15. In 13 Fällen mit akrozentrischen Markerchromosomen wurde ein familiäres Vorkommen beobachtet. Davon zeigten 7 Fälle keinerlei Symptomatik, in 4 Fällen lagen keine Informationen zu Auffälligkeiten vor, in einem Fall war die Indikation ein auffälliger Ultraschallbefund und in einem weiteren Fall, allerdings mit isodizentrischem Marker, wurde eine erhöhte Abortneigung beschrieben. Da es sich hier um eine statistisch nicht verwertbare, immer noch sehr kleine Anzahl von Fällen handelt, sind weitere Untersuchungen an größeren Untersuchungskollektiven notwendig, um auch für familiäre und neu entstandenen Marker von akrozentrischen Chromosomen verbindliche Aussagen zu klinischen Konsequenzen treffen zu können.

#### **4.2.3.4. Nachweis euchromatischer Anteile mit Hilfe des subcenM-FISH**

Da zur Abschätzung der phänotypischen Auswirkungen eines Markerchromosoms nach der Frage der Herkunft des Markers in erster Linie das evtl. Vorhandensein von euchromatischen Sequenzen ausschlaggebend ist, wurde eine Methode gesucht, mit der gezielt die perizentrischen Regionen der einzelnen Chromosomen untersucht werden können.

Bis zur Etablierung neuerer Techniken wie des subcenM-FISH wurde die Bestimmung des euchromatischen Anteils von Markerchromosomen meist mittels Chromosomen- oder Chromosomenregion-spezifischen *wcp*- oder *pcp*-Sonden oder FISH Techniken durchgeführt, die mit diesen Sonden arbeiten (z.B. M-FISH). Mit diesen Methoden ist jedoch eine sichere Aussage über das Vorhandensein von geringen Mengen perizentrischen Euchromatins nicht möglich, da durch das Blocken mit COT-1 DNA zwar eine Anfärbung des Zentromers weitgehend unterdrückt, aber nie vollständig verhindert wird. Ein auf einem Marker detektiertes Signal mit diesen Sonden kann somit durch angefärbte euchromatische Sequenzen oder durch unvollständiges *blocking* der Zentromerregion verursacht werden (Abb. 8.5. Im Anhang), wodurch eine Fehleinschätzung des Risikos für phänotypische Konsequenzen des Trägers möglich ist, wie es z.B. in zwei Fällen mit Markerchromosomen vom Chromosom 12 (Fälle BK, HY) der Fall war. Eine weitere, zur Identifizierung von SMC eingesetzte, Technik ist die Mikrosezierung (des Markerchromosoms) und eine anschließende Hybridisierung der DNA-Bank auf normale menschliche Metaphasen (*reverse painting*) (z.B. Senger *et al.*, 1990, Carter *et al.* 1992, Müller-Navia *et al.*, 1995). Mittels dieser Technik ist eine schnelle Identifizierung eines Markers möglich, jedoch sind auch hier keine zuverlässigen Aussagen zur Präsenz von sehr geringen Mengen euchromatischer Sequenzen machbar.

In Kombination mit dem cenM-FISH Sonde Set zur Identifizierung kleiner Marker ist man mit dem subcenM-FISH in der Lage, innerhalb von zwei Tagen ein Markerchromosom hinsichtlich Herkunft und Zusammensetzung exakt zu charakterisieren. Besonders in Fällen, in denen ein Markerchromosom pränatal nachgewiesen wurde, bietet somit diese Technik die Möglichkeit einer schnellen und exakten Information, die eine gute Grundlage zur Risiko-Einschätzung und damit z.B. einer genetischen Beratung darstellt. Mittels der entwickelten subcenM-FISH Sonden Sets wurden bisher ca. 100 Fälle mit Markerchromosomen (Tabelle 8.9. siehe Anhang) untersucht.

In den Fällen, in denen es sich um ein größeres Marker- oder Ringchromosom handelte, kamen weitere FISH Techniken, wie das MCB, zum Einsatz. Mittels M-FISH ist eine sichere Identifizierung größerer Marker (größer als 17p) möglich, deren Bruchpunkte durch MCB auf Subbandeniveau bestimmbar sind (Liehr *et al.*, 2002a und c).

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Markerchromosomen sind im Anhang in Tabelle 8.9. dargestellt.

Das entwickelte YAC/BAC-MCB 22 konnte zur näheren Charakterisierung von Veränderungen bei Fällen mit CES herangezogen werden, wodurch eine weitere Eingrenzung der Bruchpunkte der derivativen Chromosomen 22 vorgenommen werden konnte.

Der Nachweis euchromatischer Anteile von kleinen Markerchromosomen wurde in der Mehrzahl mit Hilfe des subcenM-FISH Sonden durchgeführt. Insgesamt wurden in 61 Fällen euchromatische Anteile auf dem identifizierten Markerchromosom nachgewiesen. Davon stammten die Marker in 12 Fällen von einem Gonosom. Von den 7 Fällen mit SMC vom Y-Chromosom zeigten 4 Patienten phänotypische Auffälligkeiten. In allen Fällen, wo auf dem Marker vom X-Chromosom euchromatisches Material identifiziert wurde, war eine Symptomatik beschrieben.

Von den 49 Fällen, in denen euchromatische zentromernahe Anteile von Autosomen nachgewiesen wurden, zeigten in 16 Fällen die Patienten phänotypische Auffälligkeiten. Eine exakte Zuordnung zur klinischen Symptomatik konnte nur in 6 Fällen erfolgen. Dies waren ein Patient mit einem Cat-eye-Syndrom (Haab, 1879, Schachenmann *et al.*, 1965), ein Patient mit Silver-Russel-Syndrom (Silver *et al.*, 1953, Russel, 1954), bei dem eine maternale Isodisomie 7 nachgewiesen werden konnte, zwei Fälle mit Pallister-Killian-Syndrom (Pallister *et al.*, 1977, Peltomaki *et al.*, 1987) und zwei Patienten mit einem Derivatvchromosom 11;22 (Giraud *et al.*, 1975, Kessel und Pfeiffer 1977). In 13 Fällen wurde eine mentale Retardierung beschrieben, 8 Patienten wiesen Fertilitätsstörungen auf und in 4 pränatalen Fällen wurden Ultraschallauffälligkeiten nachgewiesen. In 16 Fällen standen keine klinischen Informationen zur Verfügung.

#### 4.2.3.5. Bewertung der Ergebnisse der Untersuchungen

##### 4.2.3.5.1. Charakterisierung von überzähligen kleinen Markerchromosomen

In der überwiegenden Anzahl der Fälle konnte somit eine klare Aussage über die Zusammensetzung der auftretenden Markerchromosomen getroffen werden, was insbesondere bei pränatalen Fällen in der genetischen Beratung sehr hilfreich ist. Daneben war es möglich, in einigen Fällen mit Ringchromosomen und deren Abbaustufen eine exakte Charakterisierung der einzelnen Ringe und deren Derivate durchzuführen.

In 17 der untersuchten Fälle mit Markerchromosomen konnte euchromatisches Material auf dem Markerchromosom nachgewiesen werden, ohne dass klinische Auffälligkeiten bei seinem Träger auftraten. Diese Fälle können evtl. Hinweise auf Regionen im menschlichen Genom geben, die genetisch weitestgehend inaktiv sind oder ohne klinische Konsequenzen inaktiviert werden können. Um eine solche Aussage treffen zu können, sind jedoch noch weitere ausgedehnte Studien an zusätzlichen Fällen mit Markerchromosomen notwendig. Weitere Faktoren für die Ausprägung eines klinischen Bildes, wie das Vorliegen einer UPD und das Vorkommen und die Häufigkeit des SMC in anderen als dem untersuchten Gewebe müssen in die Analyse mit einbezogen werden. Insgesamt ist es für eine klinische Korrelation des Auftretens von Markerchromosomen mit euchromatischen Anteilen und phänotypischen Konsequenzen notwendig, weitaus umfangreichere Studien zu SMC der einzelnen menschlichen Chromosomen durchzuführen, wie dies mittels der Bruchpunktanalysen der Markerchromosomen des Chromosoms 12 (siehe 3.2.2.4.2.) bereits begonnen wurde.

##### 4.2.3.5.2. Einschätzung der Relevanz von Markerchromosomen

Ein großes Problem bei der Einschätzung der Relevanz von Markerchromosomen ist, neben der Charakterisierung ihrer Herkunft und Zusammensetzung hinsichtlich des Vorhandenseins von Euchromatin, ihr mengenmäßiges Auftreten in den Zellen des jeweiligen Gewebes, der so genannte Mosaikstatus. So kann ein Marker gleicher Herkunft und Zusammensetzung verschiedene klinische Konsequenzen haben, abhängig davon, ob er in allen oder nur einem Teil der Zellen des jeweiligen Gewebes auftritt.

Zur Risikoabschätzung ist es weiterhin von Interesse, ob ein Marker bzw. Derivatchromosom neu entstanden ist oder von den Eltern an die Nachkommen weitergegeben wurde. Ist das der Fall, geht man mit großer Wahrscheinlichkeit davon aus, dass kein erhöhtes Risiko für eine klinische Symptomatik besteht, wenn bei dem elterlichen Träger keinerlei phänotypische Auffälligkeiten auftraten. Da jedoch auch unterschiedliche Mengenmäßige Anteile (Mosaikstatus) des Markers in z.T. auch unterschiedlichen Geweben bei Eltern und Kinder vorliegen können, ist diese Aussage nicht in allen Fällen zutreffend. So wurde z. B. von Adhvaryu *et al.* 1998 der Fall eines familiären SMCs 15 beschrieben, der über drei Generationen weitergegeben wurde, jedoch in unterschiedlichen prozentualen Anteilen und mit der veränderter Struktur. Obwohl auch bei den innerhalb dieser Arbeit analysierten familiären Fälle mit (ausschließlich akrozentrischen) SMCs meist keinerlei Auffälligkeiten auftraten, wurden aber in einem Fall Ultraschall-Auffälligkeiten und in einem weiteren Fall Fertilitätsstörungen beschrieben. Inaktivierungsprozesse von, auf dem Marker enthaltenen, Genen können hier für die Ausprägung einer Symptomatik von Bedeutung sein.

Obwohl sehr viele Publikationen zu überzähligen Markerchromosomen bereits erschienen sind, standen bis dato jedoch nicht die geeigneten FISH Methoden zur Verfügung, um eine exakte Charakterisierung derselben durchzuführen. Eine sichere Korrelation eines auftretenden Markerchromosoms zur klinischen Symptomatik ist bisher nur in sehr seltenen Fällen mit typischen Markern, wie beim Pallister-Killian Syndrom mit dem typischen Isochromosom 12p und dem Cat-eye-Syndrom mit einem invertiert duplizierten SMC 22 möglich.

Weiterführende umfangreiche Untersuchungen könnten in Zukunft helfen, auch in den übrigen Fällen klare Aussagen zur Prognose treffen zu können. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung ist die von Dr. T. Liehr in Kürze zugängliche *homepage* ([http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL\\_ZYTO/sSMC.htm](http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm)), auf der alle bisher beschriebenen

Markerchromosomen, ihre Charakterisierung und ihre klinischen Auswirkungen zu finden sein werden.

#### **4.2.3.6. Untersuchungen zur Struktur und Stabilität von Ringchromosomen**

Ringchromosomen entstehen durch Doppelstrangbrüche in beiden Armen eines Chromosoms und einer anschließenden Fusion beider Enden des zentralen Fragments (Speedvak *et al.*, 2003). Die Häufigkeit von Ringen beträgt ca. 1 auf 50000. Es kann zwischen überzähligen Ringen und Ringchromosomen, die statt eines normalen Chromosoms auftreten, unterschieden werden. Häufig sind Ringchromosomen instabil und treten bei ihrem Träger sowohl als einfache Ringe als auch als Doppelringe oder Mehrfachringe mit einem oder mehreren Zentromeren und vollständigen Kopien des ursprünglichen Ringes auf (Stetten *et al.*, 1984, Speevak *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Varianz findet man Ringchromosomen häufig im Mosaik vorkommend. Es wird beschrieben, dass diese Umbauten zu mitotisch stabileren Formen führen, die dann in der überwiegenden Anzahl der Zellen zu finden sind. Daneben treten zusätzlich zu den einfachen Ringchromosomen und den Doppel- und Mehrfachringen des gleichen Bereiches oft auch kleinere Fragmente des Ringes auf (z.B. Callen *et al.*, 1991; Plattner *et al.*, 1993).

Die Einschätzung der prognostischen Bedeutung eines Ringchromosoms für den Träger ist aufgrund dieser unterschiedlichen Struktur (trotz eines z.T. balancierten Karyotyps) meist schwierig. In der Literatur sind auch Phänomene, wie das „Ringsyndrom“ (Kosztolanyi 1987, Vermeesch *et al.*, 2002) beschrieben, wobei die Symptomatik weniger abhängig von der Herkunft des Ringes als der Struktur desselben ist. Als Ursache wird die mitotische Instabilität eines Ringchromosoms aufgrund seines abnormalen Schwesterchromatid-Austausches in somatischen Zellen angenommen, die auch zu den bereits beschriebenen strukturellen Umbauten von Ringchromosomen führt. Ausschlaggebend ist zudem eine evtl. vorliegende Monosomie des nicht enthaltenen Bereiches bei nicht zusätzlich auftretenden Ringen, wie sie z.B. beim Turner-Syndrom beschrieben sind (Pfeiffer *et al.*, 1968).

##### **4.2.3.6.1. Überzählige Ringchromosomen**

Überzählige Ringchromosomen treten z.B. beim Cat-eye-Syndrom (Haab, 1879) und beim De Grouchy-Syndrom auf (De Grouchy *et al.*, 1964) und führen hier zu einer unbalancierten Situation und damit zur Ausbildung einer klinischen Symptomatik.

Darüber hinaus werden oft Ringchromosomen als negative prognostischen Faktoren bei hämatologischen Erkrankungen (z.B. Alimena *et al.*, 1975, Werner-Favre *et al.*, 1986, Gisselsson *et al.*, 1999) diskutiert. Von großer prognostischer Bedeutung ist bei überzähligen Ringen die auf dem Ring enthaltene euchromatische Region und die damit resultierende Polysomie (je nachdem ob z.B. ein einfacher oder mehrfacher Ring vorliegt) dieses Bereiches.

Das Risiko für phänotypische Abweichungen ist bei Nachweis eines Ringchromosoms als relativ hoch anzusehen, wie verschiedene Untersuchungen zeigten (z.B. Crolla *et al.*, 1998, Stankiewicz *et al.*, 2000). In mindestens 50% ist mit mentaler Retardierung zu rechnen (Crolla *et al.*, 1998) und der Anteil der Patienten mit Dysmorphien liegt sogar noch höher. Von den bisher beschriebenen postnatalen Fällen mit Ringchromosomen hatte die überwiegende Anzahl (bis zu 75%) phänotypische Auffälligkeiten (Daniel und Malafiej, 2003), wobei es große Unterschiede in Abhängigkeit von der Herkunft des Ringes gab. So waren z.B. Patienten mit Ringen vom Chromosom 3 meist unauffällig. Von den pränatal nachgewiesenen Ringchromosomen wurden 30% mit Auffälligkeiten assoziiert. Für eine Risikoeinschätzung ist es somit äußerst wichtig, die Herkunft und genaue Zusammensetzung eines Ringchromosoms zu kennen und auch weitere prognostische Faktoren, wie z.B. das evtl. Vorliegen einer UPD abzuklären.

##### **4.2.3.6.2. Ergebnisse der Charakterisierung von Ringchromosomen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden innerhalb der 140 untersuchten Fälle mit SMC auch 30 Fälle mit Ringchromosomen charakterisiert. Darunter waren 2 Fälle mit Ringchromosomen X und ein Fall mit Ringchromosom Y, die jeweils anstelle des zweiten Gonosoms auftraten.

In drei Fällen mit Ringchromosomen handelte es sich um größere Marker, die Bruchpunkte mehr als zwei GTG-Banden vom Zentromer entfernt aufwiesen. Diese zwei Ringe vom Chromosom 15 und ein Ring vom X-Chromosom wurden mit MCB analysiert. Alle übrigen 27 Ringchromosomen enthielten im Wesentlichen nur das Zentromer und die perizentrische Region des jeweiligen Chromosoms. In 10 der 24 postnatalen Fälle wurden phänotypische Auffälligkeiten beobachtet. Dieser Anteil liegt nicht ganz so hoch, wie in der Literatur angegeben. Es ist jedoch zu beachten, dass fast ausschließlich sehr kleine Ringe mit wenig oder keinen euchromatischen Anteilen untersucht wurden. In weiteren 3 Fällen wurde mentale Retardierung beschrieben und in 4 Fällen traten Fertilitätsstörungen auf. In zwei der 6 pränatal auftretenden Ringchromosomen wurden Ultraschallauffälligkeiten beobachtet.

In einem Drittel (10) der Fälle mit überzähligen Ringen waren neben dem analysierten einfachen Ringchromosom auch strukturell abweichende di- oder monozentrische Marker und/oder Mehrfachringe zu beobachten. Vor allem die Ringchromosomen des Chromosoms 8 zeigten in 3 von 5 Fällen eine große strukturelle Variation (Fälle 67-01, 318-03, 182-03 Tabelle 8.9.). Mit Hilfe der entwickelten Verfahren des cenM-FISH und des subcenM-FISH war auch in diesen Fällen eine Erfassung und Charakterisierung aller auftretenden Varianten des Ringchromosoms möglich.

Bisher sind in der Literatur ca. 88 Fälle mit überzähligen Ringchromosomen beschrieben (Daniel und Malafiej, 2003). Das sind im Vergleich zu den übrigen Markerchromosomen verhältnismäßig wenig Fälle, obwohl deren Anteil unter den zusätzlichen Markerchromosomen bis zu 16% beträgt (Blennow *et al.*, 1995). Ein Grund dafür könnte sein, dass besonders kleinere Ringe zytogenetisch nicht immer als solche erkennbar sind und ihre Struktur nur in einer sehr hochauflösenden Bänderung erkennbar ist. Aufgrund ihrer Entstehungsweise geht man davon aus, dass Ringe keine Telomere besitzen (z.B. Daniel *et al.*, 1994, Röthlisberger *et al.*, 2001) und ihre relative Stabilität gegenüber Abbauprozessen durch die Ringstruktur gewährleistet ist.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten (siehe Tab. 3.2.2.4.1.) zu Telomersequenzen auf SMCs zeigen jedoch, dass sehr kleine (*minute*) Markerchromosomen, die ausschließlich aus Zentromermaterial bestehen und bei denen ein Ringschluß aufgrund ihrer geringen Größe schwer vorstellbar ist, in einigen Fällen auch keine nachweisbaren Telomersequenzen besitzen. Der endgültige Beweis, ob es sich bei einem kleinen Marker um ein Ringchromosom handelt oder nicht, bleibt daher schwierig und es sind weitere umfangreiche Untersuchungen notwendig, um diese Frage zu klären. Ein Ansatzpunkt hierfür wäre evtl. eine 3-dimensionale Untersuchung der fraglichen Markerchromosomen wie sie für Interphasekerne unauffälliger Probanden bereits beschrieben wurde (Steinhaeuser *et al.*, 2002).

#### **4.2.3.7. Entstehung von kleinen SMCs und UPD**

##### **4.2.3.7.1. Die uniparentale Disomie (UPD)**

Als uniparentale Disomie (UPD) bezeichnet man den Zustand einer Zelle, wenn statt jeweils einem Chromosom eines Elternteils zwei homologe Chromosomen eines Elternteils vorliegen (z.B. Kotzot, 1999) Es gibt sowohl vollständige UPDs als auch solche, die nur einen chromosomalen Teilbereich betreffen.

Eine UPD, sowohl paternaler als auch maternaler Herkunft, ist für fast alle menschlichen Chromosomen schon beschrieben worden. Bei einer UPD kann man zwischen Heterodisomie, dem Vorliegen der beiden Homologen eines Elternteils, und der Isodisomie, dem Verbleiben von zwei Kopien eines Homologen eines Elternteils unterscheiden. Auch das gleichzeitige Auftreten von hetero- und isodisomen Bereichen ist möglich.

Durch das Vorliegen einer UPD kann es aufgrund von atypischer genomischer Prägung (*genomic imprinting*) (Ledbetter und Engel, 1995) oder dem homozygoten Vorliegen autosomal rezessiver Mutationen zur Ausbildung einer klinischen Symptomatik kommen. Dies ist zum Beispiel bei der maternalen UPD 7, 14 und 15 und der paternalen UPD 6, 11, 14 und 15 der Fall (Kotzot, 1999 und 2001). Jedoch nicht in jedem Fall ist bei Vorliegen einer UPD mit phänotypischen Auffälligkeiten beim Träger zu rechnen. Am bekanntesten ist wohl die UPD 15, die bei maternalem Vorliegen zum Prader-Willi-Syndrom führt, bei paternalem

Vorliegen jedoch zur Ausbildung des Angelman-Syndroms. Beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom wird in ca. 11% der Fälle eine UPD des Chromosoms 11 beschrieben, während das Silver-Russel-Syndrom in 6-10% mit einer (maternalen) UPD 7 assoziiert ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass Patienten mit Markerchromosomen eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer UPD haben (Kotzot, 2002), weshalb es sinnvoll ist, bei Trägern von Markerchromosomen das Vorliegen einer UPD zu erfassen.

#### **4.2.3.7.2. Entstehungsweise von Markerchromosomen**

Die beschriebene Häufung von UPDs bei Trägern eines SMC wird leicht nachvollziehbar, betrachtet man sich die Entstehungsweise von Markerchromosomen an. Zur Entstehung vor allem der kleinen Markerchromosomen (SMC bzw. *minute marker*) gibt es verschiedene Theorien. Die meist favorisierte geht von einem ursprünglich trisomen Chromosomensatz für das Chromosom aus, von dem der Marker abstammt. Durch verschiedene Abbauprozesse eines der drei Chromosomen („*trisomic rescue*“) zur Erhaltung des normalen, disomen Chromosomensatzes entstehen dann kleine Markerchromosomen. Diese stellen praktisch „Reste“ des abgebauten überzähligen Homologen dar. Da es bei diesem Abbau auch dazu kommen kann, dass gerade das einzelne Chromosom eines Elternteils abgebaut wird und die verbleibenden vollständigen Chromosomen beide von dem anderen Elternteil vererbt wurden, kann es zur Ausbildung einer sogenannten uniparentalen Disomie (UPD) kommen. Die gleiche Wahrscheinlichkeit für eine UPD ist bei einem weiteren diskutierten Entstehungsmechanismus von Markern, dem „*monosomic rescue*“ gegeben, wo aus einer ursprünglich monosomen Zygote mit dem ererbten Marker durch Verdopplung des einen normalen Chromosoms wieder eine disome Zelle entsteht (z.B. Robinson *et al.*, 1993). Diese Theorie ist noch umstritten und es ist mit diesem Denkmodell nur eine komplette Isodisomie aufgrund eines *non-disjunction* in der Mitose erklärbar. In vielen Fällen mit Markerchromosomen wird aber eine Heterodisomie beschrieben (z.B. Röthlisberger *et al.*, 2001), die eher auf den erstgenannten Entstehungsmechanismus des Markers hindeutet.

#### **4.2.3.8. Nachweis uniparentaler Disomien in Fällen mit SMC**

Wie schon erwähnt, besteht für Träger eines überzähligen Markerchromosoms eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer uniparentalen Disomie (Kotzot, 2002). Aus diesem Grund wurde bei allen Fällen, in denen uns Material der Eltern und des Kindes zur Verfügung stand, eine UPD-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 8.9. im Anhang zu finden. Obwohl die Häufung von UPDs bei Patienten mit SMC seit längerem bekannt ist, sind bisher zumeist Einzelfälle in der Literatur beschrieben. Studien an größeren Untersuchungskollektiven sind bis zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit nicht erfolgt. Eine Einschätzung der klinischen Relevanz der bekannten UPDs bezieht sich zudem zumeist auf Fälle in denen kein Markerchromosom auftritt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 33 Fälle mit Markerchromosomen auf das Vorliegen einer UPD hin untersucht. In insgesamt 6 Fällen wurde eine UPD nachgewiesen. Dies waren im Einzelnen zwei Fälle mit einer maternalen UPD 22, wobei in einem der Fälle (332-02) zusätzlich eine partielle UPD 11 vorlag. Es kam zum Schwangerschaftsabbruch aufgrund des Vorliegens eines Derivat 22-Syndroms. Im zweiten Fall (357-02FW) mit einer UPD 22 wurden bis dato keinerlei Auffälligkeiten beschrieben. Neben einem phänotypisch auffälligen Patienten mit einer maternalen UPD 15 wurde bei einem völlig unauffälligen Patienten eine maternale UPD 12 nachgewiesen (Fall HS; v. Eggeling *et al.*, 2002). Bei einem Patienten mit Silver-Russel-Syndrom konnte eine maternale Isodisomie 7 nachgewiesen werden, was mit der auftretenden Klinik korrelierte. Bei einem weiteren Patienten mit Markerchromosom vom Chromosom 4 und einer nachgewiesenen partiellen, maternalen UPD 4 ist wohl eher die zusätzlich auftretende Trisomie 21 als ursächlich für die klinische Symptomatik zu sehen (Starke *et al.*, 2003b).

Bisher ist noch unbekannt, wie die Zelle das Signal für den Abbau eines dieser Chromosomen erhält und wie er genau abläuft. Unklar ist auch, ob zufällig irgendeines dieser drei Chromosomen eliminiert wird oder ob es bevorzugt zum Abbau des zweiten Chromosoms eines Elternteiles kommt. Würde der Abbau rein zufällig erfolgen, wie bisher angenommen (Strachan und Read, 1996), müsste es in ca. 1/3 aller Fälle mit



Markerchromosomen zum Vorliegen einer UPD kommen. Es ist aber aufgrund der weitaus geringeren Häufigkeit einer UPD eher wahrscheinlich, dass ein Zellzyklus-vermittelter, gezielter Abbau erfolgt und dieser im Falle des Zustandekommens einer UPD gestört ist. Insgesamt sind auch hier für Aussagen zur klinischen Bedeutung einer evtl. vorliegenden UPD bei Trägern von Markerchromosomen ausgedehntere Untersuchungen notwendig.

#### **4.2.3.9. Neozentromerische Markerchromosomen**

Als Neozentromere werden Regionen im Genom bezeichnet, die primär keine Zentromerfunktion, Zentromer-spezifische DNA und Proteine besitzen, jedoch zur Stabilisierung des Genoms sekundär Zentromerfunktion übernehmen können.

Eine Aktivierung von Neozentromeren in *Drosophila melanogaster* wurde bereits 1998 beschrieben (Williams *et al.*, 1998). Schon 1997 fand die Arbeitsgruppe um Depinet (Depinet *et al.*, 1997) heraus, dass sich Neozentromere in Markerchromosomen in Regionen ohne Alpha-Satelliten DNA ausbilden können. Diese Erkenntnis wurde inzwischen durch weitere Arbeitsgruppen (z.B. du Sart *et al.*, 1997, Levy *et al.*, 2000, Dufke *et al.*, 2001) bestätigt. Die Neozentromere besitzen einen vergleichbaren (nicht identischen!) Aufbau wie primäre Zentromere aber keine nachweisbare Alpha-Satelliten DNA. Allerdings ist beschrieben, dass sich Neozentromere in menschlichen Zelllinien am ehesten ausbilden, wenn Alpha-Satelliten DNA zur Kultur gegeben wird. (Sullivan *et al.*, 2001).

Wie und aufgrund welchen Reizes die Ausbildung des Neozentromers genau vonstatten geht, ist noch weitgehend unklar. Umstritten ist auch die Frage, ob es innerhalb eines jeden Chromosoms für die Neozentromerbildung prädisponierte Stellen gibt oder ob sich eine solch funktionale Einheit im Prinzip an jeder Stelle des Genoms ausbilden kann. Es scheinen aber Regionen mit besonders viel repetitiver DNA prädisponiert für die Ausbildung eines Neozentromers zu sein. Als Bereiche, die bevorzugt Neozentromere ausbilden gelten u.a. 3q26, 8p23, 13q32,15q23 und Yq12 (Amor und Choo, 2002), aber es wurden bisher auch Neozentromere auf allen anderen menschlichen Chromosomen mit Ausnahme des Chromosoms 16 nachgewiesen.

Bisher wurden in der Literatur ca. 60 Fälle mit neozentrischen Chromosomen beschrieben. Meist handelt es sich um Patienten, bei denen ein Markerchromosom nachgewiesen wurde. Das Vorkommen eines solchen neozentrischen Markers war meist mit phänotypischen Auffälligkeiten verbunden (Amor und Choo, 2002).

#### **Der Nachweis von Neozentromeren**

Neozentromere können mit Antikörpern gegen Zentromerproteine dargestellt werden.

Der Nachweis der molekularen Komponenten des Zentromers des Menschen und anderer Säuger wurde erstmals 1980 mittels eines Autoimmun-Serums eines Patienten mit CREST Syndrom durchgeführt (Moroi *et al.*, 1980). Patienten mit dieser Erkrankung entwickeln vermehrt Auto-Antikörper gegen die verschiedenen Zentromerproteine. So konnte festgestellt werden, dass die Zentromerproteine (CENP's) A, B und C während des gesamten Zellzyklus nachweisbar waren und wahrscheinlich mit der Zentromer-DNA interagieren (Sullivan und Glass, 1991; Saitoh *et al.*, 1992; Sullivan *et al.*, 1994).

Als spezifisch für funktionell aktive Zentromere bzw. Neozentromere wird eine Färbung mit den Proteinen CENP-C, CENP-A und CENP-E angesehen (Sullivan und Schwarz, 1995, Warburton *et al.*, 1997).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 4 Fälle mit neozentrischen Markerchromosomen identifiziert (siehe Anhang Tabelle 8.9.), wobei der Antikörper-Nachweis des Neozentromers selbst nicht in unserem Haus durchgeführt wurde.

Im Fall 191-02 wurde ein neozentrisches Isochromosom 13qter bis q14 identifiziert. Mittels MCB wurde im Fall (336-00) eine partielle Tetrasomie des Bereiches 12pter bis 12p12.3 in Form des Vorliegens eines Isochromosoms 12 für diesen Bereich nachgewiesen (Dufke *et al.*, 2001). Bei der Patientin wurden die typischen Symptome eines Pallister-Killian Syndromes, das durch das Vorliegen eines Isochromosoms 12p gekennzeichnet ist, beobachtet. Der Nachweis eines aktiven Neozentromers erfolgte mittels CENP-C Antikörpern in Tübingen. In einem weiteren Fall mit analphoidem Markerchromosom 12 (Fall 2004045, Tabelle 8.9. im Anhang) aus der Region 12p13.33 bis 12pter steht der Nachweis

der Zentromeraktivität des Neozentromers noch aus. In einem Fall (Fall BD) konnte die Identität des Markers mittels diverser FISH Analysen und Mikrosezierung des Markers nicht geklärt werden (Mackie Ogilvie *et al.*, 2001).

### 4.3. Resumé und Ausblick

Mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden MCB, cenM-FISH und acro-cenM-FISH, sowie der Technik des subcenM-FISH und verschiedener Sondenkombinationen für das Chromosom 9 wurde erstmals eine umfassende Untersuchung der perizentrischen Region des Menschen durchführbar.

Die MCB Technik ermöglichte eine Beschreibung von chromosomalen Umbauten ab einer Mindestgröße von 5-10Megabasen. Für eine noch feinere Analyse, insbesondere der ans Zentromer angrenzenden Regionen, wurden zusätzliche Verfahren entwickelt. Die Technik des cenM-FISH (Nietzel *et al.*, 2001) erlaubt eine schnelle und zuverlässige Identifizierung der Herkunft von kleinen Markerchromosomen, wie deren Anwendung im Rahmen der Diagnostik bereits gezeigt hat. Mit dem Verfahren des acro-cenM-FISH (Trifonov *et al.*, 2003) wird sowohl eine (weitere) Identifizierungsmöglichkeit insbesondere von akrozentrischen Markern, als auch die Möglichkeit der genauen Charakterisierung der Zusammensetzung der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen und deren Derivatvchromosomen durchführbar.

Durch die Entwicklung von verschiedenen Sondenkombinationen für das Chromosom 9 und die Etablierung von subcenM-FISH Sonden Sets für alle menschlichen Chromosomen ist nun ebenfalls erstmals eine zytogenetische Analyse von sehr kleinen, sich unmittelbar ans Zentromer anschließenden, euchromatischen Regionen möglich. Damit wird auch eine (molekular-) zytogenetische Erfassung von bislang nur molekulargenetisch beschreibbaren Veränderungen dieser Bereiche durchführbar, wie erste Untersuchungen von Derivatvchromosomen mit Veränderungen der perizentrischen Region bereits zeigten (3.2.2.1.; Starke *et al.*, 2003a). Das Verfahren des subcenM-FISH ermöglichte weiterhin eine sichere Erfassung von zentromernahen euchromatischen Regionen auf kleinen Markerchromosomen und somit auch eine erste Phänotyp-Genotyp-Korrelation von SMC.

Für das Chromosom 9 wurden mit dem subcenM-FISH Set 9 und der Sondenkombination 1 bereits umfangreiche Analysen durchgeführt und Veränderungen der perizentrischen Region 9 in Form von Inversionen, Duplikationen und Deletionen erfasst und charakterisiert. Zudem konnten im Rahmen dieser Arbeit weitere, bisher nicht beschriebene Heteromorphismen erfasst werden.

Weitere Studien sollten in Zukunft Aufschluss über die Mechanismen der verschiedenen Variationen der perizentrischen Region des Chromosoms 9 und ihrer klinischen Bedeutung insbesondere für die scheinbar gehäuft in dieser Patientengruppe auftretenden Fertilitätsstörungen (z.B. Sasagawa *et al.*, 1998) geben.

Insbesondere mit der Weiterentwicklung des MCB, dem *Multitude*-MCB (Weise *et al.*, 2003), wird es in Zukunft auch möglich sein, hoch komplexe Karyotypveränderungen nach M-FISH hinsichtlich ihrer Bruchpunkte mit nur einer Hybridisierung auf Subbandenebene zu charakterisieren. Dies ist von besonderer Bedeutung bei Karyotypisierung von Fällen aus dem Bereich der Pränatal- und Tumordiagnostik, wo oft nur eine begrenzte Zahl an Metaphaseplatten zur Verfügung steht. Durch Einbeziehung zusätzlicher Fluorochrome wird die derzeit noch problematische Wiederholung von Farbkombinationen zu beheben sein. Eine zusätzliche, sinnvolle Ergänzung des MCB ist durch Kombination der einzelnen Mikrosezierungs-basierenden Sondenmixe mit regionspezifischen BAC und/oder YAC Sonden möglich. Wenn auch eine Eignung dieser Sonden für ein YAC/BAC basierendes MCB aufgrund des hohen technischen Aufwandes und der unzureichenden Abdeckung nicht besteht, so ist doch mittels dieser Sonden eine noch feinere Bruchpunktdefinition auf Basis ihrer physikalischen Kartierung durchführbar.

Zur Optimierung des cenM-FISH Proben Sets ist eine Einbeziehung weiterer zentromerspezifischer Sonden der Chromosomen 1 und Y und zusätzlicher

heterochromatischer Sonden für die Regionen 9q12 und 16q11.2 angedacht, um auch Marker, die aus diesen Regionen stammen, sicher erfassen zu können.

Um eine exakte Charakterisierung der zentromernahen Region des Menschen zu gewährleisten und die Probleme zusätzlicher Signale der eingesetzten BAC-Sonden und der zum Teil noch unzureichenden Zentromernähe bewältigen zu können, wird derzeit an einer Ergänzung bzw. einem Austausch von BAC-Sonden auf Grundlage der heute aktuellen Sequenzierungs- und Kartierungsdaten gearbeitet, die in Zukunft für subcenM-FISH Analysen zur Verfügung stehen.

In Zukunft sollen des Weiteren umfassende Analysen der perizentrischen Regionen aller Chromosomen mittels eines Zweifarben Sonden Sets (3.1.3.1.3.) sowohl an phänotypisch auffälligen als auch klinisch unauffälligen Personen nähere Aussagen zur Häufigkeit und zur evtl. prognostischen Bedeutung derartiger Aberrationen zulassen.

Die genaue Analyse der Struktur und Organisation kleiner Marker- und Ringchromosomen kann zudem in Zukunft zum besseren Verständnis der Entstehung von Markerchromosomen beitragen. Neben den bereits in einigen Fällen mit SMC durchgeführten Telomeranalysen ist weiterhin eine Einbeziehung der einzelnen Chromosomen-spezifischen Subtelomersonden zum jeweiligen subcenM-FISH Set geplant. Nähere Einblicke in die Struktur von kleinen Marker- und vor allem Ringchromosomen könnte auch deren dreidimensionale Darstellung und Analyse erlauben. Steinhäuser und Mitarbeitern (Steinhäuser *et al.*, 2002) gelang es bereits mit der Technik des S-FISH im Interphasekern sowohl verschiedenfarbige Zentromere darzustellen, als auch, ähnlich der bei Lemke *et al.* (2001) beschriebenen Arbeiten, MCB Analysen durchzuführen.

## V. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die bis dato molekular-zytogenetisch nahezu nicht untersuchte, perizentrische Region des Menschen zu analysieren und zu charakterisieren. Da bis zu Beginn der Anfertigung der vorliegenden Arbeit dazu keine ausreichenden Methoden zur Verfügung standen, war es zunächst notwendig, geeignete Verfahren zu entwickeln, die derartige Untersuchungen möglich machten. Dies waren im Einzelnen die auf Mikrosezierungsbanken oder auf YAC/BAC Sonden basierende Multicolor-Bänderung, die zentromerspezifische Multicolor-FISH (cenM-FISH) ein spezifisches Sonden Set zur Charakterisierung der akrozentrischen Chromosomen– das acro-cenM-FISH, sowie das subcenM-FISH und verschiedene Sondenkombinationen für die zentromernahe Region des Chromosoms 9.

Zur Charakterisierung von Bruchpunkten chromosomaler Umbauten auf Subbanden-Niveau wurde die Multicolor-Bänderung auf Basis von überlappenden regionspezifischen Mikrosezierungs-Sonden für alle menschlichen Chromosomen etabliert. Mittels MCB wurden im Rahmen dieser Arbeit vor allem Markerchromosomen, die größer als der kurze Arm des Chromosom 17 waren und größere Derivatchromosomen mit Veränderungen der perizentrischen Region untersucht.

Das alternativ dazu entwickelte YAC/BAC basierende MCB zeigte in den meisten Fällen eine unzureichende Auflösung.

Zur noch exakteren Analyse des perizentrischen Bereiches der menschlichen Chromosomen war die Etablierung weiterer Verfahren notwendig.

Zur gezielten Untersuchung von Variationen in der perizentrischen Region des Chromosoms 9 wurden zwei Sondenkombinationen eingesetzt, die es möglich machten, neben den bereits in der Literatur beschriebenen Heteromorphismen auch bisher unbekannte zentromernahe Veränderungen genau zu charakterisieren. Mit dem neu entwickelten Verfahren des subcenM-FISH konnten erstmals auch sehr kleine Veränderungen der zentromernahen Region, wie Inversionen, Duplikationen und Deletionen erfasst werden. Zusammen mit der Methode des cenM-FISH und des acro-cenM-FISH gelang außerdem eine schnelle Identifizierung der Herkunft kleiner Markerchromosomen (SMC) und eine klare Aussage zum Vorhandensein von euchromatischen Regionen auf diesen. Dies war die Grundlage für eine erste Genotyp-Phänotyp Korrelation von Fällen mit SMC.

Eine Ergänzung insbesondere zur Charakterisierung von akrozentrischen Markern und zur Untersuchung von Aberrationen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen stellte das acro-cenM-FISH Verfahren dar.

Gezielte Bruchpunktanalysen wurden mit Zentromer 12 assoziierten Sonden in 4 Fällen mit Marker- oder Ringchromosomen 12 durchgeführt.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass das Vorhandensein von zusätzlichen euchromatischen Sequenzen in Form von überzähligen SMC zwar in den meisten, jedoch nicht in jedem Fall zu klinischen Konsequenzen führt.

Insbesondere im Falle der Veränderungen der akrozentrischen Chromosomen und des Chromosoms 9 konnte gezeigt werden, dass Bruchereignisse bevorzugt in *repeat*-reichen Regionen stattfinden. Im Falle des Chromosoms 9 scheinen jedoch die Mehrzahl der Veränderungen ohne phänotypische Konsequenzen zu sein.

Das etablierte Zweifarben Sonden Set stellt eine weitere Grundlage zu umfangreichen Untersuchungen zu perizentrischen Aberrationen in der Normalbevölkerung und damit zur Feststellung der Häufigkeit und Relevanz derartiger Veränderungen dar.

---

## VI. Literaturverzeichnis

- Adhvaryu SG, Peters-Brown T, Livingston E, Qumsiyeh MB (1998).** Familial supernumerary marker chromosome evolution through three generations. *Prenat Diagn.* 18: 178-181
- Alimena G, Annino L, Dallapiccola B, Ricci N (1975).** Ring chromosomes and leukaemia. *Experientia* 31: 1359-1360
- Amor DJ und Choo KHA (2002).** Neocentromeres: Role in Human Disease, Evolution, and Centromere Study. *Am J Hum Genet.* 7: 695-714
- Arnold J (1879).** Über feinere Strukturen der Zelle unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Virchows arch path Anat.* 77: 181-206
- Arrighi FE, Hsu TC (1971).** Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86
- Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Zucker JM, Mazabraud A (1984).** Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma: a cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 12: 21-25
- Aurich-Costa J, Vannier A, Gregoire E, Nowak F, Cherif D (2001).** IPM-FISH, a new M-FISH approach using IRS-PCR painting probes: application to the analysis of seven human prostate cell lines. *Genes Chromos Cancer.* 30: 143-146
- Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR (2000).** An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *Am J Hum Genet.* 66: 1684-1688
- Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE (2001).** Segmental duplications : organization and impact within the current humane genome project assembly. *Genome Res.* 11: 1005-1017
- Bailey JA, Yavor AM, Viggiano L, Misceo D, Horvath JE, Archidiacono N, Schwartz S, Rocchi M, Eichler EE (2002).** Human-specific duplication and mosaic transcripts: the recent paralogous structure of chromosome 22. *Am J Hum Genet.* 70: 83-100
- Barbi G, Spaich C, Adolph S, Kehrer-Sawatzki H (2003).** Analphoid de novo marker chromosome inv dup(3)(q28qter) with neocentromere in a dysmorphic and developmentally retarded girl. *J Med Genet.* 40: e27
- Barbosa AC, Otto PA, Vianna-Morgante AM (2000).** Replication timing of homologous alpha-satellite DNA in Roberts syndrome. *Chromos Res.* 8: 645-50
- Bates GP, Wainwright BJ, Williamson R, Brown SD (1986).** Microdissection of and microcloning from the short arm of human chromosome 2. *Mol Cell Biol.* 6: 826-30
- Benzacken B, Monier-Gavelle F, Siffroi JP, Agbo P, Chalvon A, Wolf JP (2001).** Acrocentric chromosome polymorphisms: beware of cryptic translocations. *Prenat Diagn.* 21: 96-98
- Blennow E, Telenius H, de Vos D, Larsson C, Henriksson P, Johansson O, Carter NP, Nordenskjöld M (1994).** Tetrasomy 15q: two marker chromosomes with no detectable alpha-satellite DNA. *Am J Hum Genet.* 54: 877-883
- Blennow E, Nielsen KB, Telenius H, Carter NP, Kristoffersson U, Holmberg E, Gillberg C, Nordenskjöld M (1995).** Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet.* 55: 85-94
- Bloom SE, Goodpasture C (1976).** An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum Genet.* 34: 199-206

- Boveri T (1904).** Ergebnisse über die Konstitution der charakteristischen Substanz des Zellkerns. *Fischer, Jena*
- Bridgland L, Footz TK, Kardel MD, Riazi MA, McDermid HE (2003).** Three duplicons form a novel chimeric transcription unit in the pericentromeric region of chromosome 22q11. *Hum Genet.* 112: 57-61
- Brown J, Horsley SW, Jung C, Saracoglu K, Janssen B, Brough M, Daschner M, Beedgen B, Kerkhoffs G, Eils R, Harris PC, Jauch A, Kearney L (2000).** Identification of a subtle t(16;19)(p13.3; p13.3) in an infant with multiple congenital abnormalities using a 12-color multiplex FISH telomere assay, M-tel. *Eur J Hum Genet.* 8: 903-910
- Budarf ML, Emanuel BS (1997).** Progress in autosomal segmental aneusomy syndromes (SASs): single or multi-locus disorders? *Hum Mol Genet.* 6: 1657-1665
- Callen DF, Eyre HJ, Ringenbergs ML, Freemantle CJ, Woodroffe P, Haan EA (1991).** Chromosomal origin of small ring marker chromosomes in man: characterization by molecular genetics. *Am J Hum Genet.* 48: 769-782
- Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT, Telenius H, Pelmeur AH, Leversha MA, Glancy MT, Wood SL, Cook K, Dyson HM (1992).** Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet.* 5: 299-307
- Caspersson T, Faber S, Foley GE, Kudnyowsky J, Modest E, Wagh V, Zech L (1968).** Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res.* 49: 219-222
- Caspersson T, Zech L, Johansson C (1970).** Analysis of human metaphase chromosomes set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp Cell Res.* 62: 490-492
- Caspersson T, Lomakka G, Zech L (1971).** The 24 fluorescence patterns of human metaphase chromosomes- distinguishing characters and variability. *Hereditas* 67: 89-102
- Chicago Conference (1966).** Standardization in human cytogenetics. Birth defects: Original Article Series 2: New York: National Foundation
- Choo KH, Vissel B, Nagy A, Earle E, Kalistis P (1991).** A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes and derivation of new consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* 19: 1179-1182
- 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, Michel S, Mühlig P, Westermann M, Grummt UW, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T (2002).** Demystifying chromosome preparation and the implications for a concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet Genome Res.* 98: 136-146
- Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF (2003).** Centromeres and Kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signalling. *Cell* 112: 407-421
- Craig-Holmes AP, Moore FB, Shaw MW (1973).** Polymorphism of C-band heterochromatin. I. Frequency of variants. *Am J Hum Genet.* 25: 181-192
- Crolla JA, Harvey JF, Sitch FL, Dennis NR (1995).** Supernumerary marker 15 chromosomes: a clinical, molecular and FISH approach to diagnosis and prognosis. *Hum Genet.* 95: 161-170
- Crolla JA, Long F, Rivera H, Dennis NR (1998).** FISH and molecular study of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosomes 15 and 22: I. Results of 26 new cases. *Am J Med Genet.* 75: 355-366
- Daniel A, Malafiej P, Preece K, Chia N, Nelson J, Smith M (1994).** Identification of marker chromosomes in thirteen patients using FISH probing. *Am J Med Genet.* 53: 8-18

**Daniel A und Malafiej P (2003).** A series of supernumerary small ring marker autosomes identified by FISH with chromosome probe arrays and a literature review excluding chromosome 15. *Am J Med Genet.* 117A: 212-222

**Dauwerse JG, Wiegant J, Raap AK, Breuning MH, van Ommen GJ (1992).** Multiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum Mol Genet.* 8: 593-598

**De Grouchy J, L'Eveque B, Debauchez C, Salmon C, Lamy M, Marie J (1964).** 17-18 Ring Chromosomes and Congenital Malformations in a Young Girl. *Ann Genet.* 91: 17-23

**Depinet TW, Zackowski JL, Earnshaw WC, Kaffe S, Sekhon GS, Stallard R, Sullivan BA, Vance GH, Van Dyke DL, Willard HF, Zinn AB, Schwartz S (1997).** Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet.* 6: 1195-1204

**Dufke A, Walczak C, Liehr T, Starke H, Trifonov V, Rubtsov N, Schoning M, Enders H, Eggermann T (2001).** Partial tetrasomy 12pter-12p12.3 in a girl with Pallister-Killian syndrome: extraordinary finding of an anaphoid, inderted duplicated marker. *Eur J Hum Genet.* 9: 572-576

**Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993).** Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic *in situ* hybridization. *Hum Genet.* 90: 590-610

**Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chissoe S, Hunt AR, Collins JE, Bruskiewich R, Beare DM, Clamp M, Smink LJ, Ainscough R, Almeida JP, Babbage A, Bagguley C, Bailey J, Barlow K, Bates KN, Beasley O, Bird CP, Blakey S, Bridgeman AM, Buck D, Burgess J, Burrill WD, O'Brien KP, et al. (1999).** The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 402: 489-495

**Du Sart D, Cancilla MR, Earle E, Mao JI, Saffery R, Tainton KM, Kalitsis P, Martyn J, Barry AE, Choo KH (1997).** A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nat Genet.* 16: 144-53

**Dutrillaux B, Lejeune J (1971).** A new technic of analysis of the human karyotype. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 272: 2638-2640

**Edström JE, Kaiser R, Röhme D (1987).** Microcloning of mammalian metaphase chromosomes. *Methods in Enzymology.* 151: 503-516

**Edwards YH, Putt W, Fox M, Ives JH (1995).** A novel human phosphoglucomutase (PGM5) maps to the centromeric region of chromosome 9. *Genomics* 30: 350-3

**Eggermann K, Mau UA, Bujdoso G, Koltai E, Engels H, Schubert R, Eggermann T, Raff R, Schwantz G (2002).** Supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 15: analysis of 32 new cases. *Clin Genet.* 62: 89-93

**Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B, Nielsen PE (1993).** PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 365: 566-568

**Eiben B, Leipoldt M, Rammelsberg O, Krause W, Engel W (1987).** High incidence of minor chromosomal variants in teratozoospermic males. *Andrologia* 19: 684-687

**Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Epplen JT (1999).** Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation of >3,000 cases. *Fetal Diagn Ther.* 14: 193-197

**Eichler EE, Lu F, Shen Y, Antonacci R, Jurecic V, Doggett NA, Moyzis RK, Baldini A, Gibbs RA, Nelson DL (1996).** Duplication of a gene-rich cluster between 16p11.1 and Xq28: a novel pericentromeric-directed mechanism for paralogous genome evolution. *Hum Mol Genet.* 5: 899-912

- Eichler EE, Budarf ML, Rocchi M, Deaven LL, Doggett NA, Baldini A, Nelson DL, Mohrenweiser HW (1997).** Interchromosomal duplications of the adrenoleukodystrophy locus: a phenomenon of pericentromeric plasticity. *Hum Mol Genet.* 6: 991-1002
- Eliez S, Morris MA, Dahoun-Hadorn S, DeLozier-Blanchet CD, Gos A, Sizonenko P, Antonarakis SE (1997).** Familial translocation t(Y;15)(q12;p11) and de novo deletion of the Prader-Willi syndrome (PWS) critical region on 15q11-q13. *Am J Med Genet.* 70: 222-228
- Ellison JR, Barr HR (1972).** Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. Late replication and high A: T content in *Samoaia leonensis*. *Chromosoma* 36: 375-390
- Ferguson JA, Boles TC, Adams CP, Walt DR (1996).** A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression. *Nat Biotechnol.* 14: 1681-1684
- Ferguson-Smith MA, Yates JR (1984).** Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses. *Prenat Diagn.* 4 Spec No: 5-44
- Flemming W (1880).** Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. *Arch. Mikr. Anat.* 18: 151-259
- Flint J, Horsley S, Regan R, Kearney L, Knight S, Kvaloy K, Brown WRA and Ning Y, Roschke A, Smith ACM, Macha M, Precht K, Riethmann H, Ledbetter DH (1996).** A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nature Genetics* 14: 86-89
- Ford CE, Miller OJ, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH (1959).** A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome). *Lancet* 1: 711-713
- Fox HS, Martin GR, Lyon MF, Hermann B, Frischauf AM, Lehrach H, Silver LM (1985).** Molecular probes define different regions of the mouse t complex. *Cell* 40: 63-69
- Froland A, Holst G, Terslev E (1963).** Multiple Anomalies associated with an extra small autosome. *Cytogenetics* 85: 99-106
- Fryns JP, Kleckowska A, Londers L, van den Berghe H (1985).** Unusual chromosome 9 polymorphism and reproductive failure. *Ann Genet.* 28: 49-51
- Fukada Y, Yasumizu T, Amemiya A, Kohno K, Takizawa M, Hoshi K (1999).** Prenatal confirmation of the translocation between chromosome 15 and Y-chromosome by fluorescence in situ hybridization. *Tohoku J Exp Med.* 187: 285-289
- Gardner RJM, Sutherland GR (1996).** Chromosome abnormalities and genetic counselling. In : *Oxford monographs on medical genetics* 29. New York, and Oxford: *Oxford University press* : 139-158
- Garrick D, Fiering S, Martin DI, Whitelaw E (1998).** Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet.* 18: 56-59
- Gebhart E, Neubauer S, Schmitt G, Birkenhake S, Dunst J (1996).** Use of a three-color chromosome *in situ* suppression technique for the detection of past radiation exposure. *Radiat Res.* 145: 47-52
- Giardino D, Finelli P, Caufin D, Gottardi G, Lo Vasco R, Turolla L, Larizza L (2002).** Pure 6p22-pter trisomic patient: refined FISH characterization and genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet.* 108: 36-40
- Giraud F, Mattei JF, Mattei MG, Bernard R (1975).** Partial trisomy 11q and familial translocation 11-22 (author's transl). *Humangenetik* 28: 343-347
- Gisselsson D, Hoglund M, Mertens F, Johansson B, Dal Cin P, Van den Berghe H, Earnshaw WC, Mitelman F, Mandahl N (1999).** The structure and dynamics of ring chromosomes in human neoplastic and non-neoplastic cells. *Hum Genet* 104: 315-325



- Haab, O (1879).** *Albrecht v Graefes Arch. Ophthalmol.* 24: 257
- Hamerton JL (1975).** Standardization in human cytogenetics. *Cytogenet Cell Genet.* 15: 361-362
- Hansmann I (1976).** Structural variability of human chromosome 9 in relation to its evolution. *Hum Genet.* 31: 247-262
- Hardas BD, Zhang J, Trent JM, Elder JT (1994).** Direct evidence for homologous sequences on the paracentric regions of human chromosome 1. *Genomics.* 21: 359-363
- Harper JC, Wells D (1999).** Recent advances and future developments in PGD. *Prenat Diagn.* 13: 1193-1199
- Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi DK, Groner Y, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blechschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Schillhabel M, Schudy A, Zimmermann W, Rosenthal A, Kudoh J, Schibuya K, Kawasaki K, Asakawa S, Shintani A, Sasaki T, Nagamine K, Mitsuyama S, Antonarakis SE, Minoshima S, Shimizu N, Nordsiek G, Hornischer K, Brant P, Scharfe M, Schon O, Desario A, Reichelt J, Kauer G, Blocker H, Ramser J, Beck A, Klages S, Hennig S, Riesselmann L, Dagand E, Haaf T, Wehrmeyer S, Borzym K, Gardiner K, Nizetic D, Francis F, Lehrach H, Reinhardt R, Yaspo ML; Chromosome 21 mapping and sequencing consortium (2000).** The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405: 311-319
- Henegariu O, Vance GH, Heiber D, Pera M, Heerema NA (1998).** Triple-color FISH analysis of 12p amplification in testicular germ-cell tumors using 12p band-specific probes. *J Molec Med.* 76: 648-655
- Henegariu O, Bray-Ward P, Artan S, Vance GH, Qumsyieh M, Ward DC (2001).** Small marker chromosome identification in metaphase and interphase using centromeric multiplex FISH (CM-FISH). *Lab invest.* 81: 475-481
- Henikoff S (1990).** Ordered deletions for DNA sequencing and in vitro mutagenesis by polymerase extension and exonuclease III gapping of circular templates. *Nucleic Acids Res.* 18: 2961-2966
- Hliscs R, Mühlig P, Claussen U (1997).** The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 76: 167-171
- Hook EB, Cross PK (1987).** Extra structurally abnormal chromosomes (ESAC) detected at amniocentesis: frequency in approximately 75,000 prenatal cytogenetic diagnoses and associations with maternal and paternal age. *Am J Hum Genet.* 40: 83-101
- Hopman AH, Wiegant J, Tesser GI, Van Duijn P (1986).** A non-radioactive in situ hybridization method based on mercurated nucleic acid probes and sulfhydryl-hapten ligands. *Nucleic Acids Res.* 14: 6471-6488
- Horvath JE, Schwartz S, Eichler EE (2000).** The mosaic structure of human pericentromeric DNA: a strategy for characterizing complex regions of the human genome. *Genome Res.* 10: 839-852
- Horvath JE, Bailey JA, Locke DP, Eichler EE (2001).** Lessons from the human genome: transitions between euchromatin and heterochromatin. *Hum Molec Genet.* 10: 2215-2223
- Howell WM, Denton TE, Diamond JR (1975).** Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia* 31: 260-262
- Howell WM, Black DA (1980).** Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015
- Huang Q, Schantz SP, Rao PH, Mo J, McCormick SA, Chaganti RS (2000).** Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors. *Genes Chromos Cancer.* 28: 395-403

- Ilbery PL, Lee CW, Winn SM (1961).** Incomplete trisomy in a mongoloid child exhibiting minimal stigmata. *Med J Aust.* 48: 182-184
- Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ (1994).** A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet.* 6: 84-89
- ISCN 1995.** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. **Mitelman, F (1995).** Karger, Basel
- Islam MQ, Kopf I, Levan A, Granberg S, Friberg LG, Levan G (1993).** Cytogenetic findings in 111 ovarian cancer patients: therapy-related chromosome aberrations and heterochromatic variants. *Cancer Genet Cytogenet.* 65: 35-46
- Jackson MS, Rocchi M, Thompson G, Hearn T, Crosier M, Guy J, Kirk D, Mulligan L, Ricco A, Piccininni S, Marzella R, Viggiano L, Archidiacono N (1999).** Sequences flanking the centromere of human chromosome 10 are a complex patchwork of arm-specific sequences, stable duplications and unstable sequences with homologies to telomeric and other centromeric locations. *Hum Mol Genet.* 8: 205-15
- Jacobs PA, Melville M, Ratcliffe S, Keay AJ, Syme J (1974).** A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Ann Hum Genet.* 37: 359-76
- Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD (2000).** Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human disorders. *Genome Res.* 19: 597-610
- Kakazu N, Bar-Am I, Hada S, Ago H, Abe T (2003).** A new chromosome banding technique, spectral color banding (SCAN), for full characterization of chromosomal abnormalities. *Genes Chromos Cancer.* 37: 412-416
- Kaiser R, Weber J, Grzeschik KH, Edstrom JE, Driesel A, Zengerling S, Buchwald M, Tsui LC, Olek K (1987).** Microdissection and microcloning of the long arm of human chromosome 7. *Mol Biol Rep.* 12: 3-6
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman FM, Pinkel D (1992).** Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994).** Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromos Cancer.* 10: 231-243
- Karpen GH, Allshire RC (1997).** The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet.* 13: 489-96
- Kessel E, Pfeiffer RA (1977).** 47,XY,+der(11;22)(q23;q12) following balanced translocation t(11;22)(q23;q12)mat. *Hum. Genet* 37: 111-116
- Knight SJ, Flint J (2000).** Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet.* 6: 401-409
- Koch J (2000).** Neocentromeres and alpha satellite: a proposed structural code for functional human centromere. *Hum Mol Genet.* 9: 149-154
- Kosztolanyi G (1987).** Does "ring syndrome" exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet.* 75: 174-179
- Kotzot D (1999).** Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. *Am J Med Genet.* 82: 265-274
- Kotzot D (2001).** Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *J Med Genet.* 38: 497-507

**Kotzot D (2002).** Supernumerary marker chromosomes (SMC) and uniparental disomy (UPD): coincidence or consequence?. *J Med Genet.* 39: 775-778

**Kuhl H, Rottger S, Heilbronner H, Enders H, Schempp W (2001).** Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases with satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromos Res.* 9: 215-222

**Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P, Roe BA, Emanuel BS, Budarf ML (2000).** Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). *Hum Mol Genet.* 9: 1665-1670

**Langer PR, Waldrop AA, Ward DC (1981).** Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78: 6633-6637

**Langer S, Fauth C, Rocchi M, Murken J, Speicher MR (2001).** AcroM fluorescent in situ hybridisation analyses of marker chromosomes. *Hum Genet.* 109: 152-158

**Larramendy ML, El-Rifai W, Knuutila S (1998).** Comparison of fluorescein isothiocyanate- and Texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. *Cytometry* 31: 174-179

**Le Baccon P, Leroux D, Dascalescu C, Duley S, Marais D, Esmenjaud E, Sotto JJ, Callanan M (2001).** Novel Evidence of a Role for Chromosome 1 Pericentric Heterochromatin in the Pathogenesis of B-cell Lymphoma and Multiple Myeloma. *Genes Chromos Cancer.* 32: 250-264

**Ledbetter DH, Engel E (1995).** Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum Mol Genet.* 4 Spec No: 1757-1764

**Lehrer H, Weise A, Michel S, Starke H, Mrasek K, Heller A, Kuechler A, Claussen U, Liehr T (2004).** GTG-dark bands split into dark and light sub-bands as demonstrated by multicolor banding (MCB). *Cytogenet Genome Res.* *In press*

**Lejeune J (1959).** Le Mongoloisme: Premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann Genet Sem Hop.* 1: 41-49

**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

**Lengauer C, Green ED, Cremer T (1992).** Fluorescence *in situ* hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics* 13: 826-828

**Lengauer C, Speicher MR, Popp S, Jauch A, Taniwaki M, Nagaraja R, Riethman HC, Donis-Keller H, D'Urso M, Schlessinger D, Cremer T (1993).** Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence *in situ* hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum Mol Genet.* 2: 505-512

**Levy B, Papenhausen P, Tepperberg J, Dunn T, Fallet S, Magid M, Kardon N, Hirschhorn K, Warburton P (2000).** Prenatal molecular cytogenetic diagnosis of partial tetrasomy 10p due to neocentromere formation in an inversion duplication analphoid marker chromosome. *Cytogenet Cell Genet.* 91: 165-170

**Li MM, Howard-Peebles PN, Killos LD, Fallon L, Listgarten E, Stanley WS (2000).** Characterization and clinical implications of marker chromosomes identified at prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 20: 138-143

**Lichter P, Tang CJ, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC (1991).** High-resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridisation with cosmid clones. *Science* 247: 64-69

- 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 using recombinant DNA libraries. *Hum Genet.* 80: 224-234
- Liehr T, Pfeiffer RA, Trautmann U (1992).** Typical and partial cat eye syndrome: identification of the marker chromosome by FISH. *Clin Genet.* 2: 91-96
- Liehr T, Park O, Feuerstein BG, Gebhart E, Rautenstrauss B (1997).** The peripheral myelin protein 22 kDa (PMP22) gene is amplified in cell lines derived from glioma and osteogenic sarcoma: a new candidate for an oncogene?. *Int Oncol.* 10: 915-919
- Liehr T, Pfeiffer RA, Trautmann U, Gebhart E (1998).** Centromeric alphoid DNA heteromorphism of chromosome 22 as revealed by FISH-technique. *Clin Genet.* 53: 231-232
- Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U (2002a).** Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med.* 9: 335-339
- Liehr T, Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Weier H-UG, Claussen U (2002b).** Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res.* 97: 43-50
- Liehr T, Nietzel A, Starke H, Heller A, Weise A, Mrasek K, Claussen U (2002c).** Characterization of small human marker chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH) and high resolution multicolor banding (MCB). *European Cytogeneticists Assoziation Newsletter* 10: 4-8
- Liehr T, Ziegler M, Starke H, Heller A, Kuechler A, Kittner G, Beensen V, Seidel J, Häbler H, Müsebeck J, Claussen U. (2003).** Conspicuous GTG-banding results of the centromere-near region can be caused by alphoid DNA heteromorphism. *Clin Genet.* 64: 166-167
- Liehr T, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, von Eggeling F, Claussen U, Starke H (2004).** Characterization of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in human. *Current Genomics* 5: 279-286
- Chicago Conference (1966).** London Conference on the Normal Human Karyotype (1963). *Cytogenetics* 2: 264-268 (reprinted in Chicago Conference (1966): 18-19)
- Lüdecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B (1990).** Construction and characterization of band-specific DNA libraries. *Hum Genet.* 84: 512-516
- Luke S, Verma RS (1993).** Genetic consequences of "euchromatic" band within 9qh region. *Am J Med Genet.* 45: 107
- Macera MJ, Verma RS, Conte RA, Bialer MG, Klein VR (1995).** Mechanisms of the origin of a G-positive band within the secondary constriction region of human chromosome 9. *Cytogenet Cell Genet.* 69: 235-239
- Mackie-Ogilvie C, Harrison RH, Horsley SW, Hodgson SV, Kearney L (2001).** A mitotically stable marker chromosome negative for whole chromosome libraries, centromere probes and chromosome specific telomere regions: a novel class of supernumerary marker chromosome? *Cytogenet Cell Genet.* 92: 69-73
- Magenis RE, Overton KM, Chamberlin J, Brady T, Lovrien E (1977).** Parental origin of the extra chromosome in Down's syndrome. *Hum Genet.* 37: 7-16
- Maresco DL, Chang E, Theil KS, Francke U, Anderson CL (1996).** The three genes of the human FCGR1 gene family encoding Fc gamma RI flank the centromere of chromosome 1 at 1p12 and 1q21. *Cytogenet Cell Genet.* 73: 157-163
- Martinson T, Weith A, Cziepluch C, Schwab M (1989).** Chromosome 1 deletions in human Neuroblastomas: generation and fine mapping of microclones from distal 1p region. *Genes Chromos Cancer.* 1: 67-78

- Maratou K, Siddique Y, Kessling AM, Davies GE (1999).** Novel methodology for the detection of chromosome 21-specific alpha-satellite DNA sequences. *Genomics* 57: 429-432
- Mattei JF, Philip N, Mattei MG, Giraud F (1985).** Small supernumerary chromosomes. *J Genet Hum.* 33: 389-396
- Milot E, Strouboulis J, Trimborn T, Wijgerde M, de Boer E, Langeveld A, Tan-Un K, Vergeer W, Yannoutsos N, Grosveld F, Fraser P (1996).** Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 87: 105-114
- Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J, Tan EM (1980).** Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 77: 1627-1631
- Mrasek K, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, Starke H, Rocchi M, Claussen U, Liehr T (2001).** Reconstruction of the female *Gorilla gorilla* karyotype using 25-color FISH and multicolour banding (MCB). *Cytogenet Cell Genet.* 93: 242-248
- Müller S, Rocchi M, Ferguson-Smith MA, Wienberg J (1997).** Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet.* 100: 271-278
- Müller S, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J (1998).** Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* 33: 445-452
- Müller S, Wienberg J (2000).** Advances in the development of chromosome bar codes: Intergration of M-FISH and Rx-FISH technology. *Med Genetik* 12: 474-477
- Müller-Navia J, Nebel A, Schleiermacher E (1995).** Complete and precise characterization of marker chromosomes by application of microdissection in prenatal diagnosis. *Hum Genet.* 96: 661-667
- Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK (1989).** Three-color fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry.* 10: 20-27
- Nielsen J, Wohler M (1991).** Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet.* 87: 81-83
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T (2001).** A new multicolour-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolour-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet.* 108: 199-204
- Nothwang HG, Rensing C, Kubler M, Denich D, Brandl B, Stubanus M, Haaf T, Kurnit D, Hildebrandt F (1998).** Identification of a novel Ran binding protein 2 related gene (RANBP2L1) and detection of a gene cluster on human chromosome 2q11-q12. *Genomic.* 47: 383-392
- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, Navarro J, Benet J (2003).** Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet.* 11: 879-883
- Park JP, Wojiski SA, Spellman RA, Rhodes CH, Mohandas TK (1998).** Human chromosome 9 homologies: implications for chromosome9 heteromorphisms. *Cytogenet Cell Genet.* 82: 192-194
- Pallister PD, Meisner LF, Elejalde BR, Francke U, Herrmann J, Spranger J, Tiddy W, Inhorn SL, Opitz JM (1977).** The Pallister mosaic syndrome. *Birth Defects Orig. Art. Ser.* XIII: 103-110
- Peltomaki P, Knuutila S, Ritvanen A, Kaitila I, de la Chapelle A (1987).** Pallister-Killian syndrome: cytogenetic and molecular studies. *Clin Genet.* 31: 399-405
- Pfeiffer RA, Scharfenberg W, Buchner T, Stolecke H (1968).** Ring chromosomes and centric fragments in Turner's syndrome. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 28: 11-26

- 
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986).** Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitive, fluorescence hybridization. *Proc Nat Acad Sci.* 83: 2934-2938
- Plattner R, Heerema NA, Howard-Peebles PN, Miles JH, Soukup S, Palmer CG (1993).** Clinical findings in patients with marker chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet.* 91: 589-598
- Prosser J, Frommer M, Paul C, Vincent PC (1986).** Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J Mol Biol.* 187: 145-155
- Pschyrembel (1996).** Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter. Berlin, New York
- Ramesh KH, Verma RS. (1996).** Breakpoints in alpha, beta, and satellite III DNA sequences of chromosome 9 result in a variety of pericentric inversions. *J Med Genet.* 33: 395-398
- Rauch A, Pfeiffer RA, Trautmann U, Liehr T, Rott HD, Ulmer R (1992).** A study of ten small supernumerary (marker) chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Clin Genet.* 42: 84-90
- Ried T, Baldini A, Rand TC, Ward DC (1992).** Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 1388-1392
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977).** Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol.* 113: 237-251
- Robinson WP, Lorda-Sanchez I, Malcolm S, Langlois S, Schuffenhauer S, Knoblauch H, Horsthemke B, Schinzel AA (1993).** Increased parental ages and uniparental disomy 15: a paternal age effect? *Eur J Hum Genet.* 1: 280-286
- Röhme D, Fox H, Hermann B, Frischauf AM, Edström JE, Mains P, Silver LM, Lehrach H (1984).** Molecular clones of the mouse t complex derived from microdissected metaphase chromosomes. *Cell* 36: 783-788
- Röthlisberger B, Zerova TE, Kotzot D, Buzhievskaya TI, Balmer D, Schinzel A (2001).** Supernumerary marker chromosome (1) of paternal origin and maternal uniparental disomy 1 in a developmental delayed child. *J Med Genet.* 38: 885-888
- Rosenberg H, Singer M, Rosenberg M (1978).** Highly reiterated sequences of SIMIANSIMIANSIMIANSIMIANSIMIAN. *Science* 200: 394-402
- Rubtsov N, Senger G, Kuzcera H, Neumann A, Kelbova C, Junker K, Beensen V, Claussen U (1996).** Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection, DNA amplification and reverse painting. *Hum Genet.* 97: 705-709
- Russell A (1954).** A syndrome of intra-uterine-dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionate short arms, and other anomalies (5 examples). *Proc. Roy. Soc. Med.* 47: 1040-1044
- Ruzicka V (1891).** Zur geschichte und feineren structur der nucleolen centraler nervenzellen. *Anat. Anz.* 16: 557-563
- Saitoh H, Tomkiel J, Cooke CA, Ratrie H 3rd, Maurer M, Rothfield NF, Earnshaw WC (1992).** CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell* 70: 115-125
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis (1989).** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Samonte RV, Conte RA, Ramesh KH, Verma RS (1996).** Molecular cytogenetic characterization of breakpoints involving pericentric inversions of human chromosome 9. *Hum Genet.* 98: 576-80

- Sasagawa I, Ishigooka M, Kubota Y, Tomaru M, Hashimoto T, Nakada T (1998).** Pericentric inversion of chromosome 9 in a infertile men. *Int Urol Nephrol*: 30: 203-207
- Sawyer JR, Swanson CM, Wheeler G, Cunniff C (1995).** Chromosome instability in ICF syndrome: formation of micronuclei from multibranched chromosome 1 demonstrating by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet*. 56: 203-209
- Scalenghe F, Turco E, Edstrom JE, Pirrotta V, Melli M (1981).** Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma* 82: 205-216
- Schachenmann G, Schmid W, Fraccarro M, Mannini A, Tiepolo L, Perona GP, Sartori E (1965).** Chromosomes in coloboma and anal atresia. *Lancet* 19: 290
- Schröck E, Du Manori S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soeksen D, Garini Y, Ried T (1996).** Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science* 273: 494-496
- Seabright M (1971).** A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 30: 971-972
- Senger G, Lüdecke HJ, Horsthemke B, Claussen U (1990).** Microdissection of banded human chromosomes. *Hum Genet*. 84: 507-11
- Senger G, Chudoba I, Plesch A (1998).** Multicolor-FISH –the identification of chromosome aberrations by 24 colors. *Bioforum*. 9: 499-503
- Senger G, Weimer J, Claussen U, Chudoba I (1999).** Microdissection and reverse chromosome painting ; in Wegner RD(ed): *Diagnostic Cytogenetics*; Springer Lab Manual. Heidelberg : 356-375
- Shaikh TH, Budarf ML, Celle L, Zackai EH, Emanuel BS (1999).** Clustered 11q23 and 22q11 Breakpoints and 3:1 Meiotic Malsegregation in Multiple Unrelated t(11;22) Families. *Am J Hum Genet*. 65: 1595-1607
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M (1992).** Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 8794-8797
- Silver HK, Kiyasu W, George J, Deamer WC (1953).** Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatrics* 12: 368-376
- Speevak MD, Smart C, Unwin L, Bell M, Farrell SA (2003).** Molecular characterization of an inherited ring (19) demonstrating ring opening. *Am J Med Genet*. 121A: 141-5
- Speicher MR, Jauch A, Parr A, Becher R (1993).** Delineation of translocation t(15; 17) in acute promyelocytic leukemia by chromosomal in situ suppression hybridization. *Leuk Res*. 4: 359-364
- Speicher MR, Ballard GS, Ward DC (1996).** Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet*. 12: 368-375
- Speicher MR, Petersen S, Uhrig S, Jentsch I, Fauth C, Eils R, Petersen I (2000).** Analysis of chromosomal alterations in non-small cell lung cancer by multiplex-FISH, comparative genomic hybridization, and multicolor bar coding. *Lab Invest*. 80: 1031-1041
- Spiegel M, Hickmann G, Senger G, Kozlowski P, Bartsch O (2003).** Two new cases of analphoid marker chromosomes. *Am J Med Genet*. 116A: 284-289
- Spinelli G (2003).** Heterochromatin and Complexity: A Theoretical Approach. *Nonlinear Dynamics, Psychol and Life Sciences* 7: 329-361
- Stankiewicz P, Bocian E, Jakubow-Durska K, Obersztyn E, Lato E, Starke H, Mroczek K, Mazurczak T (2000).** Identification of supernumerary marker chromosomes derived from chromosomes 5, 6, 19 and 20 using FISH. *J Med Genet*. 37: 114-120

- Starke H, Schreyer I, Kähler C, Fiedler W, Beensen V, Heller A, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (1999).** Molecular cytogenetic characterization of a prenatally detected supernumerary minute marker chromosome 8. *Prenat Diagn.* 19: 1169-1174
- Starke H, Senger G, Kossakiewicz M, Tittelbach H, Rau D, Rubtsov N, Trifonov V, Heller A, Hartmann I, Claussen U, Liehr T (2001a).** Maternal insertion of 18q11.2→q12.2 in 18p11.3 of the same chromosome analysed by microdissection and multicolour banding (MCB). *Prenat Diag* 21: 1049-1052
- Starke H, Raida M, Trifonov V, Clement JH, Loncarevic IF, Heller A, Bleck C, Nietzel A, Rubtsov N, Claussen U, Liehr T (2001b).** Molecular cytogenetic characterization of an acquired supernumerary minute marker chromosome as sole abnormality in a case clinically diagnosed as Philadelphia negative chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 113: 435-438
- Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, Behrend C, Sandig KR, Kelbova C, Senger G, Albrecht B, Hansmann I, Heller A, Claussen U, Liehr T (2002).** Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet* 10: 790-800
- Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Kuechler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T (2003a).** Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet.* 114: 51-67
- Starke H, Mitulla B, Nietzel A, Heller A, Beensen V, Grosswendt G, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T (2003b).** First patient with trisomy 21 accompanied by an additional der(4):(p11 --> q11:) plus partial uniparental disomy 4p15-16. *Am J Med Genet.* 116A: 26-30
- Steinhaeuser U, Starke H, Nietzel A, Lindenau J, Ullmann P, Claussen U, Liehr T (2002).** Suspension S-FISH a new technique for interphase. *J Histochem Cytochem.* 50: 1697-1698
- Sternberg NL (1992).** Cloning high molecular weight DNA fragments by the bacteriophage P1 system. *Trends Genet.* 8: 11-6
- Stetten G, Sroka B, Corson VL, Boehm CD (1984).** Prenatal detection of an unstable ring 21 chromosome. *Hum Genet.* 68: 310-313
- Strachan T, Read AP (1996).** *Molekulare Humangenetik.* Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag
- Sullivan BA, Schwartz S (1995).** Identification of centromeric antigens in dicentric Robertsonian translocations: CENP-C and CENP-E are necessary components of functional centromeres. *Hum Mol Genet.* 4: 2189-2197
- Sullivan BA, Willard HF (1998).** Stable dicentric X chromosomes with two functional centromeres. *Nat Genet.* 20: 227-228
- Sullivan BA, Blower MD, Karpen GH (2001).** Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nat Rev Genet.* 2: 584-596
- Sullivan KF, Glass CA (1991).** CENP-B is a highly conserved mammalian centromere protein with homology to the helix-loop-helix family of proteins. *Chromosoma* 100: 360-370
- Sullivan KF, Hechenberger M, Masri K (1994).** Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol.* 127: 581-592
- Sumner AT (1972).** A simple technique for demonstrating centromeric hetero-chromatin. *Exp Cell Res.* 75: 304-306
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, Navarro J, Benet J, Martin RH (2004).** Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet.* 74: 521-531



**Sutton WS (1904).** The chromosomes inheritance. *Biol Bull.* 4: 231-248

**Tagarro I, Fernandez-Peralta AM, Gonzalez-Aguilera JJ (1994).** Chromosomal localization of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes. *Hum Genet.* 93: 383-388

**McTaggart KE, Budarf ML, Driscoll DA, Emanuel BS, Ferreira P, McDermid HE (1998).** Cat eye syndrome chromosome breakpoint clustering: identification of two intervals also associated with 22q11 deletion syndrome breakpoints. *Cytogenet Cell Genet.* 81: 222-228

**Tanke HJ, De Haas RR, Sagner G, Ganzer M, van Gijlswijk RP (1998).** Use of platinum coproporphyrin and delayed luminescence imaging to extend the number of targets FISH karyotyping. *Cytometry* 33: 453-459

**Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992).** Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 3: 718-725

**Tijo JH, Levan A (1956).** The chromosomal number of man. *Hereditas* 42: 1-6

**Tönnies H, Stumm M, Wegner RD, Chudoba I, Kalscheuer V, Neitzel H (2001).** Comparative genomic hybridization based strategy for the analysis of different chromosome imbalances detected in conventional cytogenetic diagnostics. *Cytogenet Cell Genet.* 93: 188-194

**Trifonov V, Seidel J, Starke H, Martina P, Beensen V, Ziegler M, Hartmann I, Heller A, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (2003).** Enlarged chromosome 13 p-arm hiding a cryptic partial trisomy 6p22.2-pter. *Prenat Diagn.* 23: 427-430

**Tunnacliffe A, Liu L, Moore JK, Leversha MA, Jackson MS, Papi L, Ferguson-Smith MA, Thiesen HJ, Ponder BA (1993).** Duplicated KOX zinc finger gene clusters flank the centromere of human chromosome 10: evidence for a pericentric inversion during primate evolution. *Nucleic Acids Res.* 21: 1409-1417

**Tyler-Smith C, Willard HF (1993).** Mammalian chromosome structure. *Curr Opin Genet Dev.* 3: 390-397

**Verma RS (1988).** Heterochromatin: molecular and structural aspects. *Cambridge University press*; New York: 276-299

**Verma RS, Babu A (1994).** Human chromosomes: Principles and techniques. *2nd ed. of McGraw-Hill, Inc.*

**Verma RS (1999).** A reply: pericentric inversion of chromosome 9qh are 'real' but the mechanisms of their origin are highly complex. *Hum Genet.* 105: 183-184

**Vermeesch JR, Duhamel H, Petit P, Falzetti D, Fryns JP, Marynen P (1999).** Multiple small accessory marker chromosomes from different centromeric origin in a moderately mentally retarded male. *Hum Genet.* 105: 611-618

**Vermeesch JR, Baten E, Fryns JP, Devriendt K (2002).** Ring syndrome caused by ring chromosome 7 without loss of subtelomeric sequences. *Clin Genet.* 62: 415-417

**Vermeesch JR, Duhamel H, Raeymaekers P, Van Zand K, Verhasselt P, Fryns JP, Marynen P (2003).** A physical map of chromosome 12 centromere. *Cytogenet Genome Res.* 103: 63-73

**Viersbach R, Engels H, Gamerdinger U, Hansmann M (1998).** Delineation of supernumerary marker chromosomes in 38 patients. *Am J Med Genet.* 76: 351-358

**Von Eggeling F, Hoppe C, Bartz U, Starke H, Houge G, Claussen U, Ernst G, Kotzot D, Liehr T (2002).** Maternal uniparental disomy 12 in a healthy girl with a 47,XX,+der(12):(p11→q11)/46,XX karyotype. *J Med Genet.* 39: 519-521

**Waldeyer W (1888).** Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikrosk Anat* 32: 1-22

**Wandall A, Tranebjaerg L, Tommerup N (1998).** A neocentromere on human chromosome 3 without detectable alpha-satellite DNA forms morphologically normal kinetochores. *Chromosoma* 107: 359-365

**Warburton D (1984).** Outcome of cases of de novo structural rearrangements diagnosed at amniocentesis. *Prenat Diagn.* 4 Spec No: 69-80

**Warburton D (1991).** De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 49: 995-1013

**Warburton PE, Cooke CA, Bourassa S, Vafa O, Sullivan BA, Stetten G, Gimelli G, Warburton D, Tyler-Smith C, Sullivan KF, Poirier GG, Earnshaw WC (1997).** Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol.* 7: 901-904

**Weier H-UG, O'Brien B, Duell TH, Wong MG, Kuo W-L, Siperstein AE, Duh Q-Y, Clark OH (1996).** High-resolution , multi-locu karyotype analysis with "Chromosomal Rainbows" (CR): a novel technique applied to rapid characterization of rearranged chromosomes in primary cultures and cell lines from thyroid cancers. *Am J Hum Genet.* 59 (Suppl): A50

**Weisblum B, De Haseth PL (1972).** Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylaterich regions in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69: 629-632

**Weise A, Starke H, Heller A, Tonnies H, Volleth M, Stumm M, Gabriele S, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (2002).** Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterised by high resolution multicolour banding and region specific FISH probes. *J Med Genet.* 39: 434-439

**Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T (2003).** Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet Genome Res.* 103: 34-39

**Weise A, Starke H, Mrasek K, Hameister H, Claussen U, Liehr T (2004).** New insights into evolution of chromosome 1. *Cytogenet Genome Res.* *In press*

**Werner-Favre C, Beris P, Piguët D, Engel E (1986).** Ring chromosomes and hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet.* 23: 265-267

**Wevrick R, Willard VP, Willard HF (1992).** Structure of DNA near long tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromere of human chromosome 7. *Genomics* : 912-923

**Williams BC, Murphy TD, Goldberg ML, Karpen GH (1998).** Neocentromere activity of structurally acentric mini-chromosomes in *Drosophila*. *Nat Genet.* 18: 30-37

**Wyandt HE, Tonk VS (2004).** Atlas of Human Chromosome Heteromorphisms. *Kluwer Academic Publishers*; Dordrecht, Boston, London

**Yoshida A, Nakahori Y, Kuroki Y, Miura K, Shirai M (1997).** An azoospermic male with an unbalanced autosomal-Y-translocation. *Jpn J Hum Genet.* 42: 451-455

**Yurov YB, Soloviev IV, Vorsanova SG, Marcais B, Roizes G, Lewis R (1996).** High resolution multicolor fluorescence in situ hybridization using cyanine and fluorescein dyes: rapid chromosome identification by directly fluorescently labeled alphoid DNA probes. *Hum Genet.* 97: 390-398

---

**Verwendete Datenbanken:**

- Universität Bari: <http://www.biologia.uniba.it>
- *BAC/PACResources Oakland*: <http://www.chori.org/BACPAC>
- Sanger Center: <http://www.sanger.ac.uk>
- Deutsches Ressourcenzentrum <http://www.rzpd.de/>
- OMIM/PubMed/ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*:  
<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/>
- Genatlas [http://bisance.citi2.fr/GENATLAS/menu\\_an.html](http://bisance.citi2.fr/GENATLAS/menu_an.html)
- *CEPH YAC library* [http://www.cephb.fr/bio/ceph\\_yac.html](http://www.cephb.fr/bio/ceph_yac.html)
- *new map of human genome* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap98/>
- *SMC homepage* [http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL\\_ZYTO/sSMC.htm](http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm)

## VII. Abkürzungsverzeichnis

|                 |  |
|-----------------|--|
| Abb.            | Abbildung  |
| acro-cenM-FISH  | Sondenset bestehend aus den Zentromersonden und Sonden der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen |
| <i>A. dest.</i> | destilliertes, steriles und pyrogenfreies Wasser   |
| BAC             | <i>bacterial artificial chromosome</i>   |
| Bio/Biotin      | Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Biotin-dUTP)   |
| bp              | Basenpaare   |
| CBG             | C-Bänderung  |
| cen/cep         | Zentromer  |
| cenM-FISH       | Sondenset bestehend aus allen menschlichen Zentromersonden   |
| CES             | Cat-eye-Syndrom  |
| CGH             | <i>comparative genomic hybridisation</i>   |
| Chr.            | Chromosom  |
| CML             | chronisch myeloische Leukämie  |
| Cos             | Cosmid-(Sonde)   |
| CV              | Chorionzotten-Bioptat  |
| Cy5             | Cyanin 5   |
| Cy5.5           | Cyanin 5.5   |
| Dig/Digoxigenin | Digoxigenin-11-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Digoxigenein-dUTP)                                      |
| DAPI            | 4',6'-Diamidino-2-phenylindol  |
| DEAC            | Diethylaminocumarin-5-dUTP (DEAC)  |
| der             | Derivatvchromosom  |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure   |
| dATP            | Desoxy-Adenosin-triphosphat  |
| dCTP            | Desoxy-Cytosin-triphosphat   |
| dGTP            | Desoxy-Guanosin-triphosphat  |
| dTTP            | Desoxy-Thymidin-triphosphat  |
| dUTP            | Desoxy-Uridin-triphosphat  |
| dNTP            | Desoxy-nukleotid-triphosphat   |
| DOP             | degenerierter Oligonukleotid-Primer  |
| DOP-PCR         | PCR unter Verwendung eines DOP Primers   |
| DS              | Hybridisierungspuffer mit Dextransulfat  |
| <i>E. coli</i>  | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA            | Ethylen-diamin-tetra-essigsäure  |
| FISH            | Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung  |
| FITC            | Fluoresceinisothiocyanat   |
| FW              | Fruchtwasser   |
| GTG             | G-Bänderung mittels Trypsin und Giemsa   |
| ICSI            | <i>intracytoplasmatic sperm injection</i>  |
| Kb              | Kilobasen  |
| LCR             | <i>low copy repeat</i>   |
| LSI             | Lokus spezifische Sonde  |
| mat             | maternal (die Mutter betreffend)   |
| Mb              | Megabasen  |
| MCB             | Multicolor-Bänderung   |
| M-FISH          | Multicolor-FISH  |
| Midi            | Mikrosezierungssonde   |
| MPP             | Metapaseplatten  |
| MR              | mentale Retardierung   |
| N               | normal   |
| n.a.            | nicht analysiert   |
| NOR             | <i>nucleolus organizing region</i>   |
| OT              | Objektträger   |

---

|                |  |
|----------------|--|
| P              | phänotypisch auffällig   |
| p              | den kurzen Arm eines Chromosoms betreffend                                   |
| PAC            | Bakteriophagen (P1)-abgeleitetes künstliches Chromosom                       |
| pat            | paternal (den Vater betreffend)  |
| PB/BL          | peripheres Blut  |
| PBS            | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung   |
| <i>pcp</i>     | <i>partial chromosome painting</i> (Teil-Chromosomen-Sonde)                  |
| PCR            | Polymerase-Ketten(chain)-Reaktion  |
| PHA            | Phytohämagglutinin   |
| PKS            | Pallister-Killian-Syndrom  |
| PNA            | <i>peptide nucleic acid</i> (-Sonde)   |
| PWS            | Prader-Willi-Syndrom   |
| q              | den langen Arm eines Chromosoms betreffend                                   |
| r              | Ringchromosom  |
| RT             | Raumtemperatur   |
| Rx-FISH        | <i>cross-species color banding</i>   |
| R110           | Rhodamin110-dUTP (Perkin Elmer)  |
| SDS            | Sodiumdodecylsulfat  |
| SG             | SpectrumGreen-dUTP (Vysis)   |
| SKY            | <i>spectral karyotyping</i>  |
| SMC            | <i>supernumerary marker chromosome</i>                                       |
| SO             | SpectrumOrange-dUTP (Vysis)  |
| SR             | SpectrumRed-dUTP (Vysis)   |
| SSC            | Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat   |
| subcenM-FISH   | Sondenmix unter Verwendung Zentromerhafter BAC Sonden und <i>pcp</i> -Sonden |
| subtel         | Subtelomer   |
| Syndr.         | Syndrom  |
| Tab.           | Tabelle  |
| Taq-Polymerase | thermostabile DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>                    |
| tel            | das Telomer eines Chromosoms betreffend                                      |
| ter            | terminal-distales Ende eines Chromosomenarms betreffend                      |
| TR             | TexasRed-12-dUTP (Molekular Probes)  |
| Tween          | Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat  |
| UFW            | unkultiviertes Fruchtwasser  |
| UPD            | uniparentale Disomie   |
| US             | Ultraschall  |
| UV             | Ultraviolettes Licht   |
| <i>wcp</i>     | <i>whole chromosome painting</i> (Ganzchromosomen-Sonde)                     |
| YAC            | <i>yeast artificial chromosome</i>   |

## VIII. Anhang

**Tabelle 8.1.:**

Sonden, die zur Herstellung des BAC/YAC-MCB Sonden Sets für Chromosom 22 eingesetzt wurden  
Die Signal-Qualitäten der getesteten Sonden wurden wie folgt eingeteilt:

- +++ sehr gute Signale ohne Hintergrundsignale
- ++ gute Signale
- + schwache Signale meist mit starkem Hintergrund

| Klon      | kartiert in           | Signalqualität |
|-----------|-----------------------|----------------|
| 980H7     | 22q11 (und Zentromer) | ++             |
| 949E6     | 22q11.21              | ++             |
| 966A8     | 22q11.21              | +              |
| 374G5     | 22q11.2-12.1          | +++            |
| bK 115F6  | 22q11.2               | +++            |
| bK 154H4  | 22q11.2               | +++            |
| bK 433F6  | 22q11.2               | +++            |
| bK 322B1  | 22q11.2-12.1          | +              |
| bK 221G9  | 22q11.21-12.2         | +              |
| 955E10    | 22q11.22/23           | ++             |
| 35G8      | 22q12.1-12.2          | ++             |
| 969A9     | 22q12.1               | +++            |
| 584H12    | 22q12.2               | ++             |
| 882G4     | 22q13.1/q12           | +              |
| 920C4     | 22q13.1               | ++             |
| 106H11    | 22q13.1               | ++             |
| bK 150C2  | 22q13.1               | ++             |
| 301B10    | 22q13.1-13.2          | +++            |
| bK 229A8  | 22q13.1-13.2          | ++             |
| bK 250D10 | 22q13.1-13.2          | ++             |
| bK 397C4  | 22q13.1-13.2          | +              |
| 924C2     | 22q13.2               | +++            |
| 960C9     | 22q13.2               | ++             |
| 891D12    | 22q13.31              | ++             |
| 226C8     | 22q13.32              | ++             |
| 1171B82   | 22q13.32              | ++             |
| 765F6     | 22q13.33              | +              |
| 899G12    | 22q13.33              | ++             |
| 967F10    | 22q13.33              | ++             |

Mit folgenden Sonden konnte kein ausreichend starkes, klar zuzuordnendes Signal erhalten werden:

| Klon     | kartiert in  |
|----------|--------------|
| 803G9    | 22q11.2      |
| 768B5    | 22q11.2      |
| bK 526G4 | 22q11.2-12.1 |

**Tabelle 8.2.:**

BAC und YAC-Sonden, die zur Herstellung der subcenM-FISH Sonden Sets verwendet wurden  
Die Signal-Qualitäten der getesteten Sonden wurden wie folgt eingeteilt:

- +++ sehr gute Signale ohne Hintergrundsignale  
++ gute Signale  
+ schwache Signale meist mit starkem Hintergrund

| Region  | Lokalisation        | Klon                                | Interne Nummer | Hybridisierungs-Qualität | Kreuz hybridisierung |
|---------|---------------------|-------------------------------------|----------------|--------------------------|----------------------|
| 1p      | 1p12                | bA940J24                            | 940J24         | +                        | 1p36.1               |
| 1q      | 1q21.1              | bA35B4                              | 35B4           | +                        |                      |
| 1q      | 1q21.1              | bA30F17                             |                | ++                       |                      |
| 2p      | 2p11.2              | YAC882D5                            | 882D5          | ++                       |                      |
| 2q      | 2q11.1              | YAC774E9                            | 774E9          | ++                       |                      |
| 2q      | 2q11.1              | YAC826E11                           | 826E11         | ++                       |                      |
| 3p      | 3p12.2              | bA91A15                             | 91A15          | ++                       | 12q                  |
| 3q      | 3q12.2              | bA21116                             | 21116          | +                        |                      |
| 4p      | 4p12                | bA317G22                            | 317G22         | +++                      |                      |
| 4p      | 4p12                | bA100N21                            | 100N21         | ++                       |                      |
| 4q      | 4q12                | bA535C7                             | 535C7          | +(+)                     |                      |
| 5p      | 5p12                | bA301A5                             | 301A5          | +++                      |                      |
| 5q      | 5q11.2              | bA160F8                             | 160F8          | ++                       |                      |
| 6p      | 6p11.2              | bA362K18                            | 362K18         | +                        | 7q32                 |
| 6q      | 6q12                | dj257L16                            | 257L16         | +/-                      |                      |
| 6q      | 6q12                | bA387L5                             | 387L5          | +(+)                     |                      |
| 7p      | 7q11.2              | bA10F11                             | 10F11          | ++                       |                      |
| 7q      | 7q11.21             | bA3N2                               | 3N2            | ++                       |                      |
| 7q      | 7q11.21             | bA144H20                            |                | +++                      |                      |
| 8p      | 8p11.21             | bA503E24                            | 503E24         | ++                       |                      |
| 8q      | 8q11.21             | bA11C20                             | 11C20          | +                        |                      |
| 8q      | 8q11.2              | bA769N21                            |                | ++                       |                      |
| 9p/q    | 9p12/9q13           | bA128P23                            | 128P23         | ++                       |                      |
| 9q      | 9q13                | bA430C15                            | 430C15         | ++                       |                      |
| 10p     | 10p11.21            | bA232C13                            | 232C13         | +                        |                      |
| 10p+10q | 10p11.1,<br>10q11.2 | bA508N22                            | 508N22         | +++                      |                      |
| 10q     | 10q11.2             | bA351D16                            | 351D16         | ++                       |                      |
| 10q     | 10q11.21            | bA178A10                            | 178A10         | ++                       |                      |
| 11p     | 11p11.21            | bA12C11                             | 12C11          | +++                      | 1p22-31              |
| 11q     | 11q12               | bA77M7                              | 77M17          | ++                       |                      |
| 12p     | 12p11.21            | bA517B23                            | 517B23         | +(+)                     | 2p                   |
| 12q     | 12q12               | bA152M7                             | 152M7          | +++                      |                      |
| 12q     | 12q12               | bA490D11                            | 490D11         | +++                      |                      |
| 13q     | 13q12.1-<br>13q12.2 | YAC768a04<br>YAC943 <sup>E</sup> 04 | 3<br>4         | +++<br>+++               |                      |
| 14q     | 14q11.2             | bA203M5                             | 203M5          | +/-                      |                      |
| 14q     | 14q11.2             | bA332N6                             | 332N6          | ++                       | 2p11                 |
| 15q     | 15q11.2             | bA441B20                            | 441B20         | +++                      |                      |
| 15q     | 15q11.2             | bA26F2                              | 26F2           | +++                      |                      |

| Region | Lokalisation | Klon      | Interne Nummer | Hybridisierungs-Qualität | Kreuz hybridisierung |
|--------|--------------|-----------|----------------|--------------------------|----------------------|
| 16p    | 16p11.2      | bA67110   | 67110          | +++                      |                      |
| 16q    | 16q12.1      | bA474B12  | 474B12         | ++                       |                      |
| 17p    | 17p11.2      | bA746M1   | 746M1          | +++                      |                      |
| 17q    | 17q11.2      | bA229K15  | 229K15         | +++                      |                      |
| 18p    | 18p11.21     | bA151D11  | 151D11         | +++                      | 1p22-31              |
| 18q    | 18q11.2      | bA59E12   | 609K12         | ++                       |                      |
| 19p    | 19p13.1      | bA22G10   | 22G10          | ++                       |                      |
| 19q    | 19q13.1      | bA14D17   | 14D17          | +++                      | 6q14?                |
| 20p    | 20p11.2      | bA96L6    | 96L6           | +++                      |                      |
| 20q    | 20q11.2      | bA243J16  | 243J16         | +++                      |                      |
| 21q    | 21q11.2      | 589M2     | 589M2(imb)     | ++ u.                    | alle acros           |
| 21q    | 21q11.2      | bC067E3   | bC067E3        | +(+)                     |                      |
| 22q    | 22q11.2      | bK 115F6* | 115F6          | ++                       |                      |
| 22q    | 22q11.2      | bK 154H4* | 154H4          | ++                       |                      |
| 22q    | 22q11.2      | bK 433F6* | 433F6          | ++                       |                      |
| Xp     | Xp11.2       | bA465B24  | 465B24         | ++                       |                      |
| Xp     | Xp11.2       | bA292J24  | 14O9           | ++                       |                      |
| Xq     | Xq12         | dJ1065K8  | dJ1065K8       | +++                      |                      |
| Yp     | Yp11.2       | bA75F5    | 75F5           | ++                       |                      |
| Yq     | Yq11.2       | bA498H20  | 498H20         | ++                       |                      |



**Tabelle 8.3.:**

Sonden, die für die Herstellung des cenM-FISH Sondenmixes verwendet wurden

| chrom. | probe   | vector     | insert    | release                 |
|--------|---------|------------|-----------|-------------------------|
| 2      | pBS4D   | bluescribe | 1.3kb     | EcoRI+Sall              |
| 3      | pAE0.68 | bluescribe | 0.68kb    | EcoRI                   |
| 4      | p4n1/4  | bluescript | 0.680kb   | XbaI                    |
| 4+9    | pZ4.1   | bluescribe | 1.2kb     | PstI                    |
| 5+1+19 | pZ5.1   | pUC13      | 390+380bp | EcoRI+Sall              |
| 6      | pEDZ6   | bluescript | 0.340     | EcoRI                   |
| 7      | pZ7.5   | pUC13      | 0.68kb    | EcoRI                   |
| 8      | pZ8.4   | bluescribe | 1.2kb     | PstI                    |
| 9      | pMR9A   | bluescribe | 0.34kb    | EcoRI+Sall              |
| 10     | pZ101.3 | b.script   | 2.7kb     | NotI+Sall               |
| 11     | pRB11   | bluescribe | 0.68kb    | EcoRI+Sall              |
| 12     | pBR12   | bluescribe | 0.68kb    | HindIII                 |
| 14+22  | p14.1   | pUC13      | 1.36Kb    | EcoRI+Sall              |
| 15     | pMC15   | bluescript | 3.5kb     | Accl+1site<br>(Eco-Xho) |
| 16     | pZ16A   | pUC13      | 0.68kb    | EcoRI                   |
| 17     | pZ17-14 | pUC19      | 1.020kb   | HindIII                 |
| 18     | 2Xba    | pUC18      | 1.7kb     | XbaI                    |
| 20     | pZ20    | bluescribe | 1.36kb    | XbaI                    |
| 21+13  | pZ21A   | bluescribe | 0.85kb    | EcoRI                   |
| 22     | pI90.22 | bluescribe | 2.0kb     | PstI                    |
| X      | pDMX1   | bluescript | 2.0kb     | PstI                    |
| Y      | pLAY5.5 | bluescript | 5.5kb     | HindIII                 |
| 1q12   | pUC177  | plasmid    |           |                         |

[chrom.= Chromosom; probe= Sonde; vector= Plasmidvektor; insert= Insert; release= Schnittstelle]

**Tabelle 8.4.:**

Mengen-Anteile der Sonden DNA, die für die 5 Stocklösungen zur Markierung mit einem Fluorochrom eingesetzt wurden. (Die Zentromere 5 und 6 werden separat mit SR, Bio und DEAC-dUTP markiert!)

| Zentromer | Farb-kombination | µl DNA<br>→<br>für<br>SG | →<br>für<br>SO | →<br>für<br>SR | →<br>für<br>BIO | →<br>für<br>DEAC |
|-----------|------------------|--------------------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|
| 1 (1q12)  | SG/SO            | 8                        | 8              |                |                 |                  |
| 2/20      | SG               | 6                        |                |                |                 |                  |
| 3         | SG/SO/BIO        | 6                        | 6              |                | 8               |                  |
| 4/9       | SR               |                          |                | 20             |                 |                  |
| 6         | SO/SR/BIO/DAC    |                          |                |                |                 |                  |
| 7         | SG/SO/SR         | 12                       | 12             | 10             |                 |                  |
| 8         | SG/SO/DEAC       | 2                        | 2              |                |                 | 2                |
| 9         | SG/SR/DEAC       | 20                       |                | 25             |                 | 25               |
| 10        | SO/SR/BIO/       |                          | 15             | 15             | 15              |                  |
| 11        | SO/BIO/DEAC      |                          | 20             |                | 20              | 20               |
| 12        | SR/BIO           |                          |                | 10             | 10              |                  |
| 13/21     | SG/DEAC          | 6                        |                |                |                 | 5                |
| 14/22     | BIO              |                          |                |                | 5               |                  |
| 15        | SG/BIO/DEAC      | 14                       |                |                | 16              | 18               |
| 16        | SO/SR            |                          | 8              | 8              |                 |                  |
| 17        | SO/DEAC          |                          | 5              |                |                 | 3                |
| 18        | SR/DEAC          |                          |                | 3              |                 | 5                |
| 5/19      | DEAC             |                          |                |                |                 | 2                |
| 20        | SG/SR            | 2                        |                | 2              |                 |                  |
| 22        | SO/BIO           |                          | 33             |                | 18              |                  |
| X         | BIO/DEAC         |                          |                |                | 5               | 5                |
| Y         | SG/BIO           | 6                        |                |                | 12              |                  |

**Tabelle 8.5.:**

Markierungsansätze für den cenM-FISH Probenmix

(pro Ansatz wurden 1,5 µl DNA der oben beschriebenen Stocklösung eingesetzt)

Die Zentromere 5 und 6 (Midi12) wurden separat markiert, gefällt und prähybridisiert.

Zentromere SO (3-facher Ansatz)

|       |    |                                |
|-------|----|--------------------------------|
| 33,84 | µl | A. dest..                      |
| 6     | µl | 10x PCR Puffer                 |
| 4,8   | µl | dNTP's (Reamplifizierungs-Mix) |
| 6     | µl | SO-dUTP                        |
| 3     | µl | DOP- Primer                    |
| 6     | µl | MgCl <sub>2</sub>              |
| 0,36  | µl | Ampli Taq Polymerase           |

Zentromere SR (8-facher Ansatz)

|       |    |                                |
|-------|----|--------------------------------|
| 90,44 | µl | A. dest.                       |
| 16    | µl | 10x PCR Puffer                 |
| 12,8  | µl | dNTP's (Reamplifizierungs-Mix) |
| 16    | µl | SR-dUTP                        |
| 8     | µl | DOP- Primer                    |
| 16    | µl | MgCl <sub>2</sub>              |
| 0,96  | µl | Ampli Taq Polymerase           |

Zentromere SG (4-facher Ansatz)

|       |    |                             |
|-------|----|-----------------------------|
| 43,52 | µl | A. dest..                   |
| 8     | µl | 10x PCR Puffer              |
| 8     | µl | dNTP's ( <i>label</i> -Mix) |
| 8     | µl | SG-dUTP                     |
| 4     | µl | DOP- Primer                 |
| 8     | µl | MgCl <sub>2</sub>           |
| 0,48  | µl | Ampli Taq Polymerase        |

Zentromere Biotin (8-facher Ansatz)

|       |    |                             |
|-------|----|-----------------------------|
| 96,16 | µl | A. dest.                    |
| 16    | µl | 10x PCR Puffer              |
| 16    | µl | dNTP's ( <i>label</i> -Mix) |
| 6,4   | µl | Biotin-16-dUTP              |
| 8     | µl | DOP- Primer                 |
| 16    | µl | MgCl <sub>2</sub>           |
| 0,96  | µl | Ampli Taq Polymerase        |

Zentromere DEAC (5-facher Ansatz)

|      |    |                      |
|------|----|----------------------|
| 62,4 | µl | A. dest..            |
| 10   | µl | 10x PCR Puffer       |
| 10   | µl | dNTP's (DEAC-Mix)    |
| 2    | µl | DEAC-dUTP            |
| 5    | µl | DOP- Primer          |
| 10   | µl | MgCl <sub>2</sub>    |
| 0,6  | µl | Ampli Taq Polymerase |

Zentromere 5 und 6 (Midi 12) (jeweils einfacher Ansatz)

|       |    |                                |
|-------|----|--------------------------------|
| 11,28 | µl | A. dest..                      |
| 1,6   | µl | dNTP's (Reamplifizierungs-Mix) |
| 2     | µl | SR-dUTP                        |

für SR Markierung bzw.

|       |    |                             |
|-------|----|-----------------------------|
| 12,08 | µl | A. dest.                    |
| 2     | µl | dNTP's ( <i>label</i> -Mix) |
| 0,8   | µl | Biotin-16-dUTP              |

für Biotin Markierung bzw.

|       |    |                   |
|-------|----|-------------------|
| 12,48 | µl | A. dest..         |
| 2     | µl | dNTP's (DEAC-Mix) |
| 0,4   | µl | DEAC-dUTP         |

für DEAC Markierung

→und jeweils zu jedem Ansatz noch

|      |    |                                  |
|------|----|----------------------------------|
| 2    | µl | 10x PCR Puffer                   |
| 2    | µl | MgCl <sub>2</sub>                |
| 1    | µl | DOP- Primer                      |
| 0,12 | µl | Ampli Taq Polymerase hinzufügen. |

**Tabelle 8.6.:**

Label- Protokoll für acro-cenM-FISH-Ansätze zur Markierung der einzelnen Sonden  
(Die Zentromersonde für Chromosom 15 wurde mittels Nick-Translation (2.9.3.) markiert)

Sonde für NOR Region SO (einfacher Ansatz)

|       |    |                                |
|-------|----|--------------------------------|
| 11,28 | µl | <i>A. dest.</i>                |
| 2     | µl | 10x PCR Puffer                 |
| 1,6   | µl | dNTP's (Reamplifizierungs-Mix) |
| 2     | µl | SO-dUTP                        |
| 1     | µl | DOP- Primer                    |
| 2     | µl | MgCl <sub>2</sub>              |
| 0,12  | µl | Ampli Taq Polymerase           |

Zentromere 14/22, Yqh SR (je 0,5-facher Ansatz)

|       |    |                                |
|-------|----|--------------------------------|
| 11,28 | µl | <i>A. dest.</i>                |
| 2     | µl | 10x PCR Puffer                 |
| 1,6   | µl | dNTP's (Reamplifizierungs-Mix) |
| 2     | µl | SR-dUTP                        |
| 1     | µl | DOP- Primer                    |
| 2     | µl | MgCl <sub>2</sub>              |
| 0,12  | µl | Ampli Taq Polymerase           |

Zentromere 13/21 (0,5-facher Ansatz)  
und 22 SG (einfacher Ansatz):

|       |    |                             |
|-------|----|-----------------------------|
| 10,88 | µl | <i>A. dest.</i>             |
| 2     | µl | 10x PCR Puffer              |
| 1,6   | µl | dNTP's ( <i>label-Mix</i> ) |
| 2     | µl | SG-dUTP                     |
| 1     | µl | DOP- Primer                 |
| 2     | µl | MgCl <sub>2</sub>           |
| 0,12  | µl | Ampli Taq Polymerase        |

Midi 54 und Yq12 DEAC (je 0,5-facher Ansatz)

|       |    |                      |
|-------|----|----------------------|
| 12,48 | µl | <i>A. dest.</i>      |
| 2     | µl | 10x PCR Puffer       |
| 2     | µl | dNTP's (DEAC-Mix)    |
| 2     | µl | DEAC-dUTP            |
| 1     | µl | DOP- Primer          |
| 2     | µl | MgCl <sub>2</sub>    |
| 0,12  | µl | Ampli Taq Polymerase |

**Tabelle 8.7.:**

## Subtelomersonden-Gesamtüberblick

Es sind jeweils die Chromosomenregion, der verwendete Klon, sowie die Herkunft der Sonden angegeben:

Klone der 1. Generation von Dr. L. Kearney (Flint *et al.*, 1996),

Klone der 2. Generation von Dr. H. Engels (Brown *et al.*, 2000, Knight und Flint 2000),

kommerziell erhältliche Sonden der Firma QBiogene (markiert mit SpectrumGreen)

Die Signal-Qualitäten der getesteten Sonden wurden wie folgt eingeteilt:

+++ sehr gute Signale ohne Hintergrundsignale

++ gute Signale

+ schwache Signale meist mit starkem Hintergrund

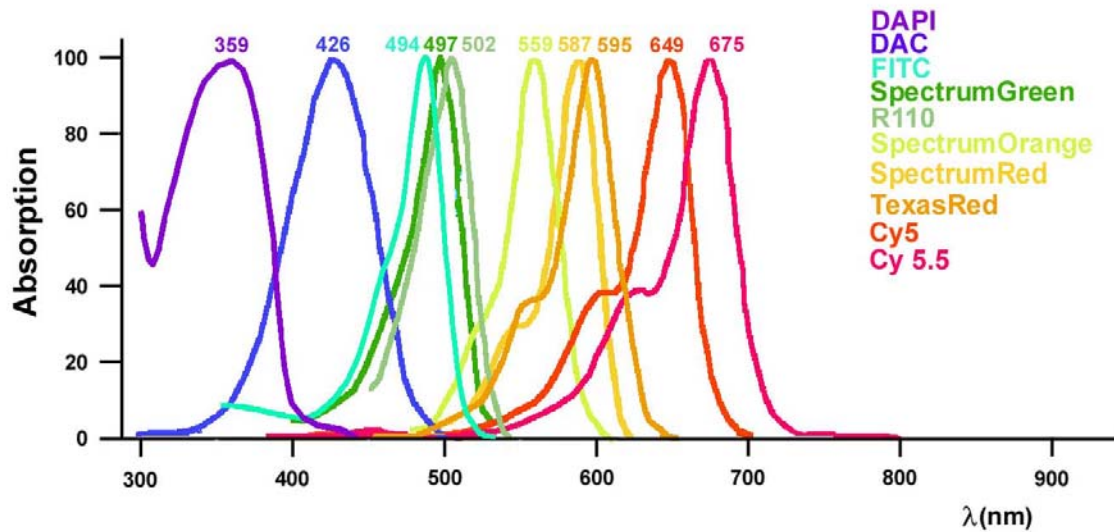
| Region | Generation/<br>Herkunft | Klon     | PAC / BAC | Hybridisierungs-<br>Qualität |
|--------|-------------------------|----------|-----------|------------------------------|
| 1p     | 2                       | 14e10    | PAC       | ++                           |
| 1q     | 2                       | 160H23   | PAC       | +++                          |
| 1q     | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 2p     | 2                       | 892G20   | PAC       | ++                           |
| 2p     | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 2q     | 1                       | 210E14   | Cos       | +++                          |
| 3p     | 2                       | 1186B18  | PAC       | +++                          |
| 3p     | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 3q     | 2                       | 196F4    | PAC       | ++                           |
| 3q     | 2                       | 196F4    | PAC       | +                            |
| 4p     | 2                       | 36P21    | PAC       | +(+)                         |
| 4p     | 1                       | B31      | Cos       | +                            |
| 4p     | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 4q     | 1                       | CT55     | Cos       | +                            |
| 4q     | QBiogene                |          |           | n.a.                         |
| 5p*    | 2                       | 189N21   | PAC       | ++                           |
| 5p     | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 5q     | 2                       | 240G13   | PAC       | ++                           |
| 5q     | 2                       | 240G13   | PAC       | ++                           |
| 6p     | 1                       | 36i2     | PAC       | ++                           |
| 6p     | 2                       | 62I11    | PAC       | ++(+)                        |
| 6q     | 2                       | 57H24    | PAC       | +                            |
| 6q     | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 7p     | 1                       | 109A6    | Cos       | ++                           |
| 7q     | 2                       | 3K23     | PAC       | ++                           |
| 7q     | 2                       | 3K23     | PAC       | +++                          |
| 8p     | 2                       | dj790J10 | PAC       | +                            |
| 8p     | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 8q     | 1                       | 2053b3   | Cos       | ++                           |
| 9p     | 1                       | 34H2     | PAC       | ++                           |
| 9p*    | 2                       | 43N6     | PAC       | ++                           |
| 9p     | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 9q     | 1                       | 2241c1   | Cos       | +                            |
| 9q     | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 10p    | 1                       | 2189b6   | Cos       | +                            |
| 10p    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 10q    | 1                       | 2136a1   | Cos       | +                            |
| 10q    | 2                       | 137E24   | PAC       | +                            |
| 10q    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 11p    | 1                       | 2209a2   | Cos       | +                            |
| 11p    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 11q    | 1                       | 2072c1   | Cos       | +                            |
| 11q*   | 2                       | 770G7    | PAC       | ++                           |
| 11q    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 12p    | 1                       | 90i5     | PAC       | +++                          |
| 12p    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 12q    | 2                       | 221K18   | PAC       | ++                           |

| Region | Generation/<br>Herkunft | Klon     | PAC / BAC | Hybridisierungs-<br>Qualität |
|--------|-------------------------|----------|-----------|------------------------------|
| 13q    | 2                       | 85A10    | PAC       | +                            |
| 13q    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 14q    | 1                       | 2006a1   | Cos       | ++                           |
| 15q    | 1                       | 154P1    | PAC       | ++                           |
| 16p    | 1                       | cGG4     | Cos       | ++                           |
| 16q    | 2                       | 240G10   | PAC       | ++                           |
| 17p*   | 2                       | 2111b1   | Cos       | ++                           |
| 17p    | 2                       | 202L17   | PAC       | ++                           |
| 17q    | 1                       | 362K4    | PAC       | ++                           |
| 18p    | 1                       | 52M11    | P1        | ++                           |
| 18q    | 1                       | 2050a6   | Cos       | ++                           |
| 18q    | 2                       | 964M9    | PAC       | +++                          |
| 19p    | 1                       | F20643   | Cos       | +                            |
| 19p    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 19q    | 2                       | 129c9    | PAC       | +                            |
| 19q    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 20p    | 2                       | dj106111 | PAC       | ++                           |
| 20p    | 2                       | 106L18   | PAC       | +++                          |
| 20q    | 2                       | 81F12    | PAC       | ++                           |
| 21q    | 1                       | C9a1     | Cos       | ++                           |
| 21q    | 2                       | 63H24    | PAC       | ++                           |
| 21q    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| 22q    | 1                       | N85A3    | Cos       | +                            |
| 22q    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |
| Xq     | 1                       | dj231B19 | PAC       | +++                          |
| Xyp*   | 2                       | 132H11   | BAC       | ++                           |
| XYp    | 2                       | 839D20   | BAC       | +++                          |
| XYq    | 1                       | C8.2/1   | Cos       | +                            |
| XYq    | QBiogene                | -        |           | n.a.                         |

**Abb. 8.1.:**

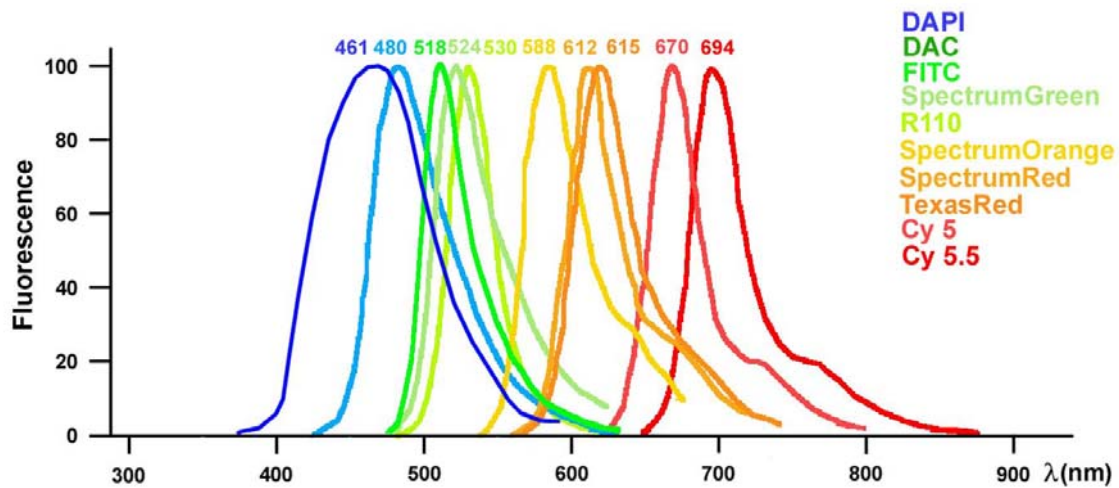
Absorptionsspektren der verwendeten Fluorochrome;

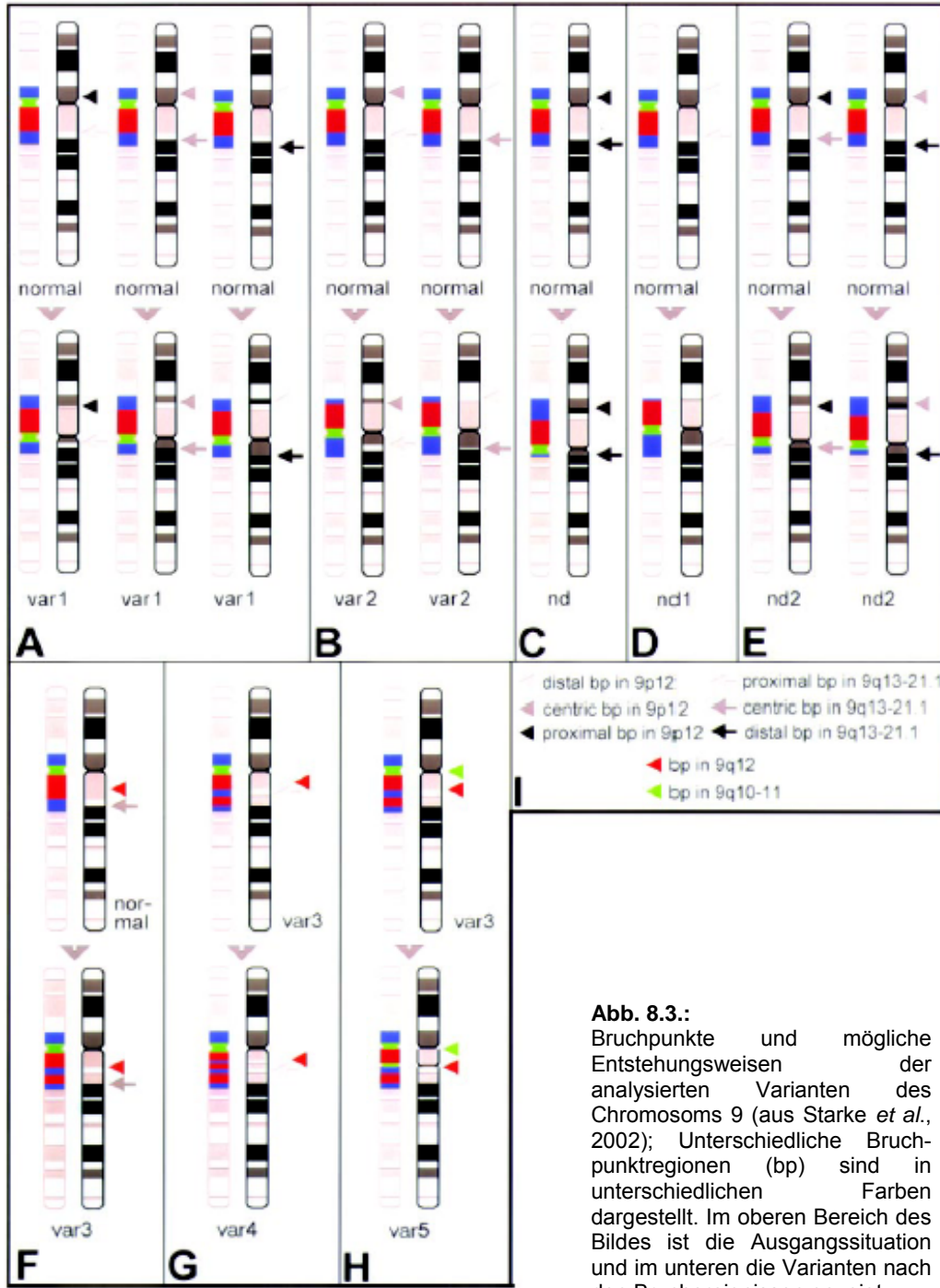
Die Farbstoffe, FITC, SpectrumGreen und R110 haben fast identische Anregungswellenlängen, weshalb sie z.T. analog zur Markierung verwendet wurden.

**Abb. 8.2.:**

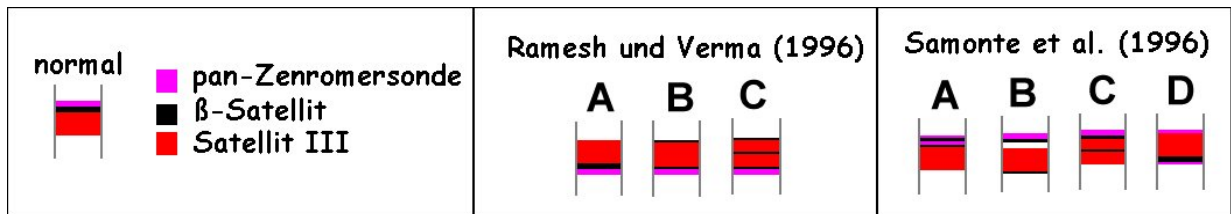
Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome;

Die Farbstoffe FITC, SpectrumGreen und R110 sowie die Fluorochrome SpectrumRed und TexasRed konnten aufgrund der weitgehend identischen Emissionsbereiche mit dem gleichen Filter aufgenommen werden.





**Abb. 8.3.:** Bruchpunkte und mögliche Entstehungsweisen der analysierten Varianten des Chromosoms 9 (aus Starke *et al.*, 2002); Unterschiedliche Bruchpunktregionen (bp) sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Im oberen Bereich des Bildes ist die Ausgangssituation und im unteren die Varianten nach den Bruchereignissen gezeigt.



**Abb. 8.4.:** Darstellung der von Ramesh und Verma 1996 und der Arbeitsgruppe um Samonte 1996 nachgewiesenen Heteromorphismen des Chromosoms 9 mit den Bruchpunkten im Zentromerbereich, in der β-Satellitenregion und der Satellit III Region.

**Tabelle 8.8.:**

Zusammenstellung der mittels Sondenkombination 1 untersuchten Fälle mit Varianten des Chromosoms 9 mit dem Ergebnis der GTG-Bänderung und der FISH Analyse (bei den Fällen 1-5 handelt es sich um die Kontrollpersonen)

→ Eine Einteilung der evtl. vorhandenen klinischen Symptomatik der Patienten erfolgte in:

phänotypisch unauffällig N  
 Störungen der Fruchtbarkeit F  
 mentale Retardierung MR

→ Das Geschlecht wurde mit F (weiblich) und M (männlich) bezeichnet.

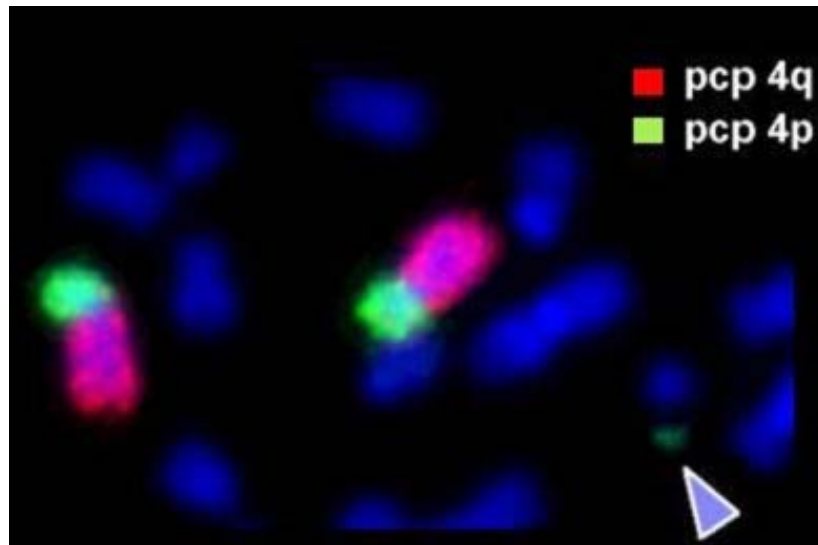
| Fall | Geschlecht | Klinik              | GTG-Ergebnis      | FISH-Ergebnis       |
|------|------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| 1    | M          | N                   | normal            | normal              |
| 2    | M          | N                   | normal            | normal              |
| 3    | F          | N                   | normal            | normal              |
| 4    | M          | N                   | normal            | normal              |
| 5    | F          | N                   | normal            | normal              |
| 6    | M          | N                   | 9qh-              | 9qh-                |
| 7    | M          | F                   | 9qh+              | 9qh+                |
| 8    | F          | F                   | 9qh+              | 9qh+                |
| 9    | F          | F                   | 9qh+              | 9qh+                |
| 10   | M          | F                   | 9qh+              | 9qh+                |
| 11   | F          | N                   | 9qh+              | 9qh+                |
| 12   | M          | N                   | 9qh+              | 9qh+ und inv (var1) |
| 13   | M          | F                   | 9qh+/extra Bande  | 9qh+ und inv (var3) |
| 14   | F          | N                   | 9qh+/ extra Bande | 9qh+ und inv (var3) |
| 15   | F          | F                   | 9qh+/ extra Bande | 9qh+ und inv (var3) |
| 16   | F          | F                   | 9qh+/ extra Bande | 9qh+ und inv (var4) |
| 17   | F          | F                   | 9qh+/ extra Bande | 9qh+ und inv (var5) |
| 18   | F          | N                   |                   | 9qh+ und inv (var5) |
| 19   | F          | N                   |                   | 9qh+ und inv (var5) |
| 20   | F          | N                   |                   | 9qh+ und inv (var5) |
| 21   | F          | N                   | inv               | 9qh- und inv (var1) |
| 22   | M          | Kleinwuchs          | inv               | 9qh- und inv (var1) |
| 23   | M          | N                   | inv               | 9qh- und inv (var1) |
| 24   | F          | N                   | inv               | 9qh- und inv (var1) |
| 25   | M          | F                   | inv               | 9qh- und inv (var1) |
| 26   | M          | MR                  | inv               | 9qh- und inv (var1) |
| 27   | M          | F                   | inv               | inv (var1)          |
| 28   | M          | N                   | inv               | inv (var1)          |
| 29   | M          | MR                  | inv               | inv (var1)          |
| 30   | F          | F                   | inv               | inv (var1)          |
| 31   | F          | N                   | inv               | inv (var1)          |
| 32   | F          | N                   | inv               | inv (var1)          |
| 33   | F          | F                   | inv               | inv (var2)          |
| 34   | M          | N                   | inv               | inv(var2)           |
| 35   | M          | MR                  | inv               | inv (var2)          |
| 36   | F          | F                   | inv               | inv (var2)          |
| 37   | M          | Fragiles X Syndrom? | inv               | inv (var2)          |
| 38   | F          | F                   | inv               | inv (var2)          |
| 39   | M          | N                   | inv               | inv (var2)          |
| 40   | F          | N                   | inv               | inv (var2)          |
| 41   | M          | MR                  | inv               | inv (var2)          |
| 42   | F          | F                   | inv               | inv (var2)          |
| 43   | F          | F                   | inv               | inv (var2)          |
| 44   | F          | N                   | inv               | inv (var2)          |
| 45   | M          | MR                  | inv               | inv (var2)          |
| 46   | M          | N                   | inv               | inv (var2)          |
| 47   | M          | Kleinwuchs          | inv               | inv (var2)          |
| 48   | F          | F                   | inv               | inv (var2)          |
| 49   | F          | N                   | inv               | inv (var2)          |
| 50   | F          | N                   | inv               | inv (var2)          |
| 51   | F          | N                   | inv               | inv (var2)          |
| 52   | M          | MR                  | inv               | inv (var2)          |
| 53   | F          | N? (FW)             | inv               | inv (var2)          |
| 54   | F          | N                   | cenh+?            | inv (var5)          |
| 55   | F          | N                   | cenh+?            | inv (var5)          |



| Fall | Geschlecht | Klinik | GTG-Ergebnis                      | FISH-Ergebnis                                  |
|------|------------|--------|-----------------------------------|--|
| 56   | M          | N      | cenh+?                            | inv (var5)                                     |
| 57   | F          | N      | 9ph+                              | 9ph+   |
| 58   | F          | F      | 9ph+                              | 9ph+   |
| 59   | M          | N      | 9p+?                              | 9ph+   |
| 60   | F          | N      | 9p+?                              | 9ph+   |
| 61   | M          | N      | 9ph+                              | 9ph+ und 9qh-                                  |
| 62   | F          | N      | 9ph+?                             | 9ph+ und inv (var1)                            |
| 63   | F          | N      | 9ph+                              | 9qh+ und inv (var2)                            |
| 64   | M          | MR     | 9ph+                              | 9ph+ und inv (var3)                            |
| 65   | M          | N      | inv                               | inv(9)(p24.1q31.2)                             |
| 66   | F          | N      | mar (75% MPP)                     | ring(9)(q12)                                   |
| 67   | M          | N?     | mar (25% MPP)<br>(= midi36), 9qh+ | der(9)(q10p12;q13q21.1)<br>9ph+ und inv (var2) |

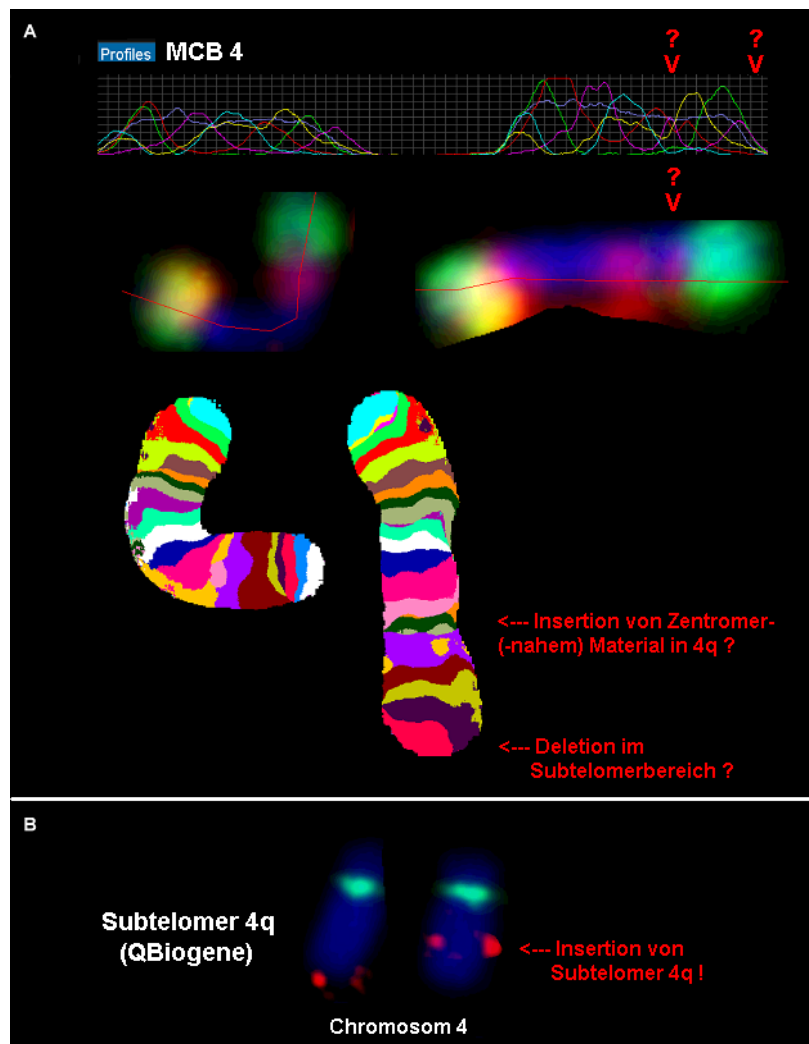
**Abb. 8.5.:**

Hybridisierungsergebnis mit Chromosomenarm-spezifischen Sonden; Auf dem (heterochromatischen) Markerchromosom ist aufgrund unvollständigen Blockens mit COT1-DNA ein Signal mit der Sonde für 4p zu sehen.

**Abb. 8.6.:**

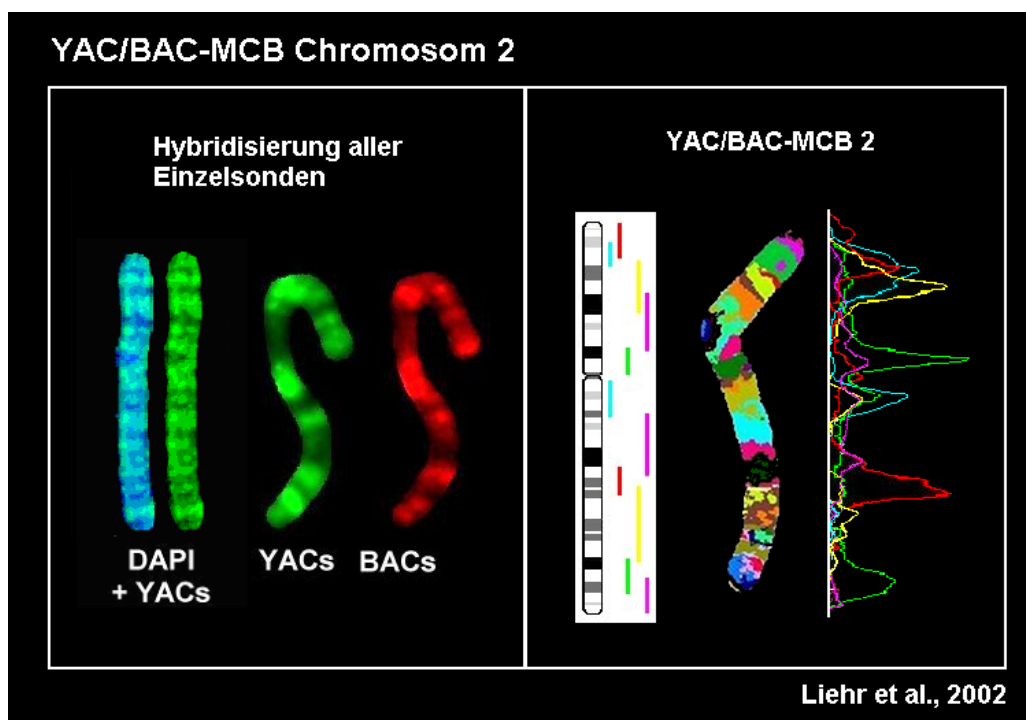
Hybridisierungsergebnis mit dem MCB 6 Sonden Set; Anhand der Pseudofarben-Bänderung würde man eine Insertion des zentromernahen Bereichs, bzw. ein dizentrisches Derivatvchromosom vermuten.

Mittels Subtelomersonde 4q (untere Bildhälfte) konnte jedoch eine Insertion des Bereiches 4q35 in 4q27 nachgewiesen werden, die zur gleichen Fluorochromkombination in 4q27 und somit zu gleichen Pseudofarben führt.



**Abb. 8.7.:**

Hybridisierung der Sonden für das YAC/BAC-MCB für Chromosom 2; links → FISH Ergebnis der Hybridisierung aller Einzelsonden: statt der vollständigen Abdeckung wird ein Bänderungs-ähnliches Signalmuster erzielt.; rechts → Nach Hybridisierung von verschieden farbigen, überlappenden BAC *contigs* wurde ein ungleichmäßiges Bandenmuster und unregelmäßige Profile erhalten.



**Tabelle 8.8.:**

Gesamtliste aller untersuchten Fälle mit SMC geordnet nach dem Chromosom von dem sie abstammen mit (interner) Fallnummer, Familiarität, dem Ergebnis der GTG-Bänderung und der FISH Analyse. Für Fälle, die bereits veröffentlicht wurden, ist die Literaturstelle angegeben.

Die hier vorgestellten Fälle wurden klinisch eingeteilt in:

- normal (ohne jegliche Symptomatik) → N
- phänotypisch unauffällig; aber mit Fertilitätsstörungen in der Partnerschaft → F
- phänotypisch auffällig → P
- mit Organfehlbildungen → O
- mit mentaler Retardierung → MR
- auffälliger Ultraschallbefund → US
- Patient mit Cat-eye-Syndrom → CES
- Patient mit Pallister-Killian-Syndrom → PKS
- Patient mit Prader-Willi-Syndrom → PWS

Als Untersuchungsmaterial diente Blut (BL), Fruchtwasser (FW) und in einigen Fällen Material einer Chorionzottenbiopsie (CV).

| Chr.       | Fall                 | Klinik      | Material          | Vererbung      | GTG-Ergebnis   | FISH-Ergebnis  | UPD       | Literatur  |
|------------|----------------------|-------------|-------------------|----------------|--|--|-----------|--|
| X*         | BL372/00<br>FW412-00 | N           | Blut/<br>Plazenta | <i>de novo</i> | Plazenta:<br>47,XX,+mar[15]/46,XX[8]<br>Blut:<br>47,XX,+mar[13]/46,XX[2]                             | min(X)(p11.1->q11)   | no<br>UPD | Liehr T<br><i>et al.</i> ,<br>2001<br>Fall 2;<br>Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 2 |
| X*         | 349/01               | US/P/<br>MR | Blut              | <i>de novo</i> | 46,X,iX(q10)[13]/<br>46,X,+mar[10]/45,X[2]   | dic(X):(q11-<br>>p11.1::p11.1-q12:)  | n.a.      | n.a.   |
| X*         | 467-01               | P           | Blut              | <i>de novo</i> | 45,X[15]/46,X,der(X)[2]/<br>47,X,r(X)[3]   | der(X):(p11.3or11.4-<br>>q13:)[8];<br>der(X):(p11.1-<br>>q11.1:)[2]  | n.a.      | n.a.   |
| X*         | 30-02                | P           | Blut              | <i>de novo</i> | 45X[26]/46,X,+r(x)[3]  | r(X)::p11.3-<br>>q21.1:)[2]/der(X):<br>p11.3-<br>>q21.1:)[3]/der(X):(p<br>11.21->q11.2:)[2] -<br>plus 45,X[93] | n.a.      | n.a.   |
| X*         | 389-02               | US          | FW                | <i>de novo</i> | 45,X[12]/46,X,der(X)[9]  | r(X):(p11.1->q13.2:)   | n.a.      | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 1  |
| X*         | 142/03               | P           | Blut              | <i>de novo</i> | 46,X,der(X)[19]/46,XX[20]  | der(X):(p11.22<br>->q11.1:)  | n.a.      | n.a.   |
| ring X     | 127-01               | P           | Blut              | <i>de novo</i> | 45,X[14]/46,X,r(X)[11]   | r(x)(p11.1q24)   | n.a.      | n.a.   |
| X 2<br>mar | 030-03               | P           | Blut              | <i>de novo</i> | 46,X,del(X)(q21)(2/3)/<br>del(X)<br>(pter->q21::p11.3->pter)<br>or (pter->q21::p11.4-<br>>pter)(1/3) | 46,X,del(X)(q21.1<br>-<br>q21.2)[5]/46,X,i(X)(q<br>11.1 or 11.2)[3]  | n.a.      | n.a.   |
| Y*         | 194/03               | N?          | Blut              | <i>de novo</i> | 45,X[21]/46,r(Y)[31]   | r(Y)::p11.3<br>->q11.2(?)3::q11.23<br>->p11.3:)  | n.a.      | n.a.   |
| Y*         | 226-01               | P           | Blut              | <i>de novo</i> | 45,X[8]/46,X,+mar[17]  | idic(Y)(p11.3<br>->q11.2::q11.2<br>->p11.3)  | n.a.      | n.a.   |
| Y*         | 246/01               | P           | Blut              | <i>de novo</i> | 45,X[21]/46,X,+mar[10]   | der(Y)(p11.3<br>->q11.2::q11.2<br>->p11.3)   | n.a.      | n.a.   |
| Y*         | 128/01               | P           | Blut              | <i>de novo</i> | 45,X[38]/46,X,der(?X)[12]  | der(Y)(q12<br>->p11.3::p11.1<br>->q12)   | n.a.      | n.a.   |
| Y          | 2004042              | n.a.        | Blut              | <i>de novo</i> | 46,X,+mar[100%]  | r(Y)(p11.2->q?)  | n.a.      | n.a.   |
| Y*         | 206-02               | N?          | FW                | <i>de novo</i> | 46,X,+mar[18]/46,XY[13]  | idic(Y)(p11.3<br>->q11.21::q11.21<br>->p11.3)  | n.a.      | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 3  |
| Y*         | 133-02               | N?          | FW                | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[4]/46,XY[133]   | 47,XY,+idic(Y)(q21)  | n.a.      | n.a.   |

| Chr. | Fall                          | Klinik                 | Material | Vererbung      | GTG-Ergebnis                        | FISH-Ergebnis   | UPD  | Literatur   |
|------|-------------------------------|------------------------|----------|----------------|-------------------------------------|---|--|---|
| 1*   | 073-03                        | P/MR                   | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XX,+r[5]/46,XX[45]               | min(1):(p12->q11:)  | n.a.   | n.a.  |
| 1*   | 342/98                        | MR                     | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[15];                     | min(1):(p12->q12:)  | n.a.   | Nietzel <i>et al.</i> , 2001, Fall 11; Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 5 |
| 1*   | 077/03                        | MR/P                   | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[8]/46,XX[12]             | min(1):(p11.1->q12:)  | n.a.   | n.a.  |
| 1*   | 206-02                        | P                      | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XY,+r[48]/46,XY[52]              | r(1)::p11.1<br>->q21.1:)  | n.a.   | n.a.  |
| 1*   | 193/02                        | ähnl. DiGeorge-Syindr. | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XY,+r[5]/46,XY[45]               | r(1)::p11.1<br>->q21.1:)  | n.a.   | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 4; Liehr <i>et al.</i> 2003 - Fall 4;    |
| 1*   | 409-02                        | N;                     | FW       | <i>de novo</i> | 47,XX,+r[7]/46,XX[28]               | r(1)::p11.1<br>->q21.1:)  | n.a.   | n.a.  |
| 1    | 075/03                        | ?                      | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar(15%)/<br>46,XX(85%)      | r(1)::p12->q12:)  | n.a.   | n.a.  |
| 1*   | 2004011                       | MR/P/<br>F             | Blut     | n.a.           | 47,XX,+mar(1)[50%]/<br>46,XX[50%]   | min(1):p12<br>->q12:).ish   | n.a.   | n.a.  |
| 1    | 200410                        | ?                      | Blut     | n.a.           | 47,XX,+mar(1)[30%]/<br>46,XX[70%]   | min(1):p12<br>->q12:).ish   | n.a.   | n.a.  |
| 2*   | 229/00                        | F                      | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[22]/46,XY[38]            | r(2)::p11.1<br>->q11.2:)  | n.a.   | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 6  |
| 2*   | 461-02                        | F                      | Blut     | n.a.           | 45,X[5]/47,XX,+mar[43]/<br>46,XX[2] | r(2)::p11.1<br>->q11.2:)  | n.a.   | n.a.  |
| 2*   | 202/01                        | BOR<br>syndro<br>me ?  | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar [15]                     | r(2)::p11.2<br>->q11.1:)  | n.a.   | Weise <i>et al.</i> , 2002, Fall 11; Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 7   |
| 3*   | 13-02                         | F                      | Blut     | n.a.           | 47,XY,+mar                          | min(3):p12.2<br>->q11.1:)   | n.a.   | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 8; Liehr <i>et al.</i> 2003 - Fall 2;    |
| 3    | 375-03                        | US                     | FW       | n.a.           | 47,XY,+mar[100%]                    | min(3):p12.1<br>->q11.2:)   | n.a.   | n.a.  |
| 3    | 497-03                        | ?                      | FW       | n.a.           | 47,XX,+mar[16]/46,XX[33]            | dic(3):p12.1<br>->q11.2::q11.2<br>->p12.1:)[12]/min(3)<br>(:p12.1->q11.2:)[3]/<br>r(3)::p12.1-q11.2:) | n.a.   | n.a.  |
| 4*   | 391-00<br>Eltern<br>410 u.411 | Trisomie 21            | Blut     | <i>de novo</i> | 48,XY,+21,+mar[28]/<br>47,XY,+21[7] | min(4):(p12->q11:)  | part.<br>mat<br>UPD<br>4<br>iso-<br>mat.<br>UPD<br>in 4<br>p16 | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 10                                       |
| 4*   | 238-02                        | ?                      | FW       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[10]/46,XY[9]             | inv dup(4)<br>(:p11.1->q12:)  | No<br>UPD<br>4   | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 9  |

| Chr. | Fall                         | Klinik                      | Material   | Vererbung      | GTG-Ergebnis  | FISH-Ergebnis   | UPD                               | Literatur                              |
|------|------------------------------|-----------------------------|------------|----------------|---|---|-----------------------------------|--|
| 5*   | 2004100                      | MR/P                        | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[11]/46,XX[5]   | min(5):(p12~13.1<br>->q10:)[11]/min(5)<br>(:p12~13.1->q10:<br>q10->p12~13.1:)<br>[2]/r(5):(p12~13.1<br>->q10:q10-<br>>p12~13.1:)[1]   | n.a.                              | n.a.                                   |
| 5*   | 391-01                       | N                           | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[38]/46,XX[15]  | min(5):(p11->q11.2:)  | n.a.                              | Starke <i>et al.</i> , 2003            |
| 6    | 266-03                       | N?                          | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[?]/46,XX[?]  | min(6):(p11.1<br>->q11.2:)  | no<br>UPD                         | n.a.                                   |
| 7*   | 460-01                       | P                           | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[26]/46,XX[14]  | r(7):(p11.1-> 11.21:)<br>[15]/r(7;7):(p11.1<br>->q11.21: :p11.1<br>->q11.21:)<br>4]/r(7;7;7;7):(p11.1-><br>q11.21::p11.1-><br>q11.21::p11.1-><br>q11.21::p11.1-><br>q11.21:)[1] | no<br>UPD                         | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 13 |
| 7*   | 139-02<br>Eltern<br>151u.152 | N                           | FW<br>Blut | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[10]/46,XX[12]  | min(7):(p11.2<br>->q11.1:)  | no<br>UPD                         | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 12 |
| 7*   | 178-02                       | Silver-<br>Russel<br>Syndr. | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[15]?   | min(7):(p11.2<br>->q11.1:)  | mat<br>UPD<br>7 iso<br>diso<br>my | n.a.                                   |
| 8*   | 338/99                       | N                           | FW         | maternal       | 47,XX,+mar[43]/46,XX[7]   | r(8):(p11.21<br>->q11.1:)   | n.a.                              | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 14 |
| 8*   | 330/98                       | N                           | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[16]/46,XX[7]   | min(8):(p11->q11:)  | no<br>UPD                         | Starke <i>et al.</i> , 1999            |
| 8*   | 396/00                       | N                           | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[33]/46,XX[2]   | min(8):(p11->q11:)  | no<br>UPD                         | n.a.                                   |
| 8*   | 67-01                        | MR/P                        | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XY,+r  | r(8):(p10->q23.3:)  | n.a.                              | n.a.                                   |
| 8*   | 2004065                      | MR/P                        | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[50%]/<br>46,XX[50%]  | min(8):(p21-q11.21:)<br>[4]/r(8):(p21<br>-q11.21:)[8]/<br>r(8):(p21<br>-q11.21:)[3]/<br>min(8):(p21-q11.21:)<br>,min(8)(p21<br>-q10::q10->p21)[1]                               | n.a.                              | n.a.                                   |
| 8*   | 083/03                       | N?                          | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[20];<br>(n. 6 Mon. ring in 60%<br>der Zellen)                        | dic(8;8):(p11.21<br>->q11.1::p11.21<br>->q11.1:)  | n.a.                              | n.a.                                   |
| 8    | 318-03                       | N?                          | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[8]/46,XX[7]<br>in Kultur 1;<br>47,XX,+mar[7]/46,XX[3]<br>in Kultur 2 | min(8):(p11.21<br>-q11.21:)[8]/<br>min(8):(p11.21<br>->q11.1:)[3]/<br>min(8):(p11.21<br>->q11.1:q11.1<br>->p11.21:)[1]/<br>r(8):(p11.21<br>-q11.1:q11.1<br>->p11.21:q11.21:)    | no.<br>UPD                        |  |

| Chr.          | Fall   | Klinik                | Material   | Vererbung      | GTG-Ergebnis   | FISH-Ergebnis  | UPD                         | Literatur   |
|---------------|--|-----------------------|------------|----------------|--|--|-----------------------------|---|
| 8*            | 182-03                                       | (P)                   | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[2]/46,XY[28]  | mos min(8):(p11.1<br>->q11.21:)[11]/r(8)<br>(::p11.1-q11.21:)[2]/<br>r(8):(p11.1<br>->q11.21::p11.1<br>->q11.21:)[1]/r(8)<br>(::p11.1-q11.21:<br>p11.1->q11.21:<br>p11.1->q11.21:)[2]/<br>dic(8):(q11.21<br>->p11.1::p11.1<br>->q11.21:)[5]/<br>dic(8):(q11.21<br>->p11.1::p11.1<br>->q11.1:)[2] | n.a.                        | n.a.  |
| 9*            | 387/99                                       | MR/P                  | Blut       | <i>de novo</i> | 48,XXY,+mar  | dic(9):(p12<br>->q11.1::q11.1<br>->p11.1:)   | n.a.                        | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 15                                |
| 9*            | mid36  | N                     | FW         | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar   | min(9):(p12->q10:)   | n.a.                        | Starke <i>et al.</i> , 2002<br>Fall 56                                |
| 9*            | mid18  | F                     | Blut       | n.a.           | 47,XX,+mar   | r(9):(p12->q10:)   | n.a.                        | Starke <i>et al.</i> , 2002<br>Fall 55                                |
| 11*           | 99084/108/<br>402KM/<br>100/99BL/<br>Midi118 | CML                   | Blut<br>KM | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar (nur in KM!)  | r(11):(p11.2<br>->q13.1::q14:)   | n.a.                        | Starke <i>et al.</i> , 2001<br>Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 16 |
| 12*           | 507/00                                       | N                     | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar   | min(12):(p?11<br>->q11:)   | mat<br>UPD<br>12            | von<br>Eggeling<br><i>et al.</i> ,<br>2002                            |
| 12*           | 218-02                                       | MR/P                  | Blut       | <i>de novo</i> | 46,XY[11]/47,XY,+r[21]   | min(12):(p11.1<br>->q12:)  | n.a.                        | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 18                                |
| 12            | 74/03  | ?                     | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar   | min(12):(p11.1<br>->q11.1:)  | n.a.                        | n.a.  |
| 12<br>larger* | 472/02                                       | PKS                   | CV         | <i>de novo</i> | mos47,XX,+F/46,XX<br>47,XX,+mar[15]<br>Kurzzeitk. 47,XX,+mar[3];<br>46,XX[37] Langzeitkultur | idic(12)(q11)  | n.a.                        | n.a.  |
| 12<br>larger* | 240/01                                       | PKS                   | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[15]<br>Kurzzeitk. 47,XX,+mar[3];<br>46,XX[37] Langzeitkultur                      | idic(12)(q10)  | n.a.                        | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 17                                |
| 13 or<br>21   | 124/99                                       | LADD-<br>syndro<br>me | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar [25]  | i(13or21)(q11.1)   | n.a.                        | n.a.  |
| 13 or<br>21*  | 142-02                                       | N                     | FW         | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[12]/46,XY[2]  | i(13or21)(q11.1)   | n.a.                        | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 19                                |
| 13 or<br>21   | 175/01                                       | US                    | FW         | paternal       | 47,XX,+mar[15]   | min(13 or 21)  | n.a.                        | n.a.  |
| 13 or<br>21   | 367-03                                       | F                     | Blut       | n.a.           | 47,XX,+mar(50%)/<br>46,XX(50%)   | i(13or21)(q10)   | n.a.                        | n.a.  |
| 13 or<br>21*  | 202-03                                       | N?                    | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[25]   | i(13or21)(q10)   | n.a.                        | n.a.  |
| 13 or<br>21   | 493/03                                       | N?                    | FW         | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[4]/46,XY[3]   | i(13or21)(q10)   | no<br>UPD<br>13<br>or<br>21 | n.a.  |
| 13 or<br>21   | 488/03                                       | N?                    | FW         | n.a.           | 47,XX,+mar[15]   | i(13or21)(q10)   | n.a.                        | n.a.  |
| 14*           | 410/99                                       | US                    | FW         | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[5]/46,XY[5]   | inv dup(14)(q11)   | n.a.                        | n.a.  |
| 14*           | 400/99                                       | N?                    | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[9]/46,XX[5]   | inv dup(14)(q11)   | n.a.                        | n.a.  |

| Chr.      | Fall            | Klinik        | Material | Vererbung      | GTG-Ergebnis               | FISH-Ergebnis  | UPD        | Literatur  |
|-----------|-----------------|---------------|----------|----------------|----------------------------|--|------------|--|
| 14*       | 333-02          | N             | FW       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[10]             | inv dup(14)(p10)   | n.a.       | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 20                              |
| 14*       | 179-02          | N             | Blut     | maternal       | 47,XX,+mar[15]             | inv dup(14)(q11)   | no UPD     | Liehr <i>et al.</i> 2003 - Fall 3;                               |
| 14*       | 426-02          | F             | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[15]             | inv dup(14)(q10)   | n.a.       | n.a.   |
| 14*       | 363/02          | F             | Blut     | n.a.           | 47,XX,+mar[43]/46,XX[7]    | inv dup(14)(q11)   | n.a.       | n.a.   |
| 14        | 080/03          | ?             | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar [15]            | inv dup(14)(q10)   | n.a.       | n.a.   |
| 14        | 473/03          | n.a.          | FW       | n.a.           | 47,XY+mar[15]/46,XY[10]    | min(14)(:p11.1-q11.1::p11.1-q11.2:)                          | n.a.       | n.a.   |
| 14*       | 420/03          | N             | Blut     | n.a.           | 47,XX,+mar[50%]/46,XX[50%] | inv dup(14)(q11.1)   | n.a.       | n.a.   |
| 14*       | 016-03          | ?             | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar [15]            | min(:14p12->q11.1:)  | no UPD     | n.a.   |
| 14*       | 338-03          | N             | Blut     | n.a.           | 47,XX,+mar [15]            | inv dup(14)(q10)   | n.a.       | n.a.   |
| 14        | 464-03          | MR            | Blut     | n.a.           | 47,XX,+mar [100%]          | inv dup(14)(q10)   | no UPD     | n.a.   |
| 14*       | 050-03          | F             | Blut     | n.a.           | 47,XX,+mar [15]            | inv dup(14)(q10)   | n.a.       | n.a.   |
| 14*       | 041-03          | F             | Blut     | n.a.           | 47,XY,+mar[15]             | inv dup(14)(q10)   | n.a.       | n.a.   |
| 14 or 22* | 087/03          | N?            | FW       | paternal       | 47,XY,+mar[15]/46,XY[5]    | min(22)(pter->q11.1:) or +min(14)(14pter->14q11.1)           | n.a.       | n.a.   |
| 15*       | 348/01          | P             | Blut     | <i>de novo</i> | 48,XX,+2mar                | 2 idic(15)(pter->q13::q13->pter)                             | mat UPD 15 | Nietzel <i>et al.</i> , 2003 Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 22 |
| 15*       | 198/00          | n.a.          | NS-Blut  | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[20]             | der(15)(p13->q?13::q?13 or q?->q? or q?13)                   | n.a.       | n.a.   |
| 15*       | 171/99          | F             | Blut     | <i>de novo</i> | 48,XX,+2mar[16]/46,XX[4]   | 2 inv dup (15)(q11.1)  | n.a.       | n.a.   |
| 15*       | 136/00          | N             | FW       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[20]/46,XY[80]   | inv dup(15)(q11)   | n.a.       | n.a.   |
| 15*       | 343-02          | N             | CV       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[10]             | inv dup(15)(q10)   | no UPD     | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 21                              |
| 15*       | 122-02          | N             | FW       | paternal       | 47,XX,+mar[23]/46,XX[1]    | inv dup(15)(q11)   | n.a.       | n.a.   |
| 15*       | 232-02          | Down syndrome | Blut     | <i>de novo</i> | 48,XY,+21,+mar[22]         | inv dup(15)(q10)   | n.a.       | Starke <i>et al.</i> , 2003 Fall 23                              |
| 15*       | 427/98, Midi117 | N             | FW       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[32]/46,XY[3]    | der(15)(:p13->q11.2:)  | n.a.       | n.a.   |
| 15*       | 397/03          | P             | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar [100%]          | idic(15)(q11)  | n.a.       | n.a.   |
| 15*       | 056/03          | MR            | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar [32]            | idic(15)(q12)  | n.a.       | n.a.   |
| 15        | 076/03          | ?             | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar                 | r(15)(pter->q13.3-q21.1)                                     | n.a.       | n.a.   |
| 15*       | 033-03          | N             | FW       | n.a.           | 47,XX,+mar[29]/46,XX[4]    | inv dup(15)(q11.2-12)  | n.a.       | Liehr <i>et al.</i> , 2003                                       |
| 15*       | 115-03          | P             | Blut     | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[13]/46,XX[11]   | r(15)(:p11.1->q11.1::)                                       | n.a.       | n.a.   |
| 15        | 199-03          | ?             | FW       | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[20]             | r(15)(:q10q1?4::)  | n.a.       | n.a.   |
| 15        | 211-03          | F             | Blut     | n.a.           | 47,XX,+mar/46,XX           | idic(15)(q11.1)  | n.a.       | n.a.   |
| 15        | 2004099         | F             | Blut     | n.a.           | 47,XY,+mar[100%]           | inv dup(15)(q11.2~q12)                                       | n.a.       | n.a.   |
| 15        | 271-03          | N             | FW       | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar[30%]/46,XY[70%] | r(15)(:p11.1->q11.1::q11.2->q13::q13->q11.2::q11.1->p11.1::) | no UPD     | n.a.   |
| 15        | 280-03          | ?             | FW       | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[30%]/46,XX[70%] | idic(15)(q11.1)  | no UPD     | n.a.   |



| Chr. | Fall    | Klinik | Material | Vererbung | GTG-Ergebnis                      | FISH-Ergebnis  | UPD                              | Literatur  |
|------|---------|--------|----------|-----------|-----------------------------------|--|----------------------------------|--|
| 15   | 355/03  | N      | FW       | n.a.      | 47,XX,+mar[61%]/<br>46,XX[39%]    | min (15)(pter-<br>->q11.1:)  | n.a.                             | n.a.   |
| 15*  | 370-03  | PWS    | Blut     | de novo   | 47,XY,+mar[70%]/<br>46,XY[30%]    | min(15)(pter->q11.1)   | met<br>hyla<br>tion<br>test<br>+ | n.a.   |
| 15   | 2004103 | N      | FW       | de novo   | 47,XX,+mar [100%]                 | idic(15)(q11.1)  | no<br>UPD                        | n.a.   |
| 15   | 412/03  | N      | FW       | maternal  | 47,XY,+mar (NOR neg.)             | i(15)(q10)   | no<br>UPD                        | n.a.   |
| 15   | 2004046 | n.a.   | FW       | maternal  | 47,XY,+mar [mos?]                 | i(15)(q10)   | n.a.                             | n.a.   |
| 15   | 2004049 | n.a.   | Blut     | maternal  | 47,XY,+mar [mos?]                 | i(15)(q11.1)   | ?                                | n.a.   |
| 16   | 445/03  | (P)    | Blut     | de novo   | 47,XY,+mar[6%]/<br>46,XY[94%]     | min(16):(p11.1<br>->q11.1 or q11.1<br>->p11.1::p11.1<br>->q11.2:)  | n.a.                             | n.a.   |
| 16*  | 514-01  | N      | FW       | de novo   | 47,XY,+mar[16]/<br>46,XY[13]      | der(16):(p11.1<br>->q11.2:)  | no<br>UPD                        | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 24   |
| 16   | 132/03  | N      | FW       | de novo   | 47,XY,+mar[25]/<br>46,XY,+mar[28] | min(16)<br>(:p11.1->q12.1:)  | no<br>UPD                        | n.a.   |
| 17*  | 131/00  | F      | Blut     | de novo   | 47,XY,+mar[10]/<br>46,XY[5]       | min(17)<br>(:p11.2->q11.1:)  | n.a.                             | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 25   |
| 18*  | 283/01  | F      | Blut     | n.a.      | 47,XX,+mar[23]/<br>46,XX[17]      | min(18)<br>(:p11.21->q11.1:)   | n.a.                             | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 27   |
| 18*  | 211-02  | US     | FW       | de novo   | 47,XY,+mar[15]                    | min(18)<br>(:p11.1->q11.1:)  | no<br>UPD                        | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 26;<br><br>Liehr <i>et al.</i> 2003 -<br>Fall 1; |
| 18*  | 084/03  | MR/P   | Blut     | n.a.      | 47,XY,+i(18p)[15]                 | idic(18)<br>(:p11.21->q10:)  | n.a.                             | n.a.   |
| 18   | 240/99  | O      | Blut     | de novo   | 47,XX,+mar[15]                    | min(18)<br>(p11.1->q11.2)  | n.a.                             | n.a.   |
| 18   | 507/03  | US     | FW       | de novo   | 46,XX,r(18)/45,XX,-18             | 46,XX,r(18):(p11.32<br>->q?23:)[16]/<br>46,XX,r(18;18)<br>(:p11.32->q?23::<br>q?23->p11.32:)[12]/<br>46,XX,r(18;18)<br>(:p11.32->q?23::<br>p11.32->q?23:)[4]<br>/46,XX,min(18)<br>(:p11.21->q11.1:)[5]/<br>47,XX,-18,+min(18)<br>(:p11.21-q11.1:)<br>x2[1]/<br>47,XX,-18,+min(18)<br>(:p11.1-q11.1:):x2[1] | n.a.                             | n.a.   |
| 19*  | 390-01  | N?     | FW       | de novo   | 47,XX,+mar[45]/46,XX[10]          | min(19)<br>(:p12->q13.1:)  | n.a.                             | Starke <i>et al.</i> , 2003<br>Fall 28   |
| 19*  | 77/02   | (MR/P) | Blut     | de novo   | 47,XY,+mar                        | min(19)<br>(:p11->q13.11:)   | n.a.                             | n.a.   |
| 19   | 2004043 | n.a.   | Blut     | n.a.      | 48,XY,+2mar[mos?]                 | min(19)<br>(:p12->q12:):x2   | n.a.                             | n.a.   |
| 19   | 2004105 | n.a.   | FW       | n.a.      | 47,XX,+mar[10%]/<br>46,XX[90%].   | min(19):(p13.11<br>->q12:)   | n.a.                             | n.a.   |

| Chr. | Fall                  | Klinik  | Material   | Vererbung      | GTG-Ergebnis                     | FISH-Ergebnis   | UPD       | Literatur |
|------|-----------------------|---------|------------|----------------|----------------------------------|---|-----------|-----------|
| 19   | 413-03<br>265/00      | (abort) | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[38]/<br>46,XX[17]     | r(19)(:p13.11<br>->q13.11-12::)<br>[16]/r(19;19)<br>(:p13.11->q13.11<br>-12::p13.11<br>->q13.11-12::)[2]/<br>min(19)(:p13.11<br>->q13.11-12::)[5]   | n.a.      | n.a.      |
| 20*  | Eltern:<br>230 u. 231 | (MR/P)  | FW<br>Blut | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[20]                   | min(20)<br>(:p11.1->q11.1:)   | n.a.      | n.a.      |
| 20*  | 372/00                | N       | FW         | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar                       | min(20)<br>(:p?11.1->q11.1:)  | no<br>UPD | n.a.      |
| 20   | 2004056               | F       | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar[13](46,XX[2]          | mar1: min(20)<br>(:20p11.21<br>->20q11.21:)[5]/<br>mar2: min(20)<br>:20p11.1<br>->20q11.21:)[1]/<br>mar3: r(20)<br>(:20p11.1<br>->20q11.21:)[1]/<br>mar4: r(20)<br>(:20p11.1><br>20q11.21::20p11.1<br>->20q11.21:)[5]/<br>mar5: min(20)<br>(:20p11.1-<br>>20q11.21::20p11.2<br>1->20p11.1:)[7]/<br>mar6: inv dup(20)<br>(:20p11.1-20p11.21<br>::20q11.21-20p11.1<br>::20p11.1-20q11.21<br>::20p11.21<br>-20p11.1:)[1]/<br>mar7: inv dup(20)<br>(:20q11.1-20q11.21<br>::20p11.21-20q11.1<br>::20q11.1<br>>20p11.21:)[1]/mar8<br>: inv dup(20)<br>(:20q11.1-20q11.21<br>::20p11.21-20q11.1<br>::20q11.1-20p11.1:)<br>48 Chromosomen:<br>mar9: min(20)<br>(:20q11.1-20p11.21<br>::20q11.21<br>-20q11.1:)<br>+ mar4: r(20)<br>(:20p11.1-20q11.21<br>::20p11.1-20q<br>11.21:)[1] | n.a.      | n.a.      |
| 20   | 078/03                | ?       | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar                       | min(20)(:p11.2?2<br>->q11.1:)   | n.a.      | n.a.      |
| 21*  | 226/99                | N       | Blut       | <i>de novo</i> | 47,XX,+idic(21)(q10)[30]         | idic(21)(q10)   | n.a.      | n.a.      |
| 21*  | 236/98                | (F)     | FW         | <i>de novo</i> | 46,XX,-<br>21,+idic(21)(p10)[12] | idic(21)(p10)   | no<br>UPD | n.a.      |
| 21*  | 175-99                | F       | FW         | maternal       | 47,XX,+idic(21)(q10)[10]         | idic(21)(q10)   | n.a.      | n.a.      |
| 21*  | 079/03                | MR/P    | Blut       | n.a.           | 47,XY,+mar[5]/46,XY[15]          | min(21)<br>(pter->q11.2:)   | n.a.      | n.a.      |

| Chr.             | Fall    | Klinik | Material | Vererbung | GTG-Ergebnis   | FISH-Ergebnis   | UPD                                    | Literatur                   |
|------------------|---------|--------|----------|-----------|--|---|--|-----------------------------|
| 21*              | 227/03  | N      | FW       | de novo   | 47,XY,+mar<br>.ish der(21)(wcp21+,<br>D13Z1/D21Z1+[10]/<br>46,XY[11] | min(21)(p11.2q11.2)   | no<br>UPD                              | n.a.                        |
| 22*              | 368/99  | N      | FW       | maternal  | 47,XX,+mar[10]   | inv dup(22)(q11)  | n.a.                                   | n.a.                        |
| 22*              | 424/00  | N      | FW       | de novo   | 47,XX,+mar[10]   | inv dup(22)(q11.1)  | n.a.                                   | Starke et al., 2003 Fall 31 |
| 22/11*           | 332-02  | ?      | FW       | paternal  | 47,XY,+mar[10]   | der(22)t(11;22)<br>(q23.2;p11.2)  | mat<br>UPD<br>22<br>part.<br>UPD<br>11 | Starke et al., 2003 Fall 29 |
| 22/11*           | 164-03  | P      | Blut     | maternal  | 47,XY,+mar[10]   | der(22)t(11;22)<br>(q23.2;p11.2)  | n.a.                                   | n.a.                        |
| 22*              | 158-02  | N      | Blut     | de novo   | 46,XX[16]/47,XX,+mar[14]   | min(22)(:p13-q11.1:)  | no<br>UPD                              |                             |
| 22*              | 41-02   | N?     | FW       | paternal; | 47,XX,+mar[6]/46,XX[35]  | idic(22)(q11.2)[cep2<br>2+, cep14/22+,<br>Md54+, bK115F6+]/<br>der(22)(:p11.1<br>>q11.1:)[cep22+,cep<br>14/22-]/<br>der(22)(:p11.1q11.1:<br>)[cep22+, cep<br>14/22+]                    | n.a.                                   | Starke et al., 2003 Fall 33 |
| 22*              | 27-02   | N      | Blut     | de novo   | 47,XX,+mar[15]   | dic(22;22)(pter<br>->q11.1:q11.1->pter)   | n.a.                                   | n.a.                        |
| 22*              | 479-01  | N?     | FW       | de novo   | 47,XX,+mar [20]  | inv dup(22)(q11.1)  | n.a.                                   | n.a.                        |
| 22*              | 357-02  | N      | FW       | maternal  | 47,XY,+mar[10]   | i(22)(q10)  | no<br>UPD                              | Starke et al., 2003 Fall 32 |
| 22*              | 35-01   | CES    | Blut     | de novo   | 47,XY,+mar[20]   | der(22)del(q11.2)<br>dup(q11.2)   | n.a.                                   | Starke et al., 2003 Fall 30 |
| 22               | 341-03  | N?     | FW       | de novo   | 47,XX,+mar[25%]/<br>46,XX[75%]                                       | i(22)(q10)  | ?                                      |                             |
| 22               | 4-02    | N      | Blut     | de novo   | 47,XX,mar[11]/46,XX[39]  | min(22)(:p11.1<br>->q11:)   | mat<br>UPD<br>22                       | n.a.                        |
| 22 or<br>14      | 076-03  | N?     | FW       | de novo   | 47,XY,+mar [15]  | dic(22;22)(pter-<br>>q11.1:q11.1->pter)<br>or dic(14;22)(14pter-<br>>14q10:22q11.1<br>->22pter)   | no<br>UPD<br>14<br>/no<br>UPD<br>22    | n.a.                        |
| acro             | 2004068 | F      | Blut     | n.a.      | 47,XY,+mar[39]/46,XY[11]   | inv dup (acro)(p10)   | n.a.                                   | n.a.                        |
| 9 und<br>20      | 157-02  | US     | CV       | de novo   | 47,XX,+mar[3]/48,XX,<br>+2mar[12]                                    | min(9)(:p11->q11:)<br>and min(20)(p11.2-><br>q11.1)[16]/<br>min(9)(:p11<br>->q11:)[4] {cenM;<br>subcenM}  | n.a.                                   | Starke et al., 2003 Fall 34 |
| 10<br>und<br>18* | 415-02  | US     | FW       | de novo   | 46;XY[11]/47,XY,+mar[11]   | i(10)(:p11.1<br>->q11.1::p or q11.1<br>->q11.1 or<br>p11.1)[15]/i(10)(pter<br>->q11.21::q11.21<br>->pter) x2 (tetraploid<br>mitosis)[2]/min(18)(p<br>11.1->q11.1)[3]<br>{cenM; subcenM} | n.a.                                   | Starke et al., 2003 Fall 35 |

| Chr.               | Fall             | Klinik | Material                    | Vererbung      | GTG-Ergebnis   | FISH-Ergebnis  | UPD  | Literatur                           |
|--------------------|------------------|--------|-----------------------------|----------------|--|--|------|-------------------------------------|
| <b>+6x<br/>mar</b> | 247-01<br>/82-03 | MR     | Blut                        | <i>de novo</i> | 47-52,XY,mar1-6  | +r(1)(p11q12),+min(2),+min(5),+min(6),+min(12),+min(14/22) | n.a. | Vermeesch <i>et al.</i> , 1999      |
| <b>neo 12</b>      | 336-00           | PKS    | Fibroblasten/<br>Blut       | <i>de novo</i> | Fibro: 46,XX[41]/<br>47,XX,+mar[34]<br>Blut: 46,XX[75]/<br>47,XX,+mar[1] | +der(12)(pter->p12.3::p12.3->pter)                         | n.a. | Dufke <i>et al.</i> , 2001          |
| <b>neo 12</b>      | 2004045          | P/MR   | Blut                        | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar   | ?r(12)(pter->p13.33)                                       | n.a. |                                     |
| <b>neo 13</b>      | 191-02           | ?      | Blut                        | <i>de novo</i> | 47,XX,+mar/46,XX   | iace(13)(qter->q14::q14->qter)                             | n.a. |                                     |
| <b>neo</b>         | BD               | MR     | EBV-transformiert<br>(Blut) | <i>de novo</i> | 47,XY,+mar   | nicht identifizierbar !                                    | n.a. | Mackie Ogilvie <i>et al.</i> , 2001 |

## IX. Lebenslauf

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Name:                       | Heike Starke  |
| geboren:                    | 31.01.1971 in Wurzen  |
| Familienstand:              | ledig   |
| Adresse:                    | Wöllnitzer Straße 22; 07749 Jena  |
| Staatsangehörigkeit:        | deutsch   |
| Schulbildung:               |   |
| 1977-1984                   | Grundschule Staaken   |
| 1984-1986                   | Ernst-Thälmann-Oberschule Röcknitz  |
| 1986-1987                   | Diesterweg-Oberschule Wurzen  |
| 1987-1989                   | Erweiterte Oberschule Wurzen  |
|                             | Abschluß: Allgemeine Hochschulreife (Juli 1989)   |
| Berufsausbildung:           |   |
| 1989-1990                   | Vorpraktikum zur Fachschulbildung am VEG Tierzucht Nordhausen mit fachbezogenem Unterricht  |
| 1990-1992                   | Fachschulbildung zur Veterinär-medizinisch-technischen Assistentin an der Ingenieurschule für Veterinärmedizin Beichlingen (Abschluß Juli 1992)   |
| Hochschulausbildung:        |   |
| 1992-1998                   | Biologie-Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena   |
| 1994                        | Vordiplom   |
| 1994-1997                   | Hauptstudium mit Schwerpunkt Mikrobiologie<br>Nebenfächer: medizinische Mikrobiologie,<br>Anthropologie,<br>Ökologie  |
| 1995                        | 3-monatiger Studienaufenthalt in Bilbao, Spanien  |
| 1997-1998                   | Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller Universität Jena zum Thema: „Der Einsatz verschiedener Mikrosezierungs- und „reverse painting“ Verfahren zur molekularzytogenetischen Analyse von Chromosomen-anomalien“ |
| 03/1998                     | Abschluß des Studiums (Diplom)  |
| 10/1999                     | Beginn der Promotion am Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena  |
| Wissenschaftliche Laufbahn: |   |
| 03/1998-12/1998             | geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena  |
| 10/1998-09/2000             | Stipendium der Herbert Quandt Stiftung der Varta AG   |
| 04/1999-03/2000             | Stipendium der Madeleine-Schickedanz-KinderkrebsStiftung  |
| 04/2000-12/2000             | geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena  |
| 01/2001-04/2004             | wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena im Rahmen eines EU Projektes   |
| 01/2003-04/2003             | Forschungsaufenthalt am „Center for Human Genetics, U.Z. Gasthuisberg“ Leuven, Belgien bei Prof. Dr. JP Vermeesch finanziert durch ein Stipendium der „Marie Curie Fellowship Association“ (MCFA)   |

---

## X. Publikationsliste

### Publikationen

#### 1999

**P1. Starke H**, Schreyer I, Fiedler W, Beensen V, Heller A, Nietzel A, Chudoba I, Claussen U, Liehr T (1999). Molecular cytogenetic characterization of a prenatally detected supernumerary minute marker chromosome 8. *Prenatal Diagn.* 19:1169-1174

**P2.** Liehr T, **Starke H**, Beensen V, Kähler C, Harbich M, Brude E, Ziegler M, Claussen U (1999). Translocation trisomy dup(21q) and free trisomy 21 can be distinguished by interphase-FISH. *Int J Mol Med.* 3: 11-14

#### 2000

**P3.** Heller A, Seidel J, Hübler A, **Starke H**, Beensen V., Senger G, Rocchi M, Wirth J, Chudoba I, Claussen U, Liehr T (2000). Molecular cytogenetic characterization of partial trisomy 9q in a case with pyloric stenosis and a review of the literature. *J Med Genet.* 37: 529-532

**P4.** Nietzel A, Rocchi M, **Starke H**, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T. A new multicolor-FISH approach for the characterizations of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet*, 2000, Vol 108, pp 199-204.

**P5.** Stankiewicz P, Bocian E, Jakubów-Durska K, Obersztyn E, Lato E, **Starke H**, Mroczek K, Mazurczak T (2000). Identification of supernumerary marker chromosomes derived from chromosomes 5, 6, 19 and 20 using FISH. *J Med Genet.* 37: 114-120

#### 2001

**P6. Starke H**, Raida M, Trifonov V, Clement JH, Loncarevic IF, Heller A, Bleck C, Nietzel A, Rubtsov N, Claussen U, Liehr T (2001). Molecular cytogenetic characterization of an acquired supernumerary minute marker chromosome as sole abnormality in a case clinically diagnosed as Philadelphia negative chronic myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* 113: 435-438

**P7.** Liehr T, Beensen V, Hauschild R, Ziegler M, Hartmann I, **Starke H**, Heller A, Kähler C, Schmidt M, Reiber W, Hesse M, Claussen U (2001). Pitfalls of rapid prenatal diagnosis using the interphase nucleus. *Prenat Diagn.* 21: 419-421

**P8.** Liehr T, Heller A, **Starke H**, Claussen U. High-quality CGH slides irrespective of the lymphocyte suspension used. *Technical Tips Online* (<http://research.bmn.com/>)

**P9.** Mrasek K, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, **Starke H**, Rocchi M, Claussen U, Liehr T (2001). Reconstruction of the female *Gorilla gorilla* karyotype by Zoo-FISH using 25-color FISH and multicolor banding (MCB). *Cytogenet Cell Genet.* 93: 242-248

**P10. Starke H**, Senger G, Kossakiewicz M, Tittelbach H, Rau D, Rubtsov N, Trifonov V, Heller A, Hartmann I, Claussen U, Liehr T (2001). Maternal insertion of 18q11.2-q12.2 in 18p11.3 of the same chromosome analysed by microdissection and multicolour banding (MCB). *Prenat Diagn.* 21: 1049-1052

**P11.** Beensen V, Liehr T, Heller A, **Starke H**, Wiedehold M, Mühlig P, Ullmann P (2001). Three dimensional analysis of cell constituents. *micro info* 40-529 e/8.00, Carl Zeiss Microscopy Division (<http://www.zeiss.de/micro>)

**P12.** Dufke A, Walczak C, Liehr T, **Starke H**, Trifonov V, Rubtsov N, Schöning M, Enders H, Eggermann T (2001). Partial tetrasomy 12pter-12p12.3 in a girl with Pallister-Killian syndrome: extraordinary finding of an analphoid, inverted duplicated marker. *Europ J Hum Genet.* 9: 572-576

**P13.** Rump A, Kasper G, Hayes C, Wen G, **Starke H**, Liehr T, Lehmann R, Lagemann D, Rosenthal A (2001). Complex Arrangement of Genes within a 220-kb Region of Double-Duplicated DNA on Human 2q37.1. *Genomics*. 73: 50-55

**P14.** Stankiewicz P, Thiele H, Giannakudis I, Schlicker M, Baldermann C, Krüger A, Dörr S, **Starke H**, Hansmann I (2001). Kabuki syndrome-like features associated with a small ring chromosome X and XIST gene expression. *Am J Med Genet*. 102: 286-292

**P15.** Scheil S, Brüderlein S, Liehr T, **Starke H**, Herms J, Schulte M, Möller P (2001). Genome-wide analysis of sixteen chordomas by comparative genomic hybridization and cytogenetics of the first human chordoma cell line, U-CH1. *Genes Chr Cancer*. 32: 203-211

**P16.** Liehr T, Beensen V, **Starke H**, Hauschild R, Hempel E, Fritsche V, Hoppe C, Großwendt G, Prechtel M, Ziegler M, Claussen U, von Eggeling F (2001). Tetrasomy 21 due to a de novo Robertsonian translocation t(14;21) and an additional free trisomy 21. *Clin Genet*. 60: 83-86

## 2002

**P17.** Weise A, **Starke H**, Heller A, Claussen U, Liehr T (2002). Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis – a multicolor banding (MCB) analysis. *Int J Mol Med*. 9: 359-361

**P18.** Liehr T, Heller A, **Starke H**, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U (2002). Microdissection based high resolution multicolor banding (MCB) for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med*. 9: 335-339

**P19.** Liehr T, Schmidt M, **Starke H**, Ziegler M, Kittner G, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, Claussen U (2002). First case of trisomy 13 plus mosaic trisomy 1q. *Fet Diag Ther*. 17: 133-136

**P20.** Loncarevic IF, Römer J, **Starke H**, Heller A, Bleck C, Ziegler M, Fiedler W, Liehr T, Clement JH, Claussen U (2002). Heterogenic molecular basis for loss of ABL1-BCR transcription: Deletions in der(9)t(9;22) and variants of standard t(9;22) in BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia. *Genes Chr Cancer*. 34: 193-200

**P21.** Heller A, **Starke H**, Trifonov V, Rubtsov N, Wedding U, Loncarevic IF, Bleck C, Claussen U, Liehr T (2002). A complex translocation event between the two homologues of chromosomes 5 leading to a del(5)(q21q33) as a sole aberration in a case clinically diagnosed as CML - characterization of the aberration by multicolor banding (MCB). *In J Onc*. 20: 1179-1181

**P22.** Weise A, **Starke H**, Heller A, Tönnies H, Volleth M, Stumm M, Senger G, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (2002). Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterized by high resolution multicolor banding (MCB) and region specific FISH probes. *J Med Genet*. 39: 434-439

**P23.** Liehr T, Schreyer I, Neumann A, Beensen V, Ziegler M, Hartmann I, **Starke H**, Heller A, Nietzel A, Claussen U (2002). Two more possible pitfalls of rapid prenatal diagnostics using interphase nuclei. *Prenat Diagn*. 22: 497-499

**P24.** Liehr T, Weise A, Heller A, **Starke H**, Mrasek K, Kuechler A, Weier HU, Claussen U (2002). Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res*. 97:43-50

**P25.** **Starke H**, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, Behrend C, Sandig KR, Kelbova C, Senger G, Albrecht B, Hansmann I, Heller A, Claussen U, Liehr T (2002). Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet*. 10: 790-800

**P26.** v Eggeling F, Hoppe C, Bartz U, **Starke H**, Houge G, Claussen U, Ernst G, Kotzot D, Liehr T (2002) Maternal uniparental disomy 12 in a healthy girl with a 47,XX,+der(12)(:p11;q11:)/46,XX karyotype. *J Med Gen*. 39: 519-521

**P27.** Liehr T, Nietzel A, **Starke H**, Heller A, Weise A, Mrasek K, Claussen U (2002). Characterization of small human marker chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH) and high resolution multicolor banding (MCB). *ECA-newsletter*. 10: 3-8

**P28.** Steinhaeuser U, **Starke H**, Nietzel A, Lindenau J, Ullmann P, Claussen U, Liehr T (2002). Suspension S-FISH a new technique for interphase. *J Histochem Cytochem*. 50: 1697-1698

### 2003

**P29. Starke H**, Mitulla B, Nietzel A, Heller A, Beensen V, Grosswendt G, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T (2003). First patient with trisomy 21 accompanied by an additional der(4)(:p11 --> q11:) plus partial uniparental disomy 4p15-16. *Am J Med Genet*. 116: 26-30

**P 30.** Nietzel A, Albrecht B, **Starke H**, Heller A, Gillissen-Kaesbach G, Claussen U, Liehr T (2003). Partial hexasomy 15pter-->15q13 including *SNRPN* and D15S10: first molecular cytogenetically proven case report. *J Med Genet*. 40: e28

**P31.** Liehr T, **Starke H**, Heller A, Weise A, Beensen V, Senger G, Kittner G, Prechtel M, Claussen U, Seidel J (2003). Evidence for a new microdeletion syndrome in 15q21. *Int J Mol Med*. 11: 575-577

**P32.** Trifonov V, Seidel J, **Starke H**, Martina P, Beensen V, Ziegler M, Hartmann I, Heller A, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (2003). Enlarged chromosome 13 p-arm hiding a cryptic partial trisomy 6p22.2-pter. *Prenat Diagn*. 23: 427-430

**P33.** Heller A, Rubtsov N, Kytola S, Karamysheva TV, Sablina OV, Degtyareva MM, **Starke H**, Metzke H, Claussen U, Liehr T (2003). Highly complex karyotypic changes in acute myelogenous leukemia: a case report. *Int J Oncol*. 23: 139-143

**P34.** Mrasek K, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, **Starke H**, Claussen U, Liehr T (2003). Detailed *Hylobates lar* karyotype defined by 25-color FISH and multicolor banding (MCB). *Int J Mol Med*. 12: 139-46

**P35.** Seidel J, Heller A, Senger G, **Starke H**, Chudoba I, Kelbova C, Tönnies H, Neitzel H, Haase C, Beensen V, Zintl F, Claussen U, Liehr T (2003). A multiple translocation event in a patient with hexadactyly, facial dysmorphism, mental retardation and behavior disorder characterized comprehensively by molecular cytogenetics – Case report and review of the literature. *Eur J Pediatr*. 162: 582-588

**P36.** Liehr T, Ziegler M, **Starke H**, Heller A, Kuchler A, Kittner G, Beensen V, Seidel J, Häßler H, Müsebeck J, Claussen U. Conspicuous GTG banding results of the centromere near region can be caused by aliphoid DNA heteromorphism. *Clinical Genet*. 64: 166-167.

**P37. Starke H**, Mitulla B, Beensen V, Trifonov V, Rubtsov N, Heller A, Ziegler M, Neumann A, Claussen U, Liehr T (2003). First postnatal case of mosaic del(22)r(22). *Prenat Diag*. 23: 765-767

**P38.** Heller A, Trifonov V, Rubtsov N, Sauerbrey A, **Starke H**, Loncarevic IF, Claussen U, Liehr T (2003). Complex chromosomal rearrangements in a secondary acute myeloblastic leukemia after chemotherapy in TRAPS. *Oncol Reports*. 10: 1789-1792

**P39.** Heller A, Fricke HJ, **Starke H**, Loncarevic IF, Claussen U, Liehr T (2003). Characterization of a highly aberrant plasma cell leukemia karyotype: a case report. *Oncol reports*. 11(1): 89-92

**P40. Starke H**, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Kuchler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T (2003). Small supernumerary marker chromosomes (SMC): genotype – phenotype correlation and classification. *Hum Genet*. 114: 51-67

**P41.** Weise A, Heller A, **Starke H**, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T (2003). Multitude multicolor chromosome banding (mMCB)- a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet Genome Res*. 103: 34-39



- P42.** Liehr T, Nietzel A, **Starke H**, Heller A, Weise A, Kuechler A, Senger G, Ebner S, Martin T, Stumm M, Wegner R, Tönnies H, Hoppe C, Claussen U, von Eggeling F (2003). Characterization of small marker chromosomes (SMC) by recently developed molecular cytogenetic approaches. *J Ass Genet Techn.* 29: 5-10
- P43.** Bartels I, Schlueter G, Liehr T, von Eggeling F, **Starke H**, Glaubitz R, Burfeind P (2003). Supernumerary small marker chromosome (SMC) and uniparental disomy 22 in a child with confined placental mosaicism of trisomy 22: Trisomy rescue due to marker chromosome formation. *Cytogenet Genome Res.* 101: 103-105
- P44.** Houge G, Liehr T, Schoumans J, Ness GO, Solland K, **Starke H**, Claussen U, Strømme P, Åkre B, Vermeulen S (2003). Ten years follow up of a boy with a complex chromosomal rearrangement: Going from a > 5 to 15-breakpoint CCR. *Am J Med Genet.* 118A: 235-240
- P45.** Sauter S, von Beust G, Burfeind P, Weise A, **Starke H**, Liehr T, Zoll B (2003). Autistic disorder and chromosomal mosaicism 46,XY[123]/46,XY,del(20)(pter --> p12.2)[10]. *Am J Med Genet.* 120A: 533-536
- P46.** Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, **Starke H**, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, Navarro J, Benet J (2003). Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Europ J Hum Genet.* 11: 879-883
- P47.** Grasshoff U, Singer S, Liehr T, **Starke H**, Fode B, Schoning M, Dufke A (2003). A complex chromosomal rearrangement with a translocation 4;10;14 in a fertile male carrier: ascertainment through an offspring with partial trisomy 14q24-->1q22 and partial monosomy 4q27-->q28. *Cytogenet Genome Res.* 103: 17-23
- P48.** Liehr T, Nietzel A, Weise A, Mrasek K, von Eggeling F, Claussen U, **Starke H** (2003). A strategy for the characterization of small supernumerary marker chromosomes (SMC). *Balk J Med Gen.* 6: 69-72
- P49.** Weise A, Rittinger O, **Starke H**, Ziegler M, Claussen U, Liehr T (2003). De novo 9-break-event in one chromosome 21 combined with a microdeletion in 21q22.11 in a mentally retarded boy with short stature. *Cytogenet Genome Res.* 103: 14-16
- 2004**
- P50.** Liehr T, **Starke H**, Weise A, Lehrer H, Claussen U (2004). Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol.* 19: 229-237
- P51.** Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, **Starke H**, Ko E, Rademaker A, Navarro J, Benet J, Martin RH (2004). Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet.* 74: 521-531
- P52.** Liehr T, Hickmann G, Kozłowski P, Claussen U, **Starke H** (2004). Molecular-cytogenetic characterization of the origin and presence of pericentromeric euchromatin on minute supernumerary marker chromosomes (SMCs). *Chromosome Res.* 12: 239-244
- P53.** Liehr T, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, von Eggeling F, Claussen U, **Starke H** (2004). Characterization of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in human. *Current Genomics.* 5: 279-286
- P54.** Lehrer H, Weise A, Michel S, **Starke H**, Mrasek K, Heller A, Kuechler A, Claussen U, Liehr T (2004). GTG-dark bands split into dark and light sub-bands as demonstrated by multicolor banding (MCB). *Cytogenet Genome Res.* **In press**
- P55.** Weise A, **Starke H**, Mrasek K, Hameister H, Claussen U, Liehr T (2004). New insights into evolution of chromosome 1. *Cytogenet Genome Res.* **In press**
- P56.** Sanjmyatav J, Rubtsov N, Ilse B, Starke H, Schubert J, Hindermann W, Junker K (2004). Identification of tumor entities of renal cell carcinoma using interphase FISH. *Clinical Cancer Res.* **submitted**

## Review

**P57.** Liehr T, Heller A, **Starke H**, Claussen U (2002). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) banding methods - applications in research and diagnostic. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2: 217-225

## Buchbeiträge

**B1.** A Nietzel, A Heller, **H Starke**, T Liehr. Centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). In: FISH-Technology, Springer-labmanual, Springer, Berlin, 2002, pp 425-431, ISBN: 3-540-67276-1

**B2.** T Liehr, A Nietzel, M Rocchi, A Heller, **H Starke**, U Claussen, F v Eggeling. Centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH) followed by analysis for uniparental disomy - a useful tool in prenatal diagnosis. In: Early prenatal diagnosis, fetal cells and DNA in the mother - present state and perspectives. The Karolinum Press, Prag, 2002, pp 293-300, ISBN: 80-246-0397-7

## Kongressbeiträge:

### 1999

**K1.** Heller A, **Starke H**, Seidel J, Beensen V, Senger G, Rocchi M, Wirth J, Chudoba I, Claussen U, Liehr T (1999). Molecular cytogenetic characterization of a partial trisomy 9q to narrow down a putative critical region of a gene responsible for pyloric stenosis. *Med Genetik* 11: 166 (Abstractnr. P4-19)

**K2.** Liehr T, Heller A, **Starke H**, Wirth J, Senger G, Chudoba I, Rocchi M, Weier H-U, Claussen U (1999). High resolution multicolor banding (hrM-FISH) for human chromosome 13 using YAC libraries as probes. *Med Genetik* 11: 132 (Abstractnr. W11-4)

**K3.** Nietzel A, **Starke H**, Heller A, Senger G, Claussen U, Liehr T (1999). Centromere specific 24-color-FISH - a new approach for the characterization of marker chromosomes. *Med Genetik* 11: 132-133 (Abstractnr. W11-6)

**K4.** **Starke H**, Schreyer I, Fiedler W, Beensen V, Heller A, Chudoba I, Claussen U, Liehr T (1999). Alternative strategy for the molecular characterization of small marker chromosomes in prenatal cases. *Med Genetik* 11: 174 (Abstractnr. P4-56)

**K5.** Heller A, **Starke H**, Ziegler M, Loncarevic I F, Claussen U, Liehr T (1999). Ist der Ausschluß eines Sub-Klones mit numerischen Veränderungen der Chromosomen 7 und/oder 8 mittels FISH bei der ALL von Relevanz? Abstractband der 12. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung

**K6. (o) Starke H**, Heller A, Ziegler M, Loncarvic I F, Claussen U, Gebhart E, Liehr T (1999). Eine neue Dreifarbf-FISH-Methode zur Verlaufskontrolle Ph-positiver CML-Fälle nach gegengeschlechtlicher KMT. Abstractband der 12. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung

**K7.** Liehr T, **Starke H**, Loncarvic I F, Heller A, Ziegler M, Claussen U (1999). Einsatz der p53 FISH-Sonde zur Prognosedifferenzierung bei Leukämien. Abstractband der 12. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung

**K8.** Liehr T, **Starke H**, Heller A, Wirth J, Senger G, Chudoba I, Rocchi M, Claussen U (1999). Multicolor banding (MCB) of human chromosome 13 based on region specific YAC clones and microdissection libraries. *Cytogenet Cell Genet*. 85: 30 (Abstractnr. O 099)

**K9.** Nietzel A, **Starke H**, Heller A, Fiedler W, Senger G, Gebhart E, Rocchi M, Claussen U, Liehr T (1999). Characterization of small marker chromosomes by centromere specific 24-color FISH. *Cytogenet Cell Genet*. 85: 40 (Abstractnr. P 142)

**K10.** Heller A, **Starke H**, Loncarevic IF, Senger G, Chudoba I, Claussen U, Liehr T. Characterization of a highly aberrant plasmocytoma case with 24-color FISH, CGH, multicolor banding (MCB) and region specific FISH probes. *Cytogenet Cell Genet*. 85: 72 (Abstractnr. P 280)

**K11. Starke H**, Heller A, Seidel J, Beensen V, Senger G, Stumm M, Wirth J, Kearney L, Claussen U, Liehr T (1999). Molecular cytogenetic characterization of the region 2q37 in patients suffering from brachydactyly E. *Cytogenet Cell Genet.* 85: 166 (Abstractnr. P 704)

**K12. Starke H**, Rump A, Seidel J, Beensen V, Stumm M, Wirth J, Heller A, Claussen U, Liehr T (1999). Molecular cytogenetic characterization of the chromosomal region 2q37 in patients suffering from brachydactyly E including probes for the putative candidate gene LOBO1. *Am J Hum Genet.* 65: A358 (Abstractnr. 2023)

**K13.** Heller A, **Starke H**, Loncarevic IF, Senger G, Chudoba I, Claussen U, Liehr T (1999). Molecular cytogenetic characterization of a highly aberrant plasmocytoma case with 24-color FISH, CGH, multicolor banding (MCB) and region specific FISH probes. *Am J Hum Genet.* 65: A130 (Abstractnr. 695)

**K14.** Liehr T, Heller A, **Starke H**, Lemke J, Wirth J, Senger G, Chudoba I, Rocchi M, Claussen U (1999). Multicolor banding (MCB) of human chromosomes 1, 5 and 13 based on region specific YAC clones and microdissection libraries. *Am J Hum Genet.* 65: p A9 (Abstractnr. 39)

## 2000

**K15.** Rubtsov N, Karamysheva T, Babochkina T, Zhdanova N, Trifonov V, **Starke H**, Heller A, Junker K, Liehr T, Claussen U (2000). A new simple version of chromosome microdissection tested by probe generation for 24-multi-color FISH, multi-color banding (MCB), ZOO-FISH and in clinical diagnostics. *Med Genetik* 12: 65 (Abstractnr. W12-4)

**K16.** Nietzel A, Wlodarska I, Heller A, **Starke H**, Gebhart E, Rautenstrauss B, Rocchi M, Hagemeyer A, Claussen U, Liehr T (2000). Amplification of centromeric satellite DNA in marker chromosomes with homogeneously staining regions (HSR) identified by centromere-specific 24-color FISH. *Med Genetik* 12: 61 (Abstractnr. W9-5)

**K17.** Heller A, **Starke H**, Trifonov V, Rubtsov N, Lemke J, Wirth J, Senger G, Chudoba I, Rocchi M, Claussen U, Liehr T (2000). Multicolor banding (MCB) of human chromosomes based on region specific YAC clones and/or microdissection libraries. *Med Genetik* 12: 92 (Abstractnr. P-I-2.3)

**K18.** Ziegler M, Schmidt A, Nietzel A, **Starke H**, Heller A, Senger G, Claussen U, Liehr T. Identification and molecular characterization of a prenatally detected maternally inherited supernumerary small ring chromosome 8p. *Med Genetik* 12: 100 (Abstractnr. P-I-4.6).

**K19.** Schreyer I, Beensen V, Eichhorn KH, Heller A, Liehr T, Schulze E, **Starke H**, Claussen U (2000). Detection of a small unbalanced 1/17 translocation in a mentally retarded and dysmorphic child via chromosome analysis of the parents. *Med Genetik* 12: 101-102 (Abstractnr. P-I-4.13)

**K20.** Liehr T, Nietzel A, Heller A, **Starke H**, Trifonov V, Rocchi M, Fiedler W, Claussen U (2000). A new M-FISH technique: centromere specific 24-color FISH (cenM-FISH). *Proceedings of the First Euroconference on quantitative molecular cytogenetics*, Italien, Bari: 36-38

**K21.** Loncarevic IF, **Starke H**, Heller A, Bleck C, Ziegler M, Fiedler W, Liehr T, Clement HJ, Kelbova C, Claussen U (2000). BCR-ABL positive but ABL-BCR negative chronic myeloid leukemia (CML) result from a deletion in chromosome der(9)t(9;22) and from BCR-ABL formation by gene insertion. *Onkologie* 23/S7: 134 (Abstractnr. 0508)

**K22. Starke H**, Rocchi M, Weier H-U, Heller A, Niemann R, Pfeiffer RA, Claussen U, Liehr T (2000). Multicolor banding (MCB) of human chromosome 22 - application of the probe mix for the characterization of "cat eye chromosome" inv dup(22)(q11). *Europ J Hum Genet.* 8 Suppl 1: 87 (Abstractnr. P-295)

**K23.** Heller A, Nietzel A, Rocchi M, Fiedler W, **Starke H**, Claussen U, Liehr T (2000). Centromere specific multi-color FISH (cenM-FISH) - a new and rapid method for the identification of marker chromosomes. *Europ J Hum Genet.* 8 Suppl 1: 87 (Abstractnr. P-294)

**K24.** Heller A, Nietzel A, Rocchi M, **Starke H**, Fiedler W, Claussen U, Liehr T (2000). The identification of marker chromosomes with a new multi-color FISH technique specific for centromeres. *Cell Mol Biol.* 46 (Abstractnr. 90)

## 2001

**K25.** Mrasek K, Heller A, **Starke H**, Trifonov V, Rubtsov N, Wedding U, Loncarevic I, Bleck C, Claussen U, Liehr T (2001). Complex translocation between the two homologue chromosomes 5 in CML - characterization of the aberration by multicolor banding (MCB). *Europ J Hum Genet.* 9/S1: 132 (Abstractnr. P0164)

**K26.** Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, **Starke H**, Loncarevic IF, Claussen U, Liehr T (2001). Characterization of complex aberrant leukemia cases by means of multicolor banding (MCB). *Europ J Hum Genet.* 9/S1: 133-134 (Abstractnr. P0171)

**K27.** Kuechler A, Michel S, Pool-Zobel B, Schäferhenrich A, Heller A, **Starke H**, Trifonov V, Rubtsov N, Claussen U, Liehr T (2001). Characterization of the colon cell line HT29 clone 19A by means of GTG-banding, 24-color FISH and multicolor banding (MCB). *Europ J Hum Genet.* 9/S1: 138 (Abstractnr. P0193)

**K28.** Liehr T, Heller A, **Starke H**, Weise A, Mrasek K, Trifonov V, Rubtsov N, Claussen U (2001). Multicolor banding (MCB) of all human chromosomes based on region specific microdissection libraries. *Europ J Hum Genet.* 9/S1: 138 (Abstractnr. P0207)

**K29.** Beensen V, Liehr T, Heller A, **Starke H**, Wiederhold M, Mühlig P, Ullmann P (2001). Ultrastructure analyses on human chromosomes in the interphase and mitosis of the cell cycle with the laser scanning microscop LSM 510. *Europ J Hum Genet.* 9/S1: 141-142 (Abstractnr. P0209)

**K30.** Weise A, **Starke H**, Volleth M, Stumm M, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, Rocchi M, Mrasek K, Claussen U, Liehr T (2001). Chromosome 2 rearrangements precisely characterized by multicolor banding (MCB) and simultaneously with region specific probes. *Europ J Hum Genet.* 9/S1: 142 (Abstractnr. P0212)

**K31.** Claussen U, Lemke J, Claussen J, Chudoba I, Trifonov V, Rubtsov N, **Starke H**, Heller A, Sperling K, Liehr T (2001). Chromosomes in interphase are similar to metaphase chromosomes. *Europ J Hum Genet.* 9/S1: 144 (Abstractnr. P0221)

**K32.** **Starke H**, Senger G, Kossakiewicz M, Tittelbach H, Rubtsov N, Trifonov V, Heller A, Claussen U, Liehr T (2001). Maternal insertion of 18q11.2-q12.2 in 18p11.3 leading to recurrent unbalanced translocations in the offspring detected by microdissection and multicolor banding (MCB). *Europ J Hum Genet.* 9/S1: 152 (Abstractnr. P0265)

**K33.** Hartmann I, **Starke H**, Nietzel A, Von Eggeling F, Heller A, Rocchi M, Beensen V, Mitulla B, Claussen U, Liehr T (2001). Characterization of a small supernumerary marker chromosome by centromere specific multicolor-color FISH (cenM-FISH): case report. *Europ J Hum Genet.* 9/S1: 142 (Abstractnr. P0210)

**K34.** Hauschild R, Beensen V, Heller A, **Starke H**, Liehr T (2001). Suspicion on triple - X - syndrome in rapid prenatal FISH diagnosis on uncultivated amniotic fluid cells: Problems and pitfalls for genetic counselling. *Europ J Hum Genet.* 9/S1: 255-256 (Abstractnr. P0800)

**K35.** Claussen U, Lemke J, Claussen J, Heller A, **Starke H**, Trifonov V, Rubtsov N, Sperling K, Liehr T (2001). Chromosome dynamics in vivo. *Ann Genet.* 44/S1: p17

**K36.** Mrasek K, Heller A, **Starke H**, Rocchi M, Trifonov V, Rubtsov N, Claussen U, Liehr T (2001). Human multicolor banding (MCB) probes applied for ZOO-FISH in Gorilla gorilla. *Ann Genet.* 44/S1: 33 (Abstractnr. 1-035)

**K37.** Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, **Starke H**, Loncarevic IF, Claussen U, Liehr T (2001). Characterization of complex aberrant leukemias by means of multicolor banding (MCB). *Ann Genet.* 44/S1: 112 (Abstractnr. 2-384)

---

**2002**

- K38.** Dufke A , Stötter M, **Starke H**, Liehr T (2002). Pure trisomy 12pter-12p11.21 in a girl with X-autosomal translocation: minor congenital anomalies and moderate developmental delay. *Med Genetik.* 14: 285 (Abstractnr. P1-04-16)
- K39.** Hartmann I, **Starke H**, Mitulla B, Beensen V, Heller A, Claussen U, Liehr T (2002). Mosaic del(22)/r(22): characterization of the derivative chromosomes by multicolor banding (MCB) and region specific probes. *Med Genetik.* 14: 335 (Abstractnr. P2-19-08)
- K40.** Heller A, Albrecht B, Nietzel A, **Starke H**, von Eggeling F, Claussen U, Liehr T (2002). Characterization of two small supernumerary marker chromosomes by acro/cenM-FISH – first case with partial hexasomy 15pter->15q13. *Med Genetik.* 14:
- K41.** Beensen V, Liehr T, Heller A, **Starke H** (2002). Confocal laser scanning microscopy on the cytoskeleton and human chromosomes after immunostaining, multicolour FISH and Feulgen reaction. *Med Genetik.* 14: 292 (Abstractnr. P1-07-08)
- K42.** Heller A, Albrecht B, Nietzel A, **Starke H**, von Eggeling F, Claussen U, Liehr T (2002). Characterization of two small supernumerary marker chromosomes by acro/cenM-FISH – first case with partial hexasomy 15pter->15q13. *Med Genetik.* 14: 334 (Abstractnr. P2-19-03)
- K43.** Liehr T, Nietzel A, Oliver Bonet M, **Starke H**, Heller A, Weise A, von Eggeling F, Claussen U (2002). Characterization of human small marker-chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH) and high resolution multicolor banding (MCB). *Med Genetik.* 14: 253 (Abstractnr. W2-03)
- K44. (o) Starke H**, Heller A, Weise A, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (2002). A new subcentromeric probe set for the characterization of centromere-near rearrangements. *Med Genetik.* 14: 262 (Abstractnr. W11-04)
- K45.** Steinhaeuser U, **Starke H**, Nietzel A, Lindenau J, Ullmann P, Claussen U, Liehr T (2002). Suspension fluorescence in situ hybridization (S-FISH) – a versatile technique for interphase analyses. *Med Genetik.* 14: 334 (Abstractnr. P2-19-02)
- K46.** Kuechler A, Weise A, Michel S, Pool-Zobel B, Schaeferhenrich A, Heller A, **Starke H**, Wendt TG, Claussen U, Liehr T (2002). Precise characterization of chromosomal rearrangements of the colon cancer cell line HT29 clone 19A by multicolor banding (MCB). *Europ J Hum Genet.* 10 Suppl. 1: 87 (Abstractnr P0064)
- K47.** Weise A, **Starke H**, Heller A, Claussen U, Liehr T (2002). Reexamination of chromosome 2 rearrangements characterized by multicolor banding (MCB) by region-specific FISH probes *Europ J Hum Genet.* 10 Suppl. 1: 94 (Abstractnr P0097)
- K48.** Liehr T, Heller A, **Starke H**, Weise A, Mrasek K, Trifonov V, Rubtsov N, Claussen U (2002). Multicolor banding (MCB) - a versatile tool for characterization of exact chromosomal breakpoints. Abstracts of the HGM (*Human Genome Meeting*) 14.-17.04.2002, Schanghai, China, p 63 (Abstractnr. 80)
- K49. (o) Starke H**, Weise A, Nietzel A, Heller A, Claussen U, Liehr T (2002). A new probe set for the characterization of centromere-near rearrangements. *Europ J Hum Genet.* 10 Suppl. 1: 147 (Abstractnr P0346)
- K50.** Liehr T, Nietzel A, **Starke H**, Heller A, Weise A, Mrasek K, Claussen U (2002). Straight-forward characterization of small human marker-chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH), high resolution multicolor banding (MCB) and analysis for uniparental disomy (UPD). *The Scand J Clin And Lab Investig.* 62 Supp 236, pp 19-20
- K51.** Hoppe C, Kotzot D, Langer S, **Starke H**, Liehr T, Ziegler M, Weise A, Ernst G, v Eggeling F (2002). Pitfalls in prenatal diagnosis of a supernumerary marker chromosome and exclusion of uniparental disomy. *Med Genetik* 14, p 356 (Abstractnr. P2-2703)

**K52.** Erlecke J, Hartmann I, **Starke H**, Liehr T, Claussen U, Sayer HG, Loncarevic IF (2002). Molecular cytogenetic discrimination between tumor and non tumor recipient cells below 5% after sex-mismatched allogenic stem cell transplantation. *Annals of Hematology*. Supl 2 81: S56 (Abstractnr. 3).

### 2003

**K53. (o) Starke H**, Trifonov V, Seidel J, Beensen V, Heller A, Claussen U, Liehr T (2003). Enlarged chromosome 13 p-arm hiding a cryptic partial trisomy 6p22.2-pter. *Europ J Hum Genet*. 11 Suppl 1: 297 (Abstractnr. P297)

**K54.** Stefanova M, **Starke H**, Krastev T, Seeger D, Petrov A, Liehr T, Marichkov D (2003). De novo complex chromosomal rearrangement with six breakpoints in a rhizomelic mentally retarded child: molecular cytogenetic study. *Europ J Hum Genet*. 11 Suppl 1: 123-124 (Abstractnr. P289)

**K55.** Steinhäuser U, **Starke H**, Trifonov V, Seidel J, Beensen V, Heller A, Claussen U, Liehr T (2003). Enlarged chromosome 13 p-arm hiding a cryptic partial trisomy 6p22.2-pter. *Med Genetik* 15: 302 (Abstractnr. P-036)

**K56.** Bartels I, Schlüter G, Liehr T, v Eggeling F, **Starke H**, Glaubitz R, Burfeind P (2003). A child with supernumerary small marker chromosome and uniparental disomy 22 due to trisomy rescue. *Med Genetik* 15: 312 (Abstractnr. P-082)

**K57.** Mrasek K, Weise A, **Starke H**, Claussen U, Liehr T (2003). A repetitive sequence present in human chromosome 1q21, 1p12 and 1p36.1 lead to new insights into the evolution of chromosome 1 and its homologues in human and 4 ape species. *Med Genetik* 15: 315 (Abstractnr. P-098)

**K58. Starke H**, Weise A, Nietzel A, Kuechler A, Heller A, Claussen U. (1), Liehr T (2003). Subcentromeric FISH defines up to present hardly characterizable centromere-near rearrangements. *Med Genetik* 15: 315 (Abstractnr. P-099)

**K59.** Liehr T, **Starke H**, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Kuechler A, Claussen U, von Eggeling F (2003). Small supernumerary marker chromosomes (SMC): genotype-phenotype correlation and classification. *Med Genetik* 15: 301-302 (Abstractnr. P-035)

**K60.** Weise A, **Starke H**, Mrasek K, Heller A, Kuechler A, Claussen U, Liehr T (2003). Multicolor-banding (MCB) for all human chromosomes in one hybridization step with a resolution of 450 bands or more. *Med Genetik* 15: 273 (Abstractnr. W2 01)

**K61.** Weise A, **Starke H**, Mrasek K, Claussen U, Liehr T (2003). Studies on a repetitive sequence present in human chromosome 1q21, 1p12 and 1p36.1 lead to new insights into the evolution of chromosome 1 and its homologues in human and 4 ape species. *Europ J Hum Genet*. 11 Suppl 1: 135 (Abstractnr. P342)

**K62.** Lehrer H, Weise A, Michel S, **Starke H**, Mrasek K, Heller A, Kuechler A, Claussen U, Liehr T (2003). Giemsa-dark bands split into dark and light subbands as demonstrated by multicolor banding (MCB). *Med Genetik* 15: 274 (Abstractnr. W2 04)

**K63.** Kuechler A, **Starke H**, Mrasek K, Ziegler M, Kelbova C, Kuepferling P, Claussen U, Liehr T (2003). Prenatal diagnosis of a duplication in 22q11.21 led to the identification of a trisomy 22q11.21 in three generations without clinical findings. *Med Genetik* 15: 301 (Abstractnr. P-034)

**K64.** Benet J, Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, **Starke H**, Liehr T, Guitiérrez C, Sánchez J, Arango O, Egozcue J, Navarro J (2003). Multiprobe FISH characterisation of a dicentric Yq (p11.32) isochromosome in an azoospermic male. *Annales de Génétique*. 46: 181 (Abstract No 4.8.)

**K65.** Lefort G, Chaze AM, Weise A, Liehr T, **Starke H**, Pellestor F, Claustre M, Sarda P (2003). Partial trisomy 20q11.2 characterized by FISH in a child with dysmorphic features and developmental delay. *Annales de Génétique*. 46: 245-246 (Abstract No 7.53.)

---

**2004**

**K66.** Weise A, **Starke H**, Mrasek K, Karst C, Kuechler A, Claussen U, Liehr T (2004). Multicolor-banding (MCB) for all human chromosomes in one hybridization Stepp with a resolution of 450 bands or more. Med Genetik 16: 108 (Abstractnr. P06-017)

**K67.** Mrasek K, Kuechler A, **Starke H**, Ziegler M, Kuepferling P, Claussen U, Liehr T (2004). Prenatal diagnosis of a duplication in 22q11.21 led to the identification of a trisomy 22q11.21 in three generations without clinical findings. Med Genetik 16: 96 (Abstractnr. P01-004)

**K68. (o) Starke H**, Liehr T, Weise A, Heller A, Mrasek K, Kuechler A, Claussen U, v Eggeling F (2004). Small supernumerary marker chromosomes (SMC) and new FISH methods for their chracterization. Med Genetik 16: 106 (Abstractnr. P06-010)

**K69.** Steinhaeuser U, **Starke H**, Claussen U, Liehr T (2004). Suspension fluorescence in situ hybridization (S-FISH) – a handy technique for interphase analyses. Med Genetik 16: 107 (Abstractnr. P06-011)

---

## XI. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, in der Arbeitsgruppe „Molekulare Zytogenetik“ unter Leitung von Dr. rer. nat. T. Liehr angefertigt.

Besonderer Dank gilt daher Dr. Thomas Liehr für die sehr gute Betreuung, ständige Unterstützung in Form von Ideen und Ratschlägen während dieser Zeit und für die Korrektur des Manuskriptes.

Für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena, sowie für Anregungen und Diskussionen bezüglich des Themas und die Durchsicht des Manuskriptes möchte ich Prof. Dr. Uwe Claussen danken.

Ganz herzlich möchte ich allen Mitgliedern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Molekulare Zytogenetik“ für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die Motivation und die vielen Ideen und Ratschläge zur Lösung großer und kleiner Probleme danken. Namentlich möchte ich hier nennen: Dr. Alma Küchler, Isabell Hartmann, Dr. Ivan Loncarevic, Ulf Steinhäuser, Heike Lehrer, Constanze Karst, Sabine Schmidt, Madeleine Groß und Melanie Glaser.

Die Mitarbeiter, denen ich besonderen Dank schulde, sind Monika Ziegler und Kristin Mrasek, die mich wesentlich bei der Charakterisierung der kleinen Markerchromosomen unterstützt haben, Anja Weise für die gewissenhafte Bearbeitung des YAC/BAC MCB 2 im Rahmen ihrer Diplomarbeit, Dr. Angela Nietzel und Dr. Maria Oliver-Bonet für die Entwicklung und Optimierung des cenM-FISH und des acro-cenM-FISH,

Dr. Vladimir Trifonov, Prof. Dr. Nikolai Rubtsov, Prof. Dr. Uwe Claussen und Dr. Anita Heller danke ich für ihren motivierten Einsatz bei der Entwicklung des Mikrosezierungs-basierenden MCB.

Für die Anfertigung einer Vielzahl von Ganz- oder Teilchromosomensonden mittels Mikrosezierungs möchte ich Dr. Gabriele Senger danken.

Großer Dank gilt auch Constanze Hoppe und Heike Thieme aus der Arbeitsgruppe „Molekulargenetik“ unter Leitung von PD Dr. Ferdinand von Eggeling, für die Durchführung der UPD-Analysen.

Desweiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena für die Bereitstellung von Sonden, die Aufarbeitung von Untersuchungsmaterial und für ihre gute Zusammenarbeit in allen Bereichen danken.

Prof. Dr. J. P. Vermeesch, vom Universitätsklinikum Gasthuisberg UZ Leuven, Belgien danke ich für die Möglichkeit der Durchführung eines Teils der Bruchpunktanalysen und für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe.

*Ganz besonders herzlich möchte ich meiner Familie und Familie Steinhäuser für die unaufhörliche Motivation und das Verständnis auch für Frustrationsphasen, sowie für die Korrektur des Manuskriptes und die Betreuung des PCs danken.*

*Mein größter Dank gilt aber Ulf Steinhäuser, der mich während der Zeit der Anfertigung dieser Arbeit stets liebevoll unterstützt und motiviert hat.*



Des weiteren möchte ich folgenden externen Einsendern für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials danken:

- Dr. B. Albrecht, Institut für Humangenetik, Essen
- Dr. N. Apeshiotis, FA für Humangenetik, Braunschweig
- Dr. I. Bartels, Institut für Humangenetik, Göttingen
- Dr. O. Bartsch, Institut für Klinische Genetik, Dresden
- Dr. U. G. Bartz, Institut für Humangenetik, Georg-August-Universität Göttingen
- Dr. U. Bartz, FA für Humangenetik, Berlin
- Dr. M. Baum, Thüringen-Klinik/Gynäkologie, Saalfeld
- Dr. C. Behrend, Medizinische Genetik, Düsseldorf
- Dr. B. Belitz, Dr. L. Pfeiffer, Praxis für Medizinische Genetik, Berlin
- Dr. E. Brude; Institut für Humangenetik-Poliklinik, Frankfurt am Main
- Dr. C. Daumer-Haas, Pränatal-Medizin München
- Dr. S. Demuth, FA für Humangenetik, Erfurt
- Dr. du Bois, Institut für Chromosomendiagnostik und genetische Beratung, Böblingen
- Dr. A. Dufke, Institut für Humangenetik, Abt. Medizinische Genetik, Tübingen
- Dr. H. Enders, Universitätsklinikum, Abt. Klinische Genetik, Tübingen
- Dr. W. Engel, Dr. G. v. Beust, Institut für Humangenetik der Universität Göttingen
- Dr. H. Engels, Institut für Humangenetik, Bonn
- Dr. Gilessen-Kaesbach, Institut für Humangenetik, Essen
- Dr. J. Götz, Partnerschaft Humangenetische Beratung und Diagnostik, Wetzlar
- Dr. J. Gregori, *Department of Medical Genetics Ljubljana*, Slowenien
- Dr. O. Haas, St. Anna Kinderspital, Wien
- Dr. I. Hansmann, Institut für Humangenetik, Halle
- Dr. U. Hehr, FA für Humangenetik, Regensburg
- Dr. H. Heilbronner, Frauenklinik des Olgahospitals, Stuttgart
- Dr. M. Hesse, Südharz-Krankenhaus gGmbH, Nordhausen
- Dr. Hickmann, Pränatal-Medizin und Genetik, Düsseldorf
- Dr. Kähler, Dr. Starker, Dr. Schlußner, Universitäts-Frauenklinik, Jena
- Dr. Karamfilov, Universitäts-Hautklinik, Jena
- Dr. Ch. Kelbova, Praxis Dr. Küpferling, Cottbus
- Dr. G. Kistner, Labor für Humangenetische Diagnostik, Schwerin
- Dr. W. Klein, Praxis Dr. Klein, Butzbach
- Dr. U. Koehler, Medizinisch Genetisches Zentrum München, Abt. Zytogenetik
- Dr. H. Körner, Charité, Berlin
- Dr. D. Kotzot, Institut für Medizinische Biologie und Humangenetik, Innsbruck
- Dr. C. Löffler, Klinikum Chemnitz gGmbH, Medizinische Genetik
- Dr. C. Mackie-Ogilvie, *Division of Medical and Molecular Genetics*, Guy's Hospital, London, UK
- Dr. T. Martin, Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes, Homburg
- Dr. Mazauric, Praxis Dr. Kozlowski, Düsseldorf
- Dr. P. Miny, Abt. Medizinische Genetik, Basel, Schweiz
- Dr. D. Missbach, Dr. C. Altus, Praxis für Medizinische Genetik, Magdeburg
- Dr. Mitulla, Genetische Beratungsstelle Zentralklinikum, Suhl
- Dr. A. Polytiko, *Institute of Hereditary disease*, Minsk, Belarus
- Dr. B. Prager, Dr. A. Junge, Praxis für Medizinische Genetik, Dresden
- Dr. M. Pruggmeyer, FA für Frauenheilkunde und Medizinische Genetik, Peine
- Dr. Ch. Ramel, Gemeinschaftspraxis Decker/Steinbeck, Mainz
- Dr. Raida, Dr. Clement, Klinik für Innere Medizin II, Jena
- Dr. Reiber, Frauenarztpraxis, Jena
- Dr. O. Rittinger, Klinische Genetik, St. Johannis-Spital, Salzburg
- Dr. L. Rodriguez, *Instituto de Salud Carlos III*, Madrid, Spanien
- Dr. K. Sandig, Praxis für Medizinische Genetik, Leipzig
- Dr. M. Schmidt, Zentralklinikum Suhl gGmbH
- Dr. I. Schreyer, Dr. A. Küchler, (Dr. R. Hauschild) Inst. für Humangenetik, Jena
- Dr. Schulze, Dr. Schmidt, FA für Humangenetik, Hannover
- Dr. G. Senger, Praxis f. Medizinische Genetik und Gynäkologie, Regensburg
- Dr. J. Seidel, Kinderklinik der FSU, Jena
- Dr. Spranger, Praxis für Humangenetik, Klinikum Bremen-Mitte
- Dr. G. Thiel, Institut für Medizinische Genetik, Charité, Berlin
- Dr. H. Tittelbach, Dr. S Neubauer, Gemeinschaftspraxis Dr. Kossakiewicz, Nürnberg
- Dr. Trappe, Dr. Burfeind, Institut für Humangenetik, Göttingen
- Dr. U. Trautmann, Institut für Humangenetik, Erlangen
- Dr. H. Tönnies, Institut für Humangenetik, Charité Campus, Berlin

- 
- Dr. J. P. Vermeesch, Universitätsklinikum Gasthuisberg UZ, Leuven, Belgien
  - Dr. L. und J. Viethen, FA für Kinder- und Jugendmedizin, Berchtesgaden
  - Dr. M. Volleth, Institut für Humangenetik, Universitäts-Klinikum, Magdeburg
  - Dr. R.-D. Wegner, Dr. M. Stumm, Medizinische Genetik, Partnerschaft Kurfürstendam, Berlin
  - Dr. D. Wieczorek, Institut für Humangenetik Universitäts-Klinikum Essen
  - Dr. K. Witzl, *Division of Med. Genetics*, University Ljubljana, Slowenien
  - Dr. M. Zankl, Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes, Homburg

Für die Überlassung der verschiedenen YAC/BAC/PAC oder Cosmid Sonden danke ich:

- Dr. L. Kearney, London, UK
- Dr. H. Engels, Bonn
- Dr. M. Rocchi, Bari, Italien
- Dr. J. Wirth, Berlin
- Dr. U. Weier, San Francisco, USA
- Dr. N. Carter, Oakland, USA

Für die finanzielle Unterstützung während der Zeit der Erstellung der vorliegenden Arbeit möchte ich mich bedanken bei:

- Der „Herbert Quandt Stiftung der Varta – AG“
- Der „Madeleine Schickedanz – Kinderkrebsstiftung“
- Der „*Marie Curie Fellowship Association*“ (MCFA)

---

## **XII. Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Jena, den 18.05.2004

.....

Heike Starke