Identifizierung und Charakterisierung putativ evolutionär relevanter Genomregionen der *Hominidae*

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 Dipl. Biol. Anja Weise
geboren am 19.12.1977 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter: 1. .....

2. .....

3. .....

Tag der Doktorprüfung: .....

Tag der öffentlichen Verteitigung: .....

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Entwicklung der Zytogenetik 2
1.2 Molekulare Zytogenetik 3
1.2.1 Prinzip der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) 3
1.2.1.1 Bedeutung Lokus-spezifischer Sonden 4
1.2.2 Entwicklungen und Möglichkeiten der FISH 5
1.2.2.1 M-FISH und SKY 5
1.2.2.2 FISH-Bänderungsverfahren 6
1.3 Hominidae Evolution und vergleichende Genomanalyse 7
1.3.1 Phylogenie der *Hominidae* 7
1.3.2 Vergleichende Genomanalyse 8
1.4 Fragestellung der Arbeit 10

2 Material und Methode 12
2.1 Untersuchungsmaterialien 12
2.1.1 Chromosomenpräparation 12
2.1.1.1 Chromosmenpräparation aus Blut 13
2.1.1.2 Chromosomenpräparation aus Primatenzelllinien 13
2.1.2 Objektträgerpräparation für die konventionelle Zytogenetik und FISH 13
2.2 Verwendete FISH Sonden 14
2.2.1 Cosmid, PAC und BAC Sonden 14
2.2.2 Mikrosezierungs-Sonden 15
2.2.3 Zentromer-Sonden 16
2.2.4 Verwendete Sondenmixe 16
2.3 Mikrosezierung von Chromosomen 16
2.4 Molekulargenetische Techniken 18
2.4.1 Isolation von Plasmid-DNA 18
2.4.2 Bestimmung des DNA-Gehaltes und der Reinheit der BAC-Proben 19
2.4.3 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 19
2.4.3.1 DOP-PCR 19
2.4.3.1.1 Amplifizierung der mikrosezierten Chromosomenfragmente 20
2.4.3.1.2 Amplifizierung der BAC-DNA 22
2.4.3.1.3 Reamplifizierungs-PCR 22
2.4.3.1.4 Markierungs-PCR 22
2.4.4 DNA-Markierung über Nick-Translation 24
2.4.5 Photo- bzw. Thermoreaktive DNA-Markierung 24
2.4.6 DNA-Fällung 24
2.4.7 Internetdatenbanken 25
2.5 Bänderungs-Zytogenetik 26
2.5.1 GTG-Bänderung 26
2.5.2 CBG-Bänderung 26
2.5.3 NOR-Färbung 27
2.6 Molekulare Zytogenetik 27
2.6.1 Hybridisierung der DNA-Sonden 29
2.6.1.1 Pepsinvorbehandlung der OTs 29
2.6.1.2 Denaturierung der OTs 29
2.6.1.3 Denaturierung der Sonden-DNA 29
2.6.1.4 Hybridisierung der denaturierten Sonden-DNA auf den denaturierten OT 30
2.6.1.4.1 Konventionelle Hybridisierung 30
2.6.1.4.2 Mikrowellen Hybridisierung 30
2.6.2 Endwaschung und Detektion 31
2.6.3 Auswertung 32

3 Ergebnisse 32
3.1 Methodische Neu- und Weiterentwicklungen 32
3.1.1 Multitude Multicolor Banding (mMCB) 32
3.1.2 Subzentromer- Subtelomer Sondenset (subCTM) 34
3.1.3 Mikrowellenvermittelte Nukleinsäurehybridisierung 35
3.1.4 Photo- bzw. Thermoreaktive DNA-Markierung 37
3.2 Gesamtgenomische Untersuchung der *Hominidae* auf kryptische Rearrangements 37
3.2.1 Beschreibung bekannter sowie neuer Rearrangements der *Hominidae* nach mMCB und subCTM 37
3.2.1.1 Chromosom 1 40
3.2.1.2 Chromosom 2 40
3.2.1.3 Chromosom 3 40
3.2.1.4 Chromosom 4 41
3.2.1.5 Chromosom 5 41
3.2.1.6 Chromosom 6 42
3.2.1.7 Chromosom 7 42
3.2.1.8 Chromosom 8 42
3.2.1.9 Chromosom 9 42
3.2.1.10 Chromosom 10 43
3.2.1.11 Chromosom 11 43
3.2.1.12 Chromosom 12 44
3.2.1.13 Chromosom 13 44
3.2.1.14 Chromosom 14 44
3.2.1.15 Chromosom 15 45
3.2.1.16 Chromosom 16 45
3.2.1.17 Chromosom 17 45
3.2.1.18 Chromosom 18 46
3.2.1.19 Chromosom 19 47
3.2.1.20 Chromosom 20 47
3.2.1.21 Chromosom 21 47
3.2.1.22 Chromosom 22 47
3.2.1.23 X Chromosom 47
3.2.2 Gesamtgenomische mMCB Untersuchungen an 3 Unterarten des Schimpansen 48
3.3 Ausgewählte Lokus-spezifische Untersuchungen am Genom der *Hominidae* 48
..... Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.3.1 Inversionen 48
3.3.1.1 Perizentromerregion des Chromosom 1 49
3.3.1.2 Perizentrische Inversionen an den homologen Chromosomen zu HSA 2 bei den *Hominidae* 50
3.3.1.2.1 Perizentrische Inversion im homologen Chromosom zu HSA 2p bei Gorilla und Orang-Utan 50
3.3.1.2.2 Perizentrische Inversion 2 "Normvariante" des Menschen 52
3.3.1.3 Perizentrische Inversion im homologen Chromosom zu HSA 4 bei Gorilla und Orang-Utan 54
3.3.1.4 Perizentrische Inversion im homologen Chromosom zu HSA 5 beim Schimpansen 55
3.3.1.5 Perizentrische Inversionen an den homologen Chromosomen zu HSA 9 bei den *Hominidae* 58
3.3.1.5.1 Perizentrische Inversion im homologen Chromosom zu HSA 9 bei Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan 58
3.3.1.5.2 Perizentrische Inversion 9 "Normvariante" des Menschen 60
3.3.1.6 Terminale Deletion und parazentrische Inversion im homologen Chromosom zu HSA 17 beim Orang-Utan 61

3.3.1.7 Komplexe Umbauten am homologen Chromosom zu HSA 20 beim Orang-Utan 62
3.3.2 Heterochromatin des Schimpansen 63
3.3.2.1 Interstitielles Heterochromatin im homologen Chromosom zu HSA 7 64
3.3.2.1.1 Charakterisierung über Mikrosezierung 64
3.3.2.1.2 Charakterisierung über BACs 64
3.3.2.2 Interstitielles Heterochromatin im homologen Chromosom zu HSA 13 66
3.3.2.2.1 Charakterisierung über Mikrosezierung 66
3.3.2.2.2 Charakterisierung über BACs 67
3.3.2.3 Parazentrisches Heterochromatin im homologen Chromosom zu HSA 16 68
3.3.2.4 Terminales Heterochromatin im homologen Chromosom zu HSA 18 69
3.4 DNA-Homologie basierende Nomenklatur der *Hominidae* Chromosomen 70

4 Diskussion 73
4.1 FISH-Bänderungstechniken 73
4.1.1 Vom MCB zum mMCB 73
4.1.2 Das mMCB im Vergleich zu anderen FISH-Bänderungstechniken 74
4.2 Das subCTM-FISH Verfahren 75
4.3 Die Chromosomen der *Hominidae* im Vergleich 75
4.3.1 Chromosom 1 76
4.3.2 Chromosom 2 76
4.3.3 Chromosom 3 77
4.3.4 Chromosom 4 77
4.3.5 Chromosom 5 78
4.3.6 Chromosom 6 78
4.3.7 Chromosom 7 78
4.3.8 Chromosom 8 79
4.3.9 Chromosom 9 79
4.3.10 Chromosom 10 79
4.3.11 Chromosom 11 80
4.3.12 Chromosom 12 80
4.3.13 Chromosom 13 80
4.3.14 Chromosom 14 80
4.3.15 Chromosom 15 81
4.3.16 Chromosom 16 81
4.3.17 Chromosom 17 81
4.3.18 Chromosom 18 82
4.3.19 Chromosom 19 82
4.3.20 Chromosom 20 82
4.3.21 Chromosom 21 83
4.3.22 Chromosom 22 83
4.3.23 X Chromosom 83
4.3.24 Y Chromosom 83
4.3.25 Zusammenfassung der chromosomalen Rearrangements der großen Menschenaffen 83
4.3.26 Zusammenfassende Darstellung der Phylogenie der *Hominidae* Chromosomen 85
4.4 Molekulare Charakteristika von perizentrischen Inversionen 86
4.4.1 „Normvarianten“-Inversionen des Menschen 86
4.4.2 Evolutionär fixierte Inversionen des Schimpansen 88
4.5 Formen des Heterochromatins beim Schimpansen 90
4.6 Zusammenhang zwischen Tumorbruchpunkten, „fragile sites“ und evolutionären Bruchpunkten 91
4.7 Chromosomenevolution und Artbildung 93
4.8 Nomenklatur von Chromosomen 93
4.8.1 Probleme und Grenzen der ISCN 1995 93

4.8.2 Nomenklatur der *Hominidae*-Chromosomen 94
4.9 Ausblicke 96

5. Zusammenfassung 97

6 Literaturverzeichnis I

7 Abkürzungen XIIII

8 Anhang .....

9 Lebenslauf .....

10 Publikationsliste .....

11 Danksagung .....

12 Eidesstattliche Erklärung .....

1 Einleitung

Eine charakteristische Eigenschaft des Menschen ist es, über sein Wesen und die biologische Entstehung nachzudenken. Carl v. Linné (1701-1778) entwickelte als erster ein *Systema naturae,* indem er die Arten klassifizierte und den Menschen in diesem Zusammenhang mit den Affen in der Ordnung Primaten zusammenfasste. Während die phylogenetischen Beziehungen zwischen Mensch und „großen Affen" (Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan) seitdem immer wieder diskutiert wurden, konnte der Mechanismus, der zu dieser Artbildung führte noch nicht wirklich aufgeklärt werden.
Als ein Motor für die Divergenz von Arten gelten chromosomale Rearrangements, die als Reproduktionsbarriere wirken (Rieseberg und Livingstone, 2003). Innerhalb der konserviert erscheinenden Karyotypen der *Hominidae* liegen Spezies-spezifische Unterschiede vor, deren Erkennung und Analyse für das Verständnis der *Hominidae*-Evolution von grundlegender Bedeutung sind. Neben einer zentrischen Fusion, die dazu führt, dass die großen Menschenaffen 48 Chromosomen und der Mensch 46 Chromosomen aufweist, unterscheiden sich die Karyotypen vor allem durch das Auftreten von perizentrischen Inversionen und in der Verteilung des Heterochromatins (Yunis und Pakrash, 1982).
Ein Teil dieser Unterschiede ist durch Einsatz bisher zur Verfügung stehender zytogenetischer- und molekularzytogenetischer Techniken analysiert worden. Weitere, bislang nicht identifizierte Unterschiede, vor allem in den Subtelomer- und Subzentromer-Bereichen, sind jedoch zu erwarten. Die hier vorliegende Arbeit hat zum Inhalt, die Karyotypen von 5 *Hominidae*-Genomen vergleichend zueinander, mit zum Teil speziell hierfür neu entwickelten Verfahren, grundlegend zu analysieren und umfassend sowie systematisch zu vergleichen. Das Multitude Multicolor Banding (mMCB) wurde eingesetzt um bislang nicht detektierbare intrachromosomale Unterschiede in einer einzigen hochauflösenden und gesamtgenomischen Analyse zu detektieren. Mit dem Subtelomer-Subzentromer-Sondenset (subCTM-FISH) wurden bisher nicht differenzierbare Zentromer- und Telomer-spezifische Umbauten zugleich analysiert. Mit diesen neuen Techniken gelang es, bislang unentdeckte Karyotypveränderungen nachzuweisen. Die Identifizierung bruchpunktüberspannender BAC-Klone ist im Weiteren Grundlage für eine molekulargenetische Charakterisierung sowie Metaanalysen der im Laufe der *Hominidae*-Evolution veränderten Genombereiche. Die bereits bekannten sowie die neu gefundenen Karyotypveränderungen wurden dazu genutzt, erstmals auf dem zur Zeit molekularzytogenetisch höchsten Niveau einen Nomenklaturabgleich der *Hominidae*-Karyotypen zu etablieren. Des Weiteren wurden auf Grundlage von detaillierten Datenbankanalysen der bruchpunktüberspannenden BACs Hinweise auf grundlegende Mechanismen der Heterochromatinentstehung und Inversionsmechanismen geliefert.

1.1 Entwicklung der Zytogenetik

Menschliche Chromosomen wurden erstmals 1879 von Arnold und 1880 von Flemming beschrieben. Der Begriff „Chromosom“ wurde 1888 von Waldeyer geprägt. Die Erkenntnis, dass die Chromosomen die Träger der Erbanlagen sind, stammt von Sutton (1903) und von Boveri (Chromosomentheorie der Vererbung, 1903). Allerdings blieben die Chromosomen einer wirklichen Analyse für mehr als 50 Jahre unzugänglich, bis Tjio und Levan 1956 mit einer geeigneten Methode die Chromosomenzahl mit 46 für den Menschen etablierten. Im Jahre 1959 wurden dann die ersten Chromosomenanomalien des Menschen beschrieben (Trisomie 21: Lejeune et al., 1959; Klinefelter-Syndrom: Jacobs und Strong et al., 1959; Turner-Syndrom: Ford et al., 1959). Seitdem entwickelte sich die Zytogenetik zu einem in der praktischen Anwendung wichtigsten Arbeitsgebiet der Humangenetik. Manche Fehlbildungssyndrome, für die es zuvor keine kausale Erklärung gab, konnten nun durch Chromosomenaberrationen erklärt werden.
Die Fortschritte in der Zytogenetik hingen wesentlich von technischen Entwicklungen ab. In den späten 50er Jahren wurden Metaphasen aus Hautfibroblasten darstellbar. Weitere Durchbrüche wurden durch den Einsatz von Phytohämagglutinin (PHA), das die peripheren Blutlymphozyten zur Zellteilung anregt (Moorhead *et al*., 1960) und die hypertone Behandlung, die zu besser analysierbaren Metaphaseplatten verhalf (Hsu, 1952), erzielt.
Die Möglichkeit, Chromosomenbanden darzustellen (Caspersson *et al*., 1968), gestattete erstmals die Identifizierung jedes einzelnen menschlichen Chromosoms und ebnete den Weg für eine genauere Analyse von Strukturveränderungen menschlicher Chromosomen. Kurz darauf wurden eine Reihe weiterer Bänderungstechniken entwickelt, die weltweit heute Standart sind und einen differenzierteren Einblick in die Chromosomenstruktur ermöglichen. So z.B. die **GTG-Bänderung** (G-bands by Trypsin using Giemsa)**,** die dadurch entstehen, dass vor der Behandlung mit Giemsa kontrolliert mit Trypsin verdaut wird (Seabright, 1971); die **Q-Bänderung**, die durch das bevorzugte Anfärben AT-reicher DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff **Q**uinacrin entstehen (wobei die Q-Banden im wesentlichen den G-Banden entsprechen, Caspersson *et al*., 1972); die **R-Bänderung** ist ein reverses GTG-Bandenmuster und entstehen, wenn man vor der Giemsafärbung eine Salzsäuredenaturierung durchführt (Duttrillaux und Lejeune *et al*., 1971).
Nun konnten neben den numerischen Chromosomenaberrationen, wie Polyploidien (Vielfaches des gesamten Chromosomensatzes) und Aneuploidien (Verlust oder Zugewinn von einzelnen Chromosomen), auch intra- und interchromosomale Veränderungen sichtbar gemacht werden, wie z.B. Duplikationen (zusätzliches chromosomales Material), Deletionen (Verlust von chromosomalem Material), Translokationen (Austausch von chromosomalem Material zwischen Chromosomen) und Inversionen (intrachromosomale Umbauten).

Yunis *et al.* zeigte 1976, dass durch bestimmte Kulturbedingungen ein „High-resolution-banding“ erzielt werden kann. Eine höhere Auflösung gelang ebenfalls mit der Methode des „Chromosome-stretching“ (Hlics et al., 1997a), wobei diese Technik anspruchsvoll und zeitaufwendig und somit meist nur der Bearbeitung spezieller Fragestellungen vorbehalten ist. Die Entwicklungen hin zur molekularen Zytogenetik in den 80er Jahren werden im Abschnitt 1.2 betrachtet.

Die zurzeit gültige Nomenklatur der menschlichen Chromosomen ist die **„International System for Human Cytogenetic Nomenclature“** (ISCN, 1995; Mitelman, 1995), die unter anderem die Nummerierung der GTG-Banden eines jeden Chromosoms sowie ein umfangreiches Regelwerk für die Bezeichnung aller bekannten Chromosomen- und Karyotypveränderungen festlegt. Jedoch ist selbst bei hoher Bandenauflösung, eine eindeutige Charakterisierung aller sichtbaren Chromosomenveränderungen nicht immer möglich. So sind z.B. folgende Fragestellungen mit herkömmlich gebänderten Chromosomen im Lichtmikroskop nicht nachweisbar: 1. die Herkunft einer zusätzlichen Bande 2. die Identität von Markerchromosomen (nicht identifizierte Chromosomen oder Chromosomenstücke) und 3. die genaue Position von Deletionen und Translokationen.

1.2 Molekulare Zytogenetik

Ein neuer technischer Durchbruch verhalf, die Unzulänglichkeiten in der zytogenetischen Diagnostik zu überwinden. Mit Hilfe der Chromosomen *in situ* Suppressions-Hybridisierung (CISS-Hybridisierung, Lichter *et al.*, 1988) bzw. der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) gelingt es, durch molekular zytogenetische Techniken bestimmte Chromosomen bzw. auch kleinste Chromosomenabschnitte bis hin zu einzelnen Genen in der Metaphase und im Interphasekern spezifisch zu markieren.

1.2.1 Prinzip der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die *in situ*-Hybridisierung ist eine Methode, um DNA- oder RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen oder zu einzelnen Chromosomenbereichen zu lokalisieren. Im Gegensatz zu anderen Hybridisierungsverfahren (Northern- oder Southern-Blot-Hybridisierung) wird bei dieser Technik das Hybridisierungssignal nicht auf einer festen Trägermembran, sondern direkt im biologischen Material (*in situ*) sichtbar (Pardue und Gall, 1969; John *et al*., 1969). Ursprünglich war nur eine radioaktive Markierung für die Nukleinsäuren und eine Detektion der Hybridisierung über Autoradiographie möglich. Diese konnte aber nur in speziell dafür ausgerüsteten Labors von Fachkräften unter gesundheitlichen Risiken durchgeführt werden. Darüber hinaus waren Ergebnisse meist erst nach 1-3 Wochen zu erwarten.
Von Pinkel und Mitarbeitern wurde erstmals 1986 die Methode der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an menschlichen Chromosomen beschrieben. Durch die Entwicklung dieser nicht radioaktiven Methode der *in situ* Hybridisierung boten sich eine Reihe weiterer Vorteile, wie z.B. die Möglichkeit, verschiedene Markierungen gleichzeitig in einem Experiment einzusetzen sowie eine hohe Flexibilität durch viele zur Verfügung stehende Antikörper Detektionssysteme. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Schnelligkeit, denn Ergebnisse können hier schon nach 1-3 Tagen vorliegen.

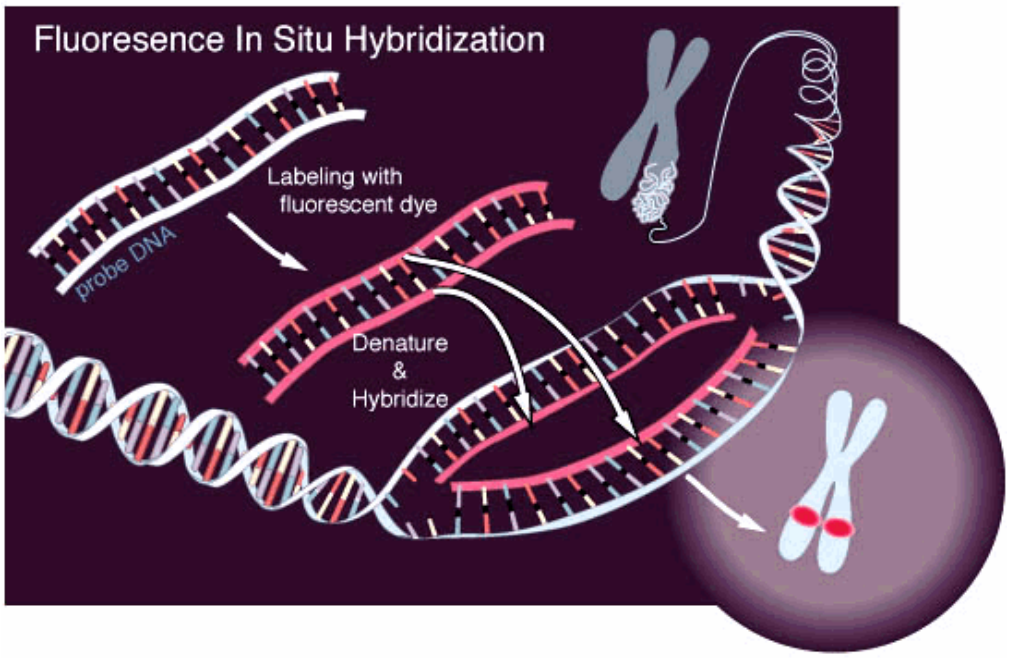


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nach Darryl Leja (http://www.accessexcellence.org/AB/GG/fish.html). Eine Proben-DNA wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und ebenso wie die chromosomale Ziel-DNA denaturiert. Anschließend lagert sich bei der Hybridisierung die markierte Sonden-DNA an die homologen DNA-Sequenzen der chromosomalen Ziel-DNA an, so dass unter einem Fluoreszenzmikroskop die markierte Sonde ein spezifisches Fluoreszenzsignal auf dem Ziel-Chromosom erzeugt.

Bei der FISH werden die DNA Sonden direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff (direkte Methode) oder mit Haptenen, wie Biotin oder Digoxigenein (indirekte Methode) über eine Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotiden (DOP-PCR; Telenius *et al*., 1992a) oder „Nick Translation" (Rigby *et al*., 1977) markiert und anschließend denaturiert (DNA liegt dann als Einzelstrang vor). Die zur Hybridisierung verwendeten Objektträger (OT) mit den zu untersuchenden Metaphaseplatten bzw. Interphasekernen werden ebenfalls denaturiert. Die markierte und denaturierte DNA der Sonde lagert sich während der Hybridisierung an homologe DNA Sequenzen der unmarkierten Ziel-DNA auf dem Objektträger an. Bei der indirekten Methode ist eine anschließende Detektion, der mit Haptenen markierten DNA nötig, dies geschieht über Fluoreszenz-markierte Antikörper. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop (siehe **Abb.1.2**).
Der schon zuvor genannte Vorteil dieser Methode, dass mehrere unterschiedlich markierte Sonden gleichzeitig eingesetzt werden können, hat vor allem im Bereich der Forschung und Diagnostik den Nutzen, dass mit einem Präparat gleichzeitig mehrere Informationen gewonnen werden können. Dies ist vor allem wichtig, wenn nur eine geringe Menge an Untersuchungsmaterial vorhanden ist. Zusätzlich kann dadurch aber auch Zeit, Arbeitsaufwand und Geld gespart werden.
Heute findet die FISH in der molekularen Zytogenetik ein weites Anwendungsfeld: 1) Erstellen physikalischer Karten von Chromosomen, 2) Analysieren der Chromosomenstruktur und deren Abweichung, 3) Untersuchungen zur Struktur, Funktion und Evolution von Chromosomen und Genomen und 4) Bestimmen der räumlichen und zeitlichen Expression von Genen. Eine wichtige Anwendung stellt die FISH im Rahmen der molekular zytogenetischen Forschung und Diagnostik dar.
Gebräuchliche DNA-Sonden sind:

Repetetive DNA-Sonden:

Diese Sonden binden an DNA Abschnitte mit einer großen Anzahl an sich wiederholenden DNA-Sequenzen (Zentromere, Telomere, Heterochromatin). Im Gegensatz zu den Telomeren lässt sich die menschliche Zentromer-DNA (α-Satelliten) einzelner Chromosomen unterscheiden und ist somit mit spezifischen Sonden nachweisbar, mit Ausnahme der Zentromersequenzen der Chromosomen 5 und 19 sowie 13 und 21 (Lee *et al*., 1997).

Chromosomen Sonden:

Diese Sonden weisen spezifisch ganze Chromosomen (wcp, „whole chromosome paint") bzw. Chromosomenarme oder Chromosomenbereiche nach (pcp, „partial chromosome paint"). Wcp-Sonden können über „chromosome flow sorting" (Speicher *et al*., 1996) oder über Mikrosezierung (Senger *et al.,* 1997) generiert werden. Pcp-Sonden können ebenfalls über eine Glasnadel-basierende (z.B. Bates *et al*., 1986) oder Laser-basierende (z.B. Monajembashi *et al*., 1986) Mikrosezierung gewonnen werden.

Lokus-spezifische Sonden:

Um gezielt bestimmte Chromosomenbanden, Gene oder definierte DNA Sequenzen anzufärben, bedient man sich außerdem sogenannter Lokus-spezifischer FISH Sonden (siehe folgendes Kapitel).

1.2.1.1 Bedeutung Lokus-spezifischer Sonden

Die besondere Bedeutung der Lokus-spezifischen Sonden liegt in ihrer Verbindung zur Sequenzierung des humanen Genoms. Die als Hilfskonstrukte für die Sequenzierung eingesetzten Abschnitte des menschlichen Genoms sind zum einen über ihre Basenabfolge genau definiert und lassen sich zum anderen als FISH Sonde zur Kartierung einsetzen.
Um eine spezifische DNA-Sequenz zu klonieren und somit beliebig zu vervielfältigen, wird die DNA in einen Vektor eingebaut und dieses Konstrukt in einer geeigneten Wirtszelle vermehrt. Anschließend kann die vervielfältigte DNA wieder isoliert werden und wegen ihrer unbekannten Sequenz z.B. über eine „DOP-PCR" (Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotid Primern, bei der anstelle bekannter definierter Primer-Sequenzen ein 22 bp Oligonukleotid-Primer mit 6 undefinierten, zentralen Basen eingesetzt

wird; Telenius *et al*., 1992a,b) vermehrt und markiert werden. Danach lässt sich die markierte DNA nach dem unter 1.2.1 beschriebenen Prinzip der FISH als Sonden DNA verwenden. Es gibt eine ganze Reihe von Vektoren, die zu solchen Klonierungen geeignet sind. Sie unterscheiden sich in ihrem Wirtsorganismus und der DNA Menge, die kloniert werden kann. Einige Beispiele sind nachstehend aufgeführt: virale Vektoren (z.B. Adenoviren), Cosmide (Lambda Phage, 0,03-0,04 Mb), Plasmide (z.B. *Escherichia coli*, bis 0,3 Mb), künstliche Chromosomen (z.B. *Saccheromyces sereviciae*, 0,2-2 Mb) (Sambrook et al., 1989).
In der vorliegenden Arbeit kommen vor allem BACs (bacterial artificial chromosome) zum Einsatz. Sie spielen nicht nur bei der Klonierung und Sequenzierung des menschlichen Genoms eine Rolle sondern auch in der molekularen Zytogenetik als Lokus-spezifische DNA-Sonden.

BACs
Dieses Klonierungssystem findet vor allem bei der Subklonierung von YACs („yeast artificial chromosome“, Schlessinger, 1990) im Rahmen des Human Genome Projektes eine weite Anwendung (Shizuya *et al*., 1992). BACs sind im eigentlichen Sinne keine Chromosomen (im Vergleich zu YACs) sondern haben ihren Ursprung im Fertilitätsplasmid prokaryotischer Bakterien (*Escherichia coli*). Es handelt sich also um ein zirkuläres DNA-Molekül, das zusätzlich zum Bakteriengenom vorliegt. Es können mehrere solcher Plasmide gleichzeitig in einer Bakterienzelle vorliegen, so dass mehr DNA isoliert werden kann als aus Hefen. Ebenfalls methodisch nicht so aufwendig, wie bei den YACs, ist die Konstruktion solcher Vektoren mit Fremd-DNA sowie die einfache Transformation von Wirtszellen mit dem Plasmid (z.B. mit der $CaCl_2$-Hitzeschock-Methode oder der Elektroporation). Allerdings sind die klonierbaren Fremd-DNA-Fragmente mit bis zu 0,3 Mb ca. zehnmal kleiner als die der YACs (Sambrook et al., 1989).
Trotzdem haben sich die BACs in den letzten Jahren wegen ihrer leichteren Handhabung als Subklonierungssysteme und relativ zuverlässige FISH-Sonden durchgesetzt. Zudem ermöglicht der freie Zugang zu öffentlichen Sequenzdatenbanken eine weitreichende Analyse der menschlichen Genomsequenzen, die über solche sequenzierten BACs abgedeckt werden.

1.2.2 Entwicklungen und Möglichkeiten der FISH

1.2.2.1 M-FISH und SKY

In den letzten Jahren fanden eine Vielzahl von Neu- und Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der FISH statt, um immer genauer wissenschaftliche und diagnostische Fragestellungen bearbeiten zu können. So wurde 1990 erstmals die gleichzeitige Darstellung von 3 Zielsequenzen mit nur 2 Farbstoffen von Nederlof und Mitarbeitern beschrieben. Eine Weiterentwicklung auf diesem Gebiet führte zur gleichzeitigen Darstellung aller Chromosomen einer Zelle in 24 verschiedenen Farben mit nur einer einzigen Hybridisierung (Schröck *et al*., 1996; Speicher *et al*., 1996). Diese Methode bezeichnet man je nach der Auswertungstechnik als „Spectral Karyotyping“ (SKY) bzw. als „Multiplex-FISH“ (M-FISH). SKY basiert auf der „Fourier-Spektroskopie“, wobei ein Interferometer die Messung des gesamten emittierten Lichtspektrums für jeden Bildpunkt ermöglicht. Im Gegensatz dazu werden beim M-FISH für jedes Fluorochrom Einzelbilder über spezielle Filter aufgenommen, die dann von einer Software übereinander gelegt werden. Beide Techniken beruhen auf wcp-Sonden für jedes Chromosom in Kombination mit 5 Fluorochromen. Allerdings ist die Zugabe von unmarkierter COT-1 DNA oder genomischer DNA unbedingt nötig, um repetetive Sequenzen (vor allem im Zentromerbereich) vorzuhybridisieren. Für die Auswertung der Signale ist eine CCD-Kamera in Verbindung mit einem geeigneten Auswertungsprogramm am Computer nötig, um auch Farbstoffe, die für das menschliche Auge nicht sichtbar sind, darzustellen. Somit ist es z.B. möglich, die Herkunft von Markerchromosomen, die man häufig in Tumorzellen findet, zu bestimmen oder die an Translokationen beteiligten Chromosomen zu identifizieren. Allerdings ist eine Darstellung von intrachromosomalen Veränderungen sowie eine Bruchpunktbeschreibung mittels M-FISH bzw. SKY nicht möglich.

So bleiben z.B. para- und perizentrische Inversionen genauso unerkannt wie kleine Duplikationen oder Deletionen.
Eine parallel-Entwicklung der M-FISH/SKY Technik ist das cenM-FISH (Nietzel *et al*., 2001). Hier werden anstelle von wcp Sonden zentromerspezifische Sonden aller Chromosomen in einem Schritt hybridisiert.

1.2.2.2 FISH-Bänderungsverfahren

Mit der Entwicklung von FISH-Bänderungsverfahren ist es erstmals gelungen, die Unzulänglichkeiten der M-FISH bzw. SKY Methode zu überwinden. So ist es nun möglich, chromosomale Subbereiche, je nach angewandter Methode unterschiedlich gut, auf FISH-Ebene zu unterscheiden (Überblick in Liehr *et al*., 2002a).

Chromosome-bar-code
Diese Technik führten Anfang der 90er Jahre Lengauer und seine Mitarbeiter ein (Lengauer *et al.,* 1992, 1993) und wurde auch von anderen Gruppen etabliert (z. B. Henegariu *et al.,* 1998). Chromosomen-spezifisch wurden hierbei YAC-Sonden mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert, wobei sich die Auflösungsgrenze dieser Methode durch die Größe der eingesetzten Sonden (0,3-2 Mb) und den Abstand zwischen den YACs ergibt.

Fragmented-hybrid-probes
Somatische Zellhybriden zwischen Mensch- und Nagetier-Zellen sind die Grundlage des „somatic cell hybrid based chromosome bar code". Hierbei erhält man je nach Zellinie 5 – 15 Fragmente in einer Größe von 5 - 50 Mb, die somit ca. 300 Regionen des humanen Genoms darstellen. Dies entspricht etwa einer Bänderung von 100 Banden pro haploiden Chromosomensatz (Müller *et al.,* 1997; Wienberg und Stanyon, 1997).

RX-FISH
Diese Methode wird auch als „Cross-species-color-banding" bezeichnet. Gibbonchromosomen weisen im Vergleich zum menschlichen Karyotyp komplexe chromosomale Veränderungen auf und eignen sich deshalb, um ein Bandenmuster auf menschlichen Chromosomen zu erzeugen. Es kommen nach „Flow-sorting", chromosomenspezifische DNA-Sonden von zwei Gibbonspezies zum Einsatz, die zu drei DNA-Pools zusammengefasst, mit drei Fluorochromen markiert, simultan hybridisiert werden. Mit RX-FISH ergibt sich eine Auflösung von 80-90 Banden pro haploiden Karyotyp (Müller *et al.,* 1998).

In den vergangenen Jahren wurden immer wieder erweiterte und kombinierte Fragmented-hybrid und RX-FISH Methoden vorgestellt um die Auflösung zu erhöhen (z.B. Müller und Wienberg, 2001; Müller *et al*., 2004).

MCB
Das „high resolution multicolour banding" (MCB) stellt eine methodische Weiterentwicklung der M-FISH Technik dar, wobei das kombinatorische Markieren mit Hilfe von pcp Sonden und 5 verschiedenen Fluorochromen auf ein Chromosom beschränkt ist. Dieses Verfahren wurde erstmals von Chudoba und Mitarbeitern 1999 am Beispiel des Chromosoms 5 beschrieben. Hier wurden mit Hilfe der Mikrosezierung insgesamt 7 regionspezifische DNA-Banken erstellt, die einen bestimmten Bereich des Chromosoms 5 anfärbte und sich in den Randbereichen überlappen. Jede einzelne Bank, wie auch die überlappenden Bereiche benachbarter Banken, werden so jeweils durch ein Fluorochrom bzw. eine einmalige Kombination dieser Fluorochrome charakterisiert. Dies bildet die Grundlage für eine definierte Farb-Klassifikation entlang der Chromosomenachse.
Eine spezielle Software (Isis von Meta Systems) führt eine automatische Unterteilung des Chromosoms in eine definierte Anzahl von Segmenten durch. So wird der Farbcode jedes Segments ermittelt und als Farbklassifikator gespeichert. Dadurch kann nun jedem Pixel eine Pseudofarbe zugeordnet werden, was zu einem Vielfarben-Bänderungsmuster führt. Auf diese Weise konnte das Chromosom 5 reproduzierbar in 23 Farbbanden (Pseudofarben)

dargestellt werden. Dies entspricht in etwa einem Bandenniveau von 550 Banden für den haploiden Chromosomensatz (Chudoba *et al*., 1999).
Mittlerweile ist ein komplettes Set von 138 regionspezifischen Mikrosezierungsbanken für das gesamte menschliche Genom erstellt (Mrasek *et al*., 2001; Liehr *et al*., 2002b). Somit steht jetzt ein hohes Auflösungspotential für die klinische Diagnostik zur Verfügung. Das MCB eignet sich aber auch für den Einsatz in der Forschung. So wurde es bereits erfolgreich in ZOO-FISH Studien zur Evolution der Chromosomen am Gorilla (Mrasek *et al*., 2001) und am Weißhand Gibbon angewendet (Mrasek *et al*., 2003). Ebenso fand es Einsatz zur hochauflösenden Karyotypisierung von Zelllinien (Kuechler *et al*., 2003) und in Studien zur Interphase Architektur (Lemke *et al*., 2002, Weise *et al*., 2002a).

1.3 *Hominidae* Evolution und vergleichende Genomanalyse

1.3.1 Phylogenie der *Hominidae*

Zurzeit sind weltweit über 200 Primatenarten bekannt. Unter den *Hominidae* faßt man nach neuerer Auffassung die großen Menschenaffen (Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan) und den Menschen zusammen (Gee, 2001). Hingegen beinhalten die *Hominoidae* neben den großen auch die kleinen Menschenaffen (Gibbon).
Die Blütezeit der Menschenaffen herrschte im Miozän, vor über 22 bis 5,5 Millionen Jahren. Zu dieser Zeit lebten rund hundert Arten von Menschenaffen. Ursprünglich entstanden die Menschenaffen in Afrika. Einer der ersten Vertreter war die Gattung *Proconsul*. Dessen Nachkommen eroberten Eurasien. Dort bildeten sie bald viele Linien und brachten die großen Menschenaffen hervor. Wahrscheinlich stammt der Orang-Utan von einer alten eurasischen Linie ab, wohingegen die afrikanischen Menschenaffen und der Mensch einen anderen, gemeinsamen Vorfahren haben (Heizmann und Begun, 2001).

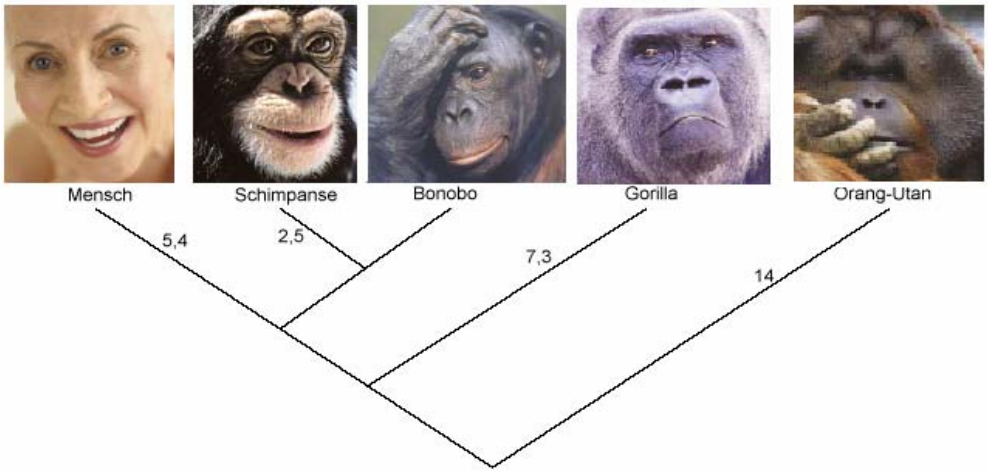


Abb. 1.3: Sequenzbasierender phylogenetischer Stammbaum der *Hominidae*. (Olsen und Varki, 2003; verändert) Die Zahlen geben die Zeit in Millionen von Jahren wieder, die seit dem letzten jeweiligen gemeinsamen Vorfahr bis heute vergangen sind. Die Angaben beruhen auf Sequenz-basierenden Berechnungen von Chen *et al*., 2001.

Homo sapiens sapiens
Der Mensch ist der einzige rezente Vertreter der Gattung Homo und durch seine besondere Eigenschaft, sich der Umwelt bzw. die Umwelt an sich anzupassen, in allen Regionen der Erde vertreten. Zum heutigen Zeitpunkt leben über 6 Milliarden Menschen auf der Erde. Besonders bevölkerungsreich sind die Regionen Asiens (China und Indien) und Afrikas.
Das menschliche Genom besteht im Gegensatz zu den anderen Menschenaffen nur aus 23 Chromosomenpaaren, bedingt durch eine Telomerfusion während seiner Evolution, die zu dem menschlichen Chromosom 2 geführt hat. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms ist, bis auf einige sehr repeatreiche Regionen, fast vollständig abgeschlossen (Istrail *et al*., 2004).

Gattung *Pan spec.*
In der Gattung *Pan spec.* unterscheidet man zwischen den Schimpansen (*Pan troglotydes*) und den Bonobos (*Pan paniscus*). Die Schimpansen lassen sich in folgende 4 Unterarten aufteilen: Westafrikanischer Schimpanse (PTV = *Pan troglotydes versus,* ca. 12.000 Tiere), Zentralafrikanischer Schimpanse (PTR = *Pan troglotydes troglotydes,* ca. 80.000 Tiere), Ostafrikanischer Schimpanse (*Pan troglotydes schweinfurthii,* ca. 13.000 Tiere) und Ostnigeria-Westkamerun Schimpanse (*Pan troglotydes vellerosus,* Populationsgröße unbekannt). Die ca. 5.400 Bonobos kommen heute nur noch freilebend in der Regenwaldzone der Republik Kongo vor (Quelle: WWF Journal 3/2002).
Wie auch die Vertreter der Gorillas und Orang-Utans weisen die Schimpansen 24 Chromosomenpaare auf. Einen zytogenetischen Unterschied in den Karyotypen von Schimpansen und Bonobos ließ sich bis jetzt nicht nachweisen. Im Vergleich zum Menschen findet man eine Reihe an perizentrischen Inversionen und terminales sowie interstitielles Heterochromatin (Yunis und Prakash, 1982). Die Sequenzhomologie in 90 untersuchten Genen zwischen Mensch und Schimpanse liegt bei 99,4% (Wildman *et al*., 2003). Eine Arbeitsversion des Schimpansengenoms liegt bereits vor (Olson und Varki, 2003).

Gattung *Gorilla spec.*
Bei den Gorillas (GGO) unterscheidet man 4 Unterarten: Westlicher Flachland-Gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*, ca. 110 000 Tiere), Cross River-Gorilla (*Gorilla gorilla diehli*, ca. 200 Tiere), Berggorilla (*Gorilla beringei beringei*, ca. 650 Tiere) und Graugorilla (*Gorilla beringei graueri*, ca. 4.000 Tiere). Freilebende Gorillas bewohnen die Regenwälder Zentral- und Westafrikas (Quelle: WWF Journal 3/2002).
Ihr Karyotyp weist ebenfalls 24 Chromosomenpaare auf. Im Vergleich zum menschlichen Karyotyp findet man neben peri- und parazentrischen Inversionen auch eine Translokation sowie terminales Heterochromatin an fast allen Chromosomenarmen (Yunis und Prakash, 1982).

Gattung *Pongo spec.*
Der Orang-Utan kommt in 2 Unterarten vor: Borneo Orang-Utan (PPY_B = *Pongo pygmaeus pygmaeus*, ca. 20.000 Tiere) und Sumatra Orang-Utan (PPY_S = *Pongo pygmaeus abelii*, ca. 9.000 Tier)(Quelle: WWF Journal 3/2002).
Der Orang-Utan Karyotyp weist ebenfalls 48 Chromosomen auf. Man findet im Vergleich zum Menschen para- und perizentrische Inversionen. Wie auch beim Menschen findet man kein terminales Heterochromatin (Yunis und Prakash, 1982). Allerdings lassen sich die beiden Unterarten durch eine perizentrische Inversion in einem dem menschlichen Chromosom 3 homologen Chromosom unterscheiden (Müller *et al*., 2000).

1.3.2 Vergleichende Genomanalyse

Vergleichende Studien der Chromosomenzusammensetzung und Morphologie geben Einblicke in grundlegende Fragen der Genomevolution und Artbildung. Unterschiede im Karyotyp zwischen verwandten Arten spiegeln die Dynamik des Genoms wieder, die besonders durch Rearrangements, Invasionen, Duplikationen und Verlust gekennzeichnet sind (Wienberg und Stanyon, 1997; Koonin *et al*., 2000; van Geel *et al*., 2002). Es liegt daher nahe anzunehmen, dass solche Veränderungen zu einer reproduktiven Inkompatibilität der Genome führen und zur Artbildung beitragen (Searle, 1998; Rieseberg, 2001).

Vor über 30 Jahren begann man, zunächst anhand der R- und später anhand der GTG-Bänderung, die Karyotypen der afrikanischer großen Menschenaffen mit dem Karyotyp des Menschen zu vergleichen (Turleau *et al*., 1972; Lejeune et al., 1973; de Grouchy *et al*., 1978; Dutrillaux, 1979). Neben vielen Ähnlichkeiten fanden sich auch eine Reihe von Unterschieden in Form von strukturellen Rearrangements, welche auch numerischeAbweichungen verglichen zum menschlichen Karyotyp zeigten. So führte eine Telomerfusion zweier Chromosomen zu einer Reduktion von 24 Chromosomenpaaren bei den großen Menschenaffen zu 23 Chromosomenpaaren beim Menschen. Die Interpretationen dieser frühen Untersuchungen waren aber oft widersprüchlich. Bis 1980

wurden die Karyotypen der *Hominidae* mit über 80 Primatenspezies verglichen (Dutrillaux, 1980). Yunis und Prakash führten 1982 GTG-Bänderungsstudien an den *Hominidae* durch und postulierten einen gemeinsamen Vorfahr.
Mit den bis dahin verwendeten Protein-vermittelten Bänderungstechniken ist es sehr schwierig, eindeutige Chromosomenhomologien zwischen Arten nachzuweisen. Besonders die Identifizierung intrachromosomaler und komplexer Veränderungen ist mit einer dichromen Färbung schwer zu definieren.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ermöglichte mittels des sog. ZOO-FISH-Versuchsansatzes (Chowdhary *et al*., 1998) eine weiterführende molekularzytogenetische Charakterisierung der *Hominidae*-Genome (Wienberg *et al*., 1990; Jauch *et al*., 1992; Stanyon *et al*., 1992). Die zunächst hierbei verwendeten Ganzchromosomen-Sonden waren aber nur in der Lage, unterschiedliche Translokationspartner zu identifizieren. Intrachromosomale Rearrangements, wie Inversionen sind jedoch die häufigsten chromosomalen Veränderungen, in denen sich Primaten untereinander unterscheiden. In den letzten Jahren konnte eine verbesserte molekularzytogenetische Auflösung einzelner chromosomaler Regionen bzw. aller Chromosomen mittels sog. FISH-Bänderungs-Techniken erreicht werden (Übersicht bei Liehr *et al*., 2002a). Diese wurden bereits zum Teil in vergleichenden, für einzelne Spezies durchgeführten Karyotypstudien eingesetzt (Müller und Wienberg, 2001; Mrasek *et al*., 2001 und 2003), zum Beispiel für *Hylobates lar*. Bei dieser Spezies waren nach M-FISH Analyse ca. 30 Bruchpunkte (Jauch *et al*., 1992) verglichen zum menschlichen Genom bekannt; mittels der multicolor banding (MCB) Technik konnten jedoch insgesamt 71 Bruchpunkte identifiziert werden (Mrasek *et al*., 2003).

Trotz dieser Fortschritte in der vergleichenden Genomanalyse der *Hominidae* gibt es bis heute eine einheitliche Banden-Nomenklatur nur für die menschlichen Chromosomen (ISCN, 1995). Erschwerend bei der vergleichenden Genomanalyse ist ebenfalls die Nummerierung der Schimpansen-, Gorilla- und Orang-Utan Chromosomen, die sich nur bedingt ähneln und „willkürlich“ in den Anfangsjahren der Bänderungstechniken nach der Größe der Chromosomen beziffert wurden.

Die augenfälligsten chromosomalen Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies der *Hominidae* sind Variationen in der Verteilung des konstitutiven Heterochromatins. Konstitutives Heterochromatin ist weitgehend identisch mit polymorphen Bereichen eines Karyotypes, welches definitionsgemäß praktisch frei von Strukturgenen ist (Zernahle, 1983). *Homo sapiens* spezifische polymorphe Bereiche sind z.B. das zentromernahe (parazentrische) Heterochromatin in 1q12, 9q12 und 16q11.2, welches man bei den anderen *Hominidae* nicht findet. Andererseits liegen in fast der Hälfte aller Schimpansen Chromosomen (*Pan spec*.) und in fast allen Gorilla Chromosomen (*Gorilla spec*.) terminale Heterochromatinbanden vor, die beim Menschen und Orang-Utan (*Pongo pygmaeus supspec.*) fehlen (Yunis und Prakash, 1982). Die unterschiedliche Heterochromatinverteilung wird im Zusammenhang mit der Artbildung als Fertilitätsbarriere diskutiert (Rieseberg und Livingstone, 2003; Oritz-Barrientos *et al*., 2002; Chung, 2001).

Der häufigste Typ euchromatischer chromosomaler Veränderung zwischen *Homo sapiens* und *Pan spec*. sind perizentrische Inversionen. Wie bereits für das Heterochromatin beschrieben, können evolutionär manifestierte Inversionen ebenfalls Fertilitätsbarrieren zwischen Arten darstellen (Dutrillaux *et al*., 1986; Noor *et al*., 2001). Des Weiteren wird eine höhere Mutationsrate innerhalb der Inversionen vermutet (Rieseberg, 2001; Hale, 1986). Evolutionär manifestierte Inversionen findet man zwischen dem menschlichen Chromosomen 1, 4, 5, 9, 12, 15, 17, 18 und den homologen Schimpansenchromosomen. Die Mehrzahl dieser Inversionen wurde bereits molekularzytogenetisch untersucht und die entsprechenden Bruchpunktregionen kartiert (Locke *et al*., 2003; Nickerson und Nelson, 1998; Miró *et al*., 1992). Über eine molekulargenetische Identifizierung und Charakterisierung der Gorilla und Orang-Utan Bruchpunkte liegen nur wenige Berichte vor.

Neben zytogenetisch und/oder molekularzytogenetisch sichtbaren Karyotypveränderungen wurden in den letzten Jahren eine Reihe von kryptischen Chromosomenveränderungen

festgestellt, welche im Laufe der *Hominidae*-Evolution neu aufgetreten sind (Garagna *et al*., 1997; Stankiewicz *et al*., 2001; Fujiyama *et al*., 2002; de Pontbriand *et al*., 2002; Samonte und Eichler, 2002). Dies sind minimale Veränderungen, welche nicht mit Bänderungszytogenetik, sondern nur mittels Lokus-spezifischer Sonden erkannt werden können. Für die Charakterisierung von solchen Genombereichen zwischen 5 kb und 200 kb bieten sich sogenannte „Bacterial Artificial Chromosomes" (BAC, siehe 1.2.1.1) an, die einen definierten Bereich des menschlichen Genoms enthalten (Shizuya *et al*., 1992). Verwendet man BAC-Klone aus dem humanen Genom Projekt, so stehen in der Regel Sequenzinformationen hierfür zur Verfügung (NCBI- oder Ensembl-Datenbank). Aus der Literatur ist bekannt, dass kryptische Veränderungen bevorzugt in den Subzentromer- und in den Subtelomer-Regionen der *Hominidae*-Karyotypen zu erwarten sind (Horvath *et al*., 2000; Jackson *et al*., 1999; Eichler *et al*., 1999; Stankiewicz *et al*., 2001; Martin *et al*., 2002; Weise *et al*., 2004).

1.4 Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist eine umfassende und systematische molekularzytogenetische Analyse der *Hominidae* Karyotypen mit den derzeit modernsten und zum Teil speziell für diese Fragestellung entwickelten, molekularzytogenetischen Methoden.
Wie bereits unter 1.2.2.2 vorgestellt, gibt es schon eine Reihe von FISH-Bänderungsverfahren, die vereinzelt für vergleichende Genomuntersuchungen eingesetzt wurden. Der Nachteil solcher Verfahren die das gesamte Genom abdecken, ist eine zu geringe Auflösung. Hingegen sind die Verfahren, die eine hohe Auflösung bieten nur separat für jedes Chromosom einzusetzen. Für die Umsetzung der Aufgabenstellung, war es deshalb zunächst notwendig, ein neues, hochauflösendes, gesamtgenomisches, kosten- und zeitsparendes FISH-Bänderungsverfahren wie das Multitude Multicolor Banding (mMCB) zu entwickeln und zu etablieren.
In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass besonders die Subtelomer- aber auch die Subzentomerregionen evolutionär sehr dynamische Bereiche des Genoms sind, die oft in kryptische Rearrangements involviert sind. Da die mMCB-Technik, wegen COT1 blockierter repetetiver DNA, besonders in diesen Regionen nur eine unzureichende Auflösung bietet, werden diese Bereiche zusätzlich mit einem speziell für diese Fragestellung neu entwickelten Sondensatz – dem Subtelomer-, Subzentromer- Sondenset (subCTM) – spezifisch untersucht.
Mit dem mMCB und dem subCTM stehen somit die zurzeit modernsten und hochauflösendsten molekularzytogenetischen Verfahren für gesamtgenomische Untersuchungen bereit, um bislang bekannte Veränderungen präzise molekularzytogenetisch zu beschreiben aber auch neue kryptische Veränderungen in den *Hominidae* Genomen nachzuweisen.

Im zweiten Teil der Arbeit werden Lokus-spezifische Untersuchungen durchgeführt. Diese sollen zum einen Bruchpunkte aus dem mMCB/subCTM-Untersuchungen, die von Literaturangaben abweichen, bestätigen und eingrenzen. Zum anderen werden Bruchpunktkartierungen durchgeführt, die Rückschlüsse über den Entstehungsmechanismus von chromosomalen Rearrangements liefern und Gene in bzw. um den Bruchpunkt identifizieren, die mögliche Hinweise auf die phänotypischen Unterschiede zwischen den *Hominidae*-Arten liefern. Des Weiteren sollen erstmals die Bruchpunkte sogenannter „Normvarianten"-Inversionen des Menschen im Vergleich zu evolutionär fixierter Inversionsbruchpunkten verglichen werden, um mögliche Unterschiede bzw. gemeinsame Mechanismen der Inversionsentstehung aufzudecken. Zusätzlich werden erstmals die Integrationsstellen des interstitiellen Heterochromatins bei zwei Schimpansenchromosomen sowie terminales und parazentrisches Heterochromatin der Schimpansen vergleichend untersucht, um Aussagen zu dessen Entstehung und Verbreitung im Genom machen zu können.
Im letzten Teil der Arbeit werden alle aus dieser Arbeit gewonnenen Daten zu Bruchpunkten und Umbauten, zusammen mit Literaturangaben dazu genutzt, erstmals einen Vorschlag für

eine auf molekularzytogenetischer Ebene basierende Chromosomen- und Banden Nomenklatur für Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan vorzuschlagen. Diese Nomenklatur würde erstmals die morphologische Nummerierung der Affenchromosomen ablösen und auf reiner Sequenzhomologie zum bereits sequenzierten Genom des Menschen beruhen. Dies würde nicht nur die Arbeit mit den Affengenomen erleichtern, sondern kann z. B. eine Basis für die Einordnung von Sequenzierungsdaten der großen Menschenaffen bieten.
Das Vorgehen bei der Umsetzung der Fragestellung ist in einem zusammenfassenden Flussdiagramm in **Abb. 1.4** dargestellt.

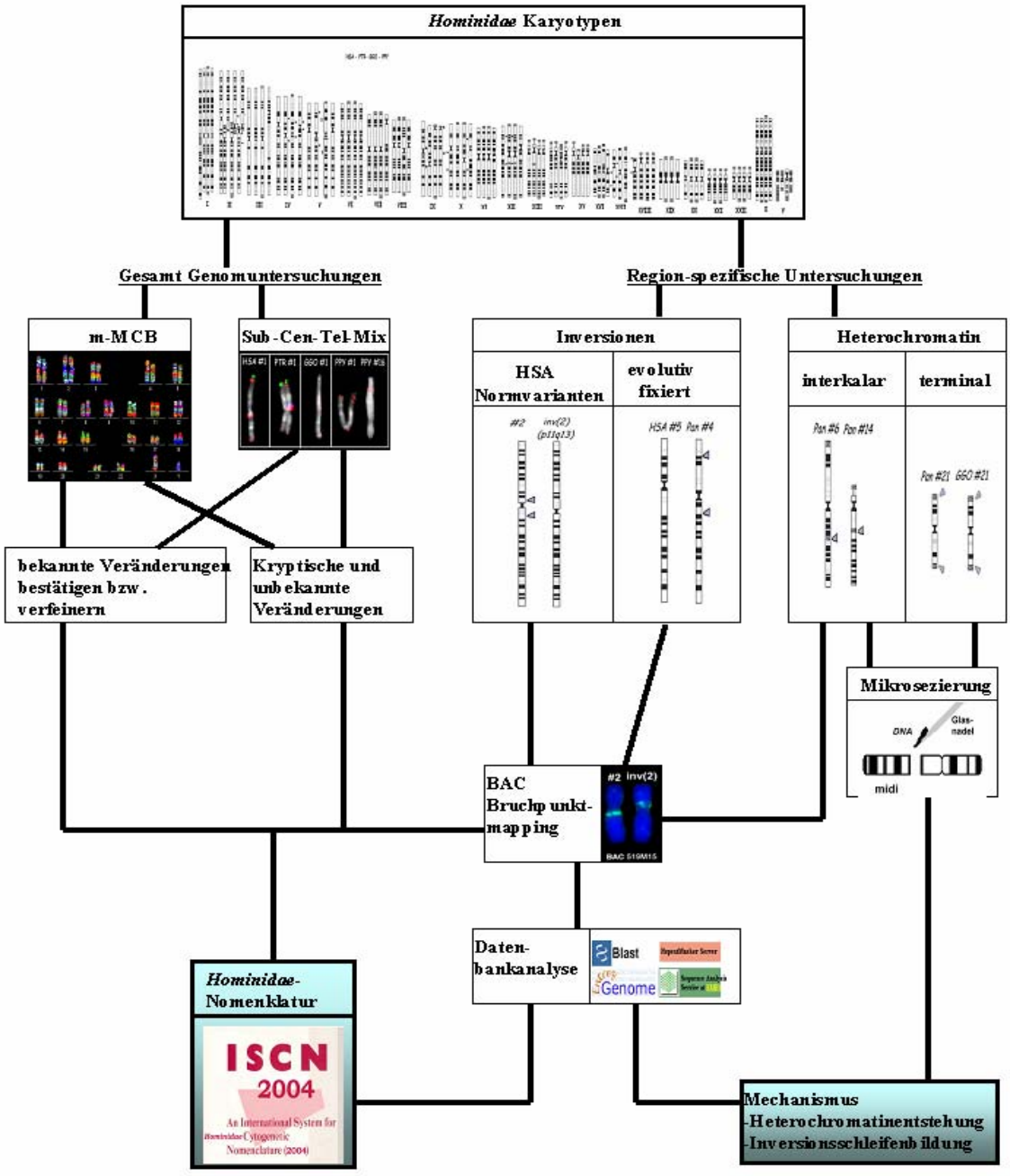


Abbildung 1.4: Flussdiagramm der Umsetzung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

2 Material und Methode

2.1 Untersuchungsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten „Blutsuspensionen“ wurden zum größten Teil in der zytogenetischen Abteilung des Institutes für Humangenetik und Anthropologie, Jena, nach Standardmethoden aufgearbeitet (Verma und Babu, 1994) und dauerhaft bei –20°C gelagert. Weiterhin wurden Zellsuspensionen von externen Laboratorien für diese Arbeit zur Verfügung gestellt, die ebenfalls nach Standardmethoden präpariert wurden.
Die Zelllinien für die ZOO-FISH Untersuchungen wurden freundlicherweise von folgenden Personen und Laboratorien zur Verfügung gestellt.

Spezies/Abkürzung	**EBV-transformierte Zelllinie**	**Zur Verfügung gestellt von**
Gorilla beringei beringei/GGO_B	1x weiblich	Prof. Rocchi/Bari, Italien
Gorilla gorilla gorilla/GGO	1x weiblich	Prof. Schempp/Freiburg
Pan paniscus/PPA	1x weiblich 1x männlich	Prof. Pääbo/Leipzig Prof. Schempp/Freiburg
Pan troglodytes troglodytes/PTR	1x weiblich	Prof. Rocchi/Bari, Italien
Pan troglodytes versus/PTV	1x männlich	Prof. Pääbo/Leipzig
Pongo pygmaeus pygmaeus/PPY_B	1x männlich 1x weiblich	Prof. Hameister/Ulm Prof. Schempp/Freiburg
Pongo pygmaeus abeli/PPY_S	1x männlich	Prof. Pääbo/Leipzig
Hylobates lar/HLA	1x männlich	Prof. Rocchi/Bari, Italien
Macaca mulatta/PMK	k. A.	Prof. Vermeesch/Belgien
Aotes spec../OMK	k. A.	Prof. Vermeesch/Belgien

Tab. 2.1: Herkunft der verwendeten Primatenzelllinien

2.1.1 Chromosomenpräparation

verwendete Reagenzien:

Aqua dest.
mit Seralpur DELTA (Seral) hergestelltes Reinstwasser (entionisiert, organisch rein, partikelfrei), zusätzlich autoklaviert

RPMI 1640 (Wachstumsmedium)
RPMI 1640 mit Glutamax-Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin (Gibco)
fetales Kälberserum (Biochrom KG) 12%
Penicillin (100000 U/ml) / Streptomycin (10000 U/ml) (Biochrom KG) 1%

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

hypotone Kaliumchlorid Lösung
KCl (Merck) 0,56%
in Aqua dest.

Fixativ
Methanol (Merck) : Eisessig (Merck) = 3 + 1

Colcemid-Lösung
Stammlösung mit 10 µg/ml

2.1.1.1 Chromosmenpräparation aus Blut

In eine sterile Kulturflasche (Cellstar, Greiner) wurden zur Kultivierung von Lymphozyten aus Blut 10 ml des Mediums RPMI 1640 und 100 µl des Mitogens Phytohämagglutinin (PHA) gegeben. PHA, welches aus *Phaseolus vulgaris* gewonnen wird, stimuliert spezifisch T-Lymphozyten, während es keine Wirkung auf B-Zellen hat.
Je Ansatz wurde 1 ml heparinisiertes Blut zugegeben. Die Kultivierung erfolgte über 72 h bei 37°C im Brutschrank. 1h 30 min vor Abbruch der Kultur wurden in jedem Ansatz 100 µl Colcemid (Seromed) pipettiert. Dieses Derivat des Alkaloids Colchicin wird aus *Colchium autumnale* gewonnen. Es verhindert den Aufbau des Spindelapparates in der Zelle und arretiert dadurch alle Zellkerne, die sich zu diesem Zeitpunkt in Mitose befanden, im Metaphasestadium.
Zur Aufarbeitung wurden die Kulturen in den Flaschen vorsichtig aufgeschüttelt bis sich sämtliche Zellen vom Boden gelöst hatten. Die Kulturflüssigkeit wurde in 14 ml Röhrchen (Falcon) überführt und 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 10 ml einer hypotonen KCl-Lösung (die vorher auf 37°C erwärmt wurde) und kräftiges Schütteln die Resuspension des Rückstandes und eine Inkubation bei 37°C für 20 min. Zur Hämolysierung der Erythrozyten wurden 1 ml 4°C kaltes Fixativ zugesetzt und gut geschüttelt. Durch die erneute Zentrifugation für 5 min bei 1500 U/min gelangten die hämolysierten Erythrocyten in den Überstand, dieser wurde entfernt und das Sediment in 10 ml kaltem Fixativ aufgenommen und nochmals 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Diese Waschvorgänge wurden zweimal wiederholt. Beim letztem Schritt wurde die Suspension mit dem Fixativ 30 min bei –20°C oder über Nacht im Kühlschrank belassen, um die vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment abhängig von seiner Dichte mit ca. 1 ml Fixativ versetzt. Bei sehr hoher Suspensionsdichte kann später nochmals mit Fixativ verdünnt werden. Die gewonnene Zellsuspension wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßes bei –20°C aufbewahrt.
Diese Lagerung bewirkt, dass die DNA-schädigende Wirkung des Fixativs, welche bedingt durch die Essigsäure zu Depurinierung und damit entstehenden Doppelstrangbrüchen in der DNA führen kann, möglichst gering gehalten wird.

2.1.1.2 Chromosomenpräparation aus Primatenzelllinien

Bei den Primatenzelllinien handelt es sich um Lymphoblastoidzellkulturen, die durch Transformation mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (humanpathogenes Virus mit doppelsträngiger DNA) und anschließender Cyclosporin-A-Behandlung immortalisiert wurden (Neizel *et al*., 1986).
Für die Kultivierung der Primatenzelllinien wurden je 10 ml RPMI-1640-Medium in eine sterile Kulturflasche überführt und die bereits in Kultur gewachsenen Zellen hinzugegeben. Optimale Wachstumsbedingungen wurden bei 37°*C* mit einer 5 % CO_2-Begasung und einer Kulturdauer von ca. 5 Tagen erreicht.
Die weitere Präparation der Zellen erfolgte wie unter 2.1.1.1 beschrieben.

2.1.2 Objektträgerpräparation für die konventionelle Zytogenetik und FISH

Zum Auftropfen wurden Objektträger (OT, Menzel-Superfrost) mit Seidenpapier gereinigt bzw. OTs, die in einem Methanol-Salzsäure-Gemisch gelagert wurden, benutzt. Die gereinigten OTs wurden in *Aqua dest*. bei 4°C im Kühlschrank gekühlt. Eine feuchte Kammer wurde bei ca. 60°*C* vorgewärmt, um ein Mikroklima zu schaffen, in welchem eine erhöhte Luftfeuchtigkeit herrschte (Spurbeck *et al.,* 1996). Die OTs wurden schräg in die feuchte Kammer gestellt. Nach dem Auftropfen der Suspension und leichter Antrocknung wurde Fixativ nachgetropft, um Plasmareste abzuspülen und eine weitere Fixierung der Zellen zu bewirken. Durch die Verdunstung des Methanols kann die Essigsäure ihre stark hygroskopische Wirkung ausüben, die wiederum zur Aufnahme von Wasser aus der

Atmosphäre führt und in einer Quellung und damit Sichtbarmachung der Chromosomen resultiert (Claussen *et al.,* 2002).
Für konventionelle zytogenetische Methoden wurden die OTs über Nacht im Trockenschrank gealtert oder alternativ bei 90°*C* für 1 h aufbewahrt.
Die OTs für molekularzytogenetische Methoden wurden zuerst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 95 %, 100 % Ethanol) dehydriert. Bei Raumtemperatur (RT) erfolgte für ca. 1 Woche die Alterung der OTs, bevor sie dann bei –20°C eingefroren wurden und so über längere Zeit lagerten.

2.2 Verwendete FISH Sonden

2.2.1 Cosmid, PAC und BAC Sonden

Cosmide sind Plasmide, die zusätzlich eine für λ-Phagen wichtige Eigenschaft, die *Cos-site*, besitzen. Dadurch wird es möglich, 40–50 kb große DNA-Fragmente, die infektiös wie Phagen sind, in die DNA von Bakterien einzuschleusen. Kommt es zur Ligation mit der Bakterien-DNA, verhält sich die integrierte DNA wie ein Plasmid (Mühlhardt, 2002).
Cosmide wurden für Subtelomersonden verwendet und wurden freundlicherweise von Lyndal Kearney/London und Hartmut Engels/Bonn zur Verfügung gestellt.
PAC ist die Abkürzung für „P1 artificial chromosome“. Der PAC Vektor stammt aus P1, einem temperenten Phagen mit einer Größe von etwa 100 kb.
Die als „Bacterial artificial chromosome“ (BAC) bekannte DNA ist ein modifiziertes Fertilitäts-Plasmid (F-Plasmid) aus dem Bakterium *Escherichia coli*, welches klonierte, humane, genomische DNA mit einer maximalen Größe von 0,3 Mb beinhaltet (Shizuya *et al.,* 1992). Die BACs liegen als relativ große Plasmide in geringer Kopiezahl in der Zelle vor, um diese stabil in der Zelle zu etablieren, muss ein hoher Selektionsdruck durch ein Antibiotikum, dessen Resistenz auf dem entsprechendem BAC codiert ist, angelegt werden.
Die in dieser Arbeit verwendeten BACs sind Bestandteile des Humanen Genomprojektes und wurden zum Teil freundlicherweise von Prof. Rocchi/Bari, Italien bereitgestellt. Des Weiteren stehen jedem Wissenschaftler gegen ein entsprechendes Entgeld die gesamte BAC Sammlung des Humanen Genomprojektes zur Verfügung (z.B. Invitrogen, CHORI/Oakland, USA). Die häufig verwendeten Sonden für den Subtelomer sowie den Subzentromerbereich sind in den **Tabellen 2.2.1 a** und **b** aufgeführt. Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten BACs sind jeweils im Ergebnisteil erwähnt.

Die BACs standen als Bakterienstocklösungen zur Verfügung. Die Aufarbeitung der Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit Protokolls (QIAGEN). Der Kit basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien mit einer anschließenden Adsorption der DNA an eine Silicat-Gel-Membran unter Hochsalz Bedingungen (siehe 2.4.1).

Bezeichnung (Sondenart)	Quelle	Lokalisation	Kreuzhybridisierung
Oncor (n.d.)	Oncor	1pter	
160H23 (PAC)	Engels H.	1qter	
892G20 (PAC)	Engels H.	2pter	
210E14 (COS)	Kearney L.	2qter	
1186B18 (PAC)	Engels H.	3pter	
Oncor (D3S1272)	Oncor	3qter	
36P21 (PAC)	Engels H.	4pter	
CT55 (COS)	Kearney L	4qter	
189N21 (PAC)	Engels H.	5pter	
240G13 (PAC)	Kearney L	5qter	
62I11 (PAC)	Engels H.	6pter	
Oncor (D6S2522)	Oncor	6qter	
109a6 (COS)	Kearney L	7pter	
Oncor (G31340)	Oncor	7qter	
Oncor (D8S2333)	Oncor	8pter	auf fast allen Telomeren
2053b3 (COS)	Kearney L	8qter	

Bezeichnung (Sondenart)	Quelle	Lokalisation	Kreuzhybridisierung
RP11-130B18	Rocchi M.	1p12	
RP11-35B4	Rocchi M.	1q21.1	1p36.1;1p12
RP11-882D5	Rocchi M.	2p11.2	
RP11-774E9	Rocchi M.	2q11.2	
RP11-91A15	Rocchi M.	3p12.1	11q23
RP11-21I16	Rocchi M.	3q12.1	
RP11-100N21	Rocchi M.	4p12	
RP11-535C7	Rocchi M.	4q12	
RP11-19F12	Rocchi M.	5p12	
RP11-160F8	Rocchi M.	5q11.2	
RP11-362K18	Rocchi M.	6p11.2	7q32
RP11387L5	Rocchi M.	6q12	
RP11-10F11	Rocchi M.	7p11.2	
RP11-144H20	CHORI	7q11.21	
RP11-64C22	Rocchi M.	8p11.21	
RP11-769N21	CHORI	8q11.21	

Bezeichnung (Sondenart)	Quelle	Lokalisation	Kreuzhybridisierung
43N6 (PAC)	Engels H.	9pter	
2241c1 (COS)	Kearney L	9qter	
2189b6 (COS)	Kearney L	10pter	
137E24 (PAC)	Engels H.	10qter	
2209a2 (COS)	Kearney L	11pter	
770G7 (PAC)	Engels H.	11qter	
90I5 (PAC)	Kearney L	12pter	
221K18 (PAC)	Engels H.	12qter	
Oncor (D13S1825)	Oncor	13qter	auf weiteren Telomeren
Oncor (D14S1420)	Oncor	14qter	
Oncor (n.d.)	Oncor	15qter	
CGG4 (COS)	Kearney L	16pter	
Oncor (Z96319)	Oncor	16qter	
2111b1 (COS)	Kearney L	17pter	
362K4 (PAC)	Kearney L	17qter	
52M11 (PAC)	Kearney L	18pter	
964M9 (PAC)	Engels H.	18qter	
F20643 (COS)	Kearney L	19pter	
129C9 (PAC)	Kearney L	19qter	
106L18 (PAC)	Engels H.	20pter	
81F12 (PAC)	Kearney L	20qter	
63H24 (PAC)	Engels H.	21qter	
N85A3 (COS)	Kearney L	22qter	
839C20 (BAC)	Engels H.	Xpter	Ypter
231B19 (BAC)	Kearney L	Xqter	Yqter
839D20 (BAC)	Engels H.	Ypter	Xpter
C8.2/1 (COS)	Kearney L	Yqter	Yqter

Bezeichnung (Sondenart)	Quelle	Lokalisation	Kreuzhybridisierung
RP11-128P23	Rocchi M.	9p12	9q13
RP11-430C15	Rocchi M.	9q13	
RP11-508N2	CHORI	10p11.21	
RP11-178A10	Rocchi M.	10q11.22	
RP11-12C11	Rocchi M.	11p11.21	
RP11-77M7	Rocchi M.	11q12	
RP11-517B23	Rocchi M.	12p11.21	
RP11-490D11	Rocchi M.	12q12	
RP11-768A4	Rocchi M.	13q12.1-12.2	
RP11-332N6	Rocchi M.	14q11.2	
RP11-171C8	Rocchi M.	15q11.2	
RP11-67I10	Rocchi M.	16p11.2	
RP11-474B12	Rocchi M.	16q12.1	
RP11-746M1	Rocchi M.	17p11.2	
RP11-229K15	Rocchi M.	17q11.2	
RP11-151D11	Rocchi M.	18p11.21	1p22-31
RP11-59E12	Rocchi M.	18q11.2	
RP11-22G10	Rocchi M.	19p13.1	
RP11-14D17	Rocchi M.	19q13.1	6q14
RP11-96L6	Rocchi M.	20p11.2	
RP11-243J16	Rocchi M.	20q11.2	
RP11-067E3	Rocchi M.	21q11.2	
RP11-115F6	Rocchi M.	22q11.21	
RP11-465B24	Rocchi M.	Xp11.2	
RP11-1065K8	Rocchi M.	Xq12	
RP11-75F5	Rocchi M.	Yp11.2	1qter
RP11489H20	Rocchi M.	Yq11.21	

Tab.2.2.1a u. b: Verwendete Subtelomersonden (a, linke Tabelle) und verwendete Subzentromersonden (b, rechte Tabelle)

2.2.2 Mikrosezierungs-Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikrosezierungs-Sonden wurden allesamt am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, hergestellt.

DNA-Banken zum Nachweis von	Bezeichnung	Sondenart	Referenz
ganzen Chromosomen	wcp 1-22,X,Y	chromosomenspezifisch	Senger *et al.,* 1998
p- bzw. q-Armen von Chromosomen	pcp 1p-12p pcp 16p-20p,Xp,Yp pcp 1q-22q,Xq,Yq	chromosomenarmspezifisch	Liehr und Claussen, 2002
Chromosomenteilen	MCB-Banken: 138 Banken über das gesamte Genom	- als regionspezifische Einzelsonden - als chromosomenspezifischer MCB-Mix - als genomspezifischer mMCB-Mix	Mrasek *et al.,* 2001 Weise *et al.,* 2003a
Chromosomenteilen	midi 54	spezifisch alle p-Arme der akrozentrischen Chromosomen	Mrasek *et al.,* 2001
	midi 36	9p12 und 9q13-21.1	Starke *et al.,* 2002

Tab. 2.2.2: Liste aller verwendeten Mikrosezierungssonden

2.2.3 Zentromer-Sonden

In einigen Fällen wurden kommerziell erhältliche zentromerspezifische Sonden der Firmen ABBOTT (früher VYSIS) und Q-BIOgene (früher Oncor) eingesetzt.
Die Sonden selber sind jeweils im Ergebnisteil beschrieben.

2.2.4 Verwendete Sondenmixe

Am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, wurden verschiedene Sondenmixe etabliert und standen für einzelne Untersuchungen zur Verfügung.
Die Labelschemata für das mMCB sowie für den subCTM Mix sind im Ergebnisteil aufgeführt (siehe 3.1.1 und 3.1.2).

Sondenmix	Zusammensetzung	Referenz
M-FISH	wcp 1-22,X,Y	Senger *et al.,* 1998
mMCB	138 MCB Banken das gesamte Genoms	Weise *et al* 2003a
subCTM-Mix	- für Chr. 1-12, 16-20, X, Y: p- und q-Arm-spezifische Subtelomersonden + Subzentromer BAC für p und q - für Chr. 13-15 + 21, 22: q-Arm- spezifische Subtelomersonden + Subzentromer BAC für q + midi 54	nicht publiziert bzw. subCenMixe aus Starke *et al*., 2003

Tab.2.2.4: Liste der verwendeten Sondenmixe

2.3 Mikrosezierung von Chromosomen

Die Mikrosezierung (nach Rubtsov *et al.,* 1996 und durchgeführt von Dr. Trifonov) wurde im Rahmen dieser Arbeit speziell für die Gewinnung von interstitiellen, terminalen und parazentrischen Heterochromatin der Gattung *Pan* eingesetzt. Zur besseren Unterscheidung der heterochromatischen Bereiche erfolgte die Mikrosezierung an GTG-gebänderten Chromosomen (siehe 2.5.1).
In Vorbereitung auf und während der gesamten Mikrosezierung wurde möglichst steril gearbeitet, um Kontaminationen zu vermeiden.

<u>verwendete Reagenzien und Ablauf:</u>

<u>Trypsin-Lösung:</u>

eine Ampulle Bacto-Trypsin (lyophilisiert, Difco) in *Aqua ad iniectabilia* lösen
(5 %ige Stammlösung); steril filtrieren, portionieren und bei –20°C lagern
Trypsin-Gebrauchslösung: 100 µl Stammlösung und 35 ml Phosphat Puffer (pH 6,88, Merck) in einem sterilen 50-ml-Plastik-Röhrchen (Greiner) ansetzen

<u>Giemsa-Lösung:</u>

35 ml Phosphat-Puffer-Lösung (pH 6,88, Merck) in ein steriles 50-ml-Plastik-Röhrchen (Greiner) geben und mit 3 ml steriler Giemsa-Lösung (Merck) mischen

<u>Sammel-Lösung:</u>

→ 10 mM Tris/HCl (pH 7.5, Merck)
→ 10 mM NaCl (Merck)
→ und *Aqua ad iniectabilia*.
Lösung mit UV bestrahlen und autoklavieren;
anschließend mit 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma) versetzen, aliquotieren, erneut mit UV bestrahlen und bei RT lagern
vor Gebrauch zugegeben von:
→ 0,5 mg/ml (Endkonzentration) Proteinase-K (Boehringer)
→ 50 µl Glycerol (Merck)

Herstellen von Glasnadeln

Die Glasnadeln zum Sammeln der Chromosomenfragmente wurden mit einem Pipettenziehgerät (Narishige, Modell PB-7) aus ca. 10 cm langen, massiven Duranglasstäben (Schott Rohrglas GmbH) mit einem Durchmesser von ca. 2 mm hergestellt. Der Glasstab wurde in Stufe 1 mit maximaler Heizkraft dünn ausgezogen. In Stufe 2 bei geringer Heizkraft und einem zusätzlichen Gewicht wurde der dünne Teil des Glasstabes abgerissen. So können beide Hälften als Nadeln zum Sammeln verwendet werden. Vor Gebrauch wurden die Nadeln unter UV-Licht bestrahlt.

Vorbereitung der Deckgläser

Deckgläser (60x24 mm, Menzel) einige Tage in 10 %iger SDS-Lösung (Sigma) entfetten

Präparation von Metaphaseplatten

vorbehandelte Deckgläser mit sterilem *Aqua dest* spülen,
auf feuchte Deckgläser je nach Zelldichte 1 - 2 Tropfen Zellsuspension geben,
vorsichtig frisches Fixativ auftropfen (bessere Spreitung der Metaphasen) und lufttrocknen

GTG-Bänderung

Deckglas für 1 min in Phosphat Puffer (pH 6,88, Merck),
40 - 60 s in der Trypsin-Gebrauchslösung (plasmareiche Präparate länger trypsinieren),
2 - 3 min in vorbereiteter Giemsa-Lösung färben,
kurz in *Aqua dest.* spülen, lufttrocknen

Die Mikrosezierung wurde an einem Inversmikroskop (Axiovert-135 oder Axiovert-10, Zeiss) durchgeführt. Es wurden Objektive mit folgender Vergrößerung verwendet: 10x (Plan-Neofluar) und 100x (Plan-Neofluar, Öl-Immersion). Am Mikroskopstativ war ein elektronisch kontrollierter Mikromanipulatoren (Firma Merzhäuser) befestigt; der sehr langsame Bewegungen in alle drei Achsen ermöglicht.
Ein Druckbleistift diente als Nadelhalter für eine sterile Glasnadel. Dieser wurde auf der rechten Seite platziert. Die Glasnadel wurde am Mikroskop mit dem 10er Objektiv zentriert. Bei dieser Vergrößerung erfolgte auch die Einstellung der Objektebene. Eine geeignete Metaphase wurde auf dem Deckglas gesucht und mit dem 100er Objektiv in die Mitte des Bildfeldes eingestellt.
Ein drehbarer Objekttisch ermöglichte es, das zu schneidende Chromosom in die gewünschte Position zur Nadel zu bringen. Danach wurde die Nadel langsam manuell auf die Metaphase mit einem Joystick abgesenkt. Die Nadel wurde soweit abgesenkt, bis sie vor der zu schneidenden Bande auf dem Deckglas aufsetzte. Für das Schneiden des entsprechenden Fragments aus dem Chromosom wurde die Nadel noch weiter abgesenkt, wodurch eine Vorwärtsbewegung entstand.
Sobald das Fragment an der Nadel hing, bewegte man die Nadel zuerst mit dem Joystick und dann mechanisch nach oben. Die beladene Nadel wurde vorsichtig in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß mit der Sammel-Lösung geführt und die Spitze der Nadel vorsichtig abgebrochen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis eine ausreichende Menge an Fragmenten gesammelt wurde (ca. 5 Fragmente).
Nach dem Sammeln der Fragmente wurde ein Proteinverdau mit der in der Sammel-Lösung enthaltenen Proteinase-K durchgeführt, indem das befüllte Eppendorfgefäß für 2 h bei 60 °C in einem PCR-Gerät inkubiert wurde.
Anschließend wurde die DNA-Bank in die vorbereitete erste PCR-Lösung (siehe 2.4.3.1) überführt.

2.4 Molekulargenetische Techniken

2.4.1 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mittels eines kommerziellen Kits der Firma QIAGEN. Der Kit basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien mit einer anschließenden Adsorption der DNA an eine Silicat-Gel-Membran unter Hochsalz Bedingungen.

verwendete Reagenzien:

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)
- 10 g Bacto-Trypton,
- 5 g Bacto-Yeast Extrakt,
- 10 g NaC,l

in 900 ml *Aqua dest*. lösen, pH mit 10 M NaOH (ca. 200 µl) auf 7.0 einstellen, Volumen auf 1 l mit *Aqua dest*. auffüllen, autoklavieren und verschlossen bei RT oder geöffnet im Kühlschrank lagern.

Chloramphenicol
34 mg /ml (Stammkonzentration) in Ethanol bei –20°C lagern, die Endkonzentration liegt bei 170 µg /ml.

Puffer P1 (QIAGEN)
Wird frisch mit RNase A (QIAGEN , 100 mg/ml) zubereitet und bei 4°C gelagert.

Puffer P2 (QIAGEN)
Puffer N3 (QIAGEN)
Puffer PE (QIAGEN)
Puffer EB (QIAGEN)
10 mM Tris-Chlorid mit pH 8.5

Die in Eppendorfgefäßen mit Agarose versandten *Escherichia coli* K12 Klone (apathogener Sicherheitsstamm, der in der freien Umwelt nicht überleben kann) wurden freundlicherweise von M. Rocchi (Universität von Bari / Italien) zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden kommerziell erworbene BACs aus dem Humanen Genomprojekt bearbeitet (CHORI/Oakland, USA bzw. Invitrogen). Bis zu ihrer Verarbeitung erfolgte die Lagerung im Kühlschrank.
Das LB-Medium musste zusätzlich mit dem Antibiotikum Chloramphenicol bzw. Kanamyzin versetzt werden, um selektiv nur Bakterien mit dem entsprechenden BAC-Plasmiden zu vermehren.
Das Animpfen der Mikroorganismen in 50 ml Röhrchen (Falcon) mit 5 ml der präparierten LB-Lösung erfolgte unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Platinimpföse unter der Werkbank im S1-Labor (Sicherheitslabor der Stufe 1 für die gentechnische Arbeit mit Mikroben, die keine Gefahr für gesunde Menschen und die Umwelt darstellen). Nach einer Kultivierung bei 37°C auf einem Schüttler über Nacht wurde das Kulturgemisch für 10 min bei 2800 rpm abzentrifugiert. Die Resuspension des Bakterienpellets erfolgte mit 250 µl des Puffers P1, danach wurden 250 µl von Puffer P2 zugegeben. Unter vorsichtigem mischen des Röhrchens klärte sich die Flüssigkeit auf. Sofort nach der Zugabe von 350 µl Puffer N3 wurde das Gemisch gut gemixt, bis die Lösung flockig wurde. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm wurde der Überstand in ein QIAprep spin colum (Eppendorfgefäß mit Säule) pipettiert und für 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die QIAprep spin colum mit 0,75 ml des Puffers PE gewaschen und für 1 min abzentrifugiert. Ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt von 1 min soll den restlichen Waschpuffer entfernen. Anschließend wurde die QIAprep spin colum in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und die DNA mit 50 µl des Puffers EB durch Zentrifugation für 1min bei 10000 rpm eluiert und dauerhaft bei –20°C gelagert.

2.4.2 Bestimmung des DNA-Gehaltes und der Reinheit der BAC-Proben

Die Konzentration der DNA wurde als Adsorption bei 260 nm mit Hilfe eines Photometers Uvikon 930 (Contron) bestimmt.
Die Reinheit der DNA ergibt sich aus dem Quotienten A_{260}/A_{280}, wenn dieser kleiner 1.8 ist, weist er auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, wenn der Wert jedoch größer als 1.8 ist, liegt wahrscheinlich eine Verunreinigung mit RNA vor.
Es wurde eine Verdünnung von 1:24 hergestellt (120 µl *Aqua dest*. + 5 µl Probe). Die gemessenen Werte bei 260 nm wurden mit dem Faktor 1200 (x50 x24) multipliziert, der sich wie folgt ergibt und die Konzentration in µg/ml angibt:
Bei 260 nm entspricht die Extinktion von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/µl (x50) beim Vorliegen von Doppelstrang-DNA multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 24 (Sambrook *et al.,* 1989).

2.4.3 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) ist es möglich, sehr geringe DNA-Mengen gezielt, *in vitro,* fast expotentiell zu vervielfältigen (Saiki *et al.,* 1985).
Für eine Standard-PCR benötigt man eine thermostabile Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde (Taq-Polymerase). Dieses Enzym besitzt eine 5`→3`-Polymerase, deren Aktivitätsoptimum bei 72°C liegt. Weiterhin benötigt werden ein Puffer, Nukleotide, Oligonukleotid-Primer und Ausgangs-DNA („template“).
Ein PCR-Zyklus läuft in 3 Stufen ab:

1. Denaturierung: Hier wird die doppelsträngige DNA Matrize bei hohen Temperaturen (92-98°C) in Einzelstränge getrennt.
2. Anlagerung der Primer: („annealing“) Zwei Oligomerprimer binden bei 37-70°C an die einzelsträngige DNA.
3. DNA-Synthese: („primer extension“ bzw. „elongation“) Bei 70-74°C beginnt die Taq-Polymerase die Primerverlängerung.

Abhängig vom Ziel der PCR können spezifische Primerpaare eingesetzt werden, die einen definierten DNA-Abschnitt amplifizieren oder unspezifische Primer, die unbekannte Zielsequenzen oder das gesamte Genom vervielfältigen.

Die in dieser Arbeit angewandten PCRs wurden unter sterilen Bedingungen und an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Weiterhin mussten die verwendeten PCR Lösungen steril sein, Nuklease- und Fremd-DNA frei sein. Für die Praxis im Labor wurden deshalb alle PCR Lösungen portioniert.
Die folgenden PCR-Reaktionen wurden in PTC-200 Thermocyclern (Peltier Thermal Cycler von Biozym Diagnostik GmbH) durchgeführt.

2.4.3.1 DOP-PCR

Die DOP-PCR (=Polymerase-Ketten-Reaktion mit degenerierten Oligonukleotid Primern) ermöglicht die Vervielfältigung von DNA unbekannter Sequenz bzw. des gesamten Genoms (Telenius *et al*., 1992a und b). Diese spezielle PCR arbeitet mit unspezifischen Primersequenzen (22 bp Oligonukleotid-Primer mit 6 undefinierten, zentralen Basen flankiert von spezifischen Basen (Bohlander *et al.,* 1992), die zusammen mit der niedrigen „annealing“ Temperatur (Renaturierungstemperatur) dafür sorgen, dass der Primer an viele Stellen der eingesetzten DNA binden kann.

Alle verwendeten Lösungen wurden mit sterilem pyrogenfreiem *Aqua dest*. (*Aqua ad iniectabilia,* Braun) hergestellt. Die Lösungen dürfen keine Nukleasen oder Fremd-DNA enthalten, da bei der Verwendung von DOP-Primern die Gefahr einer unspezifischen Amplifizierung besteht, die bei der Auswertung der Ergebnisse als Hintergrund stören würde.

Deshalb empfiehlt es sich, die Lösungen in kleine Aliquots zu portionieren und die PCR unter einer sterilen Werkbank durchzuführen.

Verwendete Reagenzien:

DOP-Primer

Der degenerierte Oligonukleotid Primer wurde von Herrn Dr. E. Birch-Hirschfeld (Institut für Virologie, Jena) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
DOP-Primer-Sequenz: 5` CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3`

dNTPs

Aus den Nukleotiden (GeneAmp, Perkin Elmer) wurde eine Gebrauchslösung hergestellt. Dabei wurden die einzelnen Nukleotide (je 10 mM) im Verhältnis 1:1:1:1 gemischt. Damit ergibt sich für jedes Nukleotid eine Konzentration von 2,5 mM.

T7-Sequenase

Die T7 Sequenase-2.0-DNA-Polymerase (13 U/µl) von Amersham wurde 1:8 in Sequenase Enzyme Dilution Buffer (Amersham) verdünnt.

AmpliTaq-DNA-Polymerase-Stoffel-Fragment

Die AmpliTaq-DNA-Polymerase-Stoffel Fragment (10 U/µl) wurde zusammen mit 10x Stoffel Fragment Puffer und 25 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) von Perkin Elmer geliefert.

Label-Mix

Aus den Nukleotiden (GeneAmp, Perkin Elmer) wurde eine Gebrauchslösung für die Markierungs-PCRs hergestellt. Die Nukleotide (je 10 mM) wurden im folgenden Verhältnis gemischt: je 2 mM dATP, dCTP und dGTP sowie 1 mM dTTP.
Anstelle des dTTP wurde während der PCR ein modifiziertes Nukleotid mit einem Hapten bzw. Fluorochrom in die DNA eingebaut.

AmpliTaq DNA-Polymerase

Die AmpliTaq DNA-Polymerase (5 U/µl, Perkin Elmer) wurde als Enzym bei den Markierungs-PCRs eingesetzt.

GeneAmp-10x-PCR-Puffer-II

Der GeneAmp-10x-PCR-Puffer-II (Perkin Elmer) 100 mM Tris-HCl; pH 8,3; 500 mM KCl, wurde als Puffer für die AmpliTaq DNA-Polymerase verwendet.

2.4.3.1.1 Amplifizierung der mikrosezierten Chromosomenfragmente

Wegen der geringen Ausgangs-DNA-Menge der mikrosezierten Chromosomenfragmente wurden 8 Sequenasezyklen als Niedrig-Temperatur-Zyklen durchgeführt. Die anfangs niedrig gewählte „annealing" Temperatur erlaubt eine häufigere und unspezifischere Bindung der DOP-Primer. In den anschließenden Hoch-Temperatur-Zyklen wird die DNA spezifischer und gezielter amplifiziert.
Das hier verwendete Protokoll wurde modifiziert nach Rubtsov *et al.,* 1996. Um eine Kontamination von Fremd-DNA zu vermeiden, wurde die PCR mit dem PCR-Gerät unter der Werkbank durchgeführt.

Lösung A (Niedrig-Temperatur-Zyklen)

	Stammlösung	*Endkonz.*	*pro Sonde*
Aqua ad			3,37 µl
Sequenase Puffer	5 x	0,6 x	0,60 µl
DOP-Primer	40,0 µM	5,0 µM	0,63 µl
dNTPs	2,5 mM	200 µM	0,40 µl

Pro mikrosezierten Fragment wurden 5 µl in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Nach Zugabe des Sammeltropfens mit der mikrosezierten DNA wurde die PCR gestartet.

Lösung B

	Stammlösung	*Endkonz.*	*pro Sonde*
Sequenase	13 U/µl	1,6 U/µl	0,25 µl
Sequenase Dilution Buffer			1,75 µl

Da die Sequenase ein thermolabiles Enzym ist und während des Denaturierungsschrittes inaktiviert wird, musste in jedem der 8 Zyklen nach der Denaturierung 0,25 µl dieser Lösung zugegeben werden.

Lösung C

	Stammlösung	*Endkonz.*	*pro Sonde*
Aqua ad			34,22 µl
Stoffel Fragment Puffer	10,0 x	1,0 x	5,00 µl
dNTPs	je 2,5 mM	220,0 µM	4,40 µl
DOP-Primer	40,0 µM	1,1 µM	1,38 µl
$MgCl_2$	25,0 mM	2,5 mM	5,00 µl

Pro Ansatz wurden 45 µl dieser Lösung zugegeben, um das Volumen des Ansatzes zu vergrößern. Die anschließenden Hoch-Temperatur-Zyklen wurden in einem Endvolumen von 57 µl pro Ansatz durchgeführt.

Lösung D (Hoch-Temperatur-Zyklen)

	Stammlösung	*Endkonz.*	*pro Sonde*
Aqua ad			3,5 µl
Stoffel Fragment Puffer	1 x	0,10 µl	0,5 µl
$MgCl_2$	25 mM	2,50 mM	0,5 µl
Stoffel Taq Polymerase	10 U/µl	1,0 U/µl	0,5 µl

Die Zugabe von 5 µl der Enzymlösung D erfolgte zuletzt, da die Primer erst einen Denaturierungsschritt durchlaufen müssen, um somit das Binden der degenerierten Sequenzen untereinander zu verhindern.

DOP-PCR-Ablauf (modifiziert nach Rubtsov *et al*., 1996)

Die DOP-PCR erfolgte unter einer sterilen Werkbank, die zuvor durch UV-Licht DNA-frei gemacht wurde. Es wurden insgesamt 8 Niedrig-Temperatur-Zyklen (bei 25°C „annealing" Temperatur) mit der thermolabilen Sequenase und 32 Hochtemperatur-Zyklen (bei 56°C „annealing" Temperatur) mit Ampli Taq DNA Polymerase Stoffel Fragment durchlaufen.
Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1.	92°C	5`	erster Denaturierungsschritt
2.	25°C	2`20``	Zugabe von 0,25 µl **Lösung B**; Primer „annealing" der Primer an die Ziel DNA
3.	34°C	2`	DNA „elongation"
4.	90°C	1`	

Die Schritte 2-4 wurden 8x durchgeführt. Anschließend erfolgten die spezifischen Amplifizierungen bei höheren Temperaturen nach folgenden Parametern:

5.	30°C	2`20``	Zugabe von 45 µl **Lösung C**
6.	92°C	1`	Denaturierungsschritt
7.	56°C	2`20``	Zugabe von 5 µl **Lösung D**, Primer „annealing"
8.	70°C	2`	DNA „elongation"
9.	92°C	1`	DNA Denaturierung
10.	56°C	1`	Primer „annealing"
11.	72°C	2`	DNA "elongation"

Die Schritte 9-11 wurden 32x durchgeführt.

12.	72°C	10`	DNA "elongation"

13. 4°C
Diese Temperatur wurde bis zur Beendigung des Programms beibehalten.

Zur höheren Stabilität der DNA gegenüber Nukleasen wurden nach der DOP-PCR 1µl EDTA pro Ansatz hinzugegeben. Die Lagerung der Proben erfolgte bei –20°C.

2.4.3.1.2 Amplifizierung der BAC-DNA

Die Amplifizierung der isolierten BAC-DNA erfolgte ebenfalls über eine DOP-PCR, wie sie in 2.4.2.1.1 beschrieben ist. Modifiziert wurde das Protokoll nur dahingehend, dass anstelle der 8 Sequenase-Zyklen nur 3 durchgeführt wurden. Die Ausgangs-DNA-Menge der BAC-DNA für die DOP-PCR lag bei ca. 200 ng/µl. Das entsprechende Volumen wurde vom *Aqua ad.* der Lösung A abgezogen.

2.4.3.1.3 Reamplifizierungs-PCR

Anschließend an eine DOP-PCR konnte eine Reamplifizierungs-PCR durchgeführt werden. Dies war nötig, um möglichst viel DNA für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu haben, ohne jedes Mal, wenn die DNA aufgebraucht war, eine erneute aufwendige DOP-PCR starten zu müssen. Diese PCR arbeitet ebenfalls mit dem unter 2.4.2.1.1 beschriebenen DOP-Primer und wurde zur Amplifizierung der Mikrosezierungs- und BAC-DNA eingesetzt.

PCR Ansatz:

	Stammlösung	*Endkonz.*	*pro Sonde*
Aqua ad.			34,25 µl
Stoffel-Fragment-Puffer	10 x	1 x	5,00 µl
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM	4,00 µl
DOP-Primer	40,0 µM	1,0 µM	1,25 µl
$MgCl_2$	25,0 mM	2,5 mM	5,00 µl
Stoffel Taq Polymerase	1 U/µl	0,1 U/µl	0,50 µl

Zu diesem Ansatz wurden 0,5 µl der DOP-PCR Produkte gegeben.

Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. 92°C 3` initiale DNA-Denaturierung
2. 91°C 1` DNA-Denaturierung
3. 56°C 1` Primer “annealing”
4. 70°C 2` DNA “elongation”

Die Schritte 2-4 wurden 29x wiederholt.

5. 72°C 5`
6. 4°C

Diese Temperatur wurde bis zur Beendigung der PCR beibehalten.

Auch nach dieser PCR wurde 1µl EDTA (Endkonzentration 5mM), zur Erhöhung der Stabilität der DNA gegenüber Nukleasen, hinzugegeben. Die Lagerung der reamplifizierten Proben erfolgte bei –20°C.

2.4.3.1.4 Markierungs-PCR

Die durch die DOP-PCR amplifizierte Mikrosezierungs- bzw. BAC-DNA wurde in einer anschließenden DOP-PCR markiert, indem modifizierte Nukleotide eingebaut wurden. Bei dieser PCR wurden neben den Einzelsonden auch Sonden-Mixe, die in DNA-Pools zusammengefasst waren, markiert.
Die Chromosomen-spezifischen MCB-Mixe wurden als Einzelbanken markiert und erst beim Fällen (siehe 2.4.6) der DNA zusammengegeben. Das Markierungsschema aller 24 Chromosomen-spezifischen MCB-Mixe ist im Ergebnisteil (siehe 3.1.1) dargestellt.
Die Zusammenstellung der subCTM-Mixe erfolgte analog, indem die Subzentromer-, die Subtelomer-Sonden für den p- sowie den q-Arm und die Ganzchromosomensonde in verschiedenen Farben einzeln markiert wurden und erst beim Fällen zusammengegeben

wurden. Es hat sich aber in der späteren Arbeit mit den subCTM Sonden gezeigt, dass es für bestimmte Fragestellungen besser ist, die Einzelsonden flexibler einsetzen zu können, weshalb die einzelnen subCTM Sonden später individuell für die Hybridisierung zusammengestellt wurden.
Der Ansatz für die Markierung der mMCB-Mixe gestaltete sich sehr viel komplexer, da hier 138 Einzelsonden kombiniert werden mussten. Hierbei wurden die DNA von 5-6 Einzel-MCB-Banken, die die gleiche Markierung erhalten sollten, zusammen pipettiert und einmal reamplifiziert (siehe 2.4.3.1.3), sodass der Aufwand für die Markierungs-PCR bei 27 Ansätzen für alle 138 Einzelbanken betrug. Diese wurden ebenfalls erst beim Fällen der markierten DNA vereinigt.

Folgende Fluorochrome zur **direkten Markierung** der Sonden-DNA wurden eingesetzt:

Name/Abkürzung	**Hersteller**	**Absorptions-maximum (nm)**	**Emissions-maximum (nm)**
Diethylaminocumarin-5-dUTP/DEAC	NEN Life Science Products, Inc.	426	480
Fluorescein-12-dUTP/Fluo	Roche	495	521
SpectrumGreen-dUTP	Abbott	497	524
ChromaTide-TexasRed-12-dUTP/TR	Molecular Probes	587	612

Die **indirekte Markierung** mit Haptenen wie Biotin-16-dUTP und Digoxigenein-11-dUTP (Roche) mussten über Fluorochrom-gekoppelte Antikörper während der Endwaschung detektiert werden (siehe 2.6.2).

PCR Ansatz:

	Stammlösung	*Endkonz.*	*pro Sonde*
Aqua ad.			12,08 µl
Replitherm Puffer	10 x	2 x	2,00 µl
DOP-Primer	40 µM	2,00 µM	1,00 µl
dNTP label-mix	10 x	2 x	2,00 µl
$MgCl_2$	25 mM	2,50 mM	2,00 µl
Modifiziertes Nukleotid	(je nach Herstellerangaben)		0,8-2,0 µl
AmpliTaq DNA Polymerase	5 U/µl	0,03 U/µl	0,12 µl

Zu diesem Ansatz wurden 2 µl der DOP-PCR Produkte gegeben.

Der dNTP „label-mix“ wurde aus 1 mM dTTP und jeweils 2 mM dATP, dCTP und dGTP hergestellt. Da anstelle des Nukleotids dTTP während der PCR der gewünschte direkte Farbstoff bzw. das indirekte Hapten eingebaut wird, ist es in einer niedrigeren Konzentration zugegeben wurden.

Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. 92°C 3` initiale DNA-Denaturierung
2. 91°C 1` DNA-Denaturierung
3. 56°C 1` Primer “annealing“
4. 70°C 2` DNA-“elongation”

Die Schritte 2-4 wurden 19x wiederholt.

5. 72°C 5`
6. 4°C

Diese Temperatur wurde bis zur Beendigung der PCR beibehalten.

Die markierte DNA wird wie unter 2.4.6 beschrieben einzeln bzw. als Mix gefällt, in Dextransulfat gelöst und bei –20°C gelagert.

2.4.4 DNA-Markierung über Nick-Translation

Die Markierung von DNA über Nick-Translation wurde erstmals von Rigby *et al*., 1977 beschrieben. Hierbei werden in einem DNA-Doppelstrang durch das Enzym DNase I und durch die nukleolytische Aktivität der DNA-Polymerase I (Kornberg-Polymerase) DNA-Strangbrüche („nicks“) gesetzt und die DNA teilweise abgebaut. Durch die polymerisierende Aktivität der DNA-Polymerase I werden die abgebauten DNA-Bereiche nach Zugabe der 4 Nukleotide, von denen eines markiert ist, repariert, wobei die DNA markiert wird. Diese Reaktion läuft optimal bei 15°C, da hier der gesamte „alte“ DNA-Strang abgebaut wurde.

Die Nick-Translation wurde in dieser Arbeit besonders für die schnelle Markierung von BACs eingesetzt. Es wurde der Biotin-16-dUTP- bzw. der Digoxigenin-11-dUTP-Nick-Translations-Kit von Roche verwendet. 1-10 µl der DNA-Sonde wurde mit 16 µl *Aqua ad*. verdünnt und mit 4 µl des Biotin- bzw. Digoxigenin-Nick-Kits, der die Nukleotide, den Puffer und die Enzyme bereits enthält, vermischt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler bei 15°C für 90 min. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 2 µl EDTA abgestoppt.
Die markierte DNA wird wie unter 2.4.6 beschrieben gefällt, in Dextransulfat gelöst und bei –20°C gelagert.

2.4.5 Photo- bzw. Thermoreaktive DNA-Markierung

Dieses Verfahren wurde als alternative, direkte, schnelle und Sequenz-unabhängige Markierungsmethode zur Markierung über DOP-PCR und Nick-Translation entwickelt (Weise *et al*., 2003b) (siehe 3.1.4).
2 µg Proben-DNA wurden in 20 µl 1x TE Puffer (1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) gelöst und mit 20 µl der Photoprobe Biotin Lösung (Vector) gemischt. Für die thermische Kopplung wurde das Gemisch mit 20 µl Mineralöl (Merck) überschichtet und bei 95°C für 20 min in einen Thermocycler inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 20 µl *Aqua dest.* und 80 µl Tris Puffer (pH 9.5). Die Trennung der beiden Phasen erfolgte durch Zugabe von 160 µl 2-Butanol (Merck), mischen und zentrifugieren bei 3000 rpm für 30 Sekunden. Die obere Butanol-Phase wurde abpipettiert und verworfen. Die Phasenaufreinigung wurde nochmals wiederholt, bevor die Biotin markierte DNA gefällt und als FISH-Sonde eingesetzt werden konnte (siehe 2.6)

2.4.6 DNA-Fällung

Die markierte DNA aus 2.4.3.1.4, 2.4.4 und 2.4.5 wurde durch eine Alkoholfällung aufgereinigt und konzentriert.

Verwendete Reagenzien:

3 M Natriumacetat
24,6 g Natriumacetat (CH_3COONa, wasserfrei) (Sigma)
add 100 ml *Aqua dest.* (pH 5,2 mit Eisessig (Merck) einstellen

Dextransulfat (DS)
2 g Dextransulfat (Sigma)
2 ml 20x SSC (Gibco)
2 ml 0,5 M Natriumphosphat (Na_3PO_4 x 12 H_2O) (Merck)
5 ml deionisiertes Formamid (ICN Biomedicals)
add 10 ml mit *Aqua dest*.
bei 70°*C* lösen (ca. 3 h)

t-RNA aus *E. coli* (Boehringer)
Stocklösung 10 µg/µl

Einzelsondenansätze wurden wie folgt gefällt:

Je Probe wurden 10 µl tRNA (zur Erhöhung der DNA-Ausbeute um ca. 10%), 20 µl steriles *Aqua dest.*, 5 µl 3 M Natriumacetat und 110 µl $EtOH_{abs}$ pipettiert und 20 min bei –80°C bzw. 2h bei –20°C gelagert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 1500 rpm für 15 min. Das Pelett wurde dann für ca. 5 min in der Speed vac (Sevant) unter Vakuum getrocknet und in 25 µl Dextransulfat resuspendiert. Die Proben wurden möglichst lichtgeschützt (wegen der Lichtempfindlichkeit der direkt markierten Proben) bei –20°C gelagert und bei Bedarf für FISH-Experimente entnommen.
Komplexere Sondenmixe, wie der M-FISCH, das MCB, das mMCB und der subCTM-Mix, wurden einzeln markiert aber zusammen gefällt, die Volumina der tRNA, des 3 M Natriumacetats und des Alkohols wurden entsprechend der Ansatzgröße erhöht.

2.4.7 Internetdatenbanken

Die enormen Fortschritte der Genomik in den letzten 10 Jahren basieren vor allem auf DNA Sequenzdaten und großen Fortschritten bei der Verarbeitung von Informationen. So sind bis heute (Stand März 2004) die Sequenzen von 85 Mikroorganismen und 7 Eukaryoten bekannt, darunter auch der Mensch. Eine Reihe weiterer Organismen werden bereits bzw. sind geplant, sequenziert zu werden. Zurzeit stehen etwa 35 Internetdatenbanken zur Bearbeitung verschiedenster Fragestellungen der Genomik zur Verfügung.
In dieser Arbeit wurden vor allem folgende Datenbanken verwendet:

NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Das „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) wurde 1988 als Informationssystem für Molekularbiologie entwickelt. Diese Datenbank ist neben Ensembl die größte und am meisten genutzte Datenbank und bietet von Sequenzhomologiesuche (BLAST) über Sequenzanalysen zu Leserahmen, „Single nucleotide polymorphism“ (SNP) und elektronischer PCR auch die Analyse von mRNAs und Proteinen. Zudem ist diese Datenbank auch eine aktuelle Ressource für Literatur (Pub med), Krankheiten und Gene (OMIM). Die gesamte Datenbank ist aufeinander und ineinander aufgebaut, so dass eine Reihe von Querverweisen und Links die Arbeit erleichtern.

RepeatMasker Server: http://repeatmasker.genome.washington.edu/cgi-bin/RM2 req.pl

Der RepeatMasker Server ist ein Programm der Ensembl Datenbank und ist in der Lage, Primaten DNA Sequenzen auf alle bekannten „Repeat“-Sequenzen zu durchsuchen. Dies sind vor allem transposable Elemente (z.B. „Medium Reiterarted repeats“ = MER), „short interspersed elements“ (SINE), Alu-Elemente, „long terminal repeat“ (LTR), „long interspersed repetitive element“ (LINE), Retrovirale Sequenzen aber auch einfache Basenpaarwiederholungen.
Die Ausgabe erfolgt in Form einer übersichtlichen Tabelle aller vorhandenen „Repeats“. Wahlweise kann aber auch direkt die „Repeat“-maskierte DNA abgerufen werden.

NCBI – PubMed:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=PubMed

NCBI – Blast: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/

Online Mendelian Inheritance in Man (=OMIM):
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM

Ensembl: http://www.ensembl.org/

The Cancer Genome Anatomy Project:
http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/AbnCytSearchForm

Tumorzytogenetik: http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Tumors/Tumorliste.html

Resources for molecular cytogenetics (Rocchi): http://www.biologia.uniba.it/rmc/

BAC/PAC resources center: http://bacpac.chori.org

Invitrogen BAC Klone: http://clones.invitrogen.com/bacpacsearch.php

Human Genome Project: http://www.gdb.org/hugo/

Liehr, 2004 / homepage: http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/human.htm

Primaten Zytogenetik:
http://www.biologia.uniba.it/primates/
http://staff.washington.edu/timk/cyto/karyotypes/index.html
http://www.primate.wisc.edu/pin/factsheets.html
http://locus.umdnj.edu/primates/primates_cgi/karyosumm.cgi

2.5 Bänderungs-Zytogenetik

Die Möglichkeit, Chromosomenbanden darzustellen gelang erstmals Dr. Lore Zech 1968. Diese Methode ermöglichte erstmals die Identifizierung jedes einzelnen menschlichen Chromosoms und ebnete den Weg einer genaueren Analyse von Strukturveränderungen menschlicher Chromosomen (Caspersson *et al.,* 1968, 1970a, 1970b).

2.5.1 GTG-Bänderung

Die GTG-Bänderung („G-bands by Trypsin using Giemsa“) ist bis heute eine der gebräuchlichsten Methoden, um Chromosomen darzustellen und so numerische und strukturelle Charakterisierungen zu ermöglichen (Seabright*,* 1971).
Diese Färbung kann sowohl für Zelllinien, Lymphozytenpräparate, Amnionzellen als auch für die Darstellung von Knochenmark-Chromosomen verwendet werden.
Für die Bänderung wurden OTs nach der unter 2.1.1 beschrieben Methode verwendet.

Verwendete Reagenzien:

Bacto-Trypsin

Bacto-Trypsin-Ampulle (DIFCO Laboratories GmbH) mit 10 ml *Aqua ad* mischen
(0,5 ml Aliquots herstellen), Lagerung bei –20°C
1 Aliquot Bacto-Trypsin in 100 ml PBS-Dulbecco (Biochrom AG) geben
bei 37°*C* vorwärmen

Giemsa-Lösung (Merck)

10 % Gebrauchslösung in certiPur-Puffer (pH 6,88) (Merck) verdünnen

Die OTs wurden für 19 s in der Bacto-Trypsin-Lösung inkubiert. Nach einem Waschschritt in PBS-Puffer schloss sich die Färbung in der Giemsa-Gebrauchslösung für 9 min an. Anschließend wurden die OTs erneut gespült, luftgetrocknet und Licht-mikroskopisch ausgewertet.

2.5.2 CBG-Bänderung

Die C-Bänderung („C-Banding using Giemsa“) führt zur spezifischen Anfärbung des Heterochromatins (Arrighi und Hsu, 1971). Neben den Zentromeren werden so auch die Heterochromatinblöcke in der Perizentromerregion der Chromosomen 1, 9 und 16 sowie das terminale Heterochromatin des Y-Chromosoms nachgewiesen.
Angewendet wird diese Färbung zur Abklärung von Polymorphismen der Heterochromatinregionen und perizentrischer Inversionen, zum Nachweis von di- bzw. polyzentrischen Chromosomen sowie zur Abklärung von Markerchromosomen.
Für die Bänderung wurden OTs nach der unter 2.1.1 beschrieben Methode verwendet.

Verwendete Reagenzien:

Salzsäure (Merck)
0,2 M HCl-Lösung

Bariumhydroxidlösung (Merck)
5 % $Ba(OH)_2$-Lösung
über einen Faltenfilter in eine Glasküvette filtrieren

2x SSC
17,5 g Natriumchlorid (NaCl) (Merck)
+ 8,8 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7$ x $2H_2O$) (Merck)
add 1000 ml *Aqua dest*.

Giemsa-Lösung (Merck)
10 % Gebrauchslösung in certiPur-Puffer (pH 6,88) (Merck) verdünnen

Die OTs wurden für 1 h bei RT in einer 0,2 M HCl-Lösung inkubiert. Nach dem Waschen in *Aqua dest*. erfolgte eine Inkubation für 7 min in einer 5 % Bariumhydroxid-Lösung.
Der entstehende weiße Niederschlag auf den OTs wurde durch gründliches Waschen entfernt. Danach erfolgte eine Inkubation der OTs für 1 h in 2x SSC bei 60°*C* in einem Wasserbad. Anschließend wurden die OTs erneut gewaschen und luftgetrocknet. Nach einer für 12 - 15 min Inkubation der OTs in einer Giemsalösung konnten die Präparate Licht-mikroskopisch ausgewertet werden.

2.5.3 NOR-Färbung

Die NOR-Färbung (Nukleolus-organisierende-Regionen) ermöglicht die Darstellung der NOR-Regionen in den p-Armen akrozentrischer Chromosomen(13, 14, 15, 21, 22) (Bloom und Goodpasture, 1976). Verschiedene Proteine des Nukleolus, z. B. das Nukleolin, reagieren dabei bevorzugt mit Silbernitrat und werden dadurch angefärbt.
Angewendet wird diese Färbung, um Polymorphismen dieser Bereiche und Markerchromosomen abzuklären und Satellitenassoziationen sichtbar zu machen.

Verwendete Reagenzien:

Colloidalentwickler-Lösung
2 g Gelatine (gepulvert) (Merck) in 100 ml *Aqua dest*. lösen
dazu 1 ml konzentrierte Ameisensäure p.a. (HCOOH) (Merck) geben

wässrige Silbernitratlösung
4 g Silbernitrat ($AgNO_3$) (Merck) in 8 ml *Aqua dest*. lösen
(dunkel lagern)

Giemsa-Lösung (Merck)
10 % Gebrauchslösung in certiPur-Puffer (pH 6,88) (Merck) verdünnen

Es wurden 2 Tropfen der Colloidalentwickler-Lösung mit 4 Tropfen der Silbernitratlösung gemischt, auf den OT gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und für 2 min auf der Heizplatte bei 70°*C* inkubiert. Nach einer Waschung erfolgte die Gegenfärbung mit einer 10 % Giemsa-Lösung für ca. 3 - 5 s und die Licht-mikroskopische Auswertung.

2.6 Molekulare Zytogenetik

verwendete Reagenzien:

Dextransulfat (DS)
2 g Dextransulfat (Sigma)
2 ml 20x SSC (Gibco)
2 ml 0,5 M Natriumphosphat (Na_3PO_4 x 12 H_2O) (Merck)
5 ml deionisiertes Formamid (ICN Biomedicals)

add 10 ml mit *Aqua dest*.
bei 70°*C* lösen (ca. 3 h)

0,5 M Na-Phosphat
0,5 M $Na_2H_2PO_4$ und 0,5 M Na_2HPO_4 1:1 mischen
pH 7,0 einstellen und zu 1 ml portionieren

deionisiertes Formamid
2 g Resin-Kügelchen (Bio Rad) Ionenaustauscher
50 ml 100 % Formamid (Merck)
für 3 h schütteln, filtrieren und bei –20°C lagern

20x SSC
87,65 g Natriumchlorid (Roth)
44,10 g Natriumcitrat-Dihydrat (Merck)
500 ml *Aqua dest*., autoklavieren
oder als gebrauchsfertige Lösung erhältlich bei Gibco BRL

2x SSC
in *Aqua dest*.
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

4xSSCT
4x SSC
0,05 % Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat, Sigma)
in *Aqua dest*.
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

SSCTM
0,5 g fettfreie Trockenmilch (Marvel)
10 ml SSCT
bei 1500 U/min zentrifugieren, oberste Schicht entfernen (kann noch ungelöstes Marvel enthalten)

1x PBS
PBS Dulbecco (9,55 g/l, Seromed)
in *Aqua dest*.

Pepsin-Lösung
1,0 % 1 N HCl
0,5 % Pepsin-Stammlösung (1 g Pepsin auf 50 ml *Aqua dest*., Sigma)
in *Aqua dest*.

Postfixationslösung
50 % Paraformaldehyd-Lösung (1 % Formaldehyd in 1x PBS)
5 % 1 M $MgCl_2$
in 1x PBS ansetzen

Formamid 50
50 % Formamid (Merck)
2x SSC
in *Aqua dest*.
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

Formamid 70
70 % Formamid (Merck)
2x SSC
in *Aqua dest*.
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

COT-1 DNA (100 µg)

50 µl COT-1 DNA (1 mg/ml, Gibco BRL) mit doppeltem Volumen $EtOH_{abs}$ versetzt, eintrocknen in der Speed vac (Savant) und bei –20°C lagern
→analog werden 25 µg, 10 µg bzw. 5 µg COT-1 DNA aliquotiert

DAPI/Antifade

0,4 % 4`,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma, Stocklösung: 50 µg/ml) mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) 0,6:1000 bis 1:1000 ansetzen und im Kühlschrank lagern

2.6.1 Hybridisierung der DNA-Sonden

2.6.1.1 Pepsinvorbehandlung der OTs

Eine wichtige Vorraussetzung für eine erfolgreiche Hybridisierung ist ein möglichst plasmafreies Präparat. Dies wird durch Protein-verdauende Enzyme, wie Pepsin, Proteinase K oder Trypsin erreicht, die das Plasma durchlässiger für Sonden-DNA machen und so die Hintergrundfärbung reduzieren. Andererseits muss auch beachtet werden, dass ein zu starker Verdau die Chromosomenmorphologie zerstört oder sogar bis zum Ablösen der Chromosomen vom OT führen kann. Zur Stabilisierung der Chromosomen wurde deshalb noch eine Nachbehandlung mit Postfixationslösung durchgeführt.

Die 1% HCl-Lösung wurde bei 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Die 500 µl Pepsin-Stammlösung wurden erst unmittelbar vor der OT Behandlung dazugegeben. Die OTs wurden exakt 5 min inkubiert und anschließend 5 min in 1x PBS bei RT gewaschen. Danach erfolgte eine Überschichtung der Präparate mit 100 µl Postfixations-Lösung für 10 min bei RT. Daran schloss sich ein erneuter Waschschritt mit 1x PBS für 5 min an. Zum Schluss wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % EtOH → 95 % EtOH → $EtOH_{abs}$) für je 3 min dehydriert (z. B. Liehr und Rautenstrauss, 1995).

2.6.1.2 Denaturierung der OTs

Dieser Schritt ist für die chromosomale DNA auf dem OT, wie auch für die DNA-Sonde nötig (siehe 2.6.1.3), um die Vorraussetzung für eine DNA-Hybridisierung zwischen der markierten Probe und dem Untersuchungsmaterial zu schaffen. Dabei wird durch die Formamidbehandlung die Stabilität der DNA-Doppelstränge verringert, wodurch die Denaturierungstemperatur niedriger als die normalerweise benötigte Temperatur gewählt werden kann und die Chromosomenstruktur weniger stark angegriffen wird.

Die Denaturierung der Präparate erfolgte mit 100 µl Formamid 70 bei 72°C auf der Heizplatte für 3 min. Danach wurden die OTs in –20°C kaltes EtOH (70%) für 3 min gegeben, um eine Renaturierung der DNA-Einzelstränge zu verhindern. Anschließend erfolgte die weitere Dehydrierung für je 3 min in 95 % und absolutem Alkohol bei RT. Die OTs wurden bei RT luftgetrocknet. Die OTs sollten nicht länger als 2h vor der Hybridisierung denaturiert werden, um eine Renaturierung der DNA zu vermeiden (z. B. Liehr und Rautenstrauss, 1995).

2.6.1.3 Denaturierung der Sonden-DNA

Die Sonden DNA wurde durch einen Prehybridisierungsschritt mit COT-1 DNA vorhybridisiert. In diesem Schritt werden repetetive Sequenzen in der Sonden DNA, die nicht hybridisieren soll, durch COT-1 DNA abgeblockt, um unspezifische Hintergrundsignale zu vermeiden. COT-1 ist eine Fraktion genomischer DNA, in der hochrepetitive Sequenzen (Alu-I-Linie, Kpu-I-Linie) durch eine bestimmte Aufarbeitung angereichert sind (Strachan und Read, 1996).
Wenn mehrere Sonden gleichzeitig eingesetzt wurden, musste das Volumen des Dextransulfates entsprechend verringert und die Menge an COT-1 DNA erhöht werden.
Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf einen halben OT. Die COT-1 DNA wurde getrocknet in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt (z. B. Liehr und Rautenstrauss, 1995).

MCB/wcp/pcp/BAC:
5 µl Sonde, 7 µl DS und 5-10 ng COT-1 wurden nach dem „Prehyb“ Protokoll denaturiert.

M-FISH:
6 µl Sondenmix, 6 µl DS und 25 ng COT-1 wurden nach dem „Prehyb“ Protokoll denaturiert.

mMCB:
Für einen halben OT wurden 10 µl Sondenmix und 25 ng COT-1 nach dem „Prehyb“ Protokoll denaturiert.

CEP (ABBOTT):
Für einen halben OT wurden 1 µl Sonde, 2 µl *Aqua dest*. und 7 µl CEP-Puffer nach dem „Direkt“ Protokoll denaturiert.

CEP (QBIOgene):
Für einen halben OT wurden 2 µl Sonde und 8 µl Hybridisierungspuffer VI nach dem „Direkt“ Protokoll denaturiert.

„Prehyb“ Protokoll (Thermocycler):

1.	75°C	5`	Denaturierung
2.	4°C	2`	
3.	37°C	30`	

„Direkt“ Protokoll (Thermocycler):

1.	72°C	5`	Denaturierung
2.	4°C	bis zur Entnahme der Proben aus dem Cycler	

2.6.1.4 Hybridisierung der denaturierten Sonden-DNA auf den denaturierten OT

Anschließend wurde das präparierte Gemisch auf den OT mit der denaturierten Ziel-DNA aufgetragen und luftblasenfrei mit einem 24 x 24 mm Deckglas abgedeckt. Die Ränder wurden mit Fixogum (Marabu) abgedichtet, um ein Austrocknen des Präparates zu verhindern.

2.6.1.4.1 Konventionelle Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht (16-24 Stunden). M-FISH und mMCB Sondenmixe, sowie Hybridisierungen auf Affenchromosomen wurden 30-48 h bei 37°C inkubiert.

2.6.1.4.2 Mikrowellen Hybridisierung

Diese neu entwickelte Technik (Weise *et al*., 2004 eingereicht) ermöglicht eine starke Verkürzung der Hybridisierungszeiten bzw. führt zu stärkeren Signalen, wenn man diese Behandlung einer konventionellen Hybridisierung vorschaltet. Hierbei wird die Temperaturerhöhung durch die Mikrowellenstrahlung auf den OT verhindert, indem dieser in einem Wasserbad bei maximal 37°C inkubiert wird, so dass scheinbar ein sterischer Effekt der Mikrowellen auf das Präparat zur Erhöhung der Hybridisierungseffizienz beiträgt.

Nachdem die denaturierte Sonden-DNA auf den denaturierten OT gebracht und die Deckgläser gut mit Fixogum abgedichtet wurden, erfolgte die Hybridisierung, indem der OT in eine Glas-Küvette und diese in einen Wasser-gefüllten Zylinder mit definiertem Volumen (750 ml) und Temperatur (16-20°C) gegeben wurde. Die Mikrowelle (BOSCH) wurde bei 360 Watt für eine definierte Zeit (abhängig von der Anfangstemperatur des Wassers im Glaszylinder, zwischen 2 min 45 sec und 4 min) gestartet, so dass nach Beendigung die Wassertemperatur im Glaszylinder bei 37°C lag.

2.6.2 Endwaschung und Detektion

Die Deckgläschen wurden vorsichtig von den OTs entfernt. Der Waschvorgang begann damit, dass die OTs 3x in Formamid 50 bei 42°C für je 5 min inkubiert wurden. Anschließend erfolgten 3 Waschschritte in 2x SSC bei 42°C für je 5 min. Dann wurden die OTs kurz in 4x SSCT bei RT gewaschen.

Indirekt markierte Sonden wurden wie folgt detektiert:
Um unspezifische Bindungsstellen für die bei der Detektion verwendeten Antikörper abzublocken, wurde das Präparat anschließend mit 100 µl SSCTM beschichtet und mit einem 24 x 60 mm Deckglas abgedeckt. Danach wurden die OTs für 15 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Das Deckglas wurde entfernt und das Präparat erneut kurz in 4x SSCT gewaschen. Danach wurden 75-100 µl der Antikörperlösung aufgetragen und der OT für 30-45 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Erfolgten noch weitere Detektionsschritte, z.B. um Signale von schwachen Sonden zu verstärken, dann wurde der OT nach jeder weiteren Inkubation der Antikörper 3x für je 5 min in 4x SSCT bei RT auf dem Schüttler gewaschen.

Verwendete Detektionssysteme:
Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper wurden lyophilisiert von den jeweiligen Herstellern geliefert und nach deren Angaben gelöst.
Zur Herstellung der Antikörper-Gebrauchslösung erfolgte eine Verdünnung in SSCTM.

Nachweis von **Biotin-16-dUTP**-markierten Sonden:

Avidin-Fluorescein-5-iso-Thiocyanat (Avidin-FITC) (Vector Laboratories)	1:500
(in einem 2. und 3. Schritt kann eine Verstärkung des Signals erzielt werden)	
- anti-Avidin-biotinyliert (Vector Laboratories)	1:100
- Avidin-FITC	1:500
FluoroLinkCy5-labelled-streptavidin (Amersham)	1:100
(in einem 2. und 3. Schritt kann eine Verstärkung des Signals erzielt werden)	
- biotinyliertes-anti-Avidin-D (in Ziege) (Vector Laboratories)	1:100
- FluoroLinkCy5-labelled-streptavidin	1:100

Nachweis von **Digoxigenin-11-dUTP-**markierten. Sonden:

anti-Digoxigenin-Rhodamin (Roche)	1:10
anti-Digoxigenin-Fluorescein	1:10
(in einem 2. und 3. Schritt kann eine Verstärkung des Signals erzielt werden)	
- anti-Maus-Digoxigenin (Sheep anti-mouse Ig-Digoxigenin, Chemicon)	1:10
- anti-Digoxigenin-Fluorescein	

Name/Abkürzung	Hersteller	Absorptions-maximum (nm)	Emissions-maximum (nm)
Avidin-Fluorescein-5-iso-Thiocyanat/FITC	Vector Laboratories	494	518
Anti-Digoxigenin-Fluorescein/α-Dig-Fluo	Vector Laboratories	494	518
anti-Digoxigenin-Rhodamine/α-Dig-Rhod	Roche	596	615
FluoroLink-Cy5-streptavidin/SA-Cy5	Amersham Pharmacia	649	670

Nach dem letzten Detektionsschritt wurde 1x in 4x SSCT für 5 min und 2x in PBS für je 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % EtOH $\rightarrow$ 95 % EtOH $\rightarrow$ $EtOH_{abs}$ für je 3 min). Die OTs wurden im Dunklen luftgetrocknet und zur Gegenfärbung der Chromosomen mit 20 μl DAPI/Antifade und Verwendung eines 24 x 60 mm Deckglases eingedeckt.

Wurden auf einem Präparat nur **direkt markierte Sonden** verwendet, z.B. bei den kommerziellen Zentromersonden, so entfielen die Detektionsschritte und das Präparat konnte sofort nach den ersten Waschschritten (Formamid 50 und 2x SSC) sowie den letzten Waschschritten (4x SSCT, 1x PBS und Alkoholreihe) und der Gegenfärbung ausgewertet werden.

2.6.3 Auswertung

Die Präparate wurden am Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) mit einem Fünffachfilterrad ausgewertet, welches die Aufnahme von DAPI, FITC, Spectrum Orange, Texas Red, Cy 5 und Cy 5.5 bzw. DEAC nacheinander ermöglichte.
Die Bildaufnahme und Verarbeitung erfolgte mit einer Standard-CCD Videokamera (IMAC) und der ISIS 3-Software (MetaSystems GmbH, Altlussheim) sowie der Paint shop pro 4-Software.

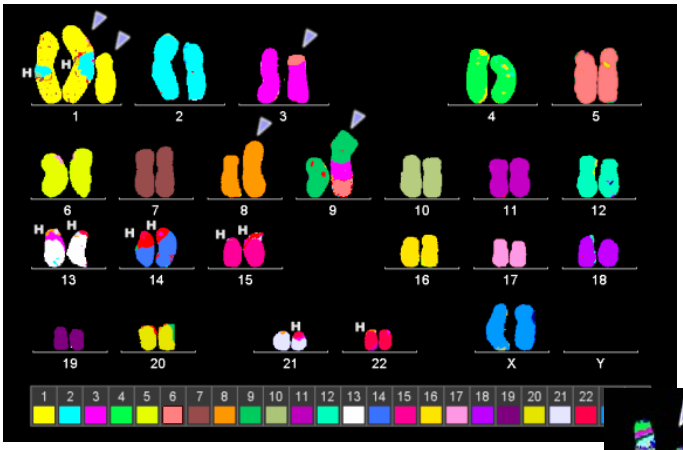
3 Ergebnisse

3.1 Methodische Neu- und Weiterentwicklungen

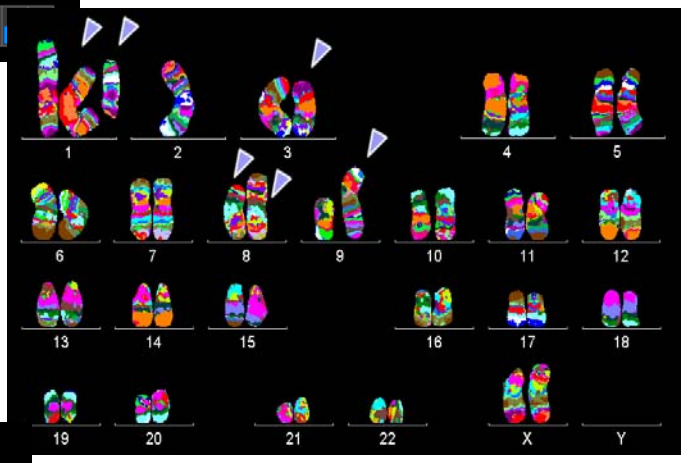
3.1.1 Multitude Multicolor Banding (mMCB)

Das sogenannte „multitude-Multicolor Banding“ (mMCB) ist ein FISH-Bänderungsverfahren (Weise *et al*., 2003a), das im Rahmen dieser Arbeit speziell für die schnelle und umfassende Analyse ganzer Genome, wie z.B. der *Hominidae*, entwickelt wurde. Es basiert auf den bekannten chromosomenspezifischen MCB Sondenmixen (Chudoba *et al*., 1999; Liehr *et al*., 2002b; Mrasek *et al*., 2001 und 2003; Kuechler *et al*., 2003). Die 24 MCB Sondenmixe werden beim mMCB in einem einzigen FISH-Ansatz (siehe 2.4.3.1.4 und 2.6) gemeinsam und somit zeit- und kostensparend eingesetzt. mMCB bietet derzeit die höchste auf FISH-Bänderungstechnik-basierende Auflösung, welche, methodisch bedingt, praktisch beliebig zwischen 1 und 550 Banden pro haploiden Chromosomensatz variiert werden kann.
Die 138 Chromosomen-regionspezifischen und überlappenden Mikrosezierungsbanken (siehe **Abb. 1 Anhang**), die das gesamte menschliche Genom abdecken, wurden zu einem Probenansatz zusammengestellt. Dieser Sondenansatz wurde erfolgreich an einem männlichen und einem weiblichen Probanden, zwei Leukämie Fällen, zwei soliden Tumorzelllinien sowie einer Gorilla Zelllinie evaluiert.

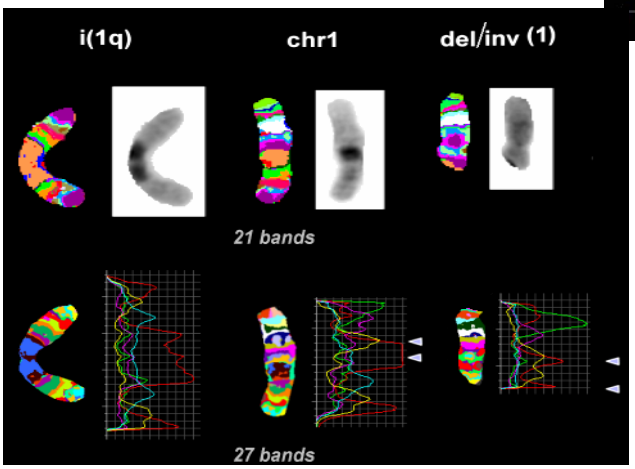
Die Auswertung erfolgte, wie es in **Abbildung 3.1.1** (unterer Bildabschnitt) exemplarisch an der epithelialen Brustkrebszelllinie MCF-10A dargestellt ist. Komplexe Karyotypen, wie bei dieser Zelllinie, erfordern eine Voruntersuchung mit M-FISH. Dies ist notwendig, da das mMCB Pseudofarbenmuster nur auf 24-30 redundanten Farben basiert. Deshalb wurde die Auswertung an Chromosomen-regionspezifischen Pseudofarben und anhand der Fluoreszenzprofile durchgeführt. Eine Besonderheit der MCB Technik ist, dass die Pseudofarben Bandenauflösung des mMCB beliebig, durch die ISIS Software (Metasystems, Altlussheim), variiert werden kann.



Karyotyp nach GTG/M-FISH:
47,XX,del(1)(?q),+i(1)(q10),
der(3)t(3;5),i(8)(q10),
der(9)t(9;3;5)



Karyotyp nach m-MCB:
47,XX,der(1)del(1)(q11)
inv(p21;q11),+i(1)(q10),
der(3)t(3;5)(5qter->5q34::3p14->
3qter),der(8)(8qter->8q22::8p22->
8qter),der(9)t(9;3;5)(9qter->
9q21::3p12->3p21::5q22->5qter)

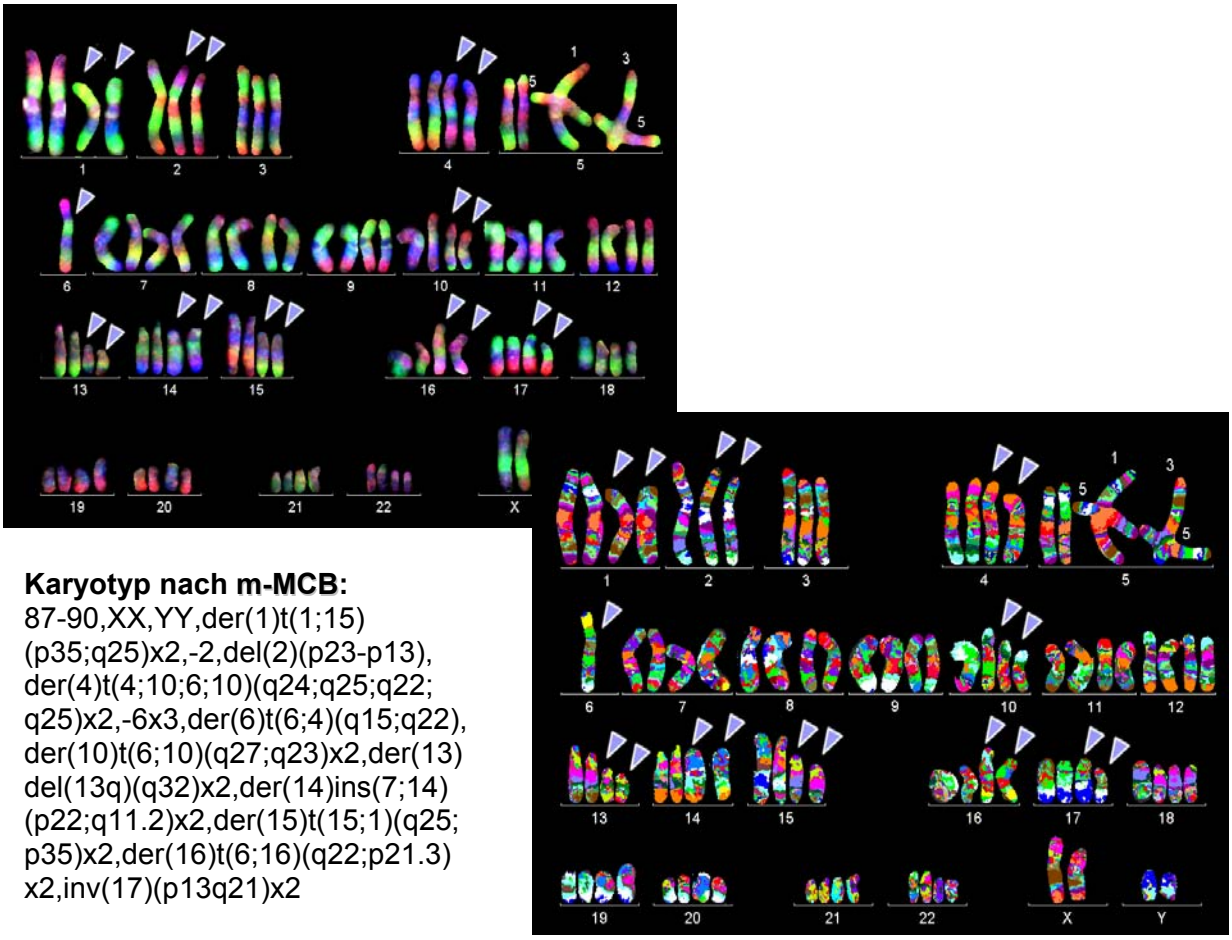


Chromosomen 1:

der(1)del(1)(q11)
inv(p21;q11),+i(1)(q10)

Abbildung 3.1.1: Exemplarische mMCB Auswertung nach M-FISH Analyse (oben) und lückenhafter Karyotypbeschreibung. Nach der mMCB Auswertung an der MCF-10A Zelllinie (Falschfarbendarstellung, Mitte) konnte der Karyotyp detailliert mit allen Bruchpunkten beschreiben werden. Die Informationen, die hierbei neu gewonnen werden konnten, sind rot unterlegt. Im unteren Bildabschnitt ist die Auswertung der 3 Varianten des Chromosoms 1 in dieser Zelllinie dargestellt. Der Isochromosomencharakter des linken Chromosoms kann sowohl anhand der Pseudofarben als auch an der Wiederholung der Fluorochromprofile nachvollzogen werden. Ebenso lässt sich auch die Deletion mit einer kleinen Inversion im rechten Chromosom nachvollziehen. Die Chromosom 1 Varianten sind mit einer Auflösung von 21 bzw. 27 Pseudofarbenbanden im normalen Chromosom 1 (Mitte) dargestellt, um die Flexibilität dieser Software-vermittelten Auflösung zu demonstrieren.

Da keine Doppelmarkierungen einzelner Mikrosezierungsbanken im mMCB vorgenommen wurden - wie es bei den herkömmlichen MCBs üblich ist - besteht theoretisch die Möglichkeit, dass intrachromosomale Veränderungen in Regionen gleicher Fluoreszenz übersehen werden können. Um zu testen, ob, und inwieweit diese theoretischen Schwächen des mMCB Sondensatzes zum Tragen kommen, wurde eine *Gorilla gorilla* Zelllinie, die bereits gut mit 24 Einzel MCB Hybridisierungen charakterisiert worden war (Mrasek *et al*., 2001), nach einer mMCB Hybridisierung ausgewertet (Daten hier nicht gezeigt). Alle bekannten Inversionen sowie eine Translokation konnten hierbei nachgewiesen werden. Die hohe Auswertbarkeit des mMCB beruht auch auf der Tatsache, dass verschiedene Banken gleicher Fluoreszenz sich auch in der Fluoreszenzintensität unterscheiden lassen, so dass die theoretische Auswertungslücke zum Teil kompensiert werden kann.
Die Untersuchungen an 2 Leukämie Fällen mit dem mMCB (Weise *et al.,* 2003a) konnten die bereits bekannten Aberrationen nachweisen und zusätzlich Einzelzellaberrationen, wie terminale Deletionen oder Inversionen, sowie eine klonale Deletion.
Die Untersuchung der Prostata Zelllinie LNCap mit mMCB erlaubte, trotz der hohen Komplexität durch Tetraploidie und zahlreicher Aberrationen, eine genaue Beschreibung des Karyotyps (siehe **Abb. 3.1.1c**).



Karyotyp nach m-MCB:
87-90,XX,YY,der(1)t(1;15)(p35;q25)x2,-2,del(2)(p23-p13),der(4)t(4;10;6;10)(q24;q25;q22;q25)x2,-6x3,der(6)t(6;4)(q15;q22),der(10)t(6;10)(q27;q23)x2,der(13)del(13q)(q32)x2,der(14)ins(7;14)(p22;q11.2)x2,der(15)t(15;1)(q25;p35)x2,der(16)t(6;16)(q22;p21.3)x2,inv(17)(p13q21)x2

Abbildung 3.1.1c: Karyogramm der Zelllinie LNCaP nach mMCB in der Echtfarbendarstellung (oben) sowie in der Pseudofarbendarstellung (unten). Die vollständige Karyotypformel ist links dargestellt.

3.1.2 Subzentromer- Subtelomer Sondenset (subCTM)

Zur Analyse kleiner zentromernaher Rearrangements wurde kürzlich ein spezifisches Verfahren entwickelt: das Subzentromer-spezifische multicolor FISH (subcenM-FISH). Hierbei wurden die nach Datenbankangaben zentromernächsten verfügbaren BAC-Sonden mit einer Zentromer- sowie je einer Sonde für den langen und kurzen Arm eines

menschlichen Chromosoms in einem 5-Farben-FISH Ansatz zusammengestellt (Starke *et al*., 2003).
Speziell für ZOO-FISH-Analysen wurden nun die genannten zentromernahen BAC-Sonden (Starke *et al*., 2003; siehe 2.2.1) mit spezifischen Sonden für die jeweiligen Subtelomerbereiche (Knight *et al*., 2000; Ning et al., 1996; kommerzielle Subtelomersonden, siehe 2.2.1) und einer humanen Ganzchromosomensonde kombiniert. Diese Sonden wurden in einem chromosomenspezifischen Fünf-Farbansatz zum sog. subCTM-FISH zusammengestellt (siehe 2.2.4). Alle 24 Sondenmixe wurden für die Chromosomen des Menschen etabliert und haben das Potential, Veränderungen der evolutionär dynamischen Subtelomer und Subzentromer Regionen sichtbar zu machen (**Abb. 3.1.2**).

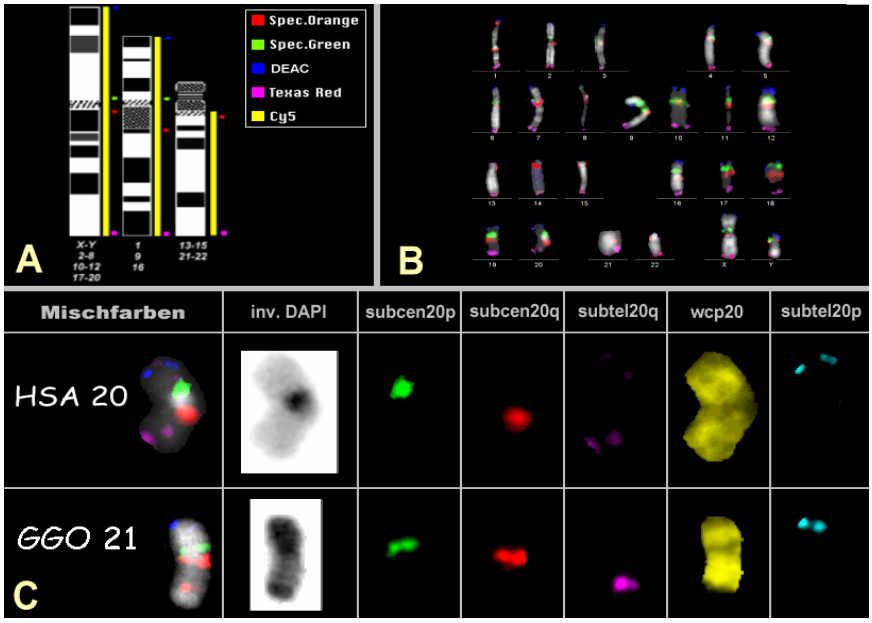


Abbildung 3.1.2: (A) Schematische Darstellung der Sondenmarkierung und Zusammensetzung an Heterochromatin-tragenden (Mitte) und akrozentrischen (rechts) sowie den anderen (links) Chromosomen. **(B)** SubCTM FISH Ergebnisse für alle 24 Chromosomen des Menschen in der Mischfarbendarstellung. **(C)** Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse des subCTM Mixes für Chromosom 20 am Menschen (HSA) und dem entsprechenden homologen Gorillachromosom 21 (GGO, nach herkömmlicher Nomenklatur).

3.1.3 Mikrowellenvermittelte Nukleinsäurehybridisierung

Die FISH-Technik weiter zu optimieren, um sie effizienzter und qualittativ zuverlässiger für den Einsatz in der Diagnostik und der Forschung zu machen, war Anliegen der folgenden Versuche.
Der Einsatz der Mikrowelle in der *in situ* Hybridisierung ist schon seit längerem, insbesondere als Vorbehandlungsmethode von Gewebsschnitten, Dekondensierung und Denaturierung von zentromerspezifischen DNA Sonden, bekannt (Sibony *et al*., 1995; Coates *et al*., 1987; Kobayashi *et al*., 2000; Ko *et al*., 2001; Kitayama *et al*., 2000). Dabei wurde vor allem der schnelle Wärmeeffekt der Mikrowellen für ein verbessertes FISH-Protokoll ausgenutzt.
Das in dieser Arbeit beschriebene und verwendete Protokoll (siehe 2.6.1.4.2) setzt zum erstenmal gezielt die Mikrowellenstrahlenwirkung für die Hybridisierung selbst ein. Diese neue Methode wurde parallel an konventionellen und Mikrowelle-vermittelten Hybridisierungsversuchen evaluiert, wobei die Autobelichtungszeit der CCD Kamera in Verbindung mit der ISIS Software als Hybridisierungsqualitätsmesser nach verschiedenen definierten Hybridisierungszeiten genutzt wurde. Die Mikrowellen-vermittelte Hybridisierung wurde an BAC- sowie Zentromer- und wcp- bzw. pcp- Sonden etabliert (Daten für die BAC Hybridisierung sind in **Abb. 3.1.3a** und **b** zusammengefasst). Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Hybridisierungsqualität und Effektivität nach Mikrowellen

behandelter Hybridisierung vor allem in den ersten 100 Minuten der Hybridisierung. So wird z.B. die Belichtungszeit nach 5 min und einer Mikrowellenbehandlung von der konventionellen Hybridisierung erst nach 80 min erreicht. Für die Praxis wird eine 4-5 fache Mikrowellenbehandlung bei 600 Watt in den ersten 30 Minuten der Hybridisierung empfohlen.
Die hier vorgestellte Methode ist also viel effektiver als die herkömmliche Hybridisierung bei 37°C und beeinflusst besonders die Hybridisierungsqualität von kleinen, schwachen und „single copy“ Sonden-DNA positiv.

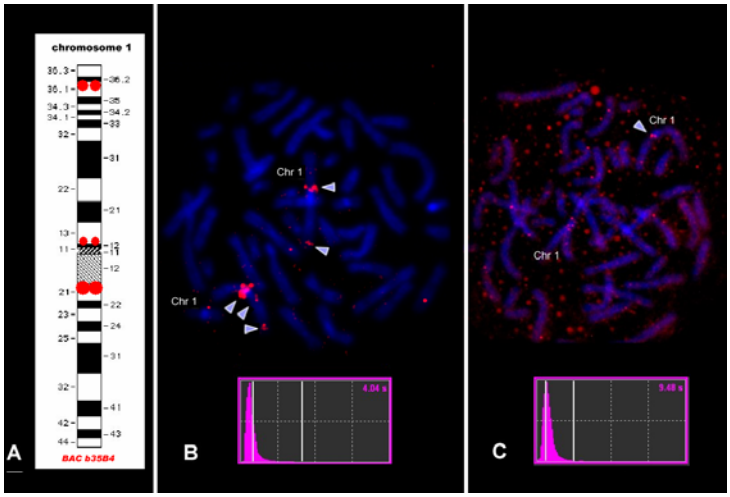


Abbildung 3.1.3a: (A) Schematische Darstellung des Hybridisierungsmusters von BAC 35B4. **(B)** FISH Ergebnisse auf einer normalen weiblichen Metaphase nach 5 min und einer Mikrowellenbehandlung; alle 3 spezifischen Signale sind auf den homologen Chromosomen 1 deutlich zu sehen (Pfeile). **(C)** FISH Ergebnisse nach der gleichen Behandlung nach 5 min aber ohne Mikrowellenbehandlung; nur das stärkste Signal in 1q21 kann auf den Chromosomen 1 identifiziert werden (Pfeile).

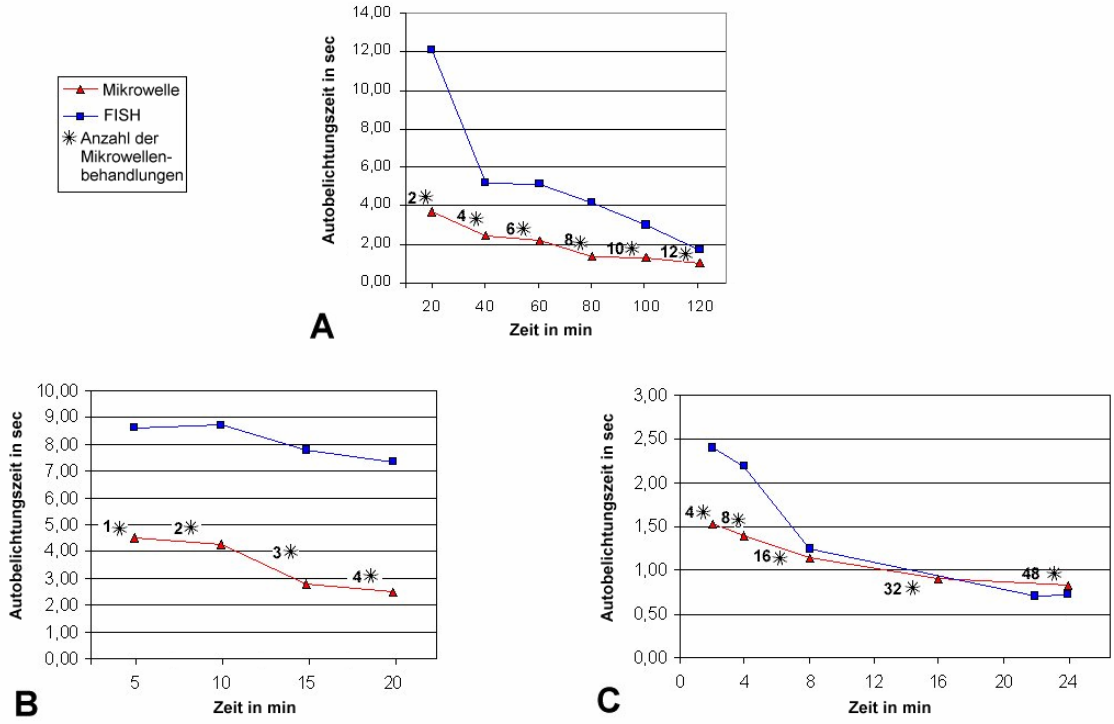


Abbildung 3.1.3b: Darstellung der Autobelichtungszeiten zwischen der konventionellen FISH Hybridisierung (blaue Linie) und der Mikrowellen Hybridisierung (rote Linie). Die Anzahl der Mikrowellenbehandlungen ist durch Sterne gekennzeichnet. Die OTs wurden alle 20 min innerhalb von 2 h **(A)**, alle 5 min innerhalb von 20 min **(B)** und nach 2, 4, 8, 16, 22 und 24 h innerhalb von 2 Tagen **(C)** ausgewertet.

3.1.4 Photo- bzw. Thermoreaktive DNA-Markierung

Dieses Verfahren wurde als alternative, direkte, schnelle und Sequenz-unabhängige Markierungsmethode zur Markierung über DOP-PCR und Nick-Translation, für die z. T. in dieser Arbeit verwendeten BAC-Kartierungssonden, entwickelt (Weise *et al*., 2003b). Die Markierung erfolgt über Photoprobe Biotin (Vector), einer photoaktivierbaren Form des Biotin. Hierbei wird das photoaktivierbare Biotin durch Exposition von Hitze oder Licht bei 365 nm kovalent an DNA gebunden. Bei dieser Markierung wird nicht wie bei der DOP-PCR oder der Nick Translation nur eine der 4 Basen markiert, es erfolgt stattdessen eine Markierung aller Basen, weshalb die Signalstärke der Photoprobe Biotin markierten Sonden deutlich besser erscheint.
Die Erweiterung der Photoprobe Biotin-Methode auf Anwendungen in der molekularen Zytogenetik konnte erfolgreich an mikrosezierten und DOP-PCR amplifizierten wcp Sonden, an YAC- sowie an BAC-Sonden gezeigt werden (Daten hier nicht gezeigt). Die mit dieser Methode erzielte Signalstärke für Lokus-spezifische Sonden ließ sogar eine Auswertung an Interphasekernen zu. Das Protokoll (siehe 2.4.5) benötigt insgesamt weniger als eine Stunde und ist damit insgesamt 2-3-fach schneller als die herkömmliche Markierung über DOP-PCR (Weise *et al*., 2003b).

3.2 Gesamtgenomische Untersuchung der *Hominidae* auf kryptische Rearrangements

3.2.1 Beschreibung bekannter sowie neuer Rearrangements der *Hominidae* nach mMCB und subCTM

Die mMCB sowie die subCTM Untersuchungen wurden vergleichend zum menschlichen Karyotyp, an dem diese Sondesätze etabliert wurden (siehe 3.1.1 und 3.1.2), durchgeführt. Es wurden jeweils 5-10 Chromosomen je Spezies untersucht.
Im Folgenden werden die Ergebnisse für jedes Chromosom und den entsprechend homologen Chromosomen der großen Menschenaffen (Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan) beschrieben. Für jede Einzelchromosomenbeschreibung sind die Hybridisierungsergebnisse in den **Abbildungen 3.2.1 a-d** dargestellt. Das terminale Heterochromatin einiger Schimpansen und Gorilla Chromosomen wird im Folgenden nicht mit betrachtet und kann den Vorschlägen zur Nomenklatur der *Hominidae* Chromosomen entnommen werden (siehe 3.4).
Auf eine Beschreibung des Y-Chromosoms wurde verzichtet, da nicht von allen *Hominidae* männliche Zelllinien zur Verfügung standen.
Die Hybridisierungsergebnisse des mMCB sind zusammenfassend für alle *Hominidae* Chromosomen als Mischfarben dargestellt (siehe **Abb.3.2.1a und b**).
Die Ergebnisse des subCTM sind ebenfalls zusammenfassend in **Abbildung 3.2.1c** als Mischfarben und in **Abbildung 3.2.1.d** schematisch dargestellt.

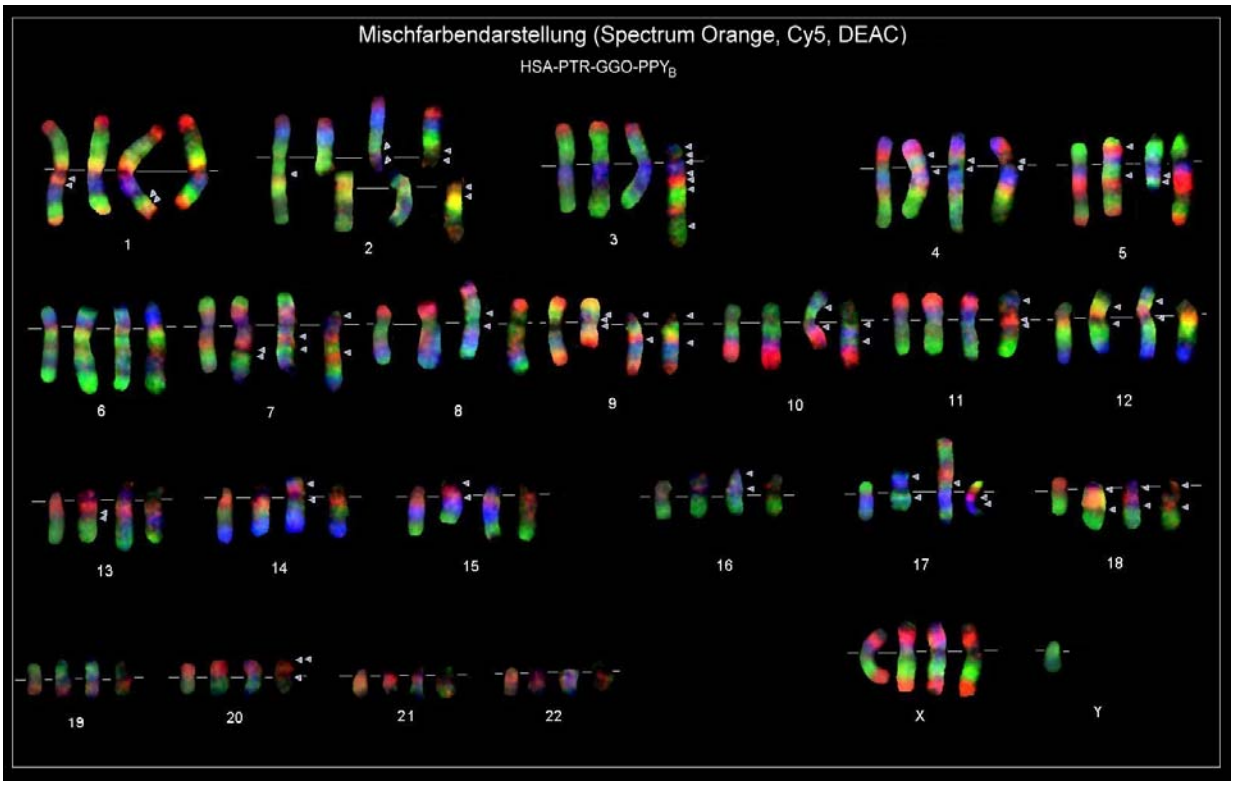


Abbildung 3.2.1a: Zusammenfassende Darstellung der Hybridisierungsergebnisse des mMCB der der Menschen (HSA), Schimpansen (PTR), Gorillas (GGO) und Orang-Utans (PPY) als Mischfarben (Spectrum Orange, Cy5, DEAC). Alle Bruchereignisse im Vergleich zum menschlichen Chromosom sind als Pfeile dargestellt und werden im Folgenden näher beschrieben.

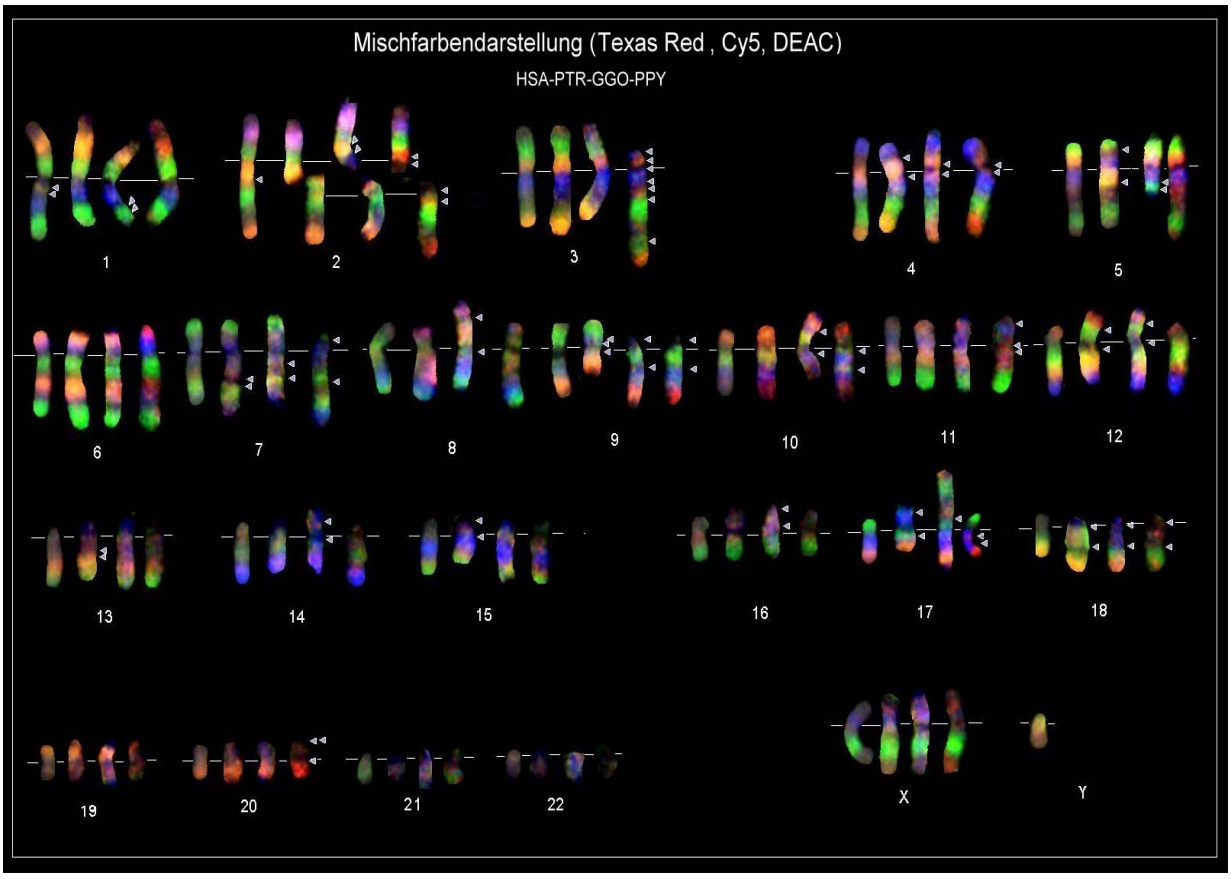


Abbildung 3.2.1b: Wie Abbildung 3.2.1a, jedoch in den Mischfarben Spectrum Orange, Cy5 und DEAC.

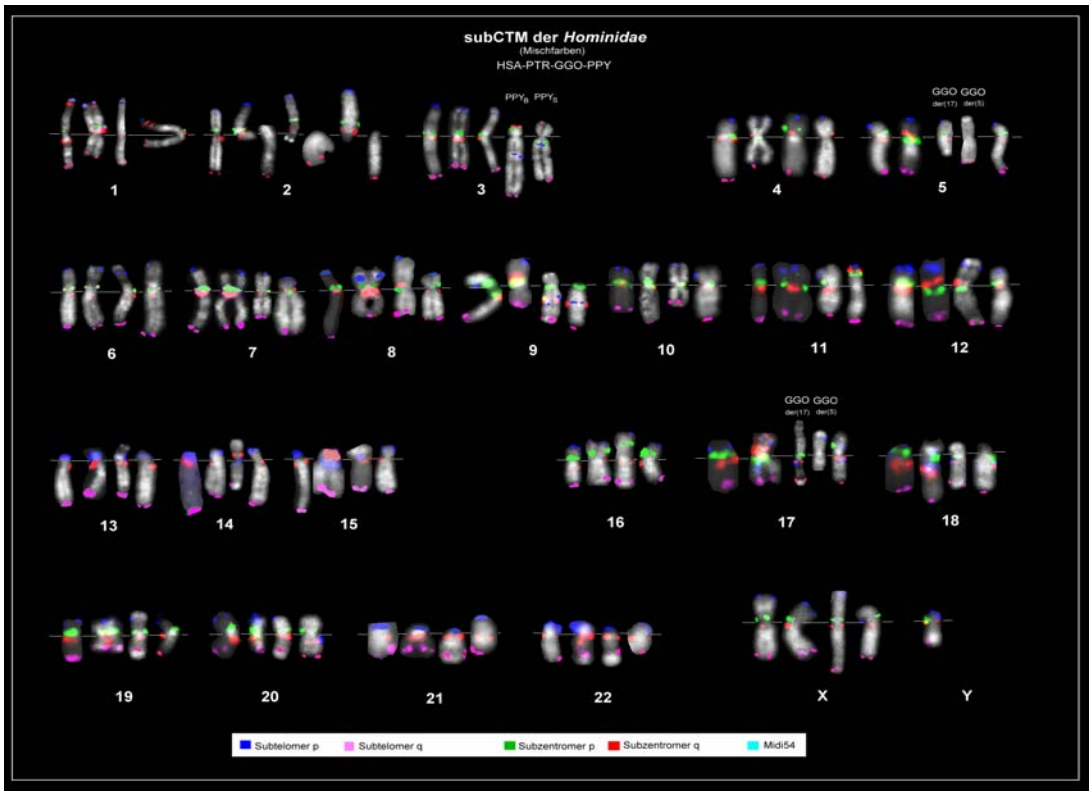


Abbildung 3.2.1c: Zusammenfassende Darstellung der Hybridisierungsergebnisse des subCTM der *Hominidae* als Mischfarben. Zusammenstellung der Abbildung wie 3.2.1.a.

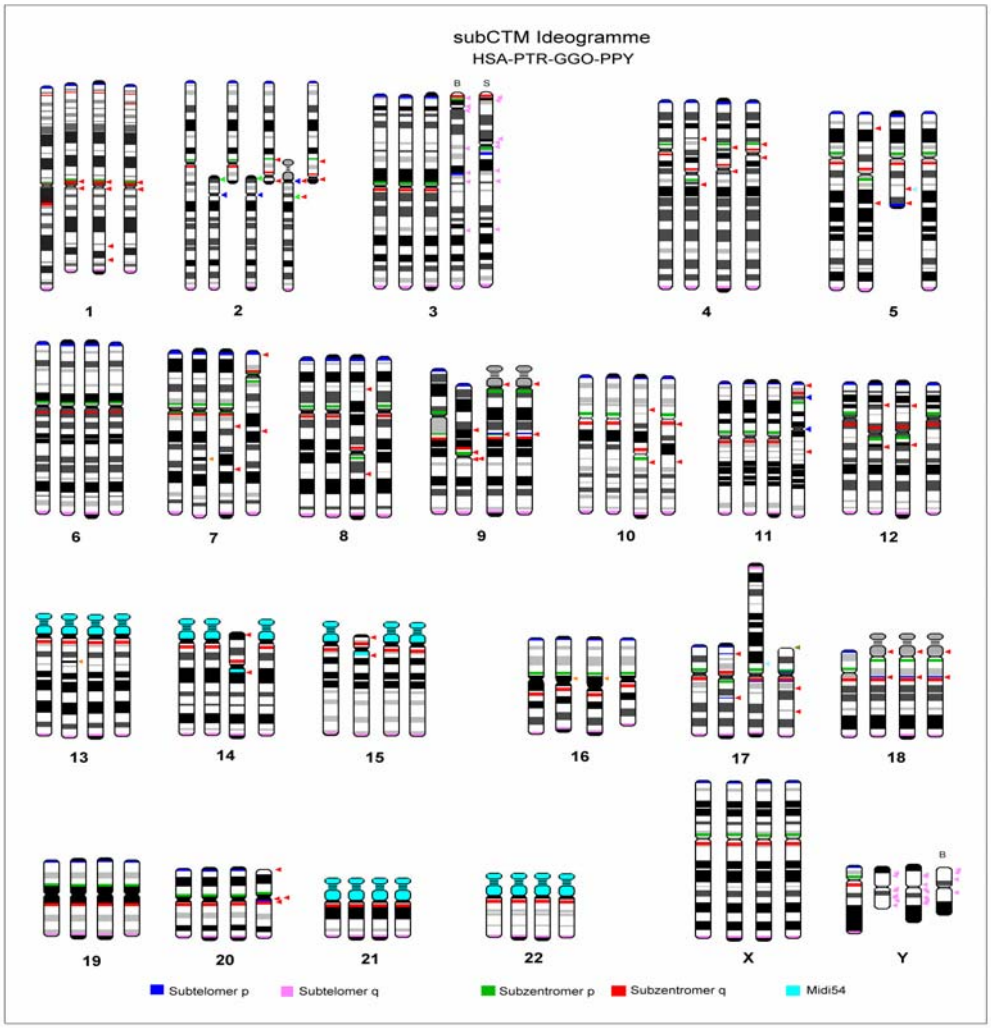


Abbildung 3.2.1d: Zusammenfassende schematische Darstellung der Hybridisierungsergebnisse des subCTM der *Hominidae*. Es ist jeweils das menschliche Chromosom dem des Schimpansen, des Gorilla und des Orang-Utan gegenübergestellt. Alle Veränderungen im Vergleich zum menschlichen Chromosom werden im Folgenden näher beschrieben.

3.2.1.1 Chromosom 1

Die Untersuchung des Chromosoms 1 mit mMCB zeigte deutlich eine kleine perizentrische Inversion im menschlichen Chromosom 1, verglichen zu den homologen Chromosomen der großen Affen. Die Besonderheit dieser Inversion ist, dass sie in einer homologen Region im HSA 1p12 und 1q21 liegt, die gut mit den Mikrosezierungssonden dieses Bereiches beobachtet werden kann.
Diese Inversion konnte ebenfalls mit dem subCTM 1 Mix nachgewiesen werden, wobei der BAC 35B4 (Subzentromer 1q), der ein starkes Signal in 1q21.1, ein schwächeres in 1p36.13 sowie ein schwaches Signal in 1p12 zeigt, bei allen großen Affen nur ein starkes Signal in 1p12 und ein schwächeres in 1p36.13 aufwies.
Das außergewöhnliche Hybridisierungsmuster dieser Sonde wurde zum Anlass genommen, eine genauere Untersuchung dieser Regionen in 9 Primaten vorzunehmen (siehe 3.3.1.1).
Eine parazentrische Inversion im Gorilla konnte mit dem mMCB in den Bruchpunkten homolog zu HSA 1q32.3 und 1q42.13 bestätigt werden.
Des Weiteren wies das mMCB eine parazentrische Inversion im Gorilla Chromosom 1 mit den Bruchpunkten 1q32.3 und 1q42.13 nach.
Ein dem Heterochromatin in HSA 1q12 homologer Bereich konnte auch mit einer spezifischen Sonde für diese Region bei keinem der anderen *Hominidae* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.2 Chromosom 2

Durch das mMCB konnte der bekannte Fusionsbruchpunkt in 2q13 bei allen großen Affen bestätigt werden. Hierdurch sind zwei fast gleich große Chromosomen bei den großen Affen vorhanden, die dem HSA 2 homolog sind.
Beim Schimpansen entspricht eines der beiden Chromosomen im wesentlichen dem kurzen Arm des HSA 2 und reicht von 2pter bis 2q13. Das andere ist etwas kürzer als der lange Arm des HSA 2 und reicht von 2q13 bis 2qter mit einem Zentromer in 2q21, das beim HSA keinem aktiven Zentromer entspricht.
Beim Gorilla unterscheidet sich das Chromosom, das homolog zu 2p ist vom Schimpansen durch eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 2q13 und 2p11 (nach mMCB). Diese Inversion wird auch durch subCTM 2 nachgewiesen, wobei der Subzentromer BAC 2p noch außerhalb der Inversion liegt, aber der Subzentromer BAC 2q invertiert wurde.
Die Orang-Utans zeigen neben einer Inversion mit den Bruchpunkten in 2q13 und 2p11 zusätzlich eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA 2q13 und 2q21 (nach mMCB).
Zur Abklärung, ob die Inversion im homologen Chromosom zu 2p bei Gorilla und Orang-Utan unabhängig oder in einem gemeinsamen Vorfahr entstanden ist, erfolgte eine Eingrenzung der Inversionsbruchpunkte mit BACs (siehe 3.3.1.2.1).

3.2.1.3 Chromosom 3

Das mMCB sowie das subCTM für das Chromosom 3 weisen bei den homologen Chromosomen des Schimpansen und des Gorillas keine Unterschiede zu HSA auf.
Das homologe Chromosom beim Orang-Utan unterscheidet sich jedoch nicht nur von den anderen *Hominidae*, sondern auch innerhalb der beiden Orang-Utan-Unterarten. So weist das homologe Chromosom 3 des Borneo Orang-Utans mindestens 7 Brüche und das des Sumatra Orang-Utans mindestens 8 Brüche nach mMCB im Vergleich zu HSA 3 auf. Ebenso sind auch die subCTM Sonden verschieden rearrangiert. Beim Borneo Orang-Utan hybridisiert der Subzentromer BAC 3q im Subtelomerbereich des kurzen Armes, der Subzentromer BAC 3p etwas proximaler im kurzen Arm und die Subtelomer Sonde 3p ist in der Mitte des langen Armes zu finden. Beim Sumatra Orang-Utan ist der Subzentromer BAC 3q ebenfalls im Subtelomerbereich des kurzen Armes zu finden, der Subzentromer BAC 3p hybridisiert in Zentromernähe im langen Arm, und etwas distaler ist das Subtelomer 3p zu

beobachten. Um die Lage der Veränderungen zueinander und eine eindeutige Zuordnung der chromosomalen Banden genauer zu definieren, wurde eine Einzel MCB 3 Analyse der beiden Orang-Utan Varianten im Vergleich zum Menschen durchgeführt (siehe **Abb. 3.2.1.3**).

Für sehr kleine Bruchstücke, die in nur einer MCB Bank liegen, lässt sich die Orientierung des Bruchstückes nicht eindeutig belegen. Nach dem MCB 3 Vergleich konnte das homologe Chromosom zu HSA 3 des Borneo Orang-Utans wie folgt beschreiben werden:
der(3)(q12.1->q12.3::p12.2->11.2::q11.2->p11.1::q13.11->q22.3::p14.2->p12.3::pter->p25.3::
p14.3->p25.2::q23->qter)
und das entsprechende Chromosom des Sumatra Orang-Utans:
der(3)(q12.1->q12.3::p12.2->p12.2::q22.3->q13.11::p12.1->p11.2::q11.2->p11.1::
p14.1->p12.3::p26.3->p25.3::p14.2->p25.2::q23->qter).

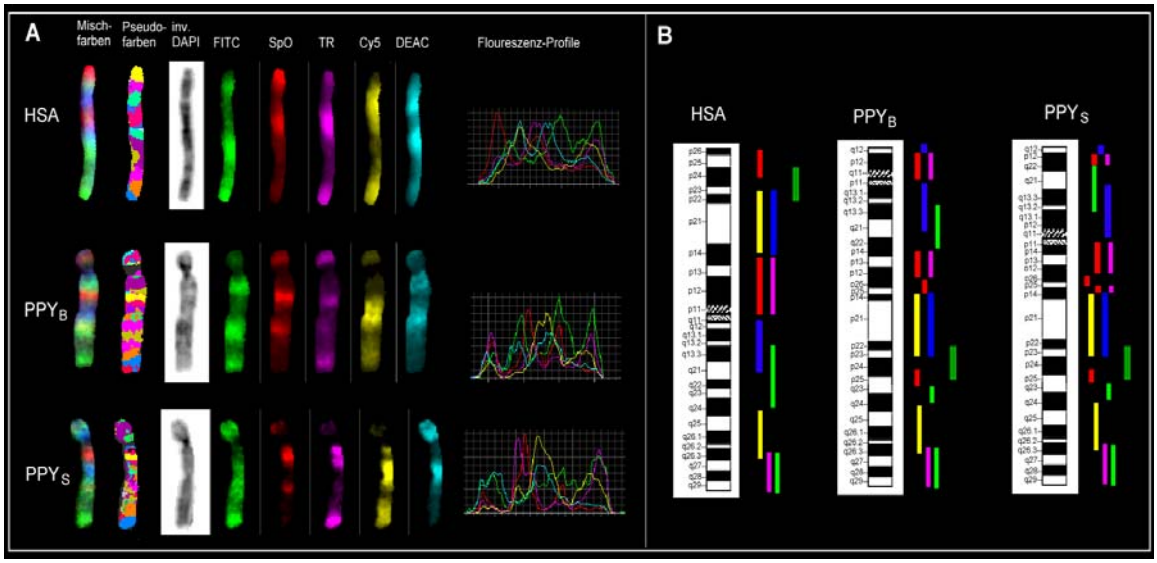


Abbildung 3.2.1.3: (A) Hybridisierungsergebnisse des Einzel-MCB 3 an HSA, PPY$_B$ und PPY$_S$. Es sind jeweils die Mischfarben, die Pseudofarben, das invertierte DAPI, der FITC-, SpO-, TR-, Cy5 und DEAC-Kanal sowie die Fluoreszenzprofile gegenübergestellt. **(B)** Schematische Darstellung der Hybridisierungsergebnisse an den Ideogrammen des HSA 3 sowie der homologen bei PPY$_B$ und PPY$_S$.

3.2.1.4 Chromosom 4

In allen großen Affen Chromosomen konnte in dem Homologen zu HSA 4 eine perizentrische Inversion mit dem mMCB nachgewiesen werden, wobei die Bruchpunkte sich jeweils unterschieden.
Beim Schimpansen konnte die größte Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 4p13 und 4q21 nachgewiesen werden. Dies Inversion wurde ebenfalls über die invertierten Subzentromersonden nachgewiesen.
Die Inversion beim Gorilla fand in den Bruchpunkten homolog zu HSA in 4p12-11.1 und 4q13.3-21.1 statt, wobei nur der Subzentromer 4q BAC invertiert wurde. Da diese Bruchpunkte von den Literaturangaben abweichen, wurden zur Bestätigung BACs aus diesen Regionen hybridisiert (siehe 3.3.1.3).
Die Inversion bei den Orang-Utans erscheint auch im mMCB als die kleinste Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 4p12-11.1 und 4q13.3. Auch hier wurde nur der Subzentromer BAC 4q invertiert.

3.2.1.5 Chromosom 5

Das Homologe zu HSA Chromosom 5 beim Orang-Utan stellt sich im mMCB sowie im subCTM komplett homolog zum menschlichen Chromosom 5 dar.

Das homologe Chromosom beim Schimpansen weist nach mMCB eine große perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 5p15.1 und 5q15 auf, die auch durch die invertierten Subzentromer BACs nachgewiesen werden konnte. Die Bruchpunkte dieser Inversion wurden zusätzlich über BACs analysiert (siehe 3.3.1.4).
Beim Gorilla ist das homologe Chromosom zu HSA 5 in eine reziproke Translokation mit dem homologen zu HSA 17 involviert. Die Bruchpunkte homolog zu HSA liegen in 5q14.3 und 17p11.2. Die Verteilung der subCTM Signale entsprach den homologen Bereichen auf den Translokationschromosomen.

3.2.1.6 Chromosom 6

Die homologen Chromosomen zu HSA 6 bei den großen Affen weisen keine Unterschiede, weder im mMCB noch im subCTM, im Vergleich zum menschlichen Chromosom 6 auf.

3.2.1.7 Chromosom 7

Das Schimpansen Chromosom homolog zu HSA 7 zeigt im mMCB und im subCTM keine Unterschiede zum Menschen, jedoch zeigt sich in der Bande homolog zu HSA 7q22 eine deutliche Hybridisierungslücke, die auf das Vorhandensein von interstitiellem Heterochromatin hinweist. Dieses Heterochromatin ist Gegenstand weiterer Untersuchungen (siehe 3.3.2.1).
Das homologe Gorilla Chromosom zeigt eine parazentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA 7q23 und 7q22.3 auf, wobei die subCTM Sondenverteilung nicht beeinflusst wurde.
Beim Orang-Utan lässt sich im homologen Chromosom zu HSA 7 eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA 7 in 7p22.3 und 7q21.1 nachweisen, die auch durch invertierte Subzentromer BACs bestätigt werden konnte. Die Subtelomersonde 7p ist von der Inversion nicht betroffen. Zur Abklärung, inwieweit der Inversionsbruchpunkt im kurzen Arm vom Telomer entfernt ist, wurden folgende BACs eingesetzt: RP11-90P13 (120-300 kb), RP11-126D15 (510-660 kb) und RP11-1003B5 (2435-2550 kb). In Klammern ist jeweils der Abstand vom Telomer 7p in Kilobasenpaaren angegeben. Da alle diese BACs noch im kurzen Arm des Orang-Utan Chromosoms hybridisierten, liegt der Bruchpunkt mindestens 2,55 Mb vom Telomer entfernt.

3.2.1.8 Chromosom 8

Das mMCB sowie das subCTM bei Mensch, Schimpanse und Orang-Utan weisen keine Unterschiede zueinander auf.
Das homologe Gorilla Chromosom weist eine perizentrische Inversion homolog zu HSA in den Bruchpunkten 8p21.1 und 8q 22.3 auf. Die Subzentromer BACs sind ebenfalls entsprechend der Inversion verändert.

3.2.1.9 Chromosom 9

Die homologen Chromosomen der großen Menschenaffen zum HSA 9 weisen alle keinen Heterochromatinblock auf, wie er beim Menschen in 9q12 vorliegt.
Das homologe Schimpansenchromosom zeigt nach mMCB eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 9p11.2 und 9q21.3. Die Auswertung der Subzentromer BACs ergab, dass beide BAC Signale in dem den menschlichen Chromosom 9p homologen Arm lagen und von proximal nach distal der Subzentromer 9q BAC auf den Subzentromer 9p BAC folgte. Dieses Ergebnis konnte nicht mit einer einfachen perizentrischen Inversion erklärt werden. Der Einsatz eines Sondensets aus pcp 9p, wcp 9, Subzentromer BAC 9p und 9q sowie der Midi 36 (siehe **Abb. 3.2.1.9**) lieferte den Hinweis auf eine zweite Inversion in der zuvor beschriebenen Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 9q11 und 9p11.2. Eine Kreuzhybridisierung der Subzentromer Sonde 9p ist im Gegensatz zum Menschen nicht zu beobachten.

Die homologen Chromosomen des Gorilla und des Orang-Utan weisen das gleiche mMCB Hybridisierungsmuster auf, bei dem eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 9pter und 9q11 zu beobachten ist. Die Subtelomersonde 9p ist in unmittelbare Nachbarschaft der Subzentromersonde 9q in die Mitte des Chromosoms invertiert. Der Subzentromer BAC 9p zeigt beim Gorilla neben dem invertierten Signal ein Kreuzhybridisierungssignal zwischen der Subtelomersonde 9p und dem Subzentromer 9q BAC in der Mitte des Chromosoms. Dem Orang-Utan fehlt dieses Kreuzhybridisierungssignal (siehe **Abb. 3.2.1.9**). Zusätzlich erzeugt die Midi 36 zusammen mit dem Subzentromer BAC 9p beim Gorilla eine Reihe von Kreuzhybridisierungen (KH) in Perizentromerbereichen weiterer Gorilla Chromosomen (Daten nicht gezeigt).
Für die Abklärung des Inversionsbruchpunktes in 9q bei Gorilla und Orang-Utan, der nach obigen Ergebnissen zwischen dem Subzentromer BAC 9q und dem Zentromer liegen muss, wurden BAC Untersuchungen angeschlossen (siehe 3.3.1.5.1).

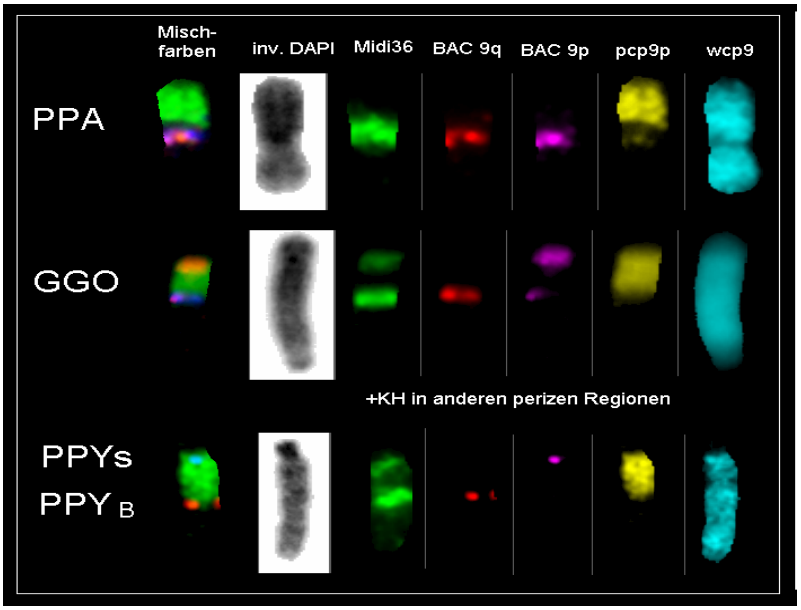


Abbildung 3.2.1.9: Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse bei PPA, GGO sowie PPY_S und PPY_B nach Hybridisierung mit einem Sondensatz aus Midi 36, Subzentromer BAC 9q und 9p, pcp9p sowie wcp 9.
Deutlich sichtbar ist eine zweite Inversion im PPA, die durch das pcp9p und den Subzentromer BAC 9p nachgewiesen wird, die hier im gleichen Chromosomenarm wie der Subzentromer BAC 9q liegen.

3.2.1.10 Chromosom 10

Der Schimpanse zeigt das gleiche Hybridisierungsmuster wie der Mensch im mMCB sowie beim subCTM.
Das homologe Gorilla Chromosom unterscheidet sich durch eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 10p11.23 und 10q22.3. Die Subzentromersonden sind entsprechend der Inversion verändert in ihrer Lage.
Das homologe Orang-Utan Chromosom weist eine parazentrische Inversion auf mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 10q11.23 und 10q22.3, wovon aber die Lage der subCTM Sonden nicht beeinflusst wurde.

3.2.1.11 Chromosom 11

Das Hybridisierungsmuster des mMCB sowie des subCTM für das HSA 11 liegt bei Schimpanse und Gorilla unverändert vor.
Das homologe Chromosom des Orang-Utans zeigt nach dem mMCB eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 11p15.5 und 11q12.2, dies konnte auch durch Einzel MCB11 Untersuchungen bestätigt werden (siehe **Abb. 3.2.1.11**). Jedoch ist das Zentromer, das beim HSA in dem DEAC/TR Bereich des MCB zu beobachten ist, beim Orang-Utan in der FITC/SpO Region lokalisiert. Diese offensichtliche Zentromerinaktivierung und Zentromerneubildung in einer anderen chromosomalen Umgebung (11p14.3) wird auch durch die Subzentromer BACs bestätigt, die in der zu erwartenden Region homolog zu HSA 11p11.1-11q11 invertiert vorliegen, wobei das funktionelle Zentromer nicht mehr zwischen den beiden Sonden zu beobachten ist. Diese Sondenverteilung konnte auch unabhängig mit

einem Sondensatz aus pcp11p, pcp11q, Subzentromer BAC p und q gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

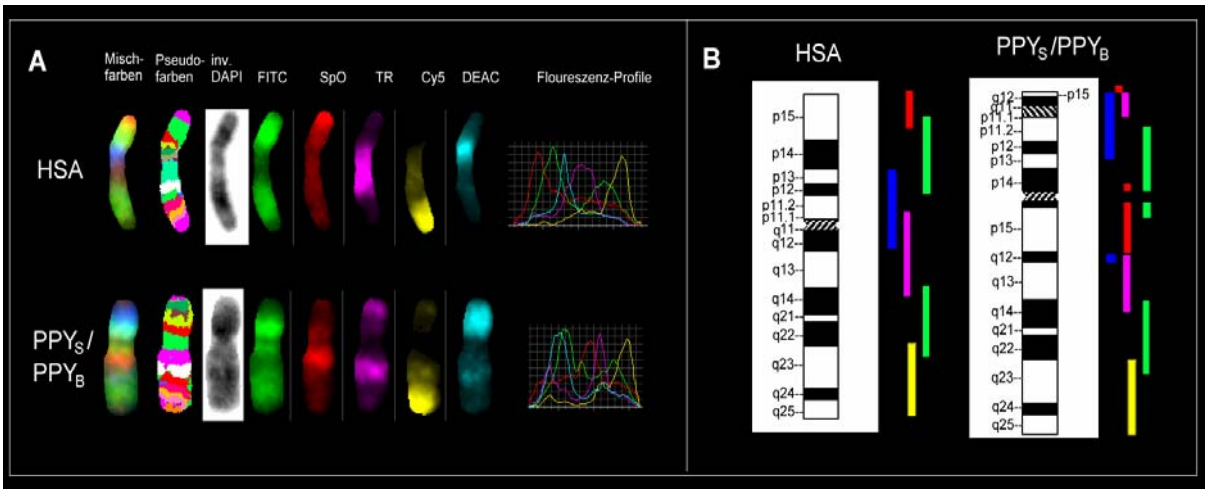


Abbildung 3.2.1.11: (A) Hybridisierungsergebnisse des Einzel-MCB 11 Sondensatzes an HSA, PPY_B und PPY_S. Es sind jeweils die Mischfarben, die Pseudofarben, das invertierte DAPI, der FITC-, SpO-, TR-, Cy5 und DEAC-Kanal sowie die Fluoreszenzprofile gegenübergestellt. **(B)** Schematische Darstellung der Hybridisierungsergebnisse an den Ideogrammen des HSA 11 sowie des homologen Chromosoms bei PPY_B und PPY_S.

3.2.1.12 Chromosom 12

Nach mMCB und subCTM zeigt das homologe Chromosom des Orang-Utan keine Unterschiede zum HSA.
Das homologe Chromosom der Schimpansen zeigt eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 12p12.1 und 12q 14.3. Diese Inversion wird auch durch die entsprechend invertierten Subzentromer Sonden des subCTM Mixes bestätigt.
Das homologe Gorilla Chromosom weist ebenfalls eine perizentrische Inversion mit dem gleichen Bruchpunkt in 12p auf. Der Bruchpunkt in 12q scheint nach mMCB im Vergleich zum Schimpansen etwas weiter proximal in 12q14.1 zu liegen. Auch hier sind die Subzentromersonden invertiert.

3.2.1.13 Chromosom 13

Die homologen Chromosomen der großen Menschenaffen zum HSA 13 weisen nach mMCB und subCTM keine Unterschiede in der Signalverteilung auf.
Im homologen Chromosom des Schimpansen ist jedoch eine Hybridisierungslücke in 13q14 homolog zu HSA zu beobachten, die auf die Integration von interstitiellem Heterochromatin hinweist, die im mMCB durch COT I DNA abgeblockt wird. Dieses interstitielle Heterochromatin ist Gegenstand weiterer Untersuchungen (siehe 3.3.2.2).

3.2.1.14 Chromosom 14

Das mMCB und das subCTM sind bei Schimpanse und Orang-Utan im Vergleich zum Menschen nicht verändert.
Das homologe Chromosom beim Gorilla zeigt nach mMCB eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 14p11.2 und 14q21.2. Diese Inversion konnte ebenfalls durch den invertierten Subzentromer BAC 14q sowie durch das invertierte Midi 54 Signal, das spezifisch nur die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen anfärbt, nachgewiesen werden.

3.2.1.15 Chromosom 15

Die mMCB sowie die subCTM Signalkonstellation bei Gorilla und Orang-Utan unterscheiden sich nicht von der des Menschen.
Das homologe Chromosom der Schimpansen weist nach mMCB und subCTM mit Midi 54 eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 15p11.2 und 15q13.1 auf.

3.2.1.16 Chromosom 16

Nach mMCB sowie subCTM weisen die Schimpansen und Orang-Utans im Vergleich zum menschlichen Chromosom 16 keine Veränderungen in der Signalverteilung auf. Jedoch gibt es Unterschiede in der Verteilung des parazentrischen Heterochromatins. Beim Menschen befindet es sich im langen Arm in der Bande 16q11.2. Eine spezifische Sonde für diese Region zeigt bei keinem der großen Affen ein Hybridisierungssignal (Daten nicht gezeigt). Beim Schimpansen und Gorilla befindet sich Heterochromatin im kurzen Arm des homologen Chromosoms, und die Orang-Utans weisen weder im kurzen noch im langen Arm Heterochromatin auf. Eine nähere Untersuchung des parazentrischen Heterochromatins beim Schimpansen erfolgt in 3.3.2.3.
Der dem kurzen Arm von Chromosom 16 homologe Bereich beim Gorilla ist von einer parazentrischen Inversion gekennzeichnet mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 16p13.3 und 16p11.2, wobei sich die Signalverteilung der subCTM Sonden im Vergleich zum Menschen nicht verändert hat.

3.2.1.17 Chromosom 17

Das homologe Chromosom zu HSA 17 ist beim Schimpansen durch eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 17p13.2 und 17q21.33 gekennzeichnet. Dies wird auch durch die invertierte Lage der Subzentromer BACs deutlich, wobei das Subzentromer 17q Signal weitere diffuse Signale auf dem gleichen Chromosomenarm erzeugte. Das Subtelomer 17p erzeugte neben der erwarteten Lage in 17pter zwei schwächere Signale in der Bruchpunktumgebung der perizentrischen Inversion (siehe **Abb. 3.2.1.17a, 3.2.1.17b**).
Beim Gorilla ist das homologe Chromosom zu HSA 17 in eine reziproke Translokation mit dem homologen zu HSA 5 involviert. Die Bruchpunkte homolog zu HSA liegen in 5q14.3 und 17p11.2. Die Verteilung der subCTM Signale entsprach den homologen Bereichen auf den Translokationschromosomen, wobei auch beim Gorilla das Subtelomer 17p Signale in der Perizentromerregion 17 homolog zu HSA erzeugt (siehe **Abb. 3.2.1.17a**). Das derivative Chromosom 5 weist nach mMCB eine parazentrische Inversion im Bereich der Translokation 17 mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 17p13.3 und 17p11.2. Das Subtelomer 17p ist jedoch nicht in diese parazentrische Inversion involviert.
Beim Orang-Utan konnte nach mMCB eine parazentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 17q21.1 und 17q24.2 nachgewiesen werden (siehe **Abb. 3.2.1.17b**). Da diese Bruchpunkte von den Literaturangaben abweichen, erfolgte eine Abklärung mit BACs aus dieser Region (siehe 3.3.1.5). Nach subCTM konnte in keiner der beiden Unterarten ein Subtelomer 17p in der homologen Region zu HSA in 17pter nachgewiesen werden, jedoch waren zusätzliche schwächere Signale in der Perizentromerregion zu beobachten. Die Eingrenzung dieser terminalen Deletion erfolgte mit BACs (siehe 3.3.1.6). Des Weiteren erzeugte der Subzentromer BAC 17q, der nicht in die parazentrische Inversion involviert ist, ein zweites deutliches Signal im langen Arm des Chromosoms (siehe **Abb. 3.2.1.17a**).

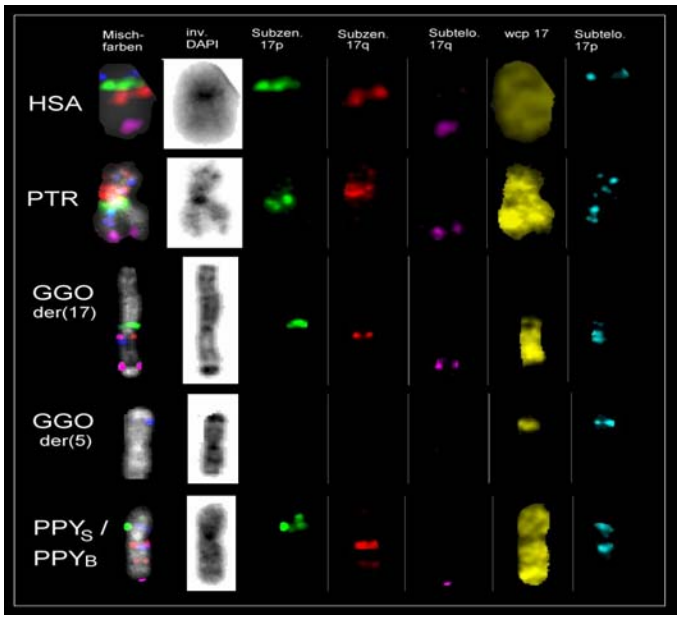


Abbildung 3.2.1.17a: Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse für das subCTM 17 an Chromosomen des Menschen (HSA), des Schimpansen (PTR), des Gorilla (GGO) sowie des Sumatra- und Borneo Orang-Utans (PPY_S, PPY_B). Es werden jeweils die Mischfarben, das invertierte DAPI, der Subzentromer BAC 17p und 17q, das Subtelomer 17q, das wcp 17 sowie das Subtelomer 17p verglichen.

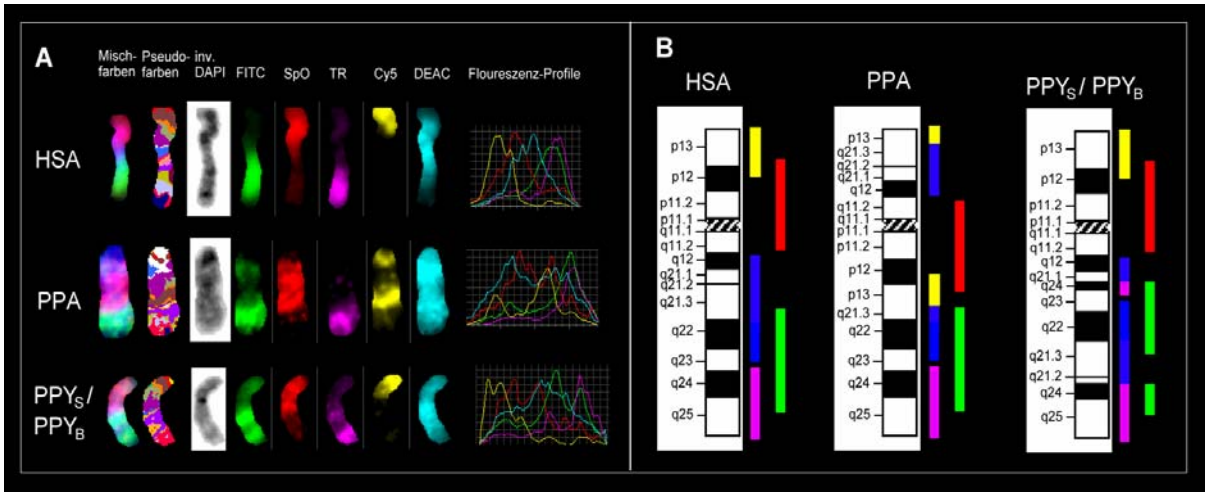


Abbildung 3.2.1.17a: (A) Hybridisierungsergebnisse des Einzel-MCB 17 an HSA, PPA, PPY_B und PPY_S. Es sind jeweils die Mischfarben, die Pseudofarben, das invertierte DAPI, der FITC-, SpO-, TR-, Cy5 und DEAC-Kanal sowie die Fluoreszenzprofile gegenübergestellt. **(B)** Schematische Darstellung der Hybridisierungsergebnisse an den Ideogrammen des HSA 17 sowie des homologen Chromosoms bei PPA, PPY_B und PPY_S.

3.2.1.18 Chromosom 18

Die homologen Chromosomen der großen Affen zum HSA 18 unterscheiden sich nach mMCB alle durch eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 18pter und 18q11.1, die ebenfalls durch das entsprechend invertierte Subtelomer 18p und den Subzentromer BAC 18p nachgewiesen werden konnte. Der Subzentromer BAC 18q sowie ein 2,4 Mb weiter proximal gelegener BAC (RP11-10G8) wurden nicht invertiert, so dass folglich der Bruchpunkt zwischen dieser Sonde und dem Zentromer in einem etwa 520kb großem Bereich liegen muss.
Da diese Inversion aus einem akrozentrischen Chromosom der großen Affen ein submetazentrisches Chromosom beim Menschen bedingt, ist zu klären, ob Material des kurzen Armes der Affenchromosomen mit invertiert wurde. Diese Fragestellung wurde in 3.3.2.4 näher untersucht.

3.2.1.19 Chromosom 19

Die homologen Chromosomen der großen Affen wiesen im Vergleich zum Menschen nach mMCB sowie subCTM keine Unterschiede auf.

3.2.1.20 Chromosom 20

Die homologen Chromosomen des Schimpansen und Gorilla zeigten keine Unterschiede im mMCB und subCTM im Vergleich zum Menschen.
Beim Orang-Utan lässt sich auch nach Einzel MCB 20 Hybridisierung (siehe **Abb. 3.2.1.20**) und Einsatz von BACs ein komplexerer Umbau nachweisen. Dies wird auch durch die abweichende Lokalisation der Subtelomer 20p Sonde, die beim Orang-Utan zwischen Zentromer und Subzentromer BAC 20q zu beobachten ist, deutlich.
Die Abklärung der ungewöhnlichen Hybridisierungsergebnisse erfolgte mit BACs (siehe 3.3.1.7).

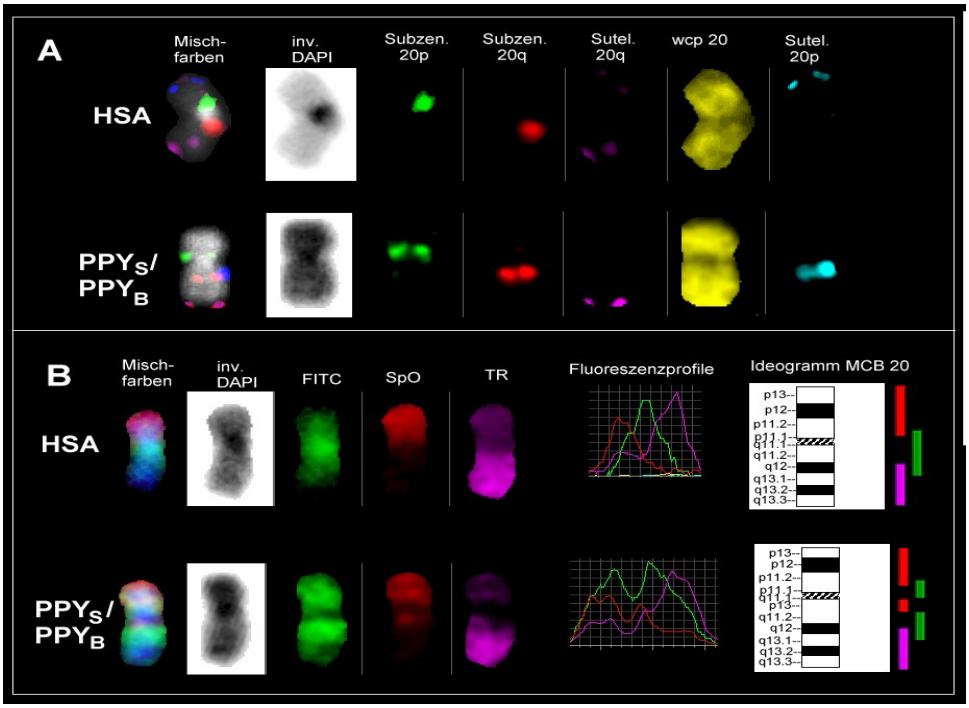


Abbildung 3.2.1.20: Darstellung der Hybridisierungsergebnisse zwischen Mensch (HSA) und Orang-Utan (PPY_S, PPY_B) nach subCTM **(A)** und Einzel MCB-20 **(B)**.

3.2.1.21 Chromosom 21

Die homologen Chromosomen der großen Affen wiesen im Vergleich zum Menschen nach mMCB sowie subCTM keine Unterschiede auf.

3.2.1.22 Chromosom 22

Die homologen Chromosomen der großen Affen wiesen im Vergleich zum Menschen nach mMCB sowie subCTM keine Unterschiede auf.

3.2.1.23 X Chromosom

Die homologen Chromosomen der großen Affen wiesen im Vergleich zum Menschen nach mMCB sowie subCTM keine Unterschiede auf.

3.2.2 Gesamtgenomische mMCB Untersuchungen an 3 Unterarten des Schimpansen

Das Ziel dieser Untersuchung war herauszufinden, ob es zwischen den Unterarten der Schimpansen nachweisbare chromosomale Veränderungen gibt. Gegenstand der Untersuchung waren Zelllinien der folgenden Unterarten: *Pan troglotydes versus, Pan troglotydes troglotydes* und *Pan paniscus.* Es wurden durchschnittlich 5 Chromosomen jeder Unterart untersucht. Die Arbeiten wurden von Frau Madeleine Gross im Rahmen Ihrer Diplomarbeit durchgeführt.
Nach Auswertung der mMCB Profile konnte kein Unterschied gefunden werden. Die Karyotypen der Schimpansenunterarten weisen nach dieser Methode keine zytogenetischen Unterschiede auf. Eine zusammenfassende Darstellung der Hybridisierungen ist in **Abb. 3.2.2** dargestellt.

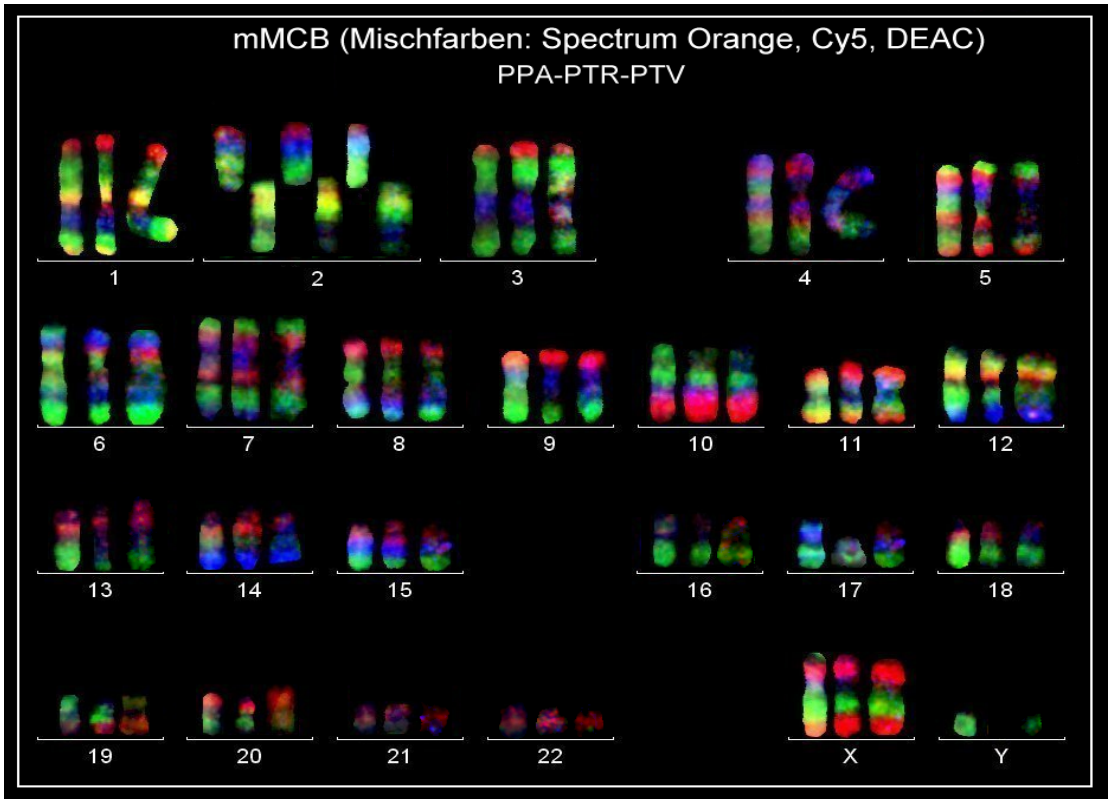


Abbildung 3.2.2: Gegenüberstellung der mMCB Ergebnisse für die Schimpansenunterarten: *Pan paniscus* (PPA), *Pan troglodytes troglodytes* (PTR), *Pan troglodytes versus* (PTV) in der Mischfarbendarstellung (Spectrum Orange, Cy5, DEAC). Da von PTR nur eine weibliche Zelllinie zur Verfügung stand, war hier keine Darstellung des Y Chromosoms möglich.

3.3 Ausgewählte Lokus-spezifische Untersuchungen am Genom der *Hominidae*

3.3.1 Inversionen

Inversionen sind die häufigsten chromosomalen Rearrangements, die die Genome der *Hominidae* unterscheiden. Im Folgenden wurden bislang kaum bzw. nur zytogenetisch beschriebene Inversionen mit BACs aus dem humanen Genomprojekt näher untersucht, um die Bruchpunkte einzugrenzen bzw. die Bruchpunkt-überspannenden BACs zu identifizieren und zu charakterisieren. Die beim Schimpansen nicht näher untersuchten perizentrischen Inversionen werden zur Zeit von der Arbeitsgruppe von Dr. Hameister (Ulm) bearbeitet. BACs wurden aber auch eingesetzt, um mMCB und subCTM Ergebnisse, die von

Literaturangaben abweichen, zu verifizieren sowie neu entdeckte chromosomale Veränderungen zu beschreiben. Je Hybridisierung wurden durchschnittlich 10-20 Chromosomen untersucht.

3.3.1.1 Perizentromerregion des Chromosom 1

Wie bereits bei der Auswertung des mMCBs und des subCTMs für das Chromosom 1 (siehe 3.2.1.1) deutlich wurde, ist die Perizentromerregion des Chromosoms 1 eine evolutionär sehr dynamische Genomregion, die an dieser Stelle an 8 Primaten (*Pan troglotydes troglotydes* = **PTR**, *Pan paniscus* = **PPA**, *Gorilla beringei beringei* = **GGO_B**, *Pongo pygmaeus pygmaeus* = **PPY_B**, *Pongo pygmaeus abelii* = **PPY_S**, *Hylobates lar* = **HLA**, *Macaca mulatta* = **PMK**, *Aotes spec*. = **OMK**) vergleichend zum Menschen (HSA) näher analysiert wurde.
Für die Untersuchungen wurde der Subzentromer BAC RP11-35B4, der aus 1p21.1 stammt aber 3 Signale auf dem Chromosom 1 zeigt (1p36.13, 1p12, 1q21.1) und eine Größe von 143 kb aufweist, zusammen mit 2 Einzelbanken des MCB1 (MCB1-2 (1pter-1p32.2), MCB1-4 (1p22.3-1p12) in einem drei-Farb FISH-Ansatz eingesetzt (siehe **Abb. 3.3.1.1**).
PTR, **PPA**, **GGO** und **PMK** zeigten ein starkes Signal des BAC RP11-35B4 in der Perizentromerregion homolog zum kurzen Arm des HSA und ein schwächeres homolog zu HSA 1p36.13. Diese Signalkonstellation konnte auch unabhängig durch die beiden Mikrosezierungsbanken nachgewiesen werden, wobei das Signal homolog zu HSA 1p36.13 nicht immer deutlich nachzuweisen war.
Bei **PPY_B** erzeugte der BAC ebenfalls das starke Signal homolog zu HSA 1p12, aber zusätzlich noch 3 weitere spezifische Signale: in der Region homolog zu HSA 1p36.13, 1p34.1-34.2 und zentromernah homolog zu 15q11.2, wobei dieses Signal nicht durch die Mikrosezierungsbanken erzeugt werden konnte. **PPY_S** zeigte das gleiche Hybridisierungsmuster wie PPY_B jedoch mit einem zusätzlichen Signal in der Perizentromerregion homolog zu 1q21.1. Zur Abklärung des zusätzlichen Signals in 1p34.1-34.2 wurde der BAC RP11-231P20 (1p36.11) zusammen mit dem BAC RP11-35B4 auf die zwei Orang-Utanarten hybridisiert, wobei kein Unterschied zur Lokalisation des BACs RP11-231P20 zum Menschen festgestellt werden konnte. Zudem zeigten die Profile des mMCB in diesem Bereich des Chromosoms keine sichtbaren Veränderungen gegenüber dem Hybridisierungsmuster bei HSA (Daten nicht gezeigt).
Der BAC RP11-35B4 erzeugte bei **HLA** drei Signale: auf dem HLA 5q (homolog zu HSA 1q21/1p12), auf HLA 7q (homolog zu HSA 1p34.1-34.2) und auf HLA 9q (homolog zu 1p36.1). Die Identifizierung der HLA Chromosomen erfolgte über die Signalkonstellationen mit den MCB 1 Banken sowie MCB Daten (Mrasek *et al*., 2003).
Das **OMK** Chromosom homolog zu HSA 1p, weist keine zytogenetischen Veränderungen auf und zeigt im wesentlichen die Signalkonstellation, wie sie auch bei PPA, PTR, GGO_B und PMK beobachtet werden konnte. Jedoch tritt neben dem starken Signal homolog zu HSA 1p12 ein weiteres starkes Signal etwas weiter distal gelegen auf.

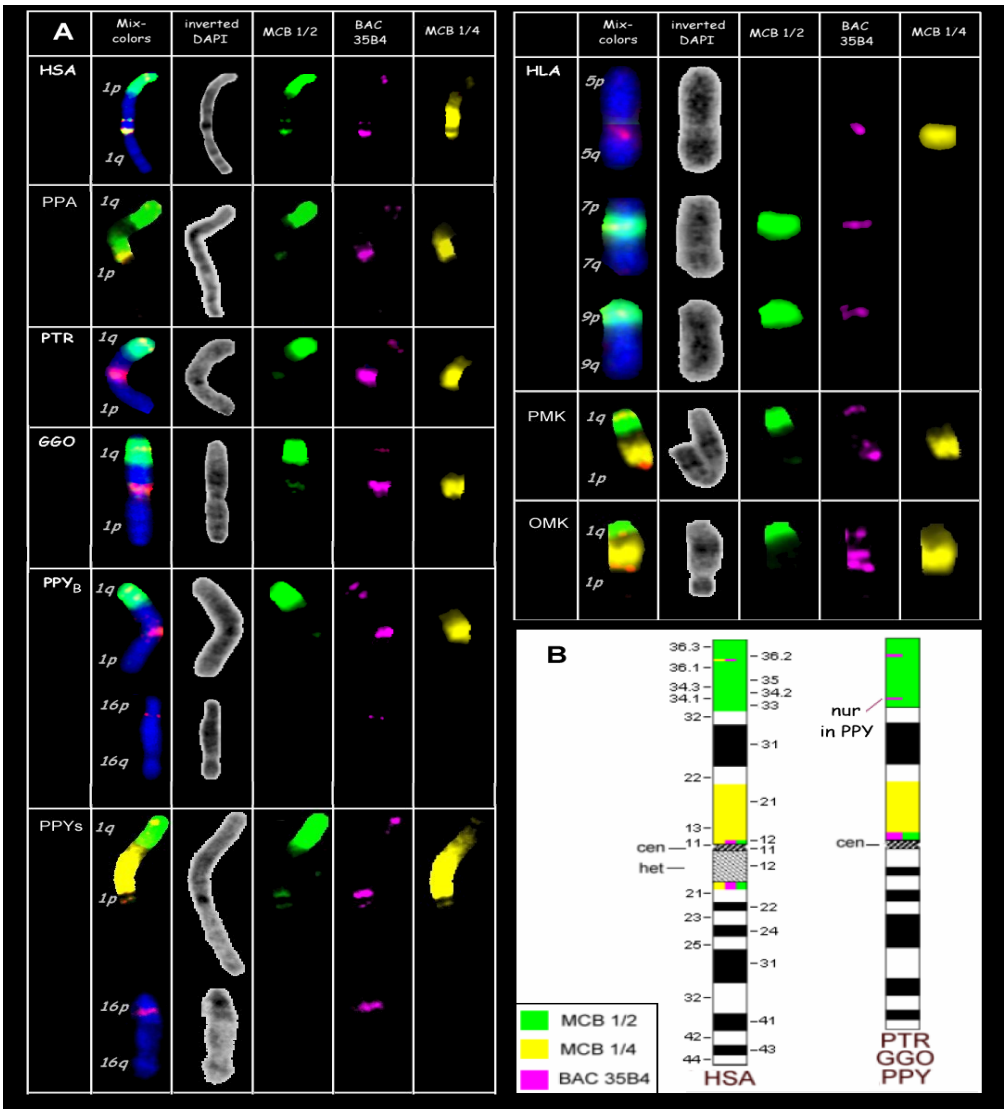


Abbildung 3.3.1.1: (A) Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse bei HSA, PPA, PTR, GGO, PPY_B, PPY_S, HLA, PMK und OMK. Dargestellt jeweils in der Mischfarbe, im invertierten DAPI, der MCB 1/2 Sonde, des BAC 35B4 und der MCB 1/4 Sonde. **(B)** Schematische Darstellung der Hybridisierungsergebnisse an einem Ideogramm des Chromosoms 1 für HSA (links) und für die großen Affen (rechts).

3.3.1.2 Perizentrische Inversionen der homologen Chromosomen zu HSA 2 bei den *Hominidae*

3.3.1.2.1 Perizentrische Inversion im homologen Chromosom zu HSA 2p bei Gorilla und Orang-Utan

Folgende BACs aus dem Perizentromerbereich von Chromosom 2 wurden vergleichend auf Chromosomen des Gorillas und der Orang-Utans hybridisiert (Abstand vom Telomer 2p in kb): RP11-27N13 (80562-80637kb), RP11-4C8 (85725-85877kb), RP11-592A2 (86590-86710kb), RP11-433C18 (90022-90080kb), RP11-575H3 (91080-91275kb) und RP11-438K19 (111870-112050kb).
Nach Auswertung und Vergleich der Hybridisierungen zeigt sich deutlich, dass es sich bei den perizentrischen Inversionen bei Gorilla und Orang-Utan um unterschiedliche Bruchpunkte handelt (siehe **Abb. 3.3.1.2.1.1**). Demnach liegen die Bruchpunkte für den Gorilla im BAC RP11-433C18 (Splittsignal, Sequenzuntersuchungen siehe auch 3.3.1.2.2) in 2p11.2 und zwischen BAC RP11-438K19 und BAC RP11-395L14 (nicht gezeigt, entspricht dem Fusionsbruchpunkt nach Fan *et al.,* 2002) in 2q13. Der Bruchpunkt beim Orang-Utan hingegen liegt zwischen dem BAC RP11-575H3 und dem Zentromer in 2p11.2 sowie zwischen BAC RP11-438K19 und BAC RP11-395L14 (114350-114520kb, nicht gezeigt, entspricht dem Fusionsbruchpunkt nach Fan *et al.,* 2002) in 2q13, so dass der kurze Arm dieses Chromosoms mit hoher Wahrscheinlichkeit nur aus heterochromatischem Material besteht.

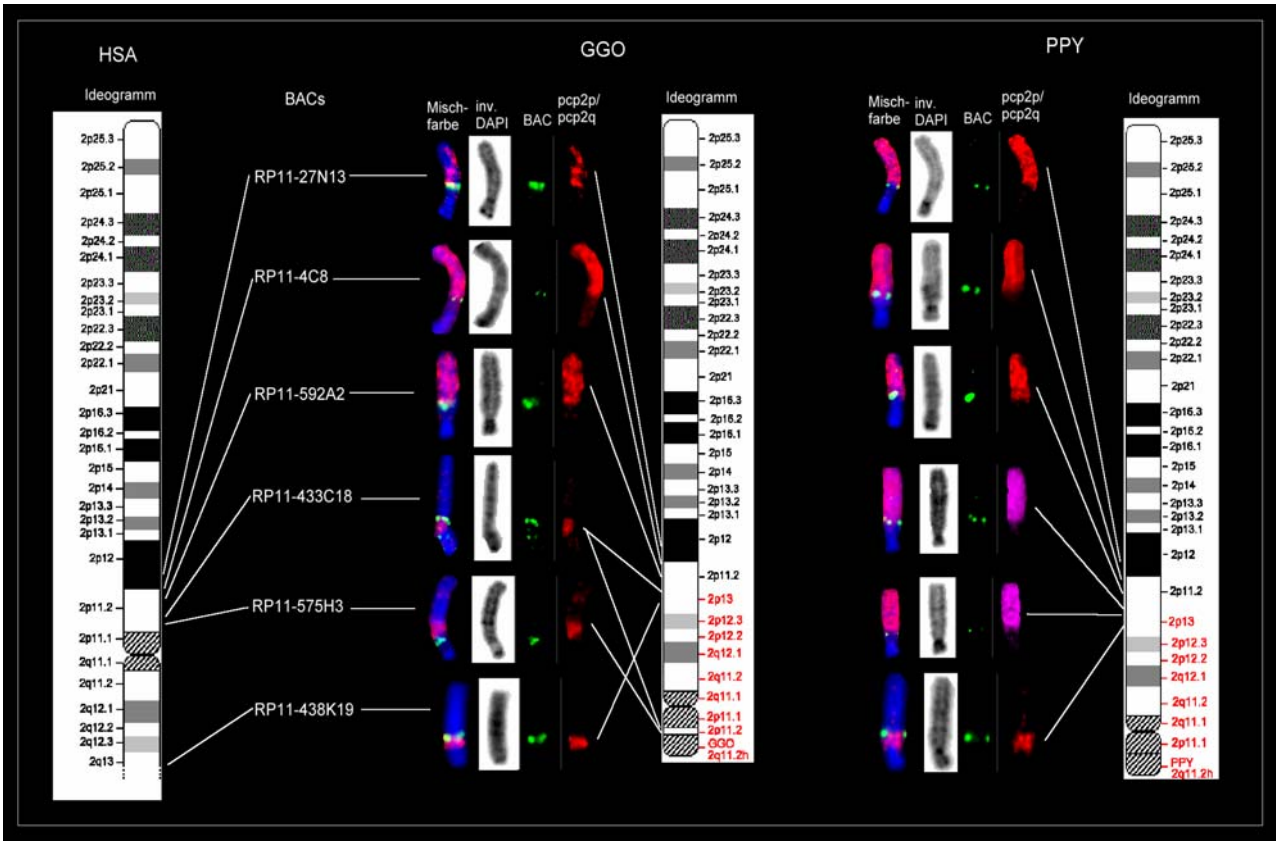


Abbildung 3.3.1.2.1: Gegenüberstellung der BAC Hybridisierungsergebnisse im Perizentromerbereich von Chromosom 2 beim Mensch (Links, HSA), Gorilla (Mitte, GGO) und Orang-Utan (Rechts, PPY). Die gleichzeitige Hybridisierung von pcp2p oder pcp2q diente lediglich zur eindeutigen Identifizierung des homologen Chromosoms sowie der relativen Lagezuordnung der BAC-Sonden. Das Ideogramm für Gorilla und Orang-Utan wurde der neuen Nomenklatur der *Hominidae* entnommen (siehe 3.4).

3.3.1.2.2 Perizentrische Inversion 2 „Normvariante“ des Menschen

Die Bruchpunktkartierung der „Normvarianten“-Inversion im Chromosom 2 des Menschen wurde von Frau Sabine Schmidt im Rahmen der von mir betreuten Diplomarbeit durchgeführt, dafür wurden folgende BAC Klone aus dem Bereich 2p12-11 verwendet (Abstand vom Telomer 2p in kb): RP11548D17 (83550-83735kb), RP11-108C2 (83735-83920kb), RP11-488M9 (457D4 (84110-84295kb), RP11-10N19 (84378-84482kb), RP11-755P13 (84600-84800kb), RP11-241M3 (84870-85070kb), RP11-617F9 (85070-85235kb), RP11-312D1 (85260-85445kb), RP11-717A5 (85532-85620kb), RP11-4C8 (85770-85860kb), RP11-301O19 (86235-86405kb), RP11-592A2 (86570-86699kb), RP11-554H10 (88500-88680kb), RP11-316G9 (89680-89890kb), RP11-433C18 (90025-90080kb), RP11-575H3 (91080-91270kb);
sowie folgende BACs aus der Region 2q13: RP11-438K19 (111870-112050kb), RP11-789G9 (112270-112430kb), RP11-330B16 (112497-112523kb), RP11-1429F20 (11252-112735kb), RP11-701F14 (112570-112720kb), RP11-889C9 (112615-112775kb), RP11-960J5 (112625-112820kb), RP11-217P16 (112735-112840kb), RP11-399B17 (112773-112920kb).
Die gesamte Bruchpunktkartierung wurde an der Suspension eines Probanden mit einer „Normvarianten“-Inversion in einem Chromosom 2 durchgeführt. Inwieweit die gefundenen Bruchpunkte auch mit denen weiteren Probanden, die zytogenetisch die gleiche Inversion tragen, übereinstimmt, wird zur Zeit abgeklärt (Daten standen zum Zeitpunkt der Anfertigung der Dissertation noch nicht zur Verfügung).

Der Bruchpunkt im kurzen Arm des Chromosoms 2 liegt im Bereich des BACs RP11-433C18, der ein starkes Spaltsignal im langen Arm des Chromosoms 2 erzeugt (siehe **Abb.**

3.3.1.2.2b). Alle BAC Sonden distal davon hybridisierten sowohl beim invertierten als auch beim normalen Chromosom 2 im kurzen Arm. Der BAC proximal davon lag im invertierten Chromosom im langen Arm und beim normalen Chromosom im kurzen Arm. Eine bessere Eingrenzung des Bruchpunktes von proximal her war nicht möglich, da es keine verfügbaren Klone zwischen BAC RP11-433C18 und RP11-575H10 gibt (siehe **Abb. 3.3.1.2.2a**). Der BAC 433C18 hat eine Größe von 56549bp und erzeugt als FISH-Sonde eine Reihe von Kreuzhybridisierungssignalen (1q12-21, 10p11.1-q11.1, 15p11.1-q11.2, 16p11.2, 19p12-q12, 21p11.1-q11.1, 22p11.1-q11.2). Die gleichen Genomregionen sowie weitere Homologiebereiche auf fast allen Chromosomen und vor allem im Inversionsbruchpunktbereich im langen Arm des Chromosoms 2 sind in der BAC-Sequenz beim Homologieabgleich zu finden (BLAST, NCBI). Die Sequenzanalyse auf Repeats erbrachte folgende Repeat-Zusammensetzung (RepeatMasker):

Gesamtlänge: 56549 bp GC Gehalt: 44.85 % Repeat-Anteil: 31124 bp (55.04 %)

SINEs (27x, 11.29 %), LINEs (15x, 15.46 %), LTR Elemente (7x, 10.09 %), DNA Elemente/Transposons (1x, 0.50 %), Satelliten DNA (5x, 3.05 %), einfache Repeats (39x, 14.30 %).

Der außergewöhnlich hohe Repeatanteil in der Sequenz ist jedoch nicht für die vielen homologen Bereiche im Genom verantwortlich, wie eine Analyse der Repeat-maskierten Sequenz auf Homologien im Genom erbrachte (Nach Bearbeitung einer DNA-Sequenz mit dem RepeatMasker Programm erhält man eine Repeat-bereinigte Sequenz.). Hierbei wurden fast genau die gleichen homologen Genomregionen angezeigt (BLAST/NCBI, Daten nicht gezeigt).
Da der BAC ein sehr asymmetrisches Spaltsignal erzeugt, ist der Bruchpunkt bei etwa 1/3 der BAC-Sequenz von distal nach proximal zu lokalisieren (bei etwa 90040kb). In diesem Bereich ist nur das Gen IGKV3D-7 (Immunglobulin Kappa Variable 3D-7) bekannt.

Der Inversionsbruchpunkt im langen Arm des Chromosoms 2 liegt in einer durch Kreuzhybridisierung mit der Region 2p11 gekennzeichneten Region. Diese Region erstreckt sich über knapp 1 Mb zwischen den BACs RP11-438K19 und RP11-789G9 (siehe **Abb. 3.3.1.2.2c**), so dass der BAC 438K19 invertiert im betroffenem Chromosom vorliegt und der BAC 789G9, wie auch im normalen Chromosom, unverändert lokalisiert ist. Wegen der Kreuzhybridisierungen im kurzen Arm, die genau in der Region des Inversionsbruchpunktes im kurzen Arm lokalisiert sind, war eine eineindeutige Aussage zum Bruchpunkt im langen Arm nicht möglich. Nach Auswertung aller kreuzhybridisierenden Klone im Bezug auf ihre Signalstärkeveränderung im invertierten Chromosom ist der Bruchpunkt im BAC RP11-1429F20 festgelegt worden (Daten nicht gezeigt). Der BAC ist überdurchschnittlich groß mit 213865 bp und ist in einer genarmen Region lokalisiert in der nur das Gen ANAPC1 („anaphase promoting complex subunit 1) bekannt ist. Die Homologieanalyse der gesamten Sequenz des BACs zeigt ganze Homologie Blöcke auf allen Chromosomen, außer auf den Chromosomen 21, 22, X und Y.
Die Sequenzanalyse auf Repeats erbrachte folgende Repeat-Zusammensetzung (RepeatMasker):

Gesamtlänge: 213865 bp GC Gehalt: 42.29% Repeat-Anteil: 92447bp (43.23%)

SINEs (134x, 16.27%), LINEs (57x, 14.97%), LTR Elemente (30x, 7.74%), DNA Elemente/Transposons (17x, 2.30 %), einfache Repeats (27x, 0.76 %).

Die Repeat-bereinigte Homologieanalyse des Genoms zeigte zwar immer noch homologe Bereiche auf fast allen Chromosomen an, jedoch keine so umfassende blockartige Abdeckung wie bei der Untersuchung der gesamten BAC-Sequenz (BLAST/NCBI, Daten nicht gezeigt).

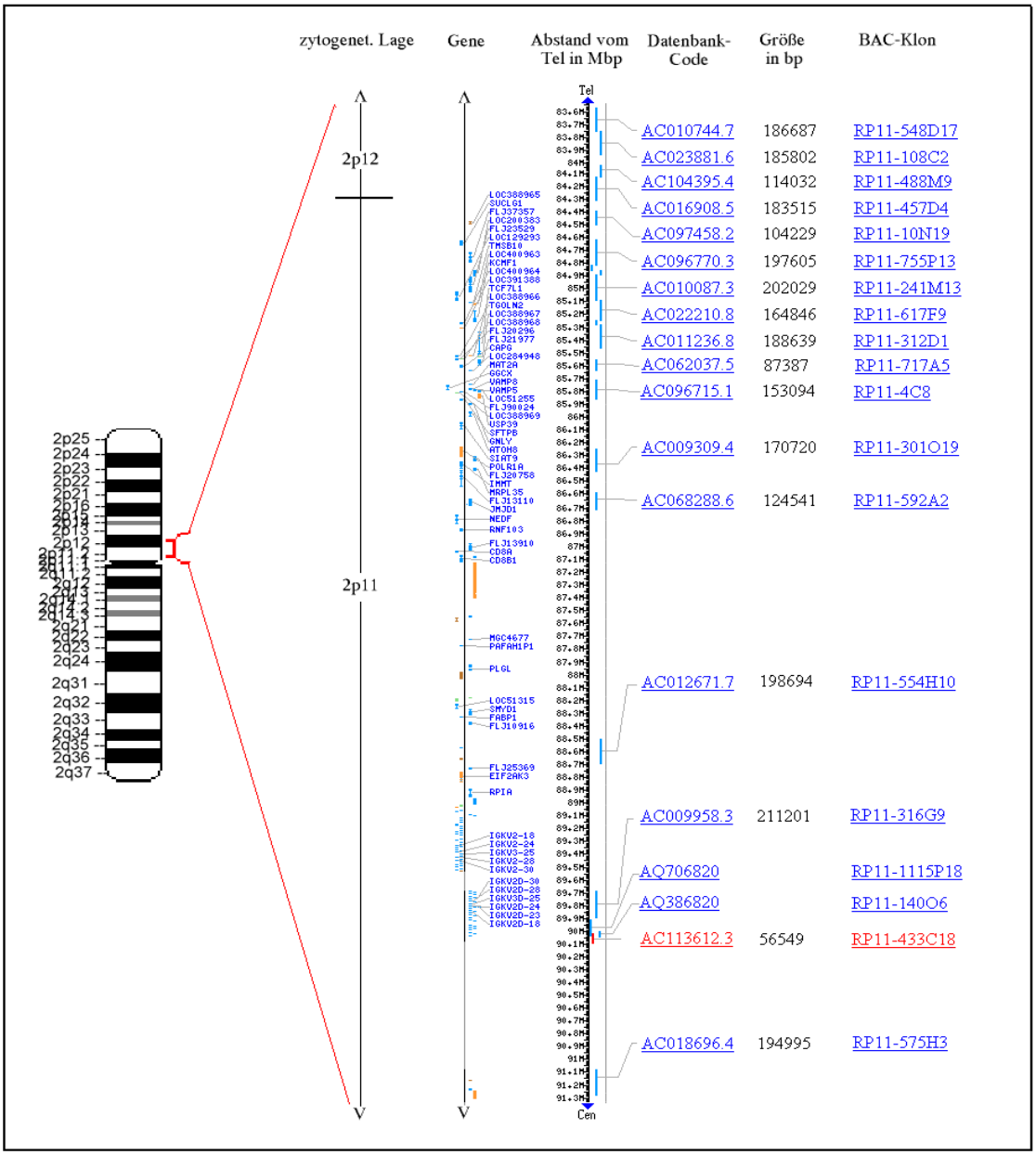


Abbildung 3.3.1.2.2a: Schematische Darstellung der Bruchpunktkartierung des „Normvarianten“ Inversionsbruchpunktes beim Menschen in 2p11. Von links nach rechts sind die zytogenetische Lage, die Gene im Untersuchungsbereich sowie die Einordnung der verwendeten BAC Sonden in den Abstand vom Telomer 2p in Mb angegeben. Rot markiert ist der bruchpunktüberspannende BAC beim invertierten Chromosom.

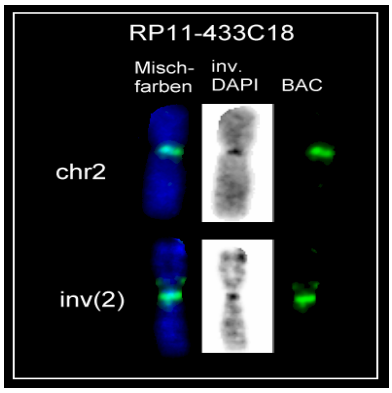


Abbildung 3.3.1.2.2.b:
Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse für den Inversionsbruchpunkt-überspannenden BAC RP11-433C18 im normalen (chr2) und invertierten Chromosom 2 (inv(2)). Der BAC zeigt eine asymmetrische Aufspaltung mit einem starken Signal im langen und einem sehr schwachen im kurzen Arm des invertierten Chromosoms.

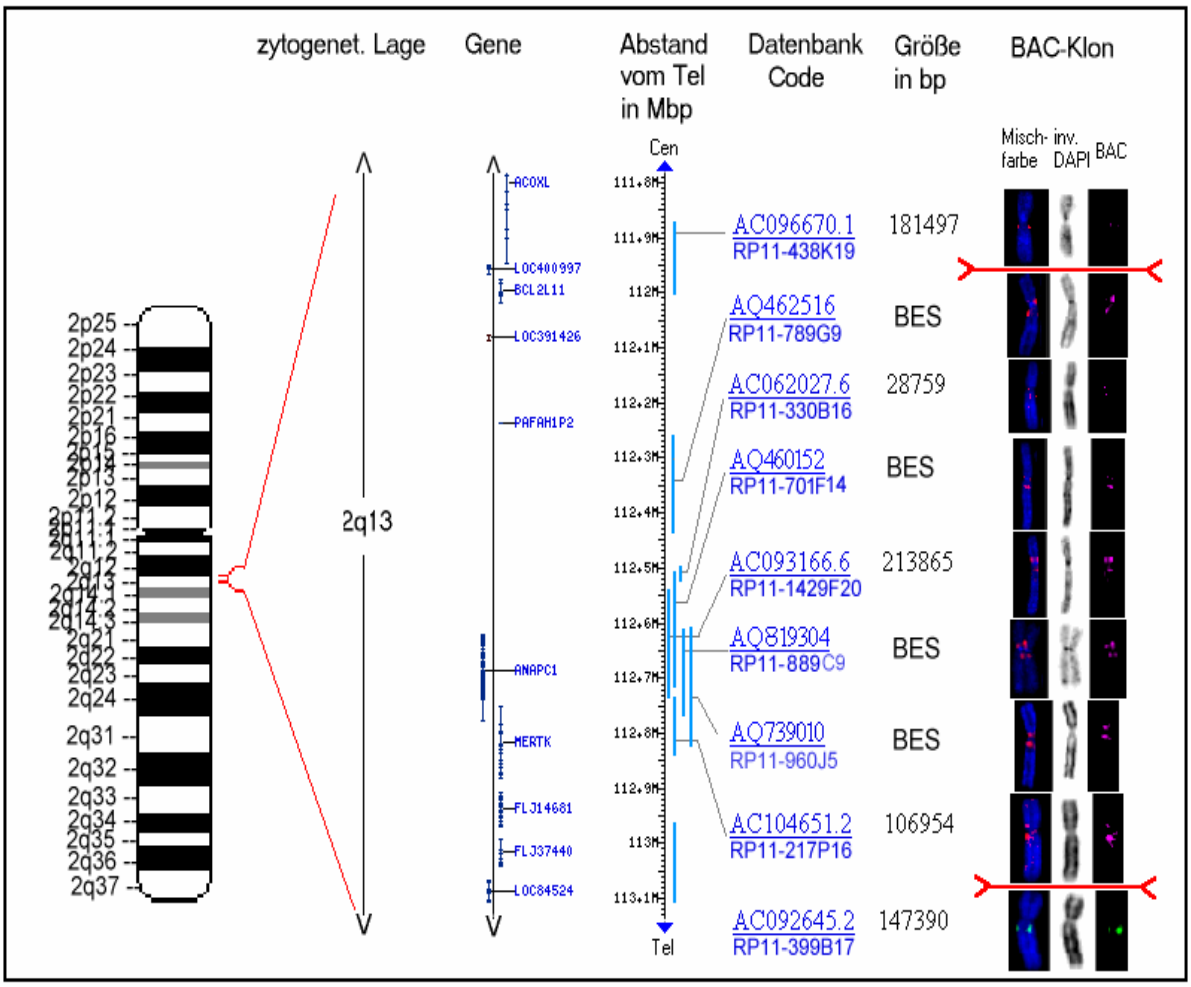


Abbildung 3.3.1.2.2c: Schematische Darstellung der Bruchpunktkartierung des „Normvarianten“ Inversionsbruchpunktes beim Menschen in 2q13. Von links nach rechts sind die zytogenetische Lage, die Gene im Untersuchungsbereich, die Einordnung der verwendeten BAC Sonden im Abstand vom Telomer 2p in Mb sowie die Hybridisierungsergebnisse am normalen Chromosom 2 angegeben. Rot markiert ist der Bereich kreuzhybridisierender BACs, in dem der Bruchpunkt beim invertierten Chromosom liegt.

3.3.1.3 Perizentrische Inversion im homologen Chromosom zu HSA 4 bei Gorilla und Orang-Utan

Die Bestätigung der im mMCB gefundenen Inversionsbruchpunkte bei Gorilla im homologen Chromosom zu HSA 4 wurde mit folgenden BACs durchgeführt (Abstand vom Telomer 4p in kb): RP11-793H20 (48165-48282kb), RP11-19F13 (48786-48810kb), RP11-700D1 (49199-49254kb), RP11-407H18 (56880-57080kb), RP11-2F17 (60925-61087kb), RP11-498E11 (65935-66085kb). Wie die **Abbildung 3.3.1.3** der Hybridisierungsergebnisse zeigt, liegt der Bruchpunkt der Inversion in 4p zwischen dem proximalsten BAC 700D1 und dem Zentromer. Der Bruchpunkt in 4q liegt distal von BAC 498E11, da dieser beim Gorilla invertiert vorliegt.

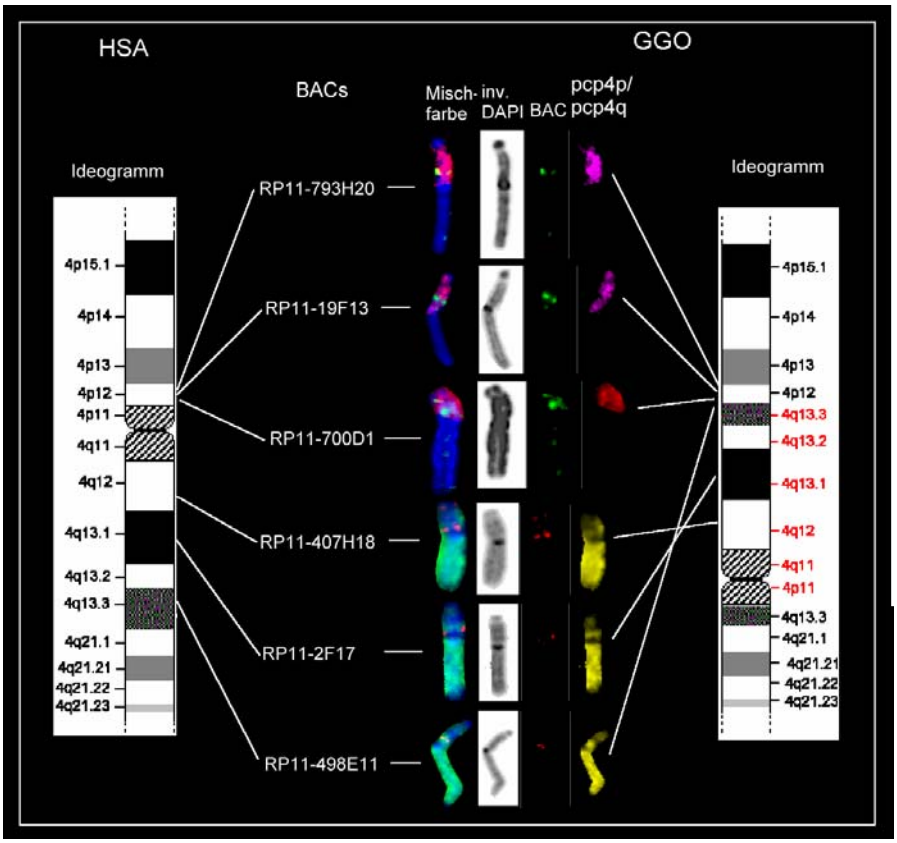


Abbildung 3.3.1.3: Darstellung der Hybridisierungsergebnisse der Inversion homolog zu HSA im Chromosom 4 des Gorillas. Die gleichzeitige Hybridisierung von pcp4p oder pcp4q diente lediglich zur eindeutigen Identifizierung des homologen Chromosoms sowie der relativen Lagezuordnung der BAC-Sonden. Das Ideogramm für den Gorilla wurde der neuen Nomenklatur der *Hominidae* entnommen (siehe 3.4).

Die Inversion im homologen Chromosom des Orang-Utan wurde mit folgenden BACs untersucht (Abstand vom Telomer 4p in kb): RP11-19F13 (48786-48810kb), RP11-700D1 (49199-49254kb), RP11-13K9 (64946-65030kb), RP11-84A1 (62880-63046kb), RP11-498E11 (65935-66085kb). Wie auch beim Gorilla liegt der Bruchpunkt in 4p zwischen dem BAC 700D1 und dem Zentromer und der Bruchpunkt in 4q liegt distal von BAC 498E11 (Daten nicht gezeigt).

3.3.1.4 Perizentrische Inversion im homologen Chromosom zu HSA 5 beim Schimpansen

Die Bruchpunktkartierung der evolutionär fixierten Inversion im Schimpansenchromosom 5 homolog zu HSA wurde von Frau Madeleine Gross im Rahmen der von mir betreuten Diplomarbeit durchgeführt. Folgende BAC Klone aus dem Bereich 5p15.1-14 wurden verwendet (Abstand vom Telomer 5p in kb): RP11-211K15 (18310-18470kb), RP11-962L3 (18389-18545kb), RP11-42C9 (18545-18690kb), RP11-35A11 (18444-1818614kb), CTD-2023M8 (18610-18785kb), RP11-1002I17 (18695-18870kb), CTD-2203 (18730-18880kb), CTD-2151L9 (18860-18940kb), RP11-81B23 (18790-19104kb), RP11-270H9 (18908-19393kb), RP11-478A7 (19104-19527kb), RP11-125H10 (19256-19618kb), RP11-433B15 (19505-19839kb), RP11-60F22 (19664-19909kb), RP11-755E13 (19860-20158kb);
sowie folgende BACs aus der Region 5q14.3-15: RP11-297J6 (90708-91145kb), RP11-88D22 (91160-91330kb), RP11-662F16 (91520-91680kb), RP11-939G5 (92130-92330kb), RP11-314H13 (92550-92735kb), RP11-519A9 (92225-93030kb), RP11-936K7 (93510-93690kb), RP11-126G10 (93990-94155kb), RP11-75K6 (94475-94620kb), RP11-294O8 (94680-94830kb), RP11-626H3 (94820-94970kb), RP11-125H13 (94920-95080kb), RP11-702J3 (95040-95205kb), RP11-685O5 (95180-95355kb), RP11-243P13 (95300-95450kb), RP11-417I14 (95450-95757kb), RP11-254I22 (95565-95700kb), RP11-526D16 (95985-96148kb), RP11-630K10 (96400-96565kb), RP11-1E3 (96930-97080kb), RP11-474J18 (97660-97880kb), RP11-930O17 (98810-98960kb). Die Lageeinordnung sowie die Gene in den Bereichen der BACs sind in **Abbildung 3.3.1.4a** und **c** dargestellt.

Der Inversionsbruchpunkt in 5p konnte durch 3 Bruchpunkt-überspannende und überlappende BACs auf eine ca. 40kb große Region eingegrenzt werden (18540-18580kb), wobei der BAC RP11-42C9 zwei etwa gleichgroße Spaltsignale, der BAC RP11-962L3 ein größeres im p- und ein sehr kleines in 5q, der BAC RP11-35A11 nur ein schwaches Spaltsignal im q-Arm aufweist und der BAC CTD-2013M8 trotz Überlappung mit den anderen BACs bereits invertiert ist (siehe **Abb. 3.3.1.4.b**). Alle BACs distal dieser 3 BACs hybridisierten sowohl beim Menschen als auch beim Schimpansen im kurzen Arm des Chromosoms, und alle proximaler gelegenen BACs hybridisierten beim Schimpansen im langen Arm des Affenchromosoms, beim Menschen jedoch im kurzen Arm. Da im Bruchpunktbereich nur der BAC RP11-35A11 sequenziert ist, wurde dieser für die weiteren Sequenzanalysen genutzt. Der BAC hat eine Größe von 170706 bp und liegt in einer etwa 2,3 Mb Region, in der keine bekannten Gene kartiert sind. Ein Homologieabgleich mit dem gesamten Genom erbrachte eine Reihe weiterer homologer Bereiche, vor allem auf dem Chromosomen 5, 7, 8 und X.
Die Repeatanalyse der BAC-Sequenz zeigte folgende Zusammensetzung (RepeatMasker):

Gesamtlänge: 170706 bp GC Gehalt: 36.13 % Repeat-Anteil: 96494 bp (56.53 %)

SINEs (34x, 5.01 %), LINEs (49x, 24.20 %), LTR Elemente (51x, 22.23 %), DNA

Elemente/Transposons (14x, 3.15 %), einfache Repeats (29x, 1.08 %)

Der außergewöhnlich hohe Repeatanteil in der Sequenz ist jedoch nicht für die homologen Bereiche im Genom verantwortlich, wie eine Analyse der Repeat-maskierten Sequenz auf Homologien im Genom erbrachte. Hierbei wurden fast genau die gleichen homologen Genomregionen angezeigt (BLAST/NCBI, Daten nicht gezeigt).

Der Inversionsbruchpunkt in 5q konnte durch einen bruchpunktüberspannenden BAC (RP11-526D16) identifiziert werden, der ein starkes FISH Signal im kurzen Arm und ein schwächeres im langen Arm beim Schimpansen erzeugt (siehe **Abb. 3.3.1.4d**). Diese Signalverteilung lässt auf eine Bruchpunktlokalisierung im 1/3 der BAC-Sequenz von distal nach proximal schließen (bei etwa 96090kb). Alle BACs, weiter distal gelegen, lagen beim Schimpansen wie auch beim Menschen, im langen Arm. Alle BACs, weiter proximal gelegen, hybridisierten beim Schimpansen im kurzen Arm und beim Menschen im langen Arm (siehe **Abb. 3.3.1.4c**). Der BAC 526D16 hat eine Größe von 165043 bp (besteht aus 14 ungeordneten Teilen ohne Überlappungsbereiche) und liegt in einer genarmen Region. In der Bruchpunktregion sind die zwei Gene LOC389311 und CAST (Calpastatin, spielt eine Rolle beim Pathogenesemechanismus von rheumatischen Erkrankungen) bekannt.
Ein Homologieabgleich mit dem gesamten Genom erbrachte nur wenige Homologien im Genom, die vor allem auf dem Chromosom 7 und X zu finden waren (BLAST/NCBI, Daten nicht gezeigt). Die Sequenzanalyse auf Repeats erbrachte folgende Repeat-Zusammensetzung (RepeatMasker):

Gesamtlänge: 163739 bp GC Gehalt: 39.62 % Repeat-Anteil: 78914 bp (48.19 %)

SINEs (63x, 9.56%), LINEs (50x, 24.35%), LTR Elemente (33x, 9.02%), DNA Elemente/Transposons

(22x, 3.97%), einfache Repeats (26x, 0.69%).

Der Repeatanteil in der Sequenz ist jedoch nicht für die homologen Bereiche im Genom verantwortlich, wie eine Analyse der Repeat-maskierten Sequenz auf Übereinstimmungen im Genom erbrachte. Hierbei wurden fast genau die gleichen homologen Genomregionen angezeigt (BLAST/NCBI, Daten nicht gezeigt).

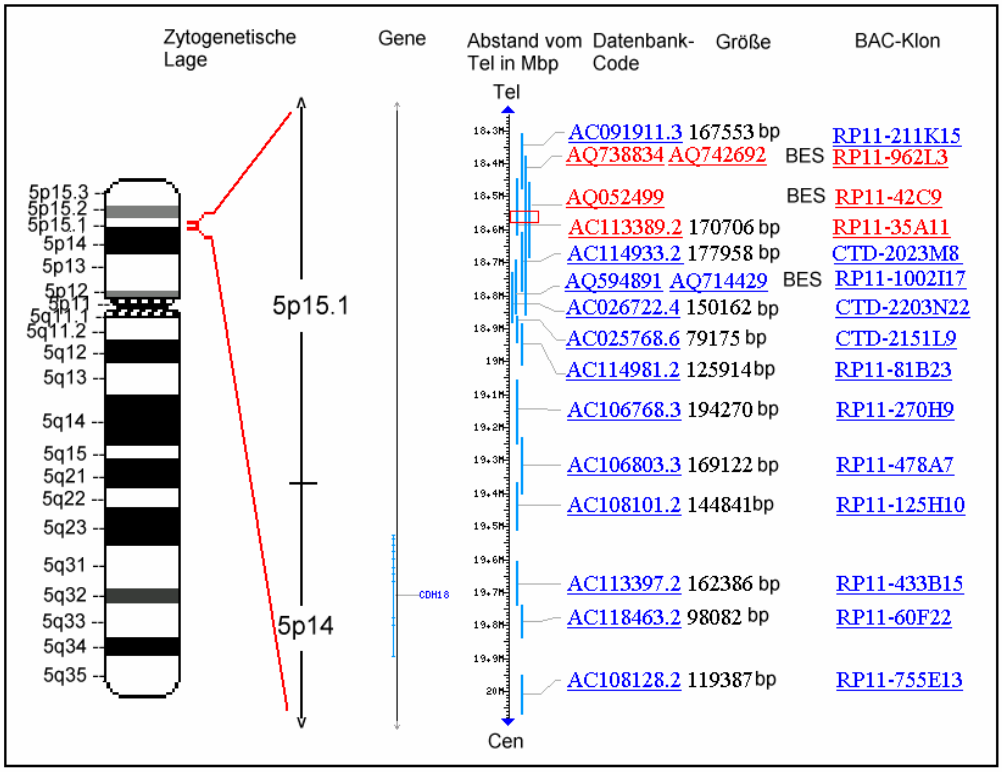


Abbildung 3.3.1.4a: Schematische Darstellung der Bruchpunktkartierung des evolutionären Inversionsbruchpunktes beim Schimpansenchromosom homolog zu HSA 5p. Von links nach rechts sinddie zytogenetische Lage, die Gene im Untersuchungsbereich sowie die Einordnung der verwendeten BAC Sonden in den Abstand vom Telomer 5p in Mb angegeben. Rot markiert sind die bruchpunktüberspannende BACs beim Schimpansen. Sofern bei den BACs keine Größenangabe in bp gegeben ist, handelt es sich um sogenannte BES Klone, von denen nur die Anfangs- und Endsequenz bekannt ist.

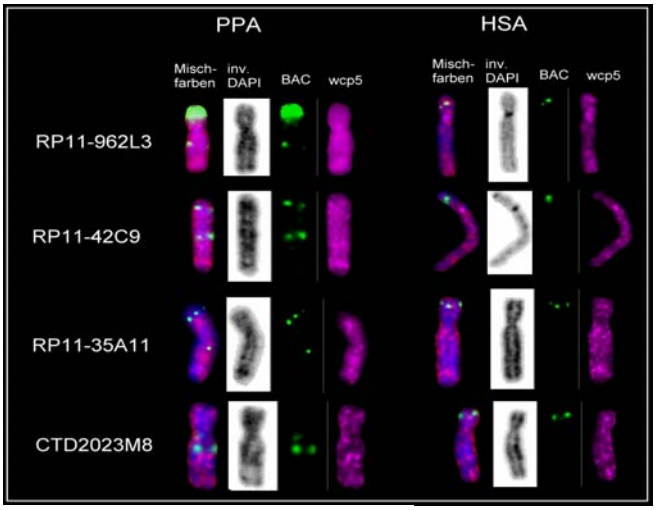


Abbildung 3.3.1.4b: Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse der bruchpunktüberspannnenden BACs in 5p beim Menschen und beim Schimpansen. Zur besseren Orientierung erfolgte die gleichzeitige Hybridisierung des wcp5.

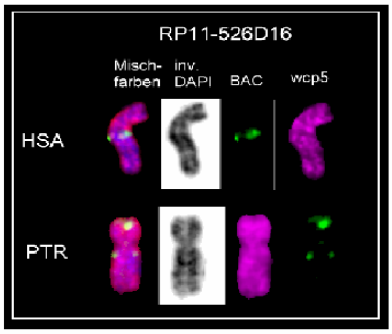


Abbildung 3.3.1.4d: Gegenüberstellung der Hybridisierungs-ergebnisse des bruchpunkt-überspannnenden BACs in 5q beim Menschen und beim Schimpansen. Zur besseren Orientierung erfolgte die gleichzeitige Hybridisierung des wcp5.

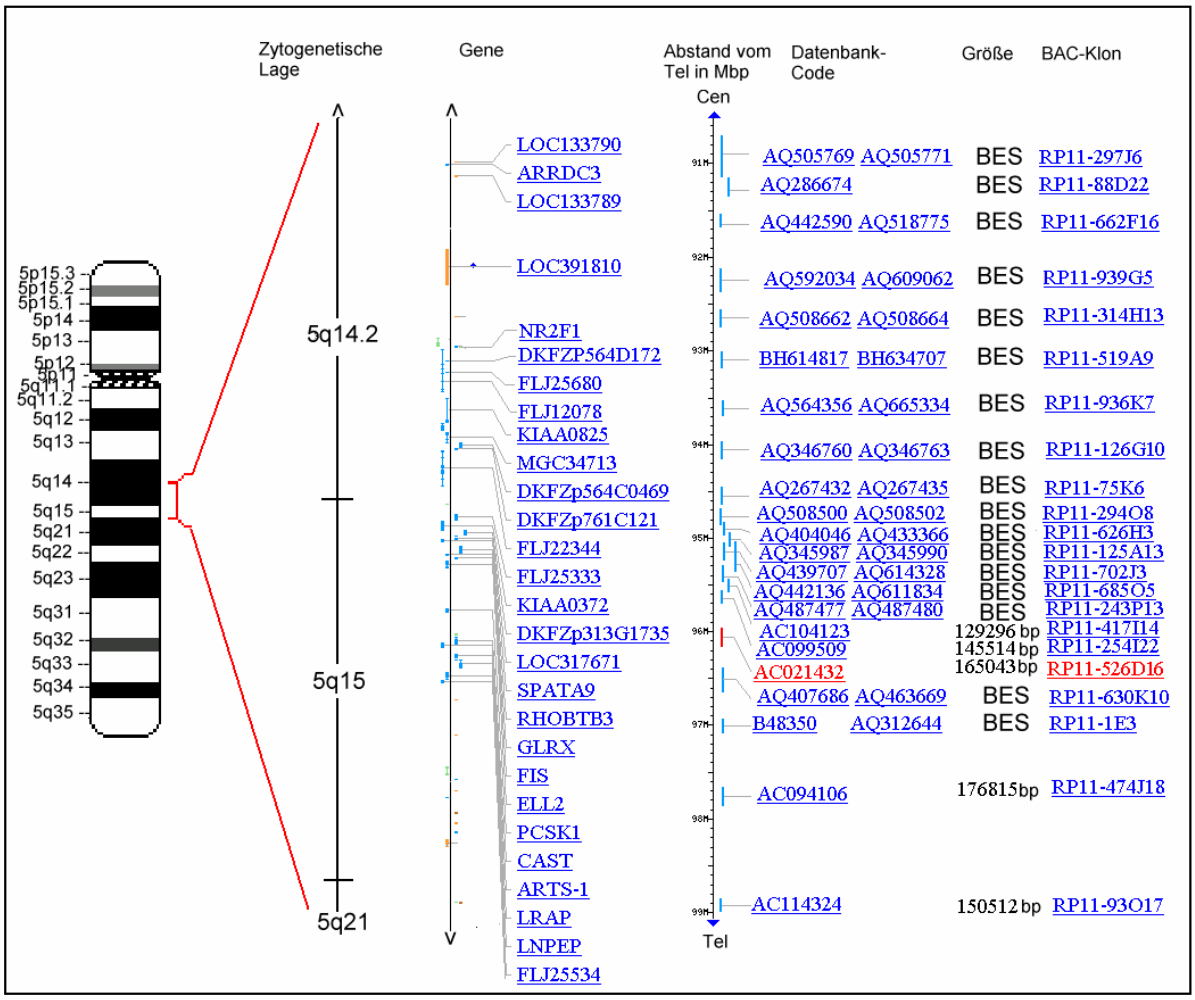


Abbildung 3.3.1.4c: Schematische Darstellung der Bruchpunktkartierung des evolutionären Inversionsbruchpunktes beim Schimpansenchromosom homolog zu HSA 5q. Von links nach rechts sind die zytogenetische Lage, die Gene im Untersuchungsbereich sowie die Einordnung der verwendeten BAC Sonden im Abstand vom Telomer 5p in Mb angegeben. Rot markiert ist der bruchpunktüberspannende BAC beim Schimpansen. Sofern bei den BACs keine Größenangabe in bp gegeben ist, handelt es sich um sogenannte BES Klone, von denen nur die Anfangs- und Endsequenz bekannt ist.

3.3.1.5 Perizentrische Inversionen an den homologen Chromosomen zu HSA 9 bei den *Hominidae*

3.3.1.5.1 Perizentrische Inversion im homologen Chromosom zu HSA 9 bei Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan

Für die Abklärung des Inversionsbruchpunktes in 9q bei Gorilla und Orang-Utan, der nach 3.2.1.9 zwischen dem Subzentromer BAC 9q (RP11-430C15, 66910-67020kb) und dem Zentromer liegen muss, wurden folgende weiter proximal gelegene BACs eingesetzt (Abstand vom Telomer 9p in kb): RP11-262H14 (62545-627003 kb), RP11-216M21 (63300-63470kb), RP11-111F5 (63535-63720kb), RP11-403A15 (65335-65525kb), RP11-274B18 (66585-66755 kb). Neben der kartierten Lage in 9q21.11 für alle dieser BACs, zeigten die BACs 262H14, 216M21, 111F5 und 403A15 ein zusätzliches Hybridisierungssignal in 9p11.2 beim Menschen. Diese kreuzhybridisierenden Regionen werden ebenfalls durch die Mikrosezierungsbank Midi 36 markiert, die zwei etwa gleich große Signale in 9p11.2 und 9q13-21.11erzeugt. Das genaue Ausmaß dieser Kreuzhybridisierung wird näher in 3.3.1.5.2 untersucht.

Bei Gorilla und Orang-Utan hybridisierte die Midi 36 ebenfalls mit zwei Signalen homolog zu HSA in 9p11.2 (also angrenzend an das Zentromer) und in 9q13-p21.11 (also etwa in der Mitte des Chromosoms) (siehe auch **Abb. 3.3.1.5.1**). Die BACs 262H14 und 216M21 zeigten lediglich ein Signal direkt ans Zentromer angrenzend. Die anderen BACs wiesen nur ein Signal in der Mitte des Chromosoms auf. Die BACs 262H14, 216M21 und 111F5 zeigten zusätzlich kreuzhybridisierende Signale im und um die Zentromerbereiche weiterer Chromosomen (Daten nicht gezeigt).
Die Midi 36 erzeugt im Schimpansen nur ein großes Signal direkt ans Zentromer angrenzend auf dem 9p homologen Chromosomenarm (siehe **Abb. 3.3.1.5.1**). Der BAC 274B18 hybridisiert ebenfalls in dem Midi 36 Bereich und ist im Vergleich zum Menschen invertiert, Der BAC 262H14 muss zweifach invertiert sein, um seine Lage im Schimpansenchromosom zu erklären (siehe auch 3.2.1.9).

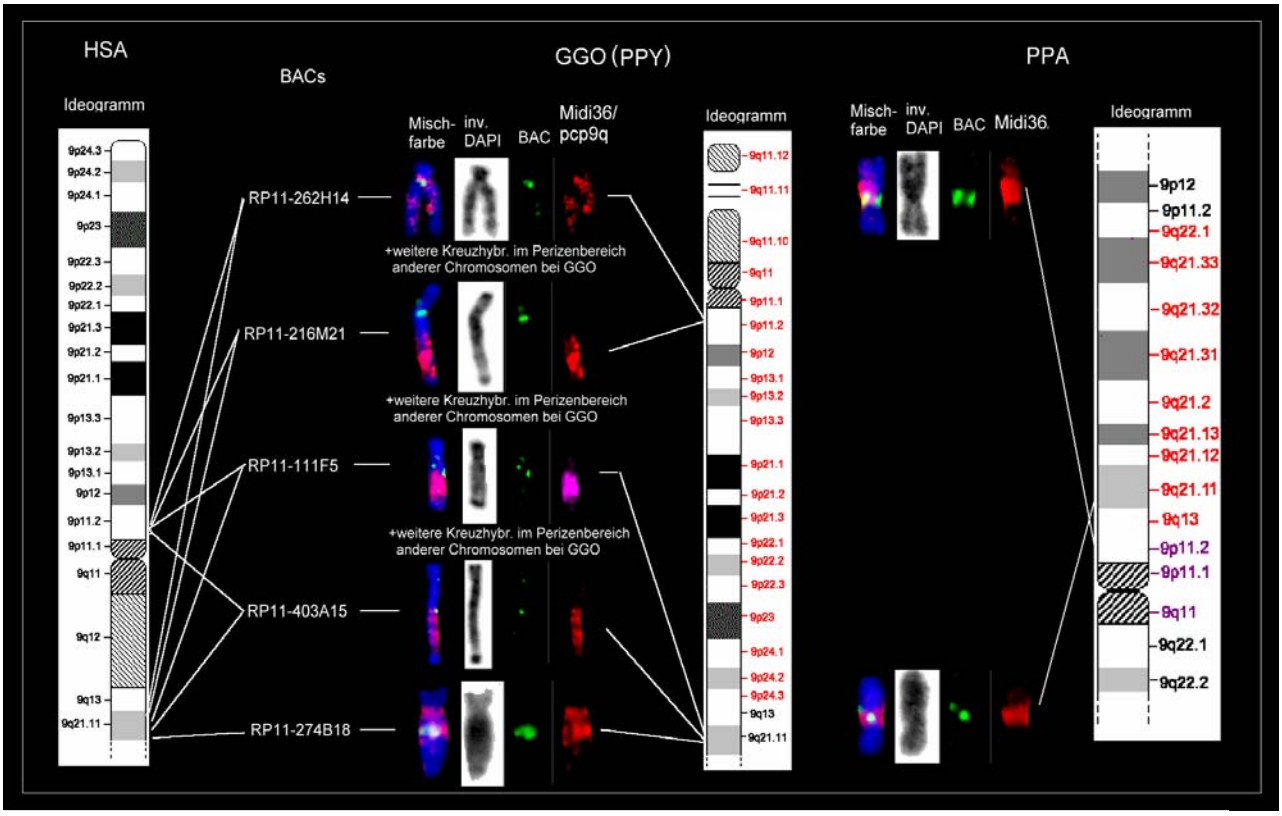


Abbildung 3.3.1.5.1: Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse zur Identifizierung des Inversionsbruchpunktes in 9q bei Gorilla und Orang-Utan (Mitte) sowie beim Schimpansen (Rechts). Da Gorilla und Orang-Utan die gleichen Hybridisierungssignale aufwiesen, wurde auf die Darstellung der Orang-Utan Hybridisierungen verzichtet. Die gleichzeitige Hybridisierung von Midi36 oder pcp9q diente lediglich zur eindeutigen Identifizierung des homologen Chromosoms sowie der relativen Lagezuordnung der BAC-Sonden. Das Ideogramm für Gorilla, Orang-Utan und Schimpanse wurde der neuen Nomenklatur der *Hominidae* entnommen (siehe 3.4).

3.3.1.5.2 Perizentrische Inversion 9 „Normvariante“ des Menschen

Die beim Menschen am häufigsten auch unabhängig auftretende Inversionsnormvariante ist die perizentrische Inversion eines Chromosoms 9 mit den Bruchpunkten in p11 und q13.
Die Untersuchung dieser Bruchpunktregionen und der Versuch, die Bruchpunkte zu identifizieren, wurde von Frau Sabine Schmidt im Rahmen der von mir betreuten Diplomarbeit durchgeführt. Die Arbeiten wurden durch die Tatsache erschwert, dass diese Regionen über weite Bereiche gegenseitige Kreuzhybridisierungen zeigten. Das Ausmaß bzw. die Grenzen der kreuzhybridisierenden Regionen im p- und q-Arm des menschlichen Chromosoms 9 wurde mit folgenden BACs aus 9p näher untersucht (Abstand vom Telomer 9p in kb): RP13-198D9 (38555-38753kb), RP11-402N8 (38735-38880kb), RP11-211-N8 (40740-40880kb), RP11-242D12 (41870-42020kb), RP11-374M1 (42362-42532kb), RP11-

157L3 (43468-43532kb), RP11-327I22 (43775-43955kb), RP11-15E1 (44040-44205kb), RP11-399F4 (44250-44345kb); sowie mit folgenden BACs aus 9q: RP11-262H14 (61125-61285kb), RP11-282E4 (61335-61355kb), RP11-111F5 (63533-637202kb), RP11-403A15 (65335-65525kb), RP11-460N11 (65830-66000kb), RP11-561O23 (66290-66465kb), RP11-88I18 (66465-66585kb), RP11-274B18 (66585-66755kb).
In den **Abbildungen 3.3.1.5.2a** und **b** sind jeweils die Hybridisierungsergebnisse der beiden Regionen für die Eingrenzung der Kreuzhybridisierungsregion dargestellt. Die Kreuzhybridisierung im kurzen Arm von Chromosom 9 beginnt zwischen BAC RP13-198D9 und RP11-402N8, also bei etwa 38735kb (Abstand vom Telomer 9p) und reicht bis zum Zentromer (44400-48000kb). Diese ca. 5,6 Mb große Region ist extrem repeatreich und wie Homologieuntersuchungen der verwendeten BACs bestätigten, ist eine außergewöhnlich hohe Anzahl an gleichen und ähnlichen Sequenzen im gesamten Genom und natürlich auch in den durch FISH nachweisbaren Kreuzhybridisierungsbereich in 9q21 (Daten nicht gezeigt) zu finden. Die Region weist eine Reihe von Genen auf die in **Abb. 3.3.1.5.2a** aufgelistet sind. Im q-Arm erstreckt sich dieser Bereich über 5,4 Mb zwischen den BACs RP11-262H14 und RP11-88I18.

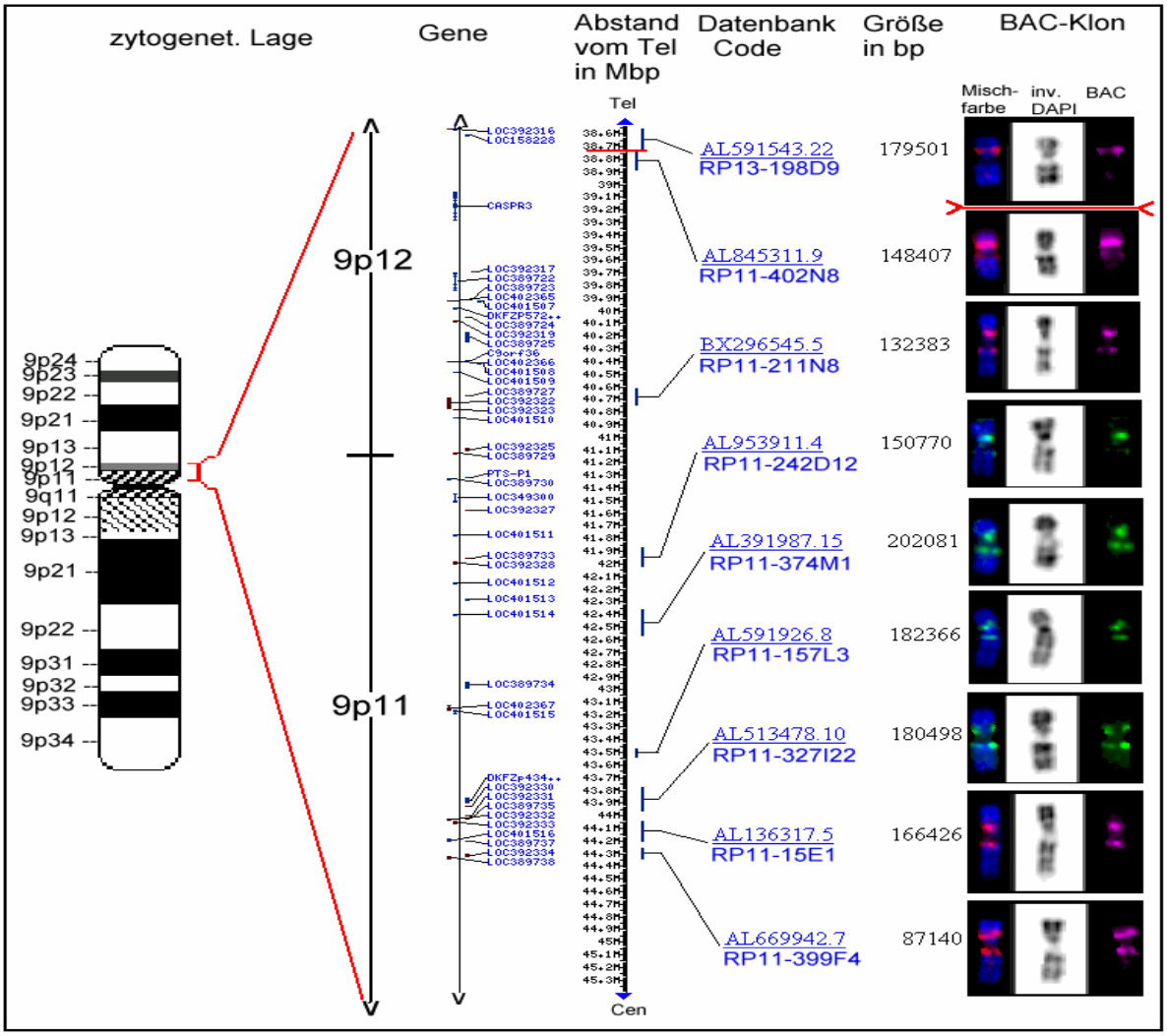


Abbildung 3.3.1.5.2a: Schematische Darstellung der Kreuzhybridisierungsregion und der Hybridisierungsergebnisse im kurzen Arm des Chromosoms 9. Von links nach rechts sind die zytogenetische Lage, die Gene im Untersuchungsbereich sowie die Einordnung der verwendeten BAC Sonden in den Abstand vom Telomer 9p in Mb dargestellt. Rot markiert ist die Grenze der kreuzhybridisierenden Region in 9p.

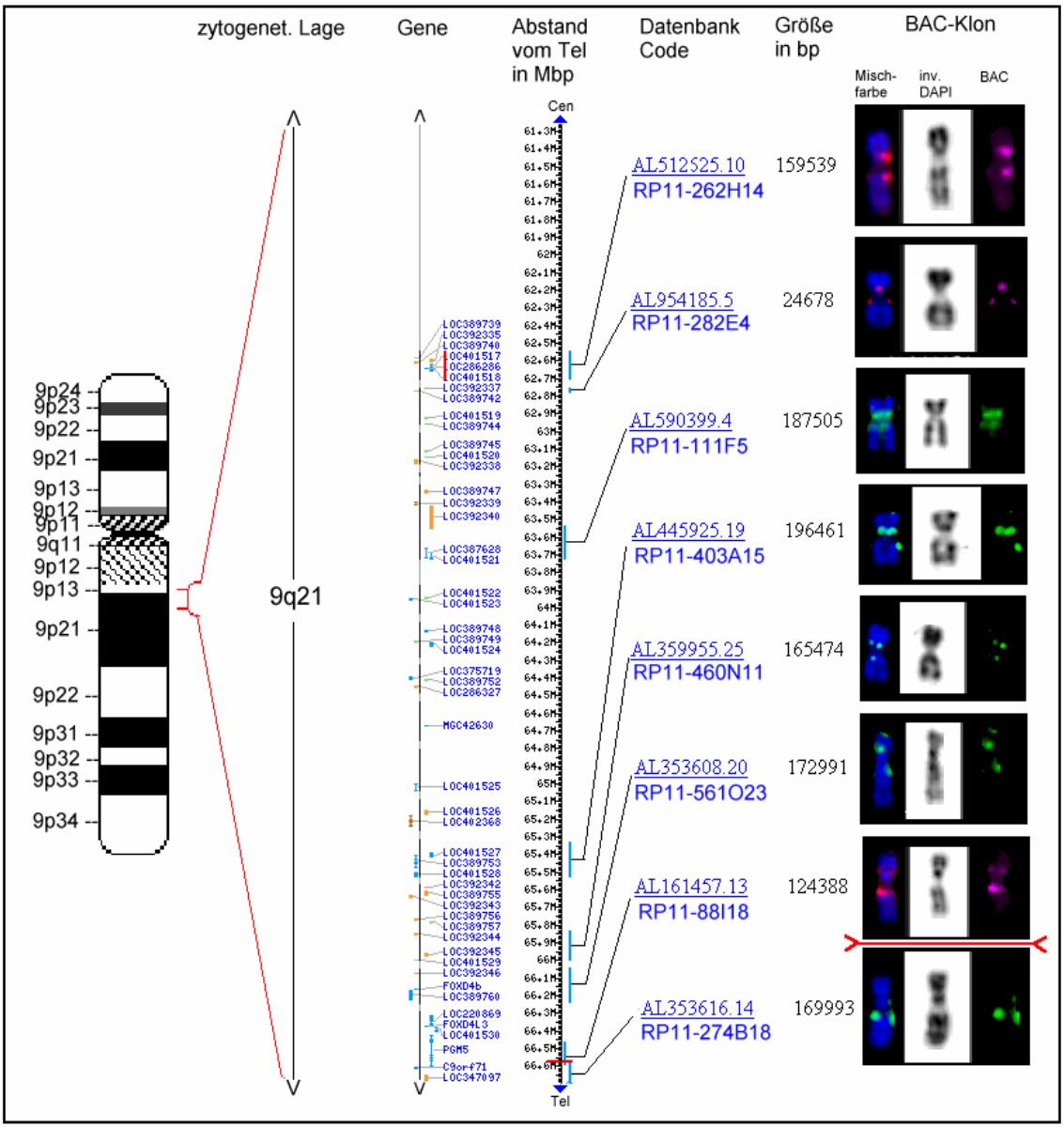


Abbildung 3.3.1.5.2b: Schematische Darstellung der Kreuzhybridisierungsregion und der Hybridisierungsergebnisse im langen Arm des Chromosoms 9. Von links nach rechts sind die zytogenetische Lage, die Gene im Untersuchungsbereich sowie die Einordnung der verwendeten BAC Sonden in den Abstand vom Telomer 9p in Mb dargestellt. Rot markiert ist die Grenze der kreuzhybridisierenden Region in 9q.

3.3.1.6 Terminale Deletion und parazentrische Inversion im homologen Chromosom zu HSA 17 beim Orang-Utan

Zur Abklärung des unterschiedlichen Hybridisierungsverhaltens sowie des Verlustes des Subtelomer 17p bei den Orang-Utans (siehe 3.2.1.17) erfolgte die Hybridisierung folgender BACs aus der Region 17pter (Abstand vom Telomer 17p in kb): RP11-61B16 (624-687kb), RP11-216P6 (840-1045kb) und RP13-626C16 (1760-1795kb). Der BAC 626C16, der am weitesten vom Subtelomer entfernt war, zeigt bei allen *Hominidae* das gleiche Hybridisierungsmuster. Der BAC 216P6 sowie 61B16 erzeugten das gleiche Muster in Mensch, Schimpanse und Gorilla. Im Orang-Utan hingegen konnte neben dem zu erwartenden Signal in 17pter weitere Signale im Perizentromerbereich des Chromosoms nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Deletion dieser BACs konnte beim Orang-Utan nicht nachgewiesen werden, sodass tatsächlich von einer terminalen Deletion

ausgegangen werden kann, die nur den Subtelomersondenbereich umfasst (PAC GS-202-L17, 60 kb vom Telomer entfernt). Bekannte Gene sind in diesem Bereich nicht zu finden. Es ist lediglich ein transkripierter Bereich bei 60 kb zu finden, dessen Protein bzw. Gen und Funktion noch unbekannt ist. Definierte Gene sind in der Region 17pter erst ab 90 kb zu finden.

Die Bestätigung und Eingrenzung der parazentrischen Inversion beim Orang-Utan mit den Bruchpunkten homolog zu HSA in 17q21.1 und 17q24.2 nach mMCB erfolgte mit folgenden BACs aus der Region (Abstand vom Telomer 17p in kb): RP11-294G4 (33473-33643kb), RP11-749I16 (38586-38780kb), RP11-425G1 (37287-37466kb), RP11-42M14 (51088-51120), RP11-524I12 (54315-54485kb), RP11-561K8 (60430-60625kb). Die zytogenetische Kartierung der einzelnen BACs ist graphisch in **Abb. 3.3.1.6** für den Menschen und den Orang-Utan gegenübergestellt. Demnach liegen die Inversionsbruchpunkte zwischen den BACs RP11-294G4 und RP11-749I16 sowie distal von BAC RP11-561K8. Die mit mMCB/MCB gefundenen Bruchpunkte konnten somit bestätigt werden (siehe 3.2.1.17).

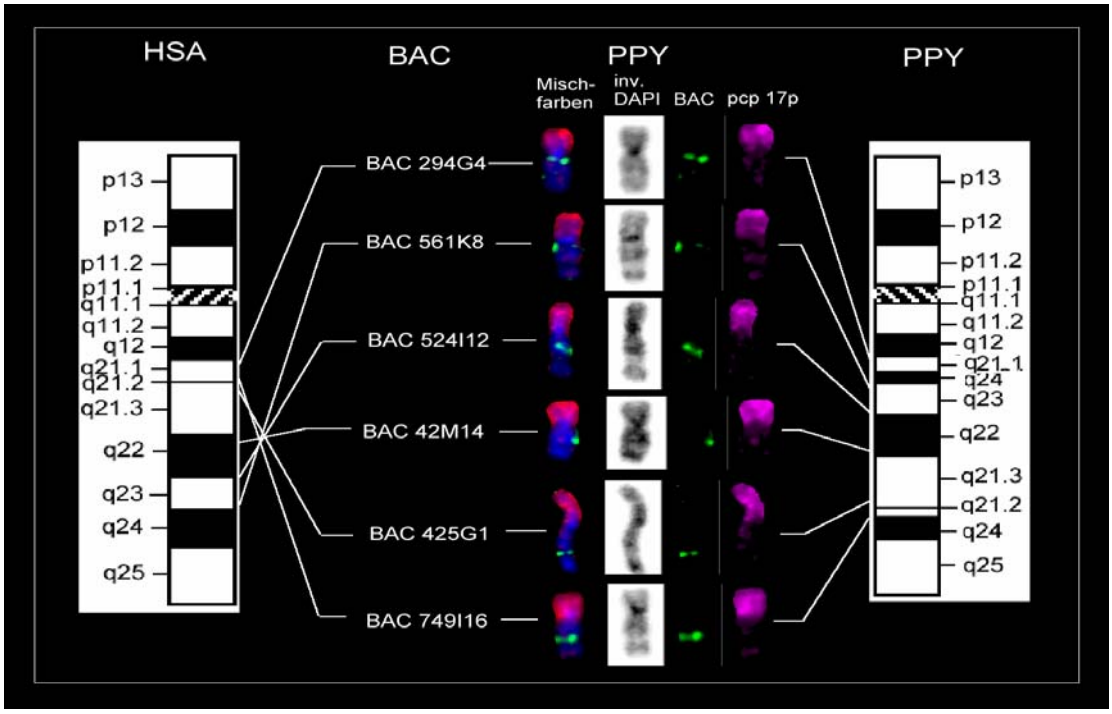


Abbildung 3.3.1.6: Gegenüberstellung der BAC Hybridisierungsergebnisse für die parazentrische Inversion im homologen Chromosom 17 des Orang-Utans. Dargestellt ist jeweils die zytogenetische Lage der BACs an Ideogrammen des HSA und des PPY. Die gleichzeitige Hybridisierung von pcp17p diente lediglich zur eindeutigen Identifizierung des homologen Chromosoms sowie der relativen Lagezuordnung der BAC-Sonden.

3.3.1.7 Komplexe Umbauten am homologen Chromosom zu HSA 20 beim Orang-Utan

Zur Abklärung der Hybridisierungsergebnisse des mMCB sowie des subCTM (siehe 3.2.1.20) wurden folgende BACs hybridisiert (Abstand vom Telomer 20p in kb): RP11-318P23 (6137-6182kb), RP11-489A10 (11741-11785kb), RP1-310O13 (31220-31384kb), RP5-954P9 (35298-35336kb), RP11-458E15 (55195-55257kb), RP11-429E11 (60907-61037kb). Die Hybridisierungsergebnisse (siehe Abb. 3.3.1.7) bestätigen die Ergebnisse des mMCB und des subCTM und lassen sich durch zwei Inversionen erklären. Die Bruchpunkte der ersten Inversion liegen homolog zu HSA in 20pter und 20q11.21, die der zweiten Inversion in 20p13 und 20q11.21.

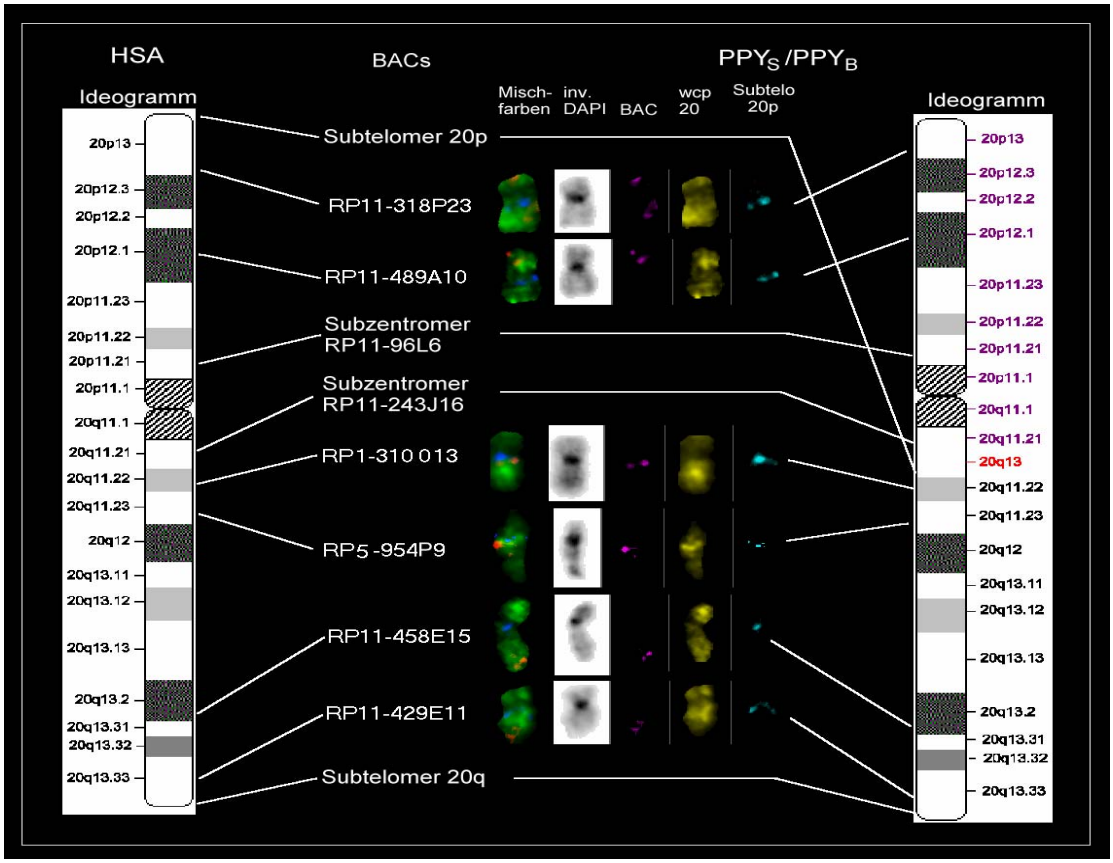


Abbildung 3.3.1.7: Darstellung der Hybridisierungsergebnisse der komplexen Rearrangements im Orang-Utan Chromosom homolog zu HSA 20. Die gleichzeitige Hybridisierung von wcp20 und Subtelomer 20p diente lediglich zur eindeutigen Identifizierung des homologen Chromosoms sowie der relativen Lagezuordnung der BAC-Sonden. Die Ergebnisse für Subtelomer 20p, 20q sowie der Subzentromer BACs 20p und 20q sind in 3.2.1.20 dargestellt. Das Ideogramm für den Orang-Utan wurde der neuen Nomenklatur der *Hominidae* entnommen (siehe 3.4).

3.3.2 Heterochromatin des Schimpansen

Das Genom des Schimpansen weist im Vergleich zum Menschen eine Reihe an zusätzlichem Heterochromatin, vor allen an den terminalen Enden der Chromosomenarme, auf. Daneben findet sich aber auch, einzigartig bei den *Hominidae*, interstitielles Heterochromatin in den homologen Chromosomen zu HSA 7 und 13. Diese Besonderheit soll im Folgenden mit BACs aus dieser Region sowie mit Mikrosezierungssonden genauer untersucht werden.
Parazentrisches Heterochromatin wird in diesem Zusammenhang im homologen Chromosom zu HSA 16 untersucht werden, das beim Schimpansen im entgegengesetzten Chromosomenarm auftritt, aber nach Auswertung des subCTM 16 keine perizentrische Inversion aufweist (siehe 3.2.1.16).
Das terminale Heterochromatin des homologen Chromosoms zu HSA 18 entspricht beim Schimpansen, wie auch beim Gorilla und Orang-Utan, den Satelliten eines akrozentrischen Chromosoms. Inwieweit dieses Heterochromatin in die perizentrische Inversion des HSA 18 involviert ist, soll ebenfalls geklärt werden.
Je Hybridisierung wurden durchschnittlich 10-20 Chromosomen untersucht.

3.3.2.1 Interstitielles Heterochromatin im homologen Chromosom zu HSA 7

3.3.2.1.1 Charakterisierung über Mikrosezierung

Die Charakterisierung des interstitiellen Heterochromatins beim Schimpansen homolog zu HSA in 7q22.1 erfolgte mit einer am Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena hergestellten Mikrosezierungssonde (Dr. Trifonov) dieser Region aus dem entsprechenden Schimpansenchromosom (= Midi PTR 7). Das Ergebnis der Mikrosezierung ist über eine Rückhybridisierung („reverse painting“) in **Abbildung 3.3.2.1.1** dargestellt. Neben der deutlich erkennbaren Mikrosezierungsregion in Chromosom 7 wurden mit dieser DNA Sonde das gesamte terminale Heterochromatin sowie das interstitielle Heterochromatin in 13q14.3 je nach Ausprägung des Heterochromatins verschieden stark angefärbt.
Die Hybridisierung dieser Mikrosezierungssonde auf den Menschen erzeugte lediglich ein Signal auf Chromosom 7, das damit zu erklären ist, dass die Mikrosezierung des sehr kleinen interstitiellen Heterochromatinbereiches beim Schimpansen neben den heterochromatischen Bereichen auch das angrenzende Euchromatin umfasste (siehe auch 3.3.2.2 und 3.3.2.3). Dieses Hybridisierungsbild wurde ebenfalls beim Gorilla erzeugt (in **Abb. 3.3.2.1.1** wurde beim Gorilla gleichzeitig die interstitiellen Heterochromatinsonden von Chromosom 7 und 13 hybridisiert).

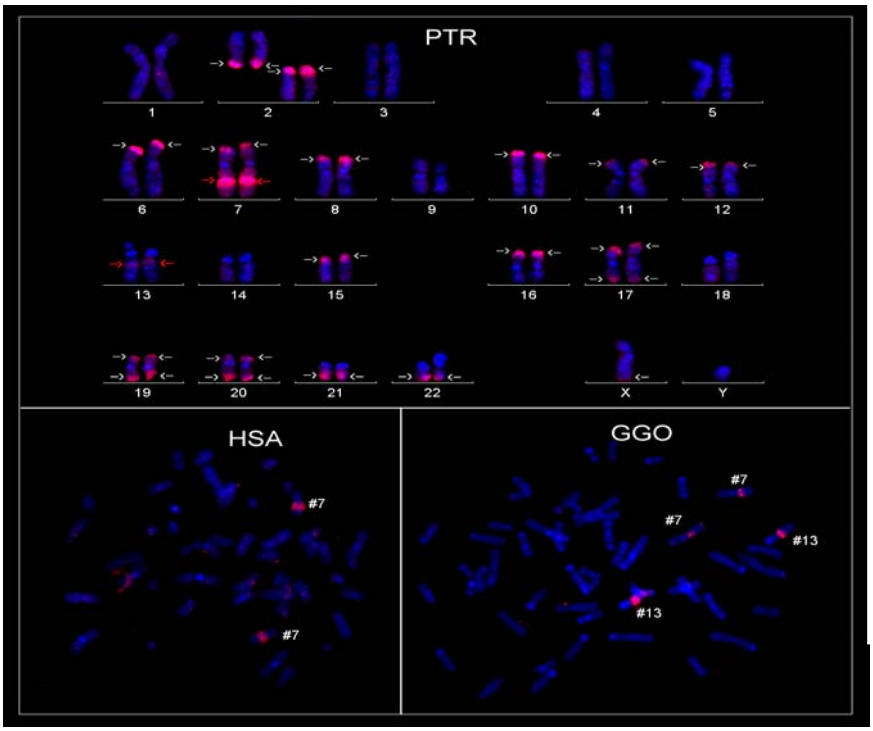


Abbildung 3.3.2.1.1: Hybridisierungsergebnisse der Mikrosezierungssonde aus dem interstitiellen Heterochromatin des Schimpansenchromosoms 7 vergleichend dargestellt am Schimpansen (Karyogramm nach Homologie zu HSA; weiße Pfeile terminales Heterochromatin; rote Pfeile interstitielles Heterochromatin), dem Menschen (Metaphase) und dem Gorilla (Metaphase). Beim Gorilla wurde gleichzeitig die interstitielle Heterochromatinsonde des Schimpansenchromosoms 13 hybridisiert.

3.3.2.1.2 Charakterisierung über BACs

Die Bruchpunktkartierung der Integrationsstelle des interstitiellen Heterochromatins im Schimpansenchromosom 7 homolog zu HSA wurde von Frau Madeleine Gross im Rahmen der von mir betreuten Diplomarbeit durchgeführt, dafür wurden folgende BAC Klone aus dem Bereich 7q22.1-7q22.2 verwendet (Abstand vom Telomer 7p in kb): RP11-757A13 (98905-99030kb), RP11-336D7 (99870-99970kb), RP11-418P20 (100985-101150kb), RP11-163M5 (101315-101495kb), CTD-2246P9 (101720-101950kb), RP11-1134K14 (101855-102015kb), CTD-2190A7 (102000-102095kb), RP11-35A7 (102185-102537kb), RP11-960F1 (102295-102672kb), RP11-577I22 (102512-102888kb), RP11-112P10 (102642-103029kb), RP11-418B19 (102995-103065kb), RP11-356G3 (102998-103381kb). Die Lageeinordnung sowie die Gene in den Bereichen der BACs ist in **Abbildung 3.3.2.1.2a** dargestellt.
Zur eindeutigen Zuordnung der Lage der untersuchten BACs zum Heterochromatin im Schimpansenchromosom erfolgte die gleichzeitige Hybridisierung der Midi PTR18 Sonde,

die ein Kreuzhybridisierungssignal auf dem interstitiellen Heterochromatin erzeugt. Der bruchpunktüberspannende BAC RP11-1134K14 zeigt neben einem Kreuzhybridisierungssignal in 7q11.2 beim Schimpansenchromosom ein Splitsignal ober- und unterhalb des interstitiellen Heterochromatins, das im Vergleich zum menschlichen Chromosom fehlt (siehe **Abb. 3.3.2.1.2b**). Alle untersuchten BACs distal hybridisierten unterhalb des Heterochromatins und alle proximal gelegenen BACs hybridisierten oberhalb des Heterochromatins (Daten nicht gezeigt).

Der BAC RP11-1134K14 ist ein sogenannter BES Klon, dass heißt, nur die Endsequenzen sind bekannt und seine Lage im Genom ist aufgrund dieser Endsequenzen bestimmt. Der BAC hat eine Größe von etwa 160 kb und liegt in einer genarmen, unsequenzierten Region in 7q22.1-q22.2. Da das Splitsignal etwa ein Signalstärkeverhältnis von 2:1 hat, lässt sich der Bruchpunkt im BAC etwa zwischen 101940-101980 kb (Abstand vom Telomer 7p) angeben. Dies konnte auch durch die überlappenden Klone CTD-2246P9 und CTD-2190A7 bestätigt werden, die kein Spaltsignal aufweisen. In dieser Region ist bislang nur ein Gen bekannt: MGC35361, das aber lediglich als Genmodell angenommen wird. Das dazugehörige Protein ist ebenfalls noch nicht bekannt. Da die Sequenz des BACs noch nicht bekannt ist, ist eine Homologiesuche sowie eine Repeat- und Sequenzanalyse bislang noch nicht möglich.

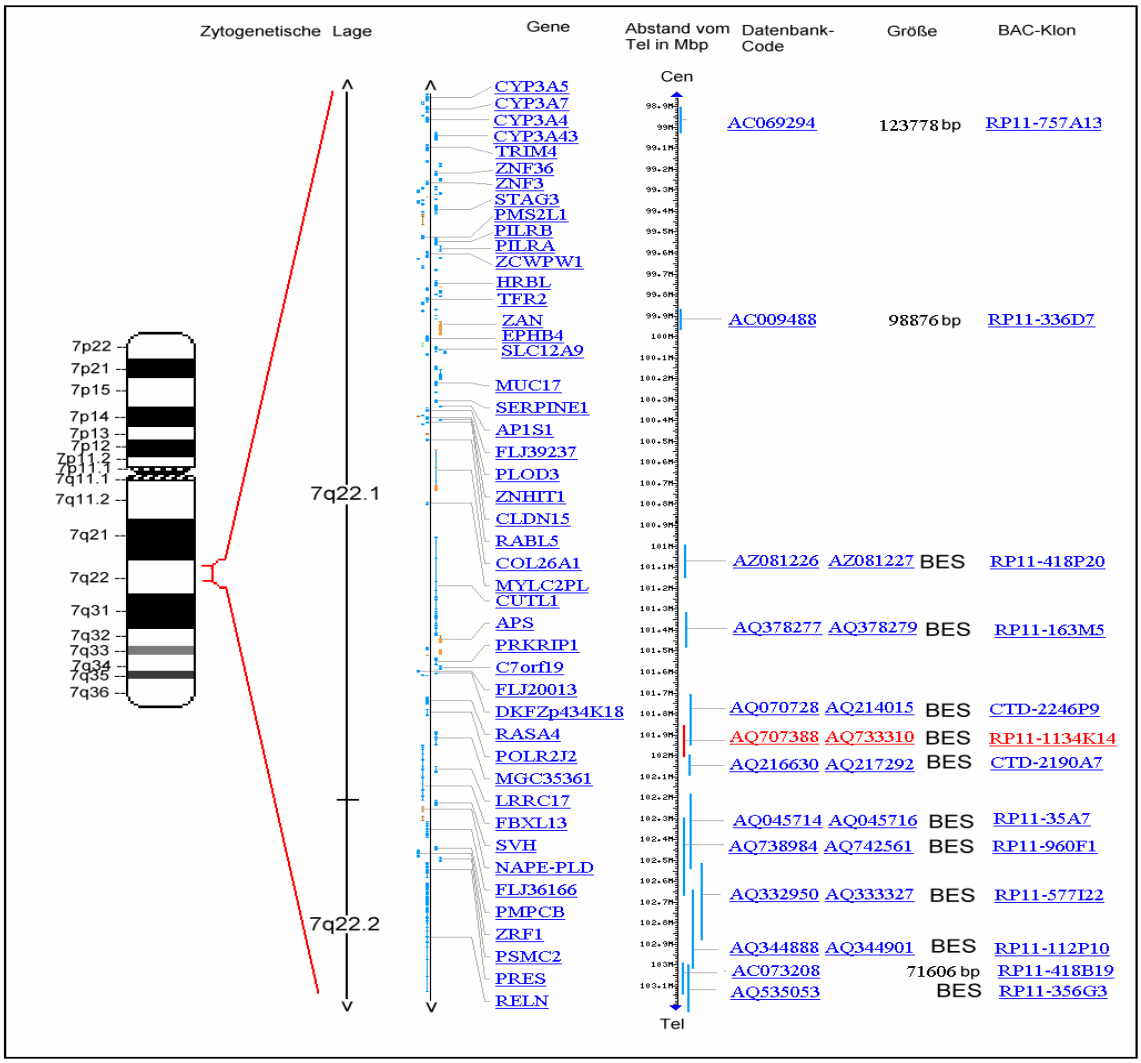


Abbildung 3.3.2.1.2a: Schematische Darstellung der Bruchpunktkartierung des interstitiellen Heterochromatins beim Schimpansenchromosom homolog zu HSA 7. Von links nach rechts sind die zytogenetische Lage, die Gene im Untersuchungsbereich sowie die Einordnung der verwendeten BAC Sonden in den Abstand vom Telomer 7p in Mb dargestellt.
Rot markiert ist der bruchpunktüberspannende BAC des Schimpansen. Sofern bei den BACs keine Größenangabe in bp gegeben ist, handelt es sich um sogenannte BES Klone, von denen nur die Anfangs- und Endsequenz bekannt ist.

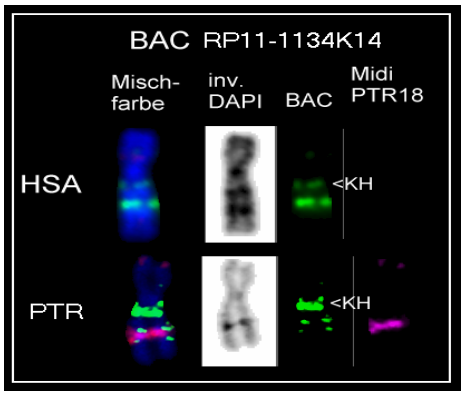


Abbildung 3.3.2.1.2b: Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse des bruchpunkt-überspannnenden BACs RP11-1134K14 beim Menschen und beim Schimpansen. Der BAC erzeugt neben dem kartierten Signal in 7q22.1 ein weiteres kreuzhybridisierendes (KH) in 7p11.2 sowohl beim Menschen als auch beim Schimpansen. Zur besseren Orientierung und Lagebestimmung erfolgte die gleichzeitige Hybridisierung der Midi PTR18 Sonde (siehe 3.3.2.4), die ebenfalls spezifisch das interstitielle Heterochromatin des Schimpansenchromosoms 7 homolog zu HSA anfärbt.

3.3.2.2 Interstitielles Heterochromatin im homologen Chromosom zu HSA 13

3.3.2.2.1 Charakterisierung über Mikrosezierung

Die Charakterisierung des interstitiellen Heterochromatins beim Schimpansen homolog zu HSA in 13q14.3 erfolgte mit einer am Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena hergestellten Mikrosezierungssonde (Dr. Trifonov) dieser Region aus dem entsprechenden Schimpansenchromosom (= Midi PTR 13). Das Ergebnis der Mikrosezierung ist über eine Rückhybridisierung („reverse painting“) in **Abbildung 3.3.2.2.1** dargestellt. Neben der deutlich erkennbaren Mikrosezierungsregion in Chromosom 13 wurden mit dieser DNA Sonde das gesamte terminale Heterochromatin sowie das interstitielle Heterochromatin in 7q22.1, je nach Ausprägung des Heterochromatins, verschieden stark angefärbt. Diese Mikrosezierungssonde erzeugt die gleichen Kreuzhybridisierungssignale wie die Sonde aus dem interstitiellen Heterochromatins des Schimpansenchromosoms 7 (siehe **Abb. 3.3.2.2.1**). Die Hybridisierung dieser Mikrosezierungssonde auf den Menschen erzeugte lediglich ein Signal auf Chromosom 13, das damit zu erklären ist, dass die Mikrosezierung des sehr kleinen interstitiellen Heterochromatinbereiches beim Schimpansen neben den heterochromatischen Bereichen auch das angrenzende Euchromatin umfasste. Dieses Hybridisierungsbild wurde ebenfalls beim Gorilla erzeugt (in **Abb. 3.3.2.2.1** wurde beim Gorilla gleichzeitig die interstitiellen Heterochromatinsonden von Chromosom 7 und 13 hybridisiert).

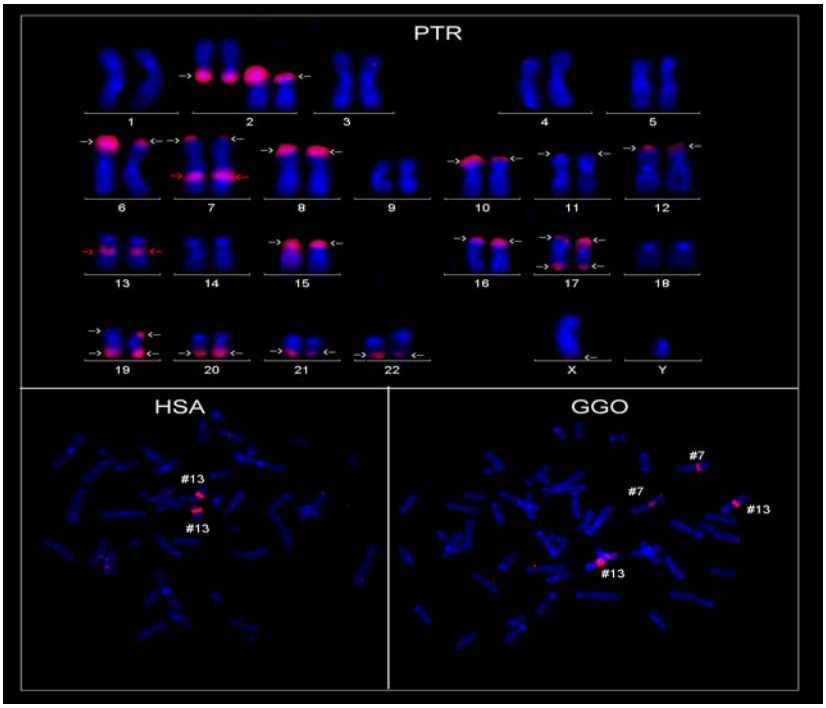


Abbildung 3.3.2.2.1: Hybridisierungsergebnisse der Mikrosezierungssonde aus dem interstitiellen Heterochromatin des Schimpansenchromosoms 13 vergleichend dargestellt am Schimpansen (Karyogramm nach Homologie zu HSA, weiße Pfeile terminales Heterochromatin; rote Pfeile interstitielles Heterochromatin), dem Menschen (Metaphase) und dem Gorilla (Metaphase). Beim Gorilla wurde gleichzeitig die interstitielle Heterochromatin-sonde des Schimpansenchromosoms 7 hybridisiert.

3.3.2.2.2 Charakterisierung über BACs

Die Bruchpunktkartierung der Integrationsstelle des interstitiellen Heterochromatins im Schimpansenchromosom 13 homolog zu HSA wurde von Frau Madeleine Gross im Rahmen der von mir betreuten Diplomarbeit durchgeführt. Dafür wurden folgende BAC Klone aus dem Bereich 13q14.1 verwendet (Abstand vom Telomer 13p in kb): RP11-351K3 (43707-44146kb), RP11-154C3 (44015-44127kb), RP11-480G1 (44043-44320kb), RP11-71J12 (44126-44496kb), RP11-106H11 (44342-44487b), RP11-247M1 (44625-44768kb), RP11-189B4 (44770-44885kb), RP11-417C20 (44920-45085kb), RP11-83N23 (45220-45425kb), RP11-320G21 (45690-45840kb), RP11-214O11 (46010-46180kb), RP11-108P5 (46975-47140kb), RP11-432M24 (47970-48120kb). Die Lageeinordnung sowie die Gene in den Bereichen der BACs ist in **Abbildung 3.3.2.1.2a** dargestellt.
Zur eindeutigen Zuordnung der Lage der untersuchten BACs zum Heterochromatin im Schimpansenchromosom erfolgte die gleichzeitige Hybridisierung der Midi PTR18 Sonde, die ein Kreuzhybridisierungssignal auf dem interstitiellen Heterochromatin erzeugt. Der Bruchpunkt-überspannende BAC RP11-189B4 zeigt beim Schimpansenchromosom ein Splitsignal ober- und unterhalb des interstitiellen Heterochromatins, das im Vergleich zum menschlichen Chromosom fehlt (siehe **Abb. 3.3.2.2.2b**). Alle untersuchten BACs distal hybridisierten unterhalb des Heterochromatins und alle proximal gelegenen BACs hybridisierten oberhalb des Heterochromatins (Daten nicht gezeigt).

Der BAC RP11-189B4 hat eine Größe von 116524 bp und liegt in einer genarmen Region in 13q14.1. Da das Splitsignal etwa ein Signalstärkeverhältnis von 1:2 hat, lässt sich der Bruchpunkt im BAC etwa zwischen 44790-44830kb (Abstand vom Telomer 13p) angeben. In dieser Region ist bislang noch kein Gen bekannt. Bei Homologieuntersuchungen der Sequenz mit dem gesamten menschlichen Genom wurden auf fast allen Chromosomen 1-6 homologe Bereiche verschiedener Größen festgestellt (BLAST/NCBI, Daten nicht gezeigt). Die Sequenzanalyse auf Repeats erbrachte folgende Repeat-Zusammensetzung (RepeatMasker):

Länge BAC: 116104 bp GC Gehalt: 39.72 % Repeat-Anteil: 55927 bp (48.17 %)

SINEs (53x, 11.07 %), LINEs (32x, 16.96 %), LTR Elemente (25x, 12.16 %), DNA Elemente

(Transposons)(9x, 4.15 %), Satelliten (2x, 2.43 %), einfache Repeats (17x, 0.70 %).

Der hohe Repeatanteil in der Sequenz ist jedoch nicht für die vielen homologen Bereiche im Genom verantwortlich, wie eine Analyse der Repeat-maskierten Sequenz auf Homologien im Genom erbrachte. Hierbei wurden fast genau die gleichen homologen Genomregionen angezeigt (BLAST/NCBI, Daten nicht gezeigt).

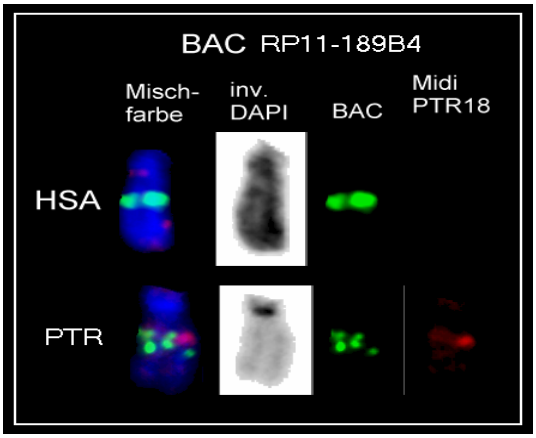


Abbildung 3.3.2.2.2b: Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse des bruchpunkt-überspannnenden BACs RP11-1134K14 beim Menschen und beim Schimpansen. Der BAC erzeugt neben dem kartierten Signal in 7q22.1 ein weiteres kreuzhybridisierendes (KH) in 7p11.2 sowohl beim Menschen als auch beim Schimpansen. Zur besseren Orientierung und Lagebestimmung erfolgte die gleichzeitige Hybridisierung der Midi PTR18 Sonde (siehe 3.3.2.4), die ebenfalls spezifisch das interstitielle Heterochromatin des Schimpansenchromosoms 13 homolog zu HSA anfärbt.

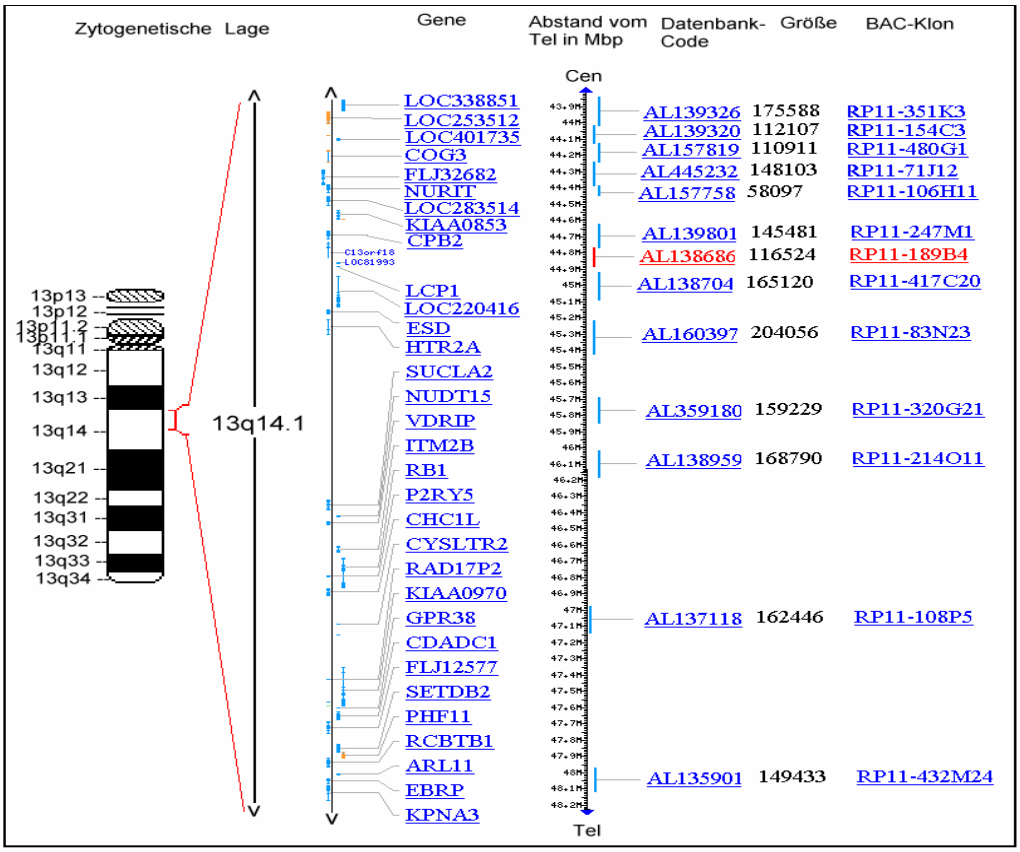


Abbildung 3.3.2.2a: Schematische Darstellung der Bruchpunktkartierung des interstitiellen Heterochromatins beim Schimpansenchromosom homolog zu HSA 13. Von links nach rechts sind die zytogenetische Lage, die Gene im Untersuchungsbereich sowie die Einordnung der verwendeten BAC Sonden in den Abstand vom Telomer 13p in Mb dargestellt.
Rot markiert ist der bruchpunktüberspannende BAC des Schimpansen.

3.3.2.3 Parazentrisches Heterochromatin im homologen Chromosom zu HSA 16

Die Charakterisierung des zentromernahen Heterochromatins beim Schimpansen homolog zum HSA Chromosom 16 erfolgte mit einer am Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena hergestellten Mikrosezierungssonde dieser Region aus dem entsprechenden Schimpansenchromosom. Das Ergebnis der Mikrosezierung ist über eine Rückhybridisierung („reverse painting“) in **Abbildung 3.3.2.3** dargestellt. Neben der deutlich erkennbaren Mikrosezierungsregion in Chromosom 16 wurden mit dieser DNA Sonde alle terminalen Heterochromatinregionen sowie das interstitielle Heterochromatin in 13q14.3 und 7q22.1 und Zentromerregionen weiterer Chromosomen, je nach Ausprägung des Heterochromatins, verschieden stark angefärbt.
Die Hybridisierung dieser Mikrosezierungssonde auf den Menschen erzeugte kein Signal in der homologen Region auf Chromosom 16, jedoch wurden ebenfalls Zentromerregionen weiterer Chromosomen angefärbt. Besonders stark hybridisierte die Sonde im Zentromer von Chromosom 17 und 11 (Pfeile in **Abb. 3.3.2.3**).
Beim Gorilla hybridisierte die Sonde nicht in der homologen Region auf dem Chromosom 16 sondern auf den terminalen Heterochromatinbereichen der Chromosomen und in den Zentromerregionen weiterer Chromosomen. Besonders stark erschien ein Signal im Zentromerbereich des Chromosoms 3 (Pfeile in **Abb. 3.3.2.3**).

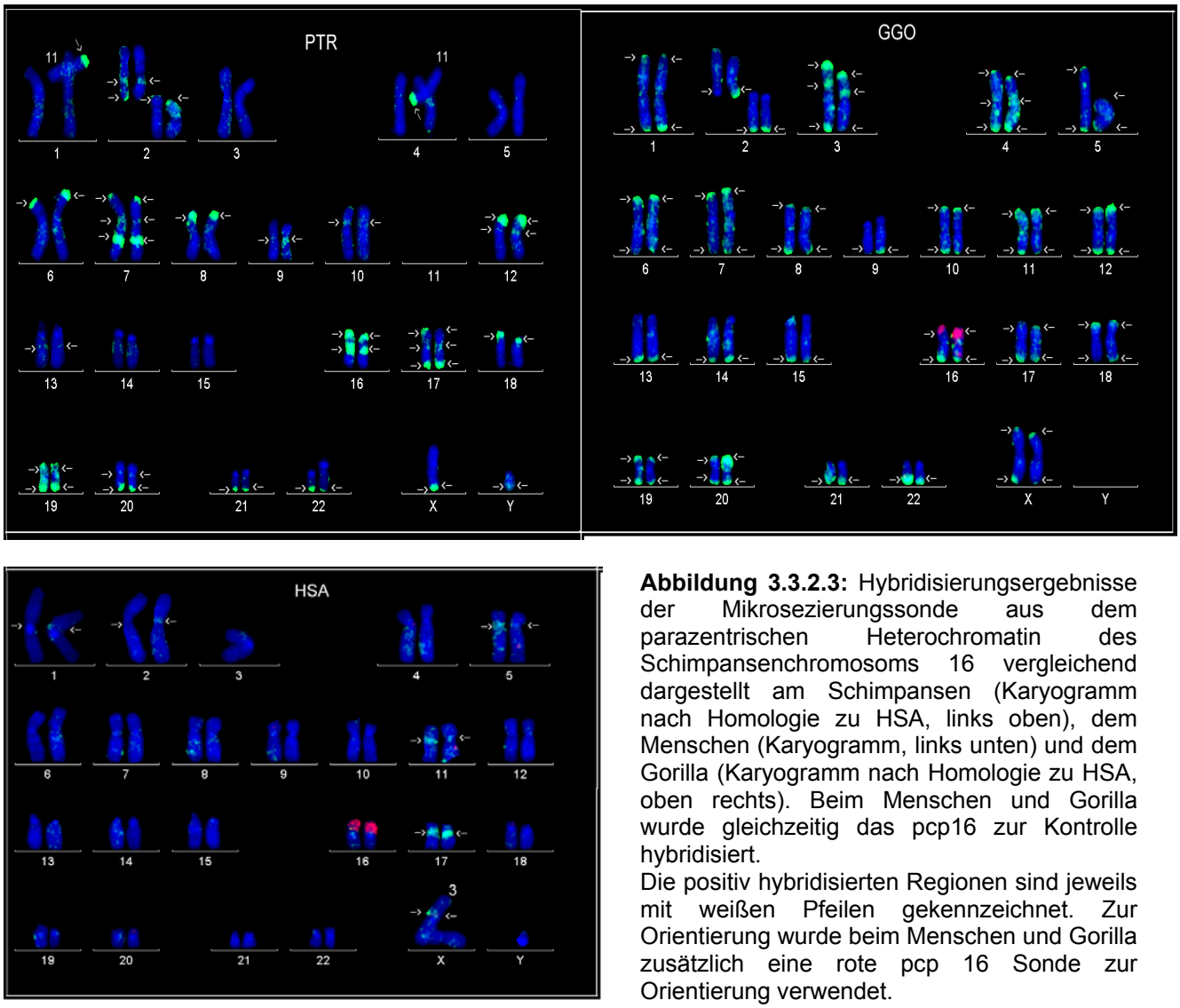


Abbildung 3.3.2.3: Hybridisierungsergebnisse der Mikrosezierungssonde aus dem parazentrischen Heterochromatin des Schimpansenchromosoms 16 vergleichend dargestellt am Schimpansen (Karyogramm nach Homologie zu HSA, links oben), dem Menschen (Karyogramm, links unten) und dem Gorilla (Karyogramm nach Homologie zu HSA, oben rechts). Beim Menschen und Gorilla wurde gleichzeitig das pcp16 zur Kontrolle hybridisiert.
Die positiv hybridisierten Regionen sind jeweils mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Zur Orientierung wurde beim Menschen und Gorilla zusätzlich eine rote pcp 16 Sonde zur Orientierung verwendet.

3.3.2.4 Terminales Heterochromatin im homologen Chromosom zu HSA 18

Die Charakterisierung des kurzen Armes des akrozentrischen Chromosoms homolog zu HSA 18 beim Schimpansen erfolgte mit einer am Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena hergestellten Mikrosezierungssonde dieser Region aus dem entsprechenden Schimpansenchromosom (= Midi PTR 18). Das Ergebnis der Mikrosezierung ist über eine Rückhybridisierung („reverse painting“) in **Abbildung 3.3.2.4** dargestellt. Neben der Mikrosezierungsregion im kurzen Arm des Chromosoms homolog zu HSA 18 wurden mit dieser DNA Sonde alle terminalen Heterochromatinregionen sowie das interstitielle Heterochromatin in 7q22.1 und etwas schwächer die kurzen Arme aller akrozentrischen Chromosomen je nach Ausprägung des Heterochromatins, verschieden stark angefärbt. Beim Menschen erzeugt diese Mikrosezierungssonde sehr starke Signale auf allen kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen sowie ein starkes Signal im Chromosom 18 und dem parazentrischen Heterochromatin in Chromosom 1. Des Weiteren konnten schwache Signale in fast allen Zentromerregionen festgestellt werden (siehe **Abb. 3.3.2.4**). Bei den Gorilla Chromosomen führt die Hybridisierung der Mikrosezierungssonde zu Signalen auf den kurzen Arm des Chromosoms homolog zu HSA 18, zu staken Signalen auf den kurzen Armen von Chromosom 21 und 22 sowie schwächeren Signalen in der Zentromerregion weiterer Chromosomen (siehe **Abb. 3.3.2.4**).

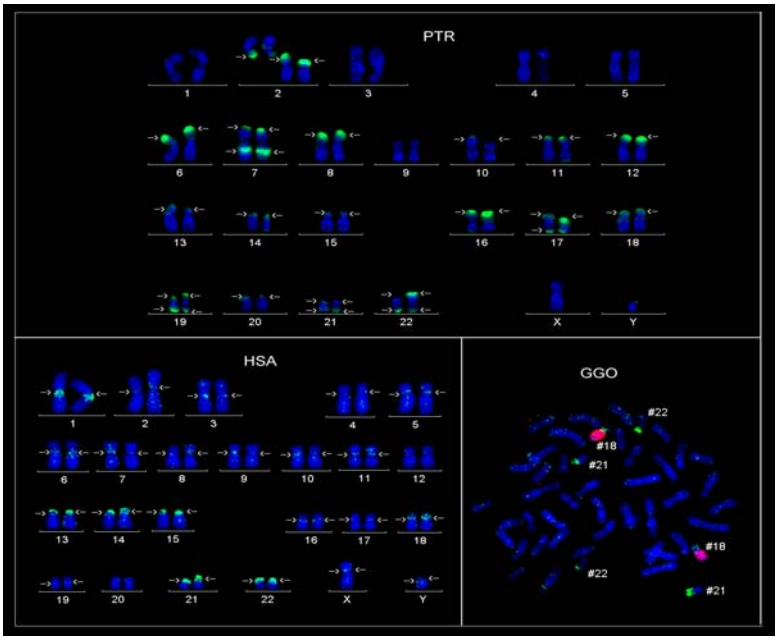


Abbildung 3.3.2.4: Hybridisierungsergebnisse der Mikrosezierungssonde aus dem kurzen Arm des akrozentrischen Chromosoms homolog zu HSA 18 des Schimpansen vergleichend dargestellt am Schimpansen (Karyogramm nach Homologie zu HSA, oben), dem Menschen (Karyogramm, links unten) und dem Gorilla (Metaphase, unten rechts). Beim Gorilla wurde gleichzeitig das wcp18 zur Kontrolle hybridisiert. Die positiv hybridisierten Regionen sind jeweils mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.

3.4 DNA-Homologie basierende Nomenklatur der *Hominidae* Chromosomen

Im Folgenden wurde ein Vorschlag für eine auf DNA-Homologien basierende Nomenklatur der *Hominidae* Chromosomen erarbeitet. Diese Nomenklatur bezieht sich auf die ISCN 1995 für die menschlichen Chromosomen. Die entsprechend homologen Chromosomen der großen Menschenaffen sind demzufolge als rearrangierte Chromosomen beschrieben. Dies entspricht nicht dem evolutionären Verlauf der chromosomalen Veränderungen innerhalb der *Hominidae*.
Basis dieser Nomenklatur sind molekularzytogenetische Daten zu den homologen Bereichen der einzelnen Chromosomen. Es wurden Daten aus dieser Arbeit verwendet (siehe 3.2. und 3.3), wenn sie im Vergleich zu Literaturangaben noch nicht bzw. ungenau beschrieben wurden und Daten aus molekularzytogenetischen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Literaturangaben, Stand März 2004), wenn sie durch die mMCB und subCTM Daten (siehe 3.2) bestätigt wurden.

In der nachfolgenden Tabelle sind jedem homologen Chromosom der großen Menschenaffen die jeweiligen Beschreibungen der veränderten Chromosomen nach der ISCN 1995 und im Bezug auf die menschlichen Chromosomen wiedergegeben.

Mensch	Schimpanse	Gorilla	Orang-Utan
chr1	der(1)inv(1)(p11.2q21.2) del(1)(q11q21.1)	der(1)add(1)(pter) inv(1)(p11.2q21.2) del(1)(q11q21.1)add(1)(qter)	der(1)inv(1)(p11.2q21.2) del(1)(q11q21.1)
chr2	der(2)add(2)(q13) chrb(2)(q14.1)add(2)(q14.1) ins(2;?)(q21.2)	der(2)add(2)(p11.2) inv(2)(p11.2q13)chrb(2)(q14.1) add(2)(q14.1)ins(2;?)(q21.2)	der(2)add(2)(p11.1) inv(2)(p11.1q13) chrb(2)(q14.1) inv(2)(q14.1q21.2) add(2)(q21.2)ins(2;?)(q21.2)
chr3	chr3	der(3)add(3)(pter)add(3)(qter)	**PPY$_B$**: der(3)(q12.1-q12.3: :p12.2-p11.2::q11.2-p11.1: :q13.11-q22.3::p14.2-p12.3: :p26.3-p14.2::p14.3-p25.2: :q23-q29) **PPY$_S$**: der(3)(q12.1-q12.3: :p12.2::q22.3-q13.11: :p12.1-p11.2::q11.2-p11.1: :p14.1-p12.3::p26.3-p25.3: :p14.2-p25.2::q23-q29)

Fortsetzung Tabelle 3.4			
Mensch	**Schimpanse**	**Gorilla**	**Orang-Utan**
chr4	inv(4)(p13q21.3)	der(4)add(4)(pter) inv(4)(p12q21.1)add(4)(qter)	inv(4)(p12q13.3)
chr5	inv(5)(p15.1q15)	der(5)add(5)(pter) t(5;17)(q14.3;p13.3) inv(17)(p11.2p13.3)add(17)(pter)	chr5
chr6	add(6)(pter)	der(6)add(6)(pter)add(6)(qter)	chr6
chr7	der(7) add(7)(pter) ins(7;?)(q22.1)	der(7) add(7)(pter) inv(7)(q11.23q22.3)add(7)(qter)	inv(7)(p22.3q21.11)
chr8	add(8)(pter)	der(8) add(8)(pter) inv(8)(p21.1q22.3)add(8)(qter)	chr8
chr9	der(9)inv(9)(p11.2q22.1) inv(9)(p11.2q11) del(9)(q11q13)	der(9)inv(9)(p24.3q11) del(9)(q11q13)add(9)(qter)	der(9)inv(9)(p24.3q11) del(9)(q11q13)
chr10	add(10)(pter)	der(10)inv(10)(p11.23q22.3) add(10)(pter)	inv(10)(q11.21q22.3)
chr11	add(11)(pter)	der(11)add(11)(pter) add(11)(qter)	der(11)inv(11)(p15.5q13.3) ins(11;?)(p14.2-p14.3)
chr12	der(12)inv(12)(p12.1q14.3) add(12)(pter)	der(12)add(12)(pter) inv(12)(p12.1q14.1)add(12)(qter)	chr12
chr13	ins(13;?)(q14.3)	add(13)(qter)	chr13
chr14	chr14	der(14)add(14)(q21.1) inv(14)(p11.2q21.1)add(14)(qter)	chr14
chr15	der(15)add(15)(q13.1) inv(15)(p11.2q13.1)	chr15	chr15
chr16	der(16)add(16)(pter) ins(16;?)(p11.1) del(16)(q11q12.1) add(16)(qter)	der(16)add(16)(pter) inv(16)(p13.3p11.1) ins(16;?)(p11.1) del(16)(q11q12.1)add(16)(qter)	del(16)(q11q12.1)
chr17	der(17)add(17)(pter) inv(17)(p13.2q21.33) add(17)(qter)	der(17)add(17)(pter) t(5;17)(q14.3;p13.3) add(17)(qter)	der(17)del(17)(pter) inv(17)(p21.1q24.1)
chr18	der(18)add(18)(q11.1) inv(18)(p11.32q11.1)	der(18)add(18)(q11.1) inv(18)(p11.32q11.1) add(18)(qter)	der(18)add(18)(q11.1) inv(18)(p11.32q11.1)
chr19	der(19)add(19)(pter) add(19)(qter)	der(19)add(19)(pter) add(19)(qter)	chr19
chr20	der(20)add(20)(pter) add(20)(qter)	der(20)add(20)(pter) add(20)(qter)	der(9)inv(9)(pterq11.21) inv(9)(p13q11.21)
chr21	add(21)(qter)	add(21)(qter)	chr21
chr22	add(22)(qter)	add(22)(qter)	chr22
chrX	add(X)(qter)	der(X)add(X)(pter)add(X)(qter)	chrX
chrY	der(Y)(q11.21: :q11.23-q11.21: :q11.22-q11.32::q11.2: :q11.32)add(Y)(q11.21)	der(Y)(p11.32::q11.21: :p11.2::p11.1-q11.1::p11.2: :q11.21-q11.22::q11.21: :p11.2::p11.21::p11.23) add(Y)(p11.32)add(Y)(p11.32)	der(Y)(p11.32::q11.21::p11.2::q 11.21-p11.1::q11.21::q11.23) add(Y)(p11.23)

Tabelle 3.4: Beschreibung der *Hominidae* Chromosomen nach der ISCN 1995.

Zeichenerklärung:

add	zusätzliches Material unbekannter Herkunft, in der **Tab. 3.4** verwendet, um das zusätzliche terminale Heterochromatin, das beim Mensch nicht vorkommt zu beschreiben
chr	Chromosom
chrb	Chromosomenbruch
der	Derivativchromosom, rearrangiertes Chromosom mit 2 oder mehr Veränderungen
del	Deletion chromosomalen Materials
ins	Insertion Materials bekannter oder unbekannter Herkunft, in der Tab. 3.4 verwendet, um zusätzliches interstitielles Heterochromatin beim Schimpansen bzw. „Neue“ Zentromere zu beschreiben, die beim Mensch nicht vorkommen
inv	Inversion eines chromosomalen Bereiches um 180°
p	kurzer Chromosomenarm
pter	terminales Ende des kurzen Armes eines Chromosoms
q	langer Chromosomenarm

qter	terminales Ende des langen Armes eines Chromosoms
?	unklare Herkunft chromosomalen Materials
::	Bruch

Die graphische Darstellung erfolgte in Form von Ideogrammen im 850 Bandenstadium, wobei dem menschlichen Chromosom die homologen Chromosomen der großen Affen gegenüber gestellt sind. Veränderungen zum menschlichen Chromosom sind jeweils durch rote Bandenbezeichnung und Pfeile mit entsprechender Quelle gekennzeichnet. Dem zusätzlich bei Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan vorhandenen Heterochromatin wurden neue Chromosomenbandennummern nach folgendem Schema vergeben: *Hominidae*-Chromosom - angrenzende Bande - h z.B. GGO 1pterh. Diese neuen Bezeichnungen wurden ebenfalls rot hervorgehoben. Aus Platzgründen sind die Ideogramme sowie eine DIN A4 Arbeitsversion in einem niedrigeren Bandenstadium im Anhang zu finden.
Eine tabellarische Form aller bekannten Bruchpunkte des Schimpansen, Gorillas und Orang-Utans sind ebenfalls im Anhang zu finden. Zu jedem Bruchpunkt ist das zytogenetische Rearrangement sowie die Methode und die Referenz des Bruchpunktnachweises angegeben. Es ist zu beachten, dass jede Methode ein anderes Auflösungsvermögen und damit Genauigkeit für die exakte Bruchpunktlokalisation birgt. Bruchpunktüberspannende BACs haben eine Genauigkeit in Abhängigkeit ihrer Größe, also maximal +/- 200 kb. YACs haben eine Genauigkeit von maximal +/- 2000 kb. MCB und mMCB haben je nach Auflösung in der Bruchpunktregion eine Genauigkeit von maximal einer halben chromosomalen Bande. D.h., für die Angabe des Bruchpunktes als kb Abstand vom p-terminalen Ende des Chromosoms liegt eine relativ hohe Genauigkeit für BACs und eine sehr niedrige Genauigkeit (da nur interpoliert) für mMCB/MCB kartierte Bruchpunkte vor. Weiterhin sind die Gene im und +/- 100 kb vom Bruchpunkt angegeben sowie deren Protein und, wenn bekannt, dessen Funktion (NCBI Datenbank, Stand März 2004). Im letzten Tabellenabschnitt sind Besonderheiten der Bruchpunktregion vermerkt.

4 Diskussion

Die Diskussion ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil werden die zur Durchführung dieser Arbeit notwendigen methodischen Neu- und Weiterentwicklungen diskutiert. Anschließend werden die damit erzielten Ergebnisse bei den vergleichenden *Hominidae* Chromosomenuntersuchungen, die Kartierungsdaten sowie die auf DNA-Homologie basierende Nomenklatur der *Hominidae* Chromosomen diskutiert.

4.1 FISH-Bänderungstechniken

FISH-Bänderungstechniken erlauben eine DNA-Homologie vermittelte Analyse von Chromosomen und ganzer Genome mit einer maximalen Auflösung bis auf das Subbandenniveau und stellen damit eine Alternative zu konventionellen Bänderungsverfahren dar.

4.1.1 Vom MCB zum mMCB

Das in dieser Arbeit entwickelte und angewendete „multitude-Multicolor Banding“ (mMCB) Verfahren (siehe 3.1.1, Weise *et al*., 2003a) ist eine FISH-Bänderungstechnik, die aus dem herkömmlichen Chromosomen-spezifischen MCB entwickelt wurde.

Das **MCB** wurde erstmals von Chudoba und Mitarbeitern 1999 beschrieben und beruht auf Glasnadel-mikrosezierten Chromosomen-Region-spezifischen-DNA-banken, die über eine Reihe an DOP-PCRs amplifiziert und markiert werden. Ein chromosomenspezifischer MCB Sondensatz setzt sich dann aus verschiedenfarbig markierten MCB-Banken eines Chromosoms zusammen. Durch die überlappenden und glockenförmigen Fluoreszenzprofile entlang eines Chromosoms ist die ISIS Software von Metasystems in der Lage, Pseudofarben zu erzeugen (Liehr *et al*., 2002b). Die MCBs aller Chromosomen liegen mittlerweile am Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena vor. Bislang wurden jedoch nur maximal 2 MCBs gleichzeitig hybridisiert (Liehr und Claussen, 2002). Chromosomen-spezifische MCBs weisen folgende Besonderheiten auf: 1. Pseudofarben können reproduzierbar spezifischen GTG-Banden bzw. Subbanden zugeordnet werden (Chudoba *et al*., 1999; Weise *et al*., 2002; Liehr *et al*., 2002b). 2. Mit Hilfe der ISIS Software ist es möglich, die Pseudofarbenauflösung je nach Fragestellung für dieselbe Hybridisierung zu variieren (Liehr *et al*., 2002b). 3. Es kann eine Pseudofarbenauflösung für ein MCB von bis zu 800 Banden pro haploiden Chromosomensatz erzeugt werden (Liehr *et al*., 2002b). 4. MCB Einzelbanken können beliebig kombiniert werden (Liehr *et al*., 2002b).
Das **mMCB** nutzt vor allem die Besonderheit der freien Kombination von MCB-Banken aus, denn hier werden erstmals alle 138 verfügbaren MCB-Banken des gesamten Genoms zu einen Sondenansatz zusammengestellt (Weise *et al*., 2003a), so dass das mMCB eine Lücke bei der Suche nach kryptischen Rearrangements schließt (2 Leukämiefälle in Weise et al., 2003a). Die vollständige Beschreibung von Zelllinien-Karyotypen, wie für die Brustkrebs Zelllinie MCF-10A oder die Prostatakrebs Zelllinie LNCaP, war bereits nach je einer M-FISH und einer mMCB Hybridisierung möglich (siehe 3.1.1). Weiterhin wurde das mMCB als ZOO-FISH Sonde auf Gorilla Chromosomen hybridisiert und wies die gleichen chromosomalen Bruchpunkte nach, wie sie auch von Mrasek *et al*. 2001 unter Verwendung von 23 Einzel-MCBs beschrieben wurden (Ausnahme siehe 4.3.14). Das mMCB kann anhand der Fluoreszenzprofile oder der Pseudofarben ausgewertet werden und erreicht eine Auflösung von über 500 Banden pro haploiden Chromosomensatz, wobei die Pseudofarben sich oft zwischen verschiedenen Chromosomen wiederholen. Dies ist z. T. auf die ISIS Software zurückzuführen, da diese für einzelne Chromosomen konzipiert ist und bislang nicht auf das gesamtgenomische mMCB optimiert bzw. neu zugeschnitten wurde sowie auf die Redundanz der 5 verwendeten Fluorochrome und deren Kombinationsmöglichkeiten. Das mMCB ist eine Kosten- und Zeit-sparende FISH-Bänderungstechnik, da statt der Hybridisierung von 24 Einzel-MCBs nur noch eine mMCB Hybridisierung nötig ist, und durch

die Zusammenfassung von MCB Banken gleicher Markierung verringert sich der Aufwand einer Markierungs-PCR für einen mMCB-Mix auf den eines M-FISH Ansatzes. Das mMCB ist somit das Mittel der Wahl bei der Analyse komplexer Karyotypen und bei der Suche nach kryptischen Rearrangements (Weise *et al*., 2003).

Eine Weiterentwicklung des mMCB, um die Redundanz zu verringern, wäre z.B. eine Adaptierung des Sondensatzes auf ein 8-Filter-Fluoreszenzmikroskop (z. B: von Zeiss), die den Einsatz zweier zusätzlicher Fluorochrome erlaubt. Zum anderen ist es dringend notwendig, die ISIS Software den Ansprüchen des mMCB anzupassen, um die Vorteile der Pseudofarbenbänderung optimaler zu nutzen.

4.1.2 Das mMCB im Vergleich zu anderen FISH-Bänderungstechniken

Von komplexen chromosomalen Veränderungen wird gesprochen, wenn mehr als 3 Chromosomen involviert sind oder mehr als 2 Bruchpunkte in einem Chromosom vorliegen. Komplexe Veränderungen werden häufig in Tumorzellen (z. B. Kuechler *et al*., 2003; Schaeferhenrich *et al*., 2003) und selten als konstitutionelle Rearrangements (z.B. Weise *et al*., 2003c; Houge *et al*., 2003) beobachtet. Aber auch evolutionär rearrangierte Karyotypen können im Vergleich zum Menschen als komplex veränderte Genome betrachtet werden.
Solche komlexen Rearrangements können nicht allein durch konventionelle Zytogenetik und „multiplex-FISH“ (M-FISH; Speicher *et al*., 1996) bzw. „spectral karyotyping“ (SKY; Schröck *et al*., 1996) aufgelöst werden (siehe auch 3.1.1). Dies ist bedingt durch methodische Nachteile, so kann beim GTG nur zwischen schwarzen und weißen Banden unterscheiden werden und M-FISH bzw. SKY liefern keine Aussagen zu intrachromosomalen Veränderungen wie Duplikationen, Deletionen oder Inversionen. Daraus resultiert eine ungenaue bzw. unsichere Bruchpunktbestimmung nach GTG und/oder M-FISH.

Um diese Nachteile zu kompensieren, wurden in den letzten Jahren eine Reihe von FISH-Bänderungsverfahren entwickelt. Im Folgenden werden die wichtigsten Verfahren beschrieben, die auch zur Untersuchung von *Hominidae* Chromosomen eingesetzt wurden.
Eine Methode, die auf somatischen Zellhybriden von menschlichen mit Nagetierzellen basiert, ist der sogenannte „**somatic cell hybrid based chromosome bar code**“, der erstmals 1997 von Müller und Mitarbeitern beschrieben wurde. Mit dieser Technik kann nur eine lückenhafte chromosomale Abdeckung gewährleistet werden mit einer Auflösung von etwa 100 Banden pro haploiden Chromosomensatz.
RX-FISH ist ein „cross-species-color-banding“ (Müller *et al*., 1998), bei dem die im Vergleich zum Menschen stark durch Translokationen rearrangierten Chromosomen zweier Gibbonarten mit 3 Fluorochromen markiert und auf den Menschen hybridisiert werden. Durch diese Methode werden zwar alle Chromosomen gleichzeitig gefärbt, aber die Auflösung liegt nur bei 90-100 Banden pro haploiden Chromosomensatz.
Eine **Kombination des RX und der somatischen Zellhybridsondensätze** führte zu 160 unterscheidbaren molekularzytogenetischen Markern, die einer Auflösung von 400 Banden pro haploiden Chromosomensatz entsprechen (Müller *et al*., 2000). Dieser Sondensatz wurde 2001 von Müller und Wienberg zu vergleichenden Genomuntersuchungen bei den großen Affen angewendet. Neben vielen beschreibbaren Veränderungen konnte aber auch eine Reihe, vor allem kleinerer Rearrangements, nicht beschrieben werden. Zudem waren die Bruchpunktangaben sehr ungenau und neue Rearrangements wurden damit nicht beschrieben.
Das **MCB** wurde erstmals 2001 von Mrasek und Mitarbeitern für vergleichende Karyotypanalysen an Gorilla Chromosomen eingesetzt. Hierbei wurden in Kombination mit einer M-FISH Untersuchung 23 Einzel-MCB Hybridisierungen an einer weiblichen *Gorilla beringei beringei* Zelllinie analysiert. Mit Hilfe des MCB konnten Bruchpunkte genauer angegeben werden bzw. in Verbindung mit YACs und spezifischen Mikrosezierungssonden konnten 3 zuvor postulierte Inversionen widerlegt werden. Der erfolgreiche Einsatz des MCB für ZOO-FISH Analysen konnte auch bei der Untersuchung des Karyotyps von *Hylobates lar* gezeigt werden (Mrasek *et al*., 2003).

Trotz der hohen Auflösung der Pseudofarben konnte das MCB in seiner herkömmlichen Form nur maximal für 2 Chromosomen gleichzeitig eingesetzt werden, das bedeutet einen enormen Hybridisierungsaufwand für die Analyse eines gesamten Genoms. Dieser Nachteil konnte durch die Entwicklung des **mMCB** überwunden werden (Weise *et al*., 2003). Das mMCB verfügt also über alle Vorteile des MCB (siehe 4.1.1) und bietet eine Abdeckung des gesamten Genoms. Der erfolgreiche Einsatz des mMCB für ZOO-FISH Untersuchungen konnte anhand der Hybridisierung auf Gorilla Chromosomen gezeigt werden, wo das mMCB die gleichen Bruchpunkte nachwies, wie die 23 Einzel-MCB Untersuchungen zuvor (Ausnahme siehe 4.3.14).

Das mMCB bietet von allen derzeit verfügbaren FISH-Bänderungsverfahren, mit über 500 Banden pro haploiden Chromosomensatz, die höchste Auflösung und deckt zudem das gesamte Genom ab. Es ist somit die ideale Basis für die vergleichende Studie aller *Hominidae* Chromosomen im Hinblick auf die Genauigkeit von Bruchpunktangaben sowie für die Identifizierung neuer evolutionärer Rearrangements .

4.2 Das subCTM-FISH Verfahren

Neben den oben genannten komplexen Karyotypveränderungen gibt es Hinweise darauf, dass eine Reihe von sogenannten kryptischen Chromosomenaberrationen im Verlauf der Karyotypevolution stattgefunden haben (Fujiyama et al., 2002; Garagna et al. , 1997; de Pontbriand et al., 2002; Samonte und Eichler , 2002). Diese minimalen Veränderungen sind kaum bzw. gar nicht, mit der konventionellen Zytogenetik bzw. Molekularzytogenetik zu erkennen. Eine Subcharakterisierung solcher kleinen Genombereiche (5-200 kb) erlauben „Bacterial Artificial Chromosomes“ (BAC) (Shizuya *et al*., 1992).

Für die Analyse kleiner zentromernaher Rearrangements wurde kürzlich ein spezifisches Verfahren entwickelt: die Subzentromer-spezifische multicolor FISH (subcenM-FISH) Technik. Hierbei wurden die nach Datenbankangaben Zentromer-nächsten verfügbaren BAC-Sonden mit einer Zentromer- sowie je einer Sonde für den langen und kurzen Arm eines menschlichen Chromosoms in einem 5-Farben-FISH Ansatz zusammengestellt (Starke *et al*., 2003).
Speziell für ZOO-FISH-Analysen zur Untersuchung der o.g. chromosomalen Regionen wurden nun die genannten zentromernahen BAC-Sonden (Starke *et al*., 2003) mit spezifischen Sonden für die jeweiligen Subtelomerbereiche (Knight *et al*., 2000 bzw. kommerzielle Subtelomersonden, siehe 2.2.1) und einer humanen Ganzchromosomensonde kombiniert.

Der chromosomenspezifische subCTM Mix ist also eine zeitsparende Alternative zu je 43 Subzentromer- und Subtelomer-spezifischen Sonden in bis zu 86 FISH-Analysen, um diese Genombereiche umfassend zu untersuchen. Zudem liefert die Mix-Zusammenstellung zusätzliche Informationen über die relative Lage der einzelnen Subtelomer- und Subzentromersonden zueinander. Weitere Einsatzgebiete, neben ZOO-FISH Untersuchungen wären die Leukämiediagnostik sowie die klinische Genetik.

4.3 Die Chromosomen der *Hominidae* im Vergleich

Im Folgenden werden die Chromosomen der *Hominidae* entsprechend ihrer Homologie zum Menschen betrachtet und die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse aus der mMCB (siehe 3.2), subCTM (siehe 3.2) sowie BAC-Kartierung von Bruchpunkten (siehe 3.3) stammenden Daten mit den Literaturangaben diskutiert. Dabei ist zu Beachten, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten, jeweils nur an einem Individum einer Art bzw. Unterart durchgeführt wurden und deshalb konstitutionelle, individuelle chromosomale Rearrangements nicht ausgeschlossen werden können. Die Beschreibung der Bruchpunkte erfolgt nach der neuen Nomenklatur der *Hominidae* Chromosomen, die sich auf die Homologie zum menschlichen Chromosom bezieht (siehe 3.4).

Das terminale Heterochromatin bei Schimpansen- und Gorillachromosomen wird bei diesen Betrachtungen nicht erwähnt und ist Gegenstand der Diskussion in Abschnitt 4.5.

4.3.1 Chromosom 1

Das Chromosom 1 der Menschen weist im Vergleich zu den anderen ***Hominidae*** einen parazentrischen Heterochromatinblock auf. Weiterhin konnte durch das subCTM 1 eine kleine kryptische perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten in 1p11.1 und 1q21.1 beim Menschen im Vergleich zu den großen Affen nachgewiesen werden. Diese Inversion wurde zuvor nur von Maresco *et al*., 1996 beschrieben und konnte hier zum ersten Mal verifiziert werden. Die Besonderheiten dieser Inversionsregion werden in 4.4.2 ausführlicher diskutiert.
Eine parazentrische Inversion im Gorilla Chromosom mit den bekannten Bruchpunkten 1q32.3 und 1q42.13 konnte ebenfalls bestätigt werden (Yunis und Prakash, 1982; Clemente *et al*., 1990; Mrasek *et al*., 2001). Diese Inversion konnte durch den „bar-code“ Ansatz (Müller und Wienberg, 2001) nicht nachgewiesen werden.

Da das menschliche sowie das Gorilla Chromosom zusätzliche Rearrangements aufweisen, liegt beim Schimpansen und dem Orang-Utan die ursprünglichere Form des Chromosoms 1 vor. Diese Vermutung von Müller und Wienberg (2001) wurden durch die mMCB/subCTM Daten bestätigt.

4.3.2 Chromosom 2

Wie schon die klassisch zytogenetischen Untersuchungen von Yunis und Pakrash 1982 zeigten, entstand das menschliche Chromosom 2 aus einer zentrischen Fusion zweier Affenchromosomen. Dieser offensichtlichste Unterschied zwischen den Affen- und den Menschgenomen war Anlass zahlreicher Untersuchungen, da man hier zu allererst den Unterschied zwischen Mensch und Affen auf die Spur kommen wollte.

Das mMCB identifizierte den **Fusionsbruchpunkt** in der Bande 2q13 (siehe 3.2.1.2), der auch schon in früheren Untersuchungen nachgewiesen wurde (Wienberg *et al*., 1994; Haaf und Bray-Ward 1996; Kasai *et al*., 2000; Müller und Wienberg, 2001). Die genaueste Untersuchung zum Fusionsbruchpunkt lieferte die Arbeitsgruppe um Fan *et al*., 2002 mit der Beschreibung des bruchpunktüberspannenden BACs (RP11-395C14; Telomer 2p Abstand:114345-114520kb) sowie der Sequenzanalyse eines 600 kb Bereiches um den Fusionsbruchpunkt, der aus einem segmental duplizierten „Cluster“ besteht mit Homologien im ganzen Genom sowie degradierten Telomersequenzen. Die Vermutung, dass derselbe Bruchpunkt auch eine Rolle bei den konstitutionellen Inversionen des Menschen am Chromosom 2 eine Rolle spielt (Fan *et al*., 2002), konnte durch die Kartierung des Inversionsbruchpunktes in dieser Arbeit widerlegt werden. Demnach liegt der Fusionsbruchpunkt mindestens 1,5 Mb weiter distal vom Inversionsbruchpunkt in 2q (siehe 3.3.1.2.2).
Durch die Fusion beim menschlichen Chromosom 2 ist das **Zentromer** im 2q Homologen beim Menschen inaktiviert worden. Baldini *et al*. wies 1993 alphoide Sequenzen dieses inaktivierten Zentromers in 2q21 nach.
Daneben weist das 2p Homologe des **Gorillas** eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten 2p11.2 und 2q13 auf. Kartierungsuntersuchungen aus dieser Arbeit (siehe 3.3.1.2.1) weisen im p-Arm den BAC RP11-433C18 als bruchpunktüberspannend nach. Es handelt sich hierbei um den selben BAC, der den Bruchpunkt der „Normvarianten“-Inversion in 2p beim Menschen überspannt (siehe 3.3.1.2.2), wobei das Spaltmuster sich in der Intensität der Splitsignale bei Mensch und Gorilla unterscheidet und demnach in einer anderen Region des gleichen BACs lokalisiert ist. Der Bruchpunkt im q-Arm liegt in einer 2 Mb großen Region zwischen BAC 438K19 und dem Fusionsbruchpunkt (siehe 3.3.1.2.1). Die in dieser Arbeit gefundenen und durch BACs belegten Bruchpunktregionen stehen im Wiederspruch zu den Daten von de Pontbriand *et al*., 2002, der die Bruchpunkte mit der HAPPY-Methode (basierend auf „fragmented hybrids“) kartierte.

Die **Orang-Utans** weisen ebenfalls eine perizentrische Inversion im 2q homologen Chromosom auf, wobei der Bruchpunkt im q-Arm der gleiche wie im Gorillachromosom ist. Der Bruch im p-Arm liegt jedoch weiter distal in einem 0,5 Mb großen Bereich zwischen BAC RP11-575H3 und Zentromer (=2p11.1; siehe 3.3.1.2.1), so dass zu vermuten ist, dass der kurze Arm dieses Chromosoms nur aus heterochromatischen Anteilen besteht. Zusätzlich trägt der 2q homologe Arm noch eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten 2q21.2 (Zentromer bei den Affen) und 2q13 (Fusionsbruchpunkt), wodurch ebenfalls ein akrozentrisches Chromosom entsteht. Diese Bruchpunkte wurden bereits von Yunis und Pakrash 1982 beschrieben und konnten mit dem mMCB bestätigt werden.

Die ursprüngliche Form des Chromosoms 2 vermuten Müller und Wienberg (2001) beim Schimpansen oder beim Gorilla, dies konnte auch durch die o. g. Untersuchungen bestätigt werden.

4.3.3 Chromosom 3

Der Mensch und die afrikanischen großen Affen weisen keine zytogenetischen und molekularzytogenetischen (subCTM/mMCB; siehe 3.2.1.3) Unterschiede auf.
Die homologen Chromosomen der beiden **Orang-Utan** Unterarten zeigen jedoch jeweils verschiedene, komplexe Umbauten auf. Eine Untersuchung dieser komplexen Veränderungen mit „cross-species“ Proben (Auflösung um 15 Mb), die nicht das gesamte Chromosom abdecken, wurde von Müller *et al*. 2000 durchgeführt. Er postulierte den Borneo Orang-Utan als ursprüngliche Form, von dem sich das homologe Sumatra Orang-Utanchromosom durch eine perizentrische Inversion und das homologe Menschen-, Schimpansen- und Gorillachromosom durch 2 Inversionen ableitet, jeweils mit den Bruchpunkten: 3p26 und 3q12 sowie 3p24 und 3q23. Diese beiden Inversionen erklären aber weder das Ergebnis des subCTM, noch das des mMCB/MCB (siehe 3.2.1.3). Nach Auswertung eines Einzel-MCB 3 in Übereinstimmung mit dem subCTM kann die Art der Rearrangements bei den beiden Unterarten nicht beschrieben werden. Es handelt sich jedoch um mindestens 7 Bruchereignisse beim Borneo Orang-Utan und um mindestens 8 beim Sumatra Orang-Utan. Da sich durch die hohe Anzahl und Komplexität der Brüche eine logische Abfolge von Einzelrearrangements nicht mehr nachvollziehen lässt und diese dann innerhalb der Zeit der Abspaltung des Orang-Utan von der restlichen Linie der Menschenaffen und Umbauten im wesentlichen nur im Chromosom 3 stattgefunden haben müssten, liegt die Interpretation eines Ereignisses nahe, bei dem ein Chromosom 3 mehrfach gebrochen vorlag und „zufällig“ wieder zusammengebaut wurde. Dass solche komplexen *de novo* Bruchereignisse in einem Chromosom stattfinden können und trotzdem zu lebensfähigen Individuen führen, belegen immer wieder Fälle aus der zytogenetischen Diagnostik (Grasshoff *et al*., 2003; Weise *et al*., 2003c). Weitere Informationen auch zur Orientierung, besonders der kleinen Bruchstücke, würde z.B. eine engmaschige Untersuchung mit BACs vom Chromosom 3 bringen. Eine solche Analyse mit 100 BACs vom Chromosom 3 wurde aktuell von Tsend-Ayush *et al*. (2004) durchgeführt, sie vermuten die gleichen Inversions-Rearrangements wie Müller *et al*., 2000a und zusätzlich zwei weitere intrachromosomale Umbauten ohne die Veränderung der umgebenden Marker.

Diese Untersuchungen sowie die von Tsend-Ayush *et al*. (2004) an 5 Affenarten zeigten außerdem, dass weder der Borneo Orang-Utan noch die afrikanischen großen Affen die ursprüngliche Form des Chromosoms 3 tragen, wie von Müller und Wienberg (2001) ursprünglich angenommen.

4.3.4 Chromosom 4

Die homologen Chromosomen der großen Menschenaffen weisen im Vergleich zum Menschen alle eine perizentrische Inversion auf. Da die mMCB und subCTM Daten (siehe 3.2.1.4) z. T. von den Literaturangaben abwichen (Mrasek *et al*., 2001) bzw. mit unkartierten YACs gearbeitet wurde (Nickerson und Nelson., 1998; Marzella *et al*., 2000), erfolgte die Eingrenzung der Bruchpunkte mit BACs aus der Region (siehe 3.3.1.3).

Die Inversionsbruchpunkte des **Schimpansen** liegen nach Nickerson und Nelson (1998) in 4p13 (YAC 806B6) und in 4q21.3 (YAC 695H10). Die zytogenetischen Bruchpunkte konnten durch das mMCB bestätigt werden.
Die Bruchpunkte des **Gorillas** wurden 2000 von Marzella und Mitarbeitern mit unkartierten YACs bestimmt, deswegen lassen sich die Bruchpunkte nicht genau genetisch und zytogenetisch einordnen. Nach Analyse des mMCB und subCTM sowie der BACs aus der Region, liegen die Bruchpunkte in 4p12 in einem etwa 1 Mb Großen Abschnitt zw. BAC RP11-700D1 und dem Zentromer sowie in 4q13.3-21.1 distal von BAC RP11-498E11.
Die Inversion im **Orang-Utan** Chromosom erscheint als kleinste, mit einem etwas weiter proximaler gelegenen Bruchpunkt in 4q (Marzella *et al*., 2000). Dies konnte auch mit dem mMCB bestätigt werden. Die Untersuchung der BACs erbrachte trotzdem die gleichen Ergebnisse wie beim homologen Gorillachromosom, wobei es sich bei dem Bruchpunkt im p-Arm um den gleichen zu handeln scheint und im q-Arm verschieden ist, was jedoch durch BAC Untersuchungen distal von BAC RP11-498E11 noch belegt werden muss.

Da alle homologen Chromosomen sich zytogenetisch voneinander unterscheiden, lässt sich nicht nachvollziehen, welche Chromosomenform die ursprüngliche war.

4.3.5 Chromosom 5

Der **Orang-Utan** zeigt im Vergleich zu den anderen großen Affen keine Unterschiede im homologen Chromosom im Vergleich zum Menschen.
Der **Schimpanse** unterscheidet sich durch eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten nach mMCB in 5p15.1 und 5q15 (siehe 3.2.1.5). Da diese Bruchpunkte von den Literaturangaben abweichen (Yunis und Pakrash, 1982; Marzella *et al*., 1997) erfolgte die Bruchpunktkartierung mit BACs aus diesen Regionen. Dabei konnten die bruchpunktüberspannenden BACs identifiziert werden (siehe 3.3.1.4). Im p-Arm konnte die Region durch 3 überlappende und bruchpunktüberspannende Sonden auf eine etwa 40 kb große Region eingegrenzt werden. Der Bruchpunkt im q-Arm konnte durch den BAC RP11-526D16 identifiziert werden, der im Gegensatz zu den Literaturangaben in der Mitte der Band 5q15 kartiert ist.
Das homologe **Gorilla**chromosom ist in eine Translokation mit dem Chromosom 17 involviert. Der Bruchpunkt im Chromosom 5 wurde durch die Arbeitsgruppe um Stankiewicz 2001 in der Bande 5q14.3 mit dem bruchpunktüberspannenden BAC CTC-428H11 identifiziert.

Die homologen Chromosomen des Menschen und Orang-Utans sollten folglich als die ursprünglichen Formen betrachtet werden, aus denen sich die der Schimpansen und Gorillas ableiten (eigene Arbeiten sowie Müller und Wienberg, 2001).

4.3.6 Chromosom 6

Die mMCB/subCTM Daten (siehe 3.2.1.6) bestätigten die Literaturangaben (Yunis und Pakrash, 1982; Müller und Wienberg, 2001; Eder *et al*., 2003), wonach alle Homologen der ***Hominidae*** unverändert sind.

Es handelt sich also offensichtlich bei allen großen Affen und dem Menschen um die ursprüngliche Form des Chromosoms (Müller und Wienberg, 2001).

4.3.7 Chromosom 7

Das homologe Chromosom der **Schimpansen** unterscheidet sich auch im mMCB nur durch eine Hybridisierungslücke (siehe 3.2.1.7), die durch einen Block aus interstitiellen Heterochromatin erzeugt wird. In dieser Arbeit gelang es zum ersten Mal, die Integrationsstelle/Expansionsstelle dieses zusätzlichen Heterochromatins zu identifizieren (siehe 3.3.2.1.2), die durch den bruchpunktüberspannenden BAC RP11-1134K14 gekennzeichnet und im distalen Bereich der Bande 7q22.1 kartiert ist.

Das **Gorilla**chromosom unterscheidet sich durch eine parazentrische Inversion, deren bekannte Bruchpunkte in 7q11.23 und 7q22.3 (Mrasek *et al*., 2001) durch das mMCB bestätigt wurden (siehe 3.2.1.7).
Das homologe Chromosom des **Orang-Utans** unterscheidet sich vom Menschen durch eine perizentrische Inversion, wobei die bekannten Bruchpunkte in 7p22.3 und 7q21.11 (Yunis und Pakrash, 1982) mit dem mMCB/subCTM bestätigt werden konnten und mit BACs aus dem Telomerbereich gezeigt werden konnte, dass der Bruchpunkt hier mindestens 2,55 Mb vom Telomer entfernt liegt (siehe 3.2.1.7). Inwieweit es sich bei dem Bruchpunkt in 7q22.3 um den gleichen wie beim Gorilla handelt, müssen weitere BAC Untersuchungen klären.

Diese Untersuchungen sowie die von Richard *et al*., 2000 sowie von Müller und Wienberg, 2001 an verschiedenen Primaten gehen davon aus, dass die Chromosomenform des Orang-Utan die ursprüngliche ist, aus der sich die der anderen *Hominidae* ableiten.

4.3.8 Chromosom 8

Die homologen Chromosomen des **Schimpansen** und **Orang-Utans** unterscheiden sich nach mMCB/subCTM und Literaturangaben (Yunis und Pakrash, 1982) nicht voneinander.
Der **Gorilla** weist hingegen eine perizentrische Inversion auf, deren bekannte Bruchpunkte in 8p21.1 und 8q22.3 (Mrasek *et al*., 2001) durch das mMCB bestätigt werden konnte (siehe 3.2.1.8).

Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass alle *Hominidae*, bis auf den Gorilla, die ursprüngliche Form des Chromosoms tragen (eigene Daten sowie Müller und Wienberg, 2001).

4.3.9 Chromosom 9

Die Chromosomen aller Menschenaffen weisen kein parazentrisches Heterochromatin auf, wie es beim Menschen vorkommt (Bande 9q12).
Die homologen Chromosomen von **Gorilla** und **Orang-Utan** unterscheiden sich vom Menschen durch eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten in 9pter und 9q11 (siehe 3.2.1.9). Eine genauere Eingrenzung mit BACs zeigte, dass der Bruchpunkt im q-Arm zwischen dem proximalst gelegenen BAC RP11-262H14 und dem Zentromer liegen muss (siehe 3.3.2.5.1).
Das homologe **Schimpansen**chromosom zeigt im Vergleich zum Menschen eine große perizentrische Inversion auf, deren bekannter Bruchpunkt in 9q22.1 (YAC 945F5; Nickerson und Nelson, 1998; Montefalcone *et al*., 1999) mit dem mMCB bestätigt werden konnte (siehe 3.2.1.9). Der Bruchpunkt im p-Arm in der Bande 9p11.2 konnte auf die Region distal von BAC RP11-128P23 eingegrenzt werden (siehe 3.3.2.5.1). Zusätzlich ließ sich eine zweite kleinere und bislang unbeschriebene perizentrische Inversion mit dem subCTM 9 nachweisen. Die Bruchpunkte hierfür liegen in 9p11.2 und 9q11(siehe 3.2.1.9 und 3.3.1.5.1).

Die eigenen Daten, die Arbeiten von Tanabe (1999) sowie Müller und Wienberg, 2001 gehen davon aus, dass der Gorilla und der Orang-Utan die ursprüngliche Form des Chromosoms 9 aufweisen.

4.3.10 Chromosom 10

Das homologe Chromosom des **Schimpansen** unterscheidet sich nicht von dem des Menschen.
Der **Gorilla** zeigt hingegen eine perizentrische Inversion, deren bekannte Bruchpunkte in 10p11.23 und 10q22.3 (Mrasek *et al*., 2001) mit dem mMCB bestätigt werden konnten (siehe 3.2.1.10).
Die **Orang-Utans** unterscheiden sich wiederum vom Menschen und Schimpansen durch eine parazentrische Inversion mit den Bruchpunkten in 10q11.23 und 10q22.3 nach mMCB (siehe 3.2.1.10).

Nach Untersuchungen von Müller und Wienberg, 2001 wird angenommen, dass die Orang-Utans die ursprüngliche Form des Chromosoms 10 tragen, aus der sich die anderen *Hominidae* ableiten, was durch die mMCB/subCTM Daten gestützt werden kann.

4.3.11 Chromosom 11

Die mMCB/subCTM Untersuchungen bestätigten, dass der **Schimpanse** und der **Gorilla** gegenüber dem Menschen keine zytogenetischen Unterschiede aufweisen (siehe 3.2.1.11).
Das homologe Chromosom des **Orang-Utans** zeigt jedoch eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten in 11p15.5 und 12q12.2 nach mMCB (siehe 3.2.1.12). Zusätzlich konnte erstmals durch das mMCB und das subCTM gezeigt werden, dass beim Orang-Utan Homologen im Vergleich zu den anderen *Hominidae* eine Zentromerinaktivierung stattgefunden hat und das aktive Zentromer in der Bande 11p14.2 (Hybridisierungslücke und Einschnürung im mMCB) zu finden ist.

Die Annahme von Müller und Wienberg, 2001, dass der Orang-Utan die ursprüngliche Form des Chromosoms trägt, ist daher an weiter entfernt verwandten Primaten und deren Zentromerlage noch zu prüfen.

4.3.12 Chromosom 12

Das homologe Chromosom im **Orang-Utan** entspricht auch nach mMCB dem des Menschen (siehe 3.2.1.12).
Der **Schimpanse** unterscheidet sich davon durch eine perizentrische Inversion mit den bekannten Bruchpunkten in 12p11.23 und 12q14.3 (YAC 917c9 und 745a10; Nickerson und Nelson, 1998).
Das Homologe beim **Gorilla** zeigt fast die gleiche Inversion mit den Bruchpunkten in 12p11.23 und 12q14.2 (YAC 917c9 und proximal von YAC 745a10; Nickerson und Nelson, 1998).

Nach mMCB/subCTM und nach Müller und Wienberg, 2001 kann angenommen werden, dass der Mensch und der Orang-Utan noch die unveränderte Form des Chromosoms aufweisen.

4.3.13 Chromosom 13

Die homologen Chromosomen der ***Hominidae*** weisen, in Übereinstimmung mit den Literaturangaben, keine Unterschiede im mMCB auf (siehe 3.2.1.13).
Eine Inversion im **Gorilla** Homologen in 13q12 und q13 (Müller *et al*., 1997; Wienberg und Stanyon, 1997; Müller und Wienberg, 2001) konnte, ebenso wie bei Mrasek *et al*., 2001, nicht nachgewiesen werden.
Das **Schimpansen**chromosom weist zusätzlich wieder eine Hybridisierungslücke im mMCB in der Bande 13q14.13 auf, die wie auch beim Chromosom 7, interstitielles Heterochromatin nachweist (siehe 3.2.1.13). Die Integrationsstelle/Expansionsstelle wurde in dieser Arbeit mit dem bruchpunktüberspannenden BAC RP11-189B4 nachgewiesen (siehe 3.3.2.2.2).

Es liegt daher nahe anzunehmen, dass Mensch, Gorilla und Orang-Utan die ursprüngliche Form des Chromosoms aufweisen.

4.3.14 Chromosom 14

Die homologen Chromosomen des **Schimpansen** und des **Orang-Utans** zeigen im Vergleich zum Menschen keine zytogenetischen Unterschiede.
Das Chromosom des **Gorillas** weist jedoch eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten in 14p11.2 und 14q21.1 nach mMCB auf (siehe 3.2.1.14). Der Bruchpunkt im q-Arm weicht von dem publizierten in Mrasek *et al*., 2001 ab und wird auch durch die Arbeit von Yunis und Pakrash, 1982 bestätigt.

Die ursprüngliche Form des Chromosoms ist demnach in Übereinstimmung mit der Literatur bei Mensch, Schimpanse und Orang-Utan zu finden (Müller und Wienberg, 2001).

4.3.15 Chromosom 15

Das Chromosom 15 des **Gorillas** und des **Orang-Utans** zeigen im Vergleich zum Menschen keine Veränderungen (siehe 3.2.1.15).
Das homologe Chromosom des **Schimpansen** weist eine perizentrische Inversion mit den Bruchpunkten in 15p11.2 und 15q13.1 auf (siehe 3.2.1.15). Der bruchpunktüberspannende BAC wurde von Locke *et al*. (2003) identifiziert (RP11-422F16). Der Bruchpunkt im p-Arm konnte gegenüber den Literaturangaben (Locke *et al*., 2003) korrigiert werden, indem der Nachweis von Heterochromatin akrozentrischer Chromosomen (Midi54-Sonde des Menschen) in der Perizentromerregion des Schimpansenchromosoms gelang (siehe 3.2.1.15).

Da Müller und Wienberg (2001), die Inversion des Schimpansenchromosoms nicht erkannten, kann nun festgestellt werden, dass der Mensch, der Gorilla und der Orang-Utan die unveränderte Form des Chromosoms 15 tragen.

4.3.16 Chromosom 16

Die ursprünglich angenommenen perizentrischen Inversionen im **Gorilla** und **Schimpansen** im Vergleich zum Menschen (Yunis und Pakrash, 1982; Richard *et al*., 2000) konnten nicht bestätigt werden. Vielmehr fehlt den großen Menschenaffen das parazentrische Heterochromatin im q-Arm (Bande 16q11.2) und auch die Subzentromer BACs des subCTM konnten keine kryptische Veränderung nachweisen (siehe 3.2.1.16). Dies wurde auch mit anderen BACs von Misceo *et al*., 2003 nachgewiesen, so dass es sich beim parazentrischen Heterochromatin im p-Arm des Chromosoms bei Schimpanse und Gorilla um unabhängig entstandenes/expandiertes Heterochromatin handeln muss, wie auch die Mikrosezierungsuntersuchungen des Schimpansenheterochromatins zeigen (siehe 3.3.2.3).
Zusätzlich weist das homologe Chromosom des Gorillas eine parazentrische Inversion mit den bekannten Bruchpunkten in 16p13.3 und 16p11.2 auf (Mrasek *et al*., 2001), die jedoch bei Untersuchungen an diesem Chromosom von einigen Arbeitsgruppen nicht beschrieben wurde (Müller und Wienberg, 2001; Misceo *et al*., 2003).

Es ist daher wahrscheinlich, dass nur der Orang-Utan, der kein parazentrisches Heterochromatin aufweist, die ursprüngliche Chromosomenform trägt.

4.3.17 Chromosom 17

Das homologe Chromosom des **Schimpansen** unterscheidet sich vom Menschen durch eine perizentrische Inversion mit den bekannten Bruchpunkten in 17p13.2 und 17q21.33 (siehe 3.2.1.17). Die bruchpunktüberspannenden BACs RP1-179H24 und RP5-1029K10 wurden von Kehrer-Sawatzki *et al*., 2002 identifiziert.
Das homologe **Gorilla**chromosom ist in eine Translokation mit dem Chromosom 5 involviert. Der Bruchpunkt im Chromosom 17 wird durch den BAC RP11-640I15 in der Bande 17p11.2 charakterisiert, der ebenfalls an einer parazentrischen Inversion mit dem zweiten Bruchpunkt in 17p13.3 beteiligt ist und durch MCB (Mrasek *et al*., 2001) sowie dem mMCB nachweisbar ist (siehe 3.2.1.17).
Die **Orang-Utans** zeigen im Vergleich zum Menschen eine parazentrische Inversion mit den Bruchpunkten in 17q21.1 und 17q24.2 (siehe 3.2.1.17; Sineo *et al*., 2002). Der Bruchpunkt in 17p konnte mit BACs auf eine etwa 5 Mb große Region zwischen den BACs RP11-294G4 und RP11-749I16 eingegrenzt werden. Der Bruchpunkt im q-Arm wurde distal von BAC RP11-561K8 kartiert (siehe 3.3.1.6). Des Weiteren konnte eine Deletion des Subtelomers 17p nachgewiesen werden (siehe 3.2.1.17). Eine Untersuchung der umgebenden Region zeigte, dass nur die terminalen 60 kb des Chromosoms betroffen sind. Zusätzlich trat noch

ein Spaltsignal bzw. kreuzhybridisierendes Signal des Subzentromer BACs 17q in der Mitte des langen Arms auf (siehe 3.2.1.17). Hinweise auf ein Rearrangement in dieser Region gibt es bislang nicht, die ein solches Signal erklären.
Zudem gibt es bislang auch keine Hinweise, die das unterschiedlich kreuzhybridisierende Verhalten der Subtelomer 17p Sonde erklären würden (siehe 3.2.1.17). Da diese Regionen aber alle im Perizentromerbereich des Chromosoms liegen und diese für segmentale Duplikationen bekannt sind (Weise *et al*., 2003; Guy *et al*., 2003), liegt eine solche Interpretation der Kreuzhybridisierungen bei den großen Menschenaffen nahe.

Da sich alle Formen des Chromosoms17 bei den *Hominidae* stark unterscheiden, würde nur eine weitergehende Untersuchung der nächsten Verwandten eine mögliche Aussage zur ursprünglichen Form des Chromosoms liefern.

4.3.18 Chromosom 18

Die homologen Chromosomen des **Schimpansen**, **Gorilla** und **Orang-Utans** unterscheiden sich in einer gemeinsamen perizentrischen Inversion vom Menschen. Die bekannten Inversionsbruchpunkte in 18pter (zwischen USP14 und Telomer) und 18q11.1 (zwischen ROCK1 und Zentromer) (Dennehey *et al*., 2004) konnten zytogenetisch durch das mMCB bestätigt werden (siehe 3.2.1.18). Die Mikrosezierungssonde des kurzen Armes des Schimpansenchromosoms 18 zeigte weiterhin, dass der Bruchpunkt im kurzen Arm des akrozentrischen Affenchromosoms liegen muss, da beim Menschen ein deutliches Signal im Zentromerbereich erzeugt wird (siehe 3.3.2.4). Deswegen ist im Umkehrschluss festzustellen, dass dem Menschen in der Nomenklatur des Chromosoms 18 eine Bande „fehlt“, die der des heterochromatischen p-Arms der Affen entspricht (siehe 4.8.1).

Nach diesen Daten und nach Müller und Wienberg (2001) handelt es sich bei der Chromosomenform der großen Affen um die ursprüngliche, aus der sich das menschliche Chromosom ableitet.

4.3.19 Chromosom 19

Wie auch durch die Literatur belegt (Yunis und Pakrash, 1982; Richard *et al*., 2000; Müller *et al*., 2001) konnten auch mit dem mMCB und dem subCTM keine Veränderungen der **großen Menschenaffen** im Vergleich zum Menschen gefunden werden.

Es liegt daher nahe, die Chromosomenform aller *Hominidae* als ursprünglich anzunehmen (eigene Daten sowie Müller und Wienberg, 2001).

4.3.20 Chromosom 20

Die homologen Chromosomen der **Schimpansen** und **Gorillas** zeigen im Vergleich zum Menschen keine Veränderungen (siehe 3.2.1.20).
Jedoch konnte mit dem mMCB und dem subCTM erstmals eine komplexe Veränderung am homologen Chromosom der **Orang-Utans** nachgewiesen werden (siehe 3.2.1.20). Nach Abklärung mit 10 BACs aus fast allen Bereichen des Chromosoms (siehe 3.23.1.7) konnte eine doppelte Inversion mit folgenden Bruchpunkten beschrieben werden: eine erste Inversion in 2pter (distal von Subtelomer 20p) und 2q11.21 (zwischen BAC RP11-310O13 und RP11-243J16) sowie eine zweite kleinere Inversion in 20p13 (zwischen Subtelomer 20p und BAC RP11-318P23). Diese Inversionen führen letztendlich zu einer so minimalen zytogenetischen Veränderung gegenüber den anderen homologen Chromosomen, dass diese wahrscheinlich deswegen bislang noch nicht beschrieben wurde.
Eine parazentrische Inversion im Schimpansenchromosom, wie sie nur von Müller und Wienberg, 2001 postuliert wird, konnte nicht bestätigt werden.

Die unveränderten Chromosomen von Mensch, Schimpanse und Gorilla repräsentieren demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit die ursprüngliche Form des Chromosoms, aus der sich das Chromosom des Orang-Utans ableitet.

4.3.21 Chromosom 21

Wie Literaturangaben belegen (Yunis und Pakrash, 1982; Müller *et al*., 2001), konnten auch mit dem mMCB und dem subCTM keine Veränderungen der **großen Menschenaffen** im Vergleich zum Menschen gefunden werden.

Es liegt daher nahe, die Chromosomenform aller *Hominidae* als ursprünglich anzunehmen (eigene Daten sowie Müller und Wienberg, 2001).

4.3.22 Chromosom 22

Bei den homologen Chromosomen 22 konnten ebenfalls mit dem mMCB und dem subCTM keine Veränderungen der **großen Menschenaffen** im Vergleich zum Menschen gefunden werden (Yunis und Pakrash, 1982; Müller *et al*., 2001).

Es liegt daher nahe, die Chromosomenform aller *Hominidae* als ursprünglich anzunehmen (Müller und Wienberg, 2001).

4.3.23 X Chromosom

Auch bei den Homologen des X Chromosoms konnten mit dem mMCB und dem subCTM keine Veränderungen bei den **großen Menschenaffen** im Vergleich zum Menschen gefunden werden (siehe 3.2.1.23; Yunis und Pakrash, 1982; Müller *et al*., 2001).

Es liegt daher nahe, die Chromosomenform aller *Hominidae* als ursprünglich anzunehmen (eigene Daten sowie Müller und Wienberg, 2001).

4.3.24 Y Chromosom

Da nicht von allen *Hominidae* männliche Zielllinien zur Verfügung standen, wurde auf eine vergleichende mMCB und subCTM Untersuchung des Y Chromosoms verzichtet. Die Literatur weist eine Reihe an Einzelsondenuntersuchungen am Y Chromosom auf (z. B. Schempp *et al*., 1995; Glaser *et al*., 1997; Samonte *et al*., 1998; Wimmer *et al*., 2002). Eine etwas umfassendere Analyse zur Evolution des Y Chromosoms wurde 1998 von Archidiacono *et al*. vorgestellt, die auch als Vorlage für die graphische Darstellung der neuen ***Hominidae*** Nomenklatur genutzt wurde (siehe Anhang).

Da sich die Y-Chromosomen wegen der eingeschränkten Rekombinationsmöglichkeiten bei den *Hominidae* der maßen unterscheiden, lässt sich eine Ursprungsform nicht mehr nachvollziehen.

4.3.25 Zusammenfassung der chromosomalen Rearrangements der großen Menschenaffen

Die chromosomalen Rearrangements der Menschenaffen in dieser Arbeit beziehen sich immer auf den menschlichen Karyotyp und werden als solche auch beschrieben. Dies entspricht nicht der phylogenetischen Entwicklung. Diese wird gesondert in 4.3.26 betrachtet. Die nachfolgende Tabelle gibt die Anzahl an Rearrangements bei den großen Affen wieder. Dies beinhaltet sowohl die aus der Literatur bekannten als auch die in dieser Arbeit neu beschriebenen Veränderungen (siehe 4.3.1-4.3.24; sowie Bruchpunkttabellen im Anhang). Das terminale Heterochromatin der Schimpansen- und Gorillachromosomen wird nicht berücksichtigt.

Zytogenet. Rearrangement	**Schimpanse** absolut/relativ	**Gorilla** absolut/relativ	**Orang-Utan** absolut/relativ
Perizentrische Inversion	9/52,8%	9/45%	10/50%
Parazentrische Inversion	-	4/20%	2/10%
Fusion	1/5,9%	1/5%	1/5%
Translokation	-	1/5%	
Zentromer „repositioning“	1/5,9%	1/5%	2/10%
Komplexe Veränderungen	-	-	1/5%
Interstitielles Heterochromatin	2/11,8%	-	-
Deletion	-	-	1/5%
Verlust/ Zugewinn von parazentrischen Heterochromatin	4/23,6%	4/20%	3/15%
Gesamt	17/100%	20/100%	20/100%

Tabelle 4.3.25a: Überblick über die Art und die jeweilige Häufigkeit von chromosomalen Rearrangements bei Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan.

Einige dieser Veränderungen konnten erst mit dem hochauflösenden mMCB oder dem subCTM Mix entdeckt werden bzw. erlaubte das mMCB eine genauere Kartierung chromosomaler Bruchpunkte. Des Weiteren gelang es mit Hilfe von BACs, Bruchpunkte einzugrenzen und zu identifizieren.
Eine Zusammenstellung der neuen und zusätzlichen Informationen zu evolutionären Bruchpunkten, die mit dieser Arbeit gewonnen werden konnten, ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Angegeben ist jeweils die zytogenetische Lage des Bruchpunktes. Die genauen Informationen zu den einzelnen Bruchpunkten sind dem Ergebnisteil bzw. den Bruchpunkttabellen im Anhang zu entnehmen.

Bruchpunkte	**Schimpanse**	**Gorilla**	**Orang-Utan**
durch mMCB/subCTM neu entdeckt	9q11 9p11.2		11p14.2 11p11.11-q11 17pter 20pter 20p13 20q11.21 20q11.21
durch mMCB/subCTM verfeinert	1p11.2 1q21.2 15p11.2	1p11.2 1q21.2 14q21.1	1p11.2 1q21.2 7p22.3 7q21.11 10q11.21 10q22.3 11p15.5 11q12.2 17q24.2
durch BACs eingegrenzt	9p11.2	4p12 4q13.3-21.1 9pter 9 q13	2p11.2 4p12 4q13.3 9qpter 9q13 17q21.1
durch BACs identifiziert	5p15.1 5q15 7q22.1 13q14.13	2p11.2	
Anzahl neuer Bruchpunktinfos/ Anzahl Bruchpunkte insgesamt (%)	10/22 (=45,5%)	8/30 (=26,7%)	22/28 (=78,6%) ohne Chromosom 3

Tabelle 4.3.25b: Zusammenfassung aller neu gewonnen Informationen zu Bruchpunkten der großen Affen aus dieser Arbeit.

Es lässt sich also feststellen, dass allein durch die gewonnenen Daten aus dieser Arbeit zu etwa der Hälfte aller Bruchpunkte der großen Affen neue Informationen gewonnen werden

konnten. Allein durch die Anwendung der neuen mMCB und subCTM Methoden wurden 2/3 dieser Daten gewonnen. Der größte Informationszuwachs konnte damit bei den Orang-Utan Karyotypen erreicht werden, da hier bislang zum größten Teil nur die GTG Ergebnisse von Yunis und Pakrash, 1982 bekannt waren. Beim Gorilla konnte mit dem mMCB nur ein Bruchpunkt gegenüber dem MCB Ergebnissen von Mrasek *et al*., 2001 verfeinert werden. Dies liegt daran, dass das mMCB auf der Basis des MCB arbeitet (siehe 4.1.1) und somit keine neuen Ergebnisse beim Gorilla damit zu erwarten sind. Trotz der extensiven zytogenetischen/molekularzytogenetischen und molekularen Untersuchungen des Schimpansengenoms, vor allen in den letzten 10 Jahren, konnte mit dem empfindlichen subCTM eine unbekannte zweite Inversion im Chromosom 9 nachgewiesen und 3 Bruchpunktangaben verfeinert werden.

4.3.26 Zusammenfassende Darstellung der Phylogenie der *Hominidae* Chromosomen

Die folgende Darstellung spiegelt die vermuteten phylogenetischen Zusammenhänge zwischen den einzelnen *Hominidae* Chromosomen wieder. Die Darstellung ist in Anlehnung an Yunis und Pakrash (1982), mit den Rückschlüssen aus der Diskussion (4.3.1-4.3.23), die auf Daten dieser Arbeit und Literaturangaben beruhen, verändert.
Unsicherheiten bei der Zuordnung der ursprünglichen Form eines gemeinsamen Vorfahren der *Hominidae* eines jeden Chromosoms bestehen vor allem bei folgenden Chromosomen: Chromosom 2 (siehe 4.3.2), Chromosom 3 (siehe 4.3.3), Chromosom 4 (siehe 4.3.4), Chromosom 11 (siehe 4.3.11), Chromosom 17 (siehe 4.3.17) und dem Y Chromosom (siehe 4.3.24), das bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt wurde. Hier müssen zukünftige Untersuchungen an weiter entfernt verwandten Primaten sowie detailierte molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt werden. Es ist aber auch vorstellbar, dass für einige dieser Chromosomen, wie z.B. das Chromosom 4, das bei jedem der *Hominidae* anders rearrangiert ist, nie eine Aussage zur ursprünglichen Form des Chromosoms gelingt. Auch hier wurde das zusätzliche terminale Heterochromatin der Schimpansen und Gorillas nicht mit betrachtet.

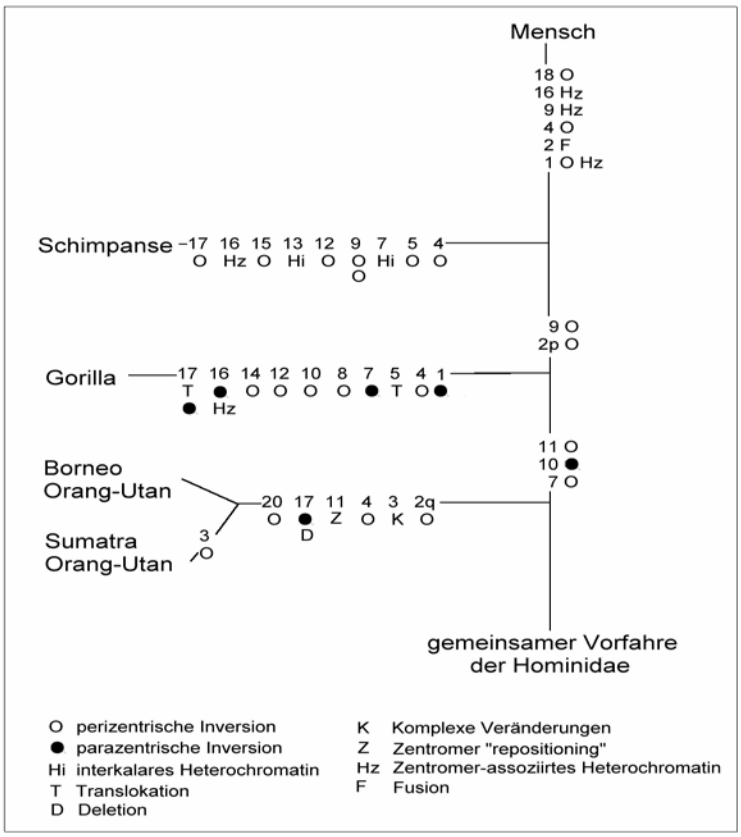


Abbildung 4.3.26: Einordnung der chromosomalen Rearrangements in die Phylogenie der *Hominidae*. Den veränderten Chromosomen ist jeweils die Art des Rearrangements zugeordnet, wobei eine zeitliche Abfolge der Rearrangements nicht wiedergegeben werden kann.

Wie die **Abbildung 4.3.26** zeigt, weist der Orang-Utan die wenigsten Rearrangements gegenüber dem vermuteten gemeinsamen Vorfahren der *Hominidae* auf. Jedoch lassen sich bei den Orang-Utans auch chromosomale Unterschiede zwischen den zwei Unterarten nachweisen. Dies konnte z.B. für die Unterarten des Schimpansen *Pan troglotydes versus, Pan troglotydes troglotydes* und *Pan paniscus* nach mMCB (siehe 3.2.2) nicht nachgewiesen werden, obwohl man annimmt, dass der Bonobo (*Pan paniscus*) schon seit über 2,5 Millionen Jahren von den anderen Schimpansen getrennt vorkommt (Chen *et al*., 2001).

4.4 Molekulare Charakteristika von perizentrischen Inversionen

Von einer Inversion spricht man, wenn ein chromosomales Fragment in entgegengesetzter Richtung vorliegt. Die Voraussetzung sind zwei Brüche und ein entgegengesetzter Einbau. Inversionen haben normalerweise keine phänotypischen Auswirkungen auf den Träger. In Abhängigkeit, ob das Zentromer mit betroffen ist, werden die Inversionen in parazentrische (Bruchpunkte in einem Chromosomenarm) und in perizentrische (Bruchpunkte in je einem Chromosomenarm) klassifiziert (Kaiser, 1984).
Inversionen des Menschen, wie sie in 4.4.1 diskutiert werden, liegen im Gegensatz zu den evolutionären Inversionen (siehe 4.4.2) meist heterozygot vor, so dass zwar keine Effekte bei der Mitose, aber in Abhängigkeit von der Größe der Inversion Probleme in der meiotischen Chromosomenpaarung (Inversionsschleifenbildung) auftreten können.

4.4.1 „Normvarianten"-Inversionen des Menschen

Im menschlichen Karyotyp beobachtet man sehr oft (~ 0,6%) perizentrische Inversionen an bestimmten Chromosomen nicht verwandter Personen, ohne dass scheinbar ein phänotypischer Effekt beim Träger der Inversion auftritt (Kaiser, 1984). Solche Inversionen treten besonders häufig in den Chromosomen 9 und 2 auf, wobei der zytogenetische Bruchpunkt immer gleich erscheint (Djalali *et al*., 1986). Eine molekularzytogenetische bzw. molekulargenetische Analyse der Bruchpunkte wurde bislang noch nicht durchgeführt, da eine solche Inversion medizinisch nicht indiziert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Bruchpunkt der „Normvarianten"-Inversion im kurzen Arm des **Chromosoms 2** mit dem bruchpunktüberspannenden BAC RP11-433C18 identifiziert. Der Bruchpunkt im langen Arm ließ sich nicht eindeutig identifizieren, da er in einer ca. 1 Mb großen Region liegt, die mit der Bruchpunktregion im kurzen Arm kreuzhybridisiert (siehe 3.3.1.2.2). Es ist zu vermuten, dass die ca. 1 Mb große Region, die proximal des BACs RP11-433C18 liegt und bislang noch nicht sequenziert bzw. mit BACs abgedeckt ist, die entsprechend homologe Zielsequenz der kreuzhybridisierenden BACs aus dem q-Arm ist. Solche Duplikationen von Sequenzen aus dem Genom sind häufig in der Umgebung des Zentromers zu finden. Sie enthalten oft Pseudogene oder auch repetetive und transposable Elemente (Jackson *et al*., 1999; Horvath *et al*., 2000; Horvath *et al*., 2001; Bailey *et al*., 2001; Weise *et al*., in press). Die Regionen der Bruchpunkte sind nach Datenbankanalysen ausgesprochen genarm (siehe **Abb. 3.3.1.2.2b und c**), dennoch scheint nicht der relativ hohe Repeatanteil der Sequenzen für die Homologien allein verantwortlich zu sein, wie die BLAST Analysen der „Repeat"-bereinigten Sequenz zeigten (siehe 3.3.1.2.2). Die Bruchpunktregionen wurden zusätzlich an 9 weiteren Probanden mit der gleichen zytogenetischen Veränderung untersucht, wobei immer das gleiche Verhalten der BACs beobachtet werden konnte.

Der gleiche Versuch, die Bruchpunkte der „Normvarianten" Inversion am **Chromosom 9** zu kartieren, gelang nicht. Wie bereits aus der Literatur bekannt, zeigen sich die Regionen, in denen die zytogenetischen Bruchpunkte liegen durch besonders starke gegenseitige Kreuzhybridisierungen aus (Samonte *et al*., 1996; Park *et al*., 1998; Starke *et al*., 2002). Da diese kreuzhybridisierenden Signale genauso stark wie das eigentliche Signal sind, ist eine eindeutige Aussage zu den BACs, ob diese außerhalb oder innerhalb der Inversion liegen oder diese überspannen, nicht möglich (siehe 3.3.1.5.2). Bei diesen Untersuchungen konnten erstmals die Ausmaße dieser extensiven kreuzhybridisierenden Bereiche, wie sie

sonst im Genom nicht vorkommen, mit BACs kartiert werden. Im p-Arm reicht diese Region über 5,2 Mb von BAC RP11-402N8 bis zum Zentromer. Sie ist sehr repeatreich und hat nach Homologievergleichen viele weitere homologe Bereiche im Genom. Wie auch bei den Bruchpunkten im Chromosom 2 handelt es sich um eine relativ genarme Region. Bei den Genen handelt es sich fast ausschließlich um so genannte LOC Gene, die Ähnlichkeiten zu bekannten Genen haben, also Hinweise auf Pseudogene liefern, oder die nur als Modell bekannt sind. Die gleiche Zusammensetzung aus LOC Genen und repetetiven Elementen lässt sich in der ca. 5,4 Mb großen Region zwischen den BACs RP11-262H14 und RP11-88I18 nachweisen.

Für die vier beschriebenen Charakteristika der Inversionsbruchpunktregionen lässt sich zusammenfassend feststellen, dass es sich um zentromernahe, genarme, Repeat- und Pseudogen-reiche Bruchpunktregionen mit ausgesprochen starker Sequenzhomologie (Kreuzhybridisierung) im entsprechend gegenüberliegenden Bruchpunkt handelt. Die gleiche Charakteristik für eine perizentrische Inversion im Chromosom 8, die vor allen bei Lateinamerikanern beobachtet wird, wurde von Graw *et al*., 2000 beschrieben.

Ein **Modell**, das die Häufigkeit vor allem der „Normvarianten"-Inversion 9 und 2 erklären könnte, wäre ein durch die starke Sequenzhomologie in den Bruchpunkten, vermitteltes „nonallelic crossing-over", d.h. eine intramolekulare Rekombination in einem Chromosom. Eine ähnliche Hypothese wurde von Shaffer und Lupski, 2000 generell für chromosomale Rearrangements wie folgt aufgestellt: 1) Auslöser ist ein DNA-Doppelstrangbruch, der zu 2) rekombinativen Wechselwirkungen zwischen Sequenzen führt und 3) der nach Auflösung neue rekombinante Produkte bildet. Die nichtallelischen rekombinativen Prozesse werden durch „Low-copy-repeats" (LCR) oder AT-reiche Palindrome vermittelt. LCRs bestehen im Wesentlichen aus fast identischen (>97% Homologie) Sequenzen, Genfragmenten und Pseudogenen mit einer Größe von 10-400 kb. Inwieweit sich der Begriff der LCRs auf die extrem großen Homologiebereiche (1 Mb bzw. 5,2 und 5,4 Mb) der „Normvarianten"-Inversionen ausdehnen lässt oder hier ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt, muss noch geklärt werden.
Ein zweites Modell, das bislang zur Erklärung für die Entstehung von Inversionen herangezogen wurde, ist ein Zweibruchereignis mit invertiertem Wiedereinbau, wobei von einer erhöhten Bruchanfälligkeit in den Inversionsbruchpunktregionen ausgegangen wird (Kaiser, 1984; Gardner und Sutherland, 2003).

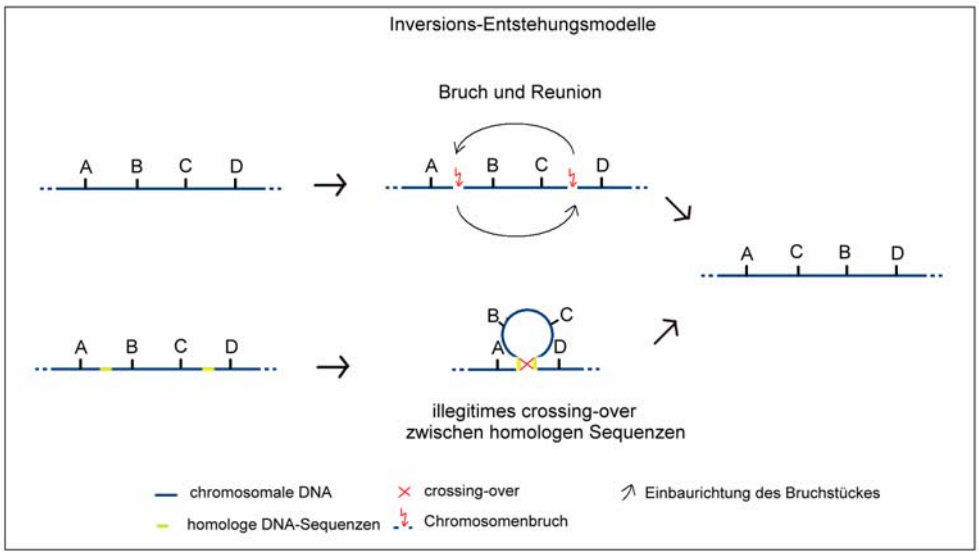


Abbildung 4.4.1: Schematische Darstellung der beiden Modelle zur Inversionsentstehung.

Neben diesen ausgedehnten Sequenzhomologien, wie sie bei den Bruchpunkten der Inversion 2 und 9 vorkommen, gibt es aber auch Hinweise aus der Drosophilagenetik, dass selbst einzelne Transposons über illegitimes „crossing-over" chromosomale Inversionen

vermitteln (Casals *et al*., 2003). Inwieweit dies eine Rolle im menschlichen Genom spielt oder diese Form nur ein weiterer Mechanismus ist, bleibt noch offen.

4.4.2 Evolutionär fixierte Inversionen des Schimpansen

Perizentrische Inversionen sind die häufigsten euchromatischen Rearrangements, in denen sich die *Hominidae* Karyotypen unterscheiden (siehe 4.3.25). Solche evolutionär manifestierten Inversionen findet man zwischen dem menschlichen Chromosomen 1, 4, 5, 9, 12, 15, 17, 18 und den homologen Schimpansenchromosomen. Einige dieser Inversionen wurden bereits molekularzytogenetisch untersucht und die entsprechenden Bruchpunktregionen kartiert (Miro´ *et al*., 1992; Nickerson und Nelson, 1998; Montefalcone *et al*., 1999; Marzella *et al*., 2000; Kehrer-Sawatzki *et al*., 2002; Locke *et al*., 2003; Dennehey *et al*., 2004). Eine weitreichende Sequenzanalyse dieser Regionen ist aber erst durch den Zugang zu öffentlichen Datenbanken möglich geworden (Frazer *et al*., 2003; Wheeler *et al*., 2004).

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die Bruchpunktregionen der kryptischen Inversion am **Chromosom 1** analysiert (siehe 3.3.1.1). Zur Untersuchung wurde der BAC RP11-35B4 genutzt, der 143.754 bp groß ist und aus der Region 1q21 stammt. Die Sequenzierung dieses BACs ist noch nicht abgeschlossen. Eine vorläufige Version aus 15 ungeordneten Teilbereichen steht in der NCBI-Datenbank zur Verfügung. Nach Sequenz- und Homologieanalysen liegen 44 Kopien von Teilbereichen der BAC Sequenz in der Region 1q21 vor (462,9 kb mit 75%-98% Homologie), die zu einem starken FISH Signal an dieser Stelle des Chromosoms führen. In 1p36.1 befinden sich 7 Kopien von Teilbereichen der BAC-Sequenz mit 82%-92% Homologie (57,1 kb), die ein schwächeres FISH Signal an dieser Stelle erzeugen. Zusätzlich sind 3 Kopien mit 84%-90% Homologie (26 kb) in der Region 1p12 zu finden, die ein schwaches FISH Signal erzeugen (siehe Tabelle 4 im Anhang). Die zusätzlichen Signale, die mit den mikrosezierten MCB-Banken MCB 1/2 und MCB 1/4 in 1q12 und 1p12 oder 1p36.1 erzeugt wurden, bestätigen im Wesentlichen die BAC Ergebnisse. Ähnliche zentromernahe „hemichromatische“ Elemente (Barber *et al*., 1999) wurden auch für die Perizentromerregion des Chromosoms 9 beschrieben (Starke *et al*., 2002). Die **Tabelle 8.4** im Anhang gibt ebenfalls die Gene der insgesamt 53 homologen Regionen auf dem Chromosom 1 wider. Es handelt sich dabei hauptsächlich um LOC Gene mit Ähnlichkeiten zu bekannten Genen (siehe auch 4.4.1) bzw. um bereits nachgewiesene Pseudogene (z.B. RNU1P6= RNA; U1 small nuclear pseudogene). Der BAC in Kombination mit den MCB Sonden wurde an insgesamt 9 Primaten untersucht und zeigte dabei eine sehr dynamische Entwicklung während der Evolution. Aus den Ergebnissen der Hybridisierungen (siehe 3.3.1.1) lassen sich folgende Veränderungen während der Primatenevolution ableiten (**Abbildung 4.4.2**). Die Sequenz ist demnach in Deletionen, Amplifikationen und Inversionen verwickelt, die offenbar nur die BAC Sequenz und nicht die umgebende DNA betreffen, wie z.B. MCB und weitere BAC Untersuchungen des zusätzlichen Signals in 1p34 bei den Orang-Utans und Gibbons zeigten (Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang ist bislang noch unklar, ob das zusätzliche Signal in 1p34 bei den Orang-Utans und Gibbons die ursprüngliche Variante ist (siehe **Abbildung 4.4.2**) oder bei den beiden Arten neu und unabhängig entstanden ist.
Die Inversion, die den Menschen von den großen Affen (außer dem Sumatra Orang-Utan) unterscheidet, konnte nach den Ergebnissen in **Tabelle 8.4** (Anhang) zwischen dem NT 004754 und NT 032962 (119538kb und 148790kb) eingegrenzt werden (Weise *et al*., 2004).

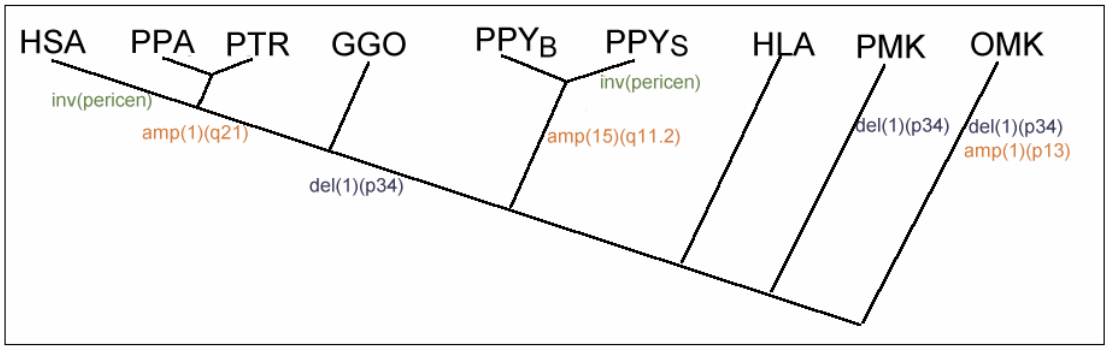


Abbildung 4.4.2: Schematische Darstellung der Veränderungen des BACs RP11-35B4 während der Primatenevolution. Betrachtet werden: *Homo sapiens sapiens* = **HSA**, *Pan troglotydes troglotydes* = **PTR**, *Pan paniscus* = **PPA**, *Gorilla beringei beringei* = **GGO$_B$**, *Pongo pygmaeus pygmaeus* = **PPY$_B$**, *Pongo pygmaeus abelii* = **PPY$_S$**, *Hylobates lar* = **HLA**, *Macaca mulatta* = **PMK**, *Aotes spec.* = **OMK**

Der Entstehungsmechanismus dieser Inversion scheint offensichtlich ein anderer zu sein als der bei den „Normvaianten"-Inversionen, da hier ursprünglich (bei den Affen) eine Homologie zwischen der Region 1p12 und 1q21 nicht bestand. Eine besondere Rolle spielt aber scheinbar die mehrfach duplizierte Sequenz an sich, da sie wiederholt, unabhängig von ihrer Umgebung, „anfällig" für Bruch-vermittelte Ereignisse wie Deletionen, Amplifikationen und Inversionen an nicht homologen Regionen des Chromosoms 1 beteiligt war.

Weiterhin wurden erstmals die Inversionsbruchpunkte am **Chromosom 5** kartiert und analysiert. Im p-Arm konnten 3 bruchpunktüberspannende sowie gegenseitig überlappende BACs identifiziert werden (RP11-42C9, RP11-962L3, RP11-35A11, siehe 3.3.1.4). Die BACs liegen in einer 2,3 Mb großen Region, in der keinerlei Gene bekannt sind und die sich durch einen sehr hohen Repeatanteil (56,53%) auszeichnet. Die BACs wurden gleichzeitig auf dem Menschenchromosomen getestet, um etwaige Kreuzhybridisierungen auszuschließen.
Im langen Arm konnte der BAC RP11-526D16 als bruchpunktüberspannend identifiziert werden. Die Sequenz besteht derzeit nur aus 14 ungeordneten Teilen. In der genarmen Bruchpunktregion sind nur 2 Gene bekannt, wobei nur von einem die Funktion bekannt ist (CAST=Calpastatin, spielt eine Rolle beim Pathogenesemechanismus von rheumatischen Erkrankungen). Der Repeatanteil (48,19%) ist etwas niedriger als im gegenüberliegenden Bruchpunkt. Eine Homologiesuche im Genom wies eine Reihe weiterer homologer Regionen auf, die nicht allein durch den hohen Repeatanteil hervorgerufen werden. Dies deutet auf das Vorhandensein von segmentalen Duplikationen in den Bruchpunktregionen hin.
Eine Homologie-vermittelte Inversion, wie bei den „Normvarianten", lässt sich auch für die Bruchpunkte im Chromosom 5 nicht nachweisen. Als einzige gemeinsame Charakteristik lassen sich nur eine besondere Genarmut in den Bruchpunktregionen sowie ein erhöhter Repeatanteil feststellen, so dass das unter 4.4.1 beschriebene Bruch-Reunions Modell am wahrscheinlichsten zutrifft.

Die Sequenzuntersuchungen von Locke *et al.*, 2003 zum Inversionsbruchpunkt 15q13.1 ergaben, dass der Bruchpunkt in einer Region mit ausgedehnten segmentalen Duplikationen liegt, so dass, wie auch bei der Kartierung der Inversionsbruchpunkte im Chromosom 1, nur die Bruchpunktregion (600 kb) eingegrenzt werden konnte. Auch hier sind wiederum nur LOC Gene bekannt, die auf Pseudogene hinweisen.
Eine Analyse der Inversionsbruchpunkte im Chromosom 12 von Nickerson *et al.*, 1999, zeigte ebenfalls segmentale Duplikationen in repaetreichen (47%) Regionen.
Die Untersuchung der Bruchpunkte in Chromosom 17 durch Kehrer-Sawatzki *et al.*, 2002 wies ebenfalls erhöhte Repeatanteile in einer genarmen Region nach, die aber keine segmentalen Duplikationen aufweisen, also ähnlich der Beobachtungen, die in dieser Arbeit für die Bruchpunkte in Chromosom 5 gemacht wurden.
Dennehey *et al.*, 2004 zeigte für die Inversionsbruchpunkte im Chromosom 18, dass es sich um genarme Regionen mit segmentalen Duplikationen handelt.

Die evolutionären Inversionsbruchpunkte des Schimpansen zeichnen sich fast alle durch hohe Repeatanteile, segmentale Duplikationen und Genarmut aus, wobei ausgedehnte Homologieregionen mit kreuzhybridisierenden BACs, wie bei den „Normvarianten"-Inversionen, bislang noch nicht beschrieben wurden. Dies spricht insgesamt für einen Bruch-Reunions Ursprung der Inversionen, wobei die segmentalen Duplikationen bzw. der hohe Repeatanteil zu erhöhten Bruchraten beitragen könnten (Pujana *et al*., 2001; Stankiewicz *et al*., 2002).

4.5 Formen des Heterochromatins beim Schimpansen

Die augenfälligsten chromosomalen Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies der *Hominidae* sind Variationen in der Verteilung des konstitutiven Heterochromatins. Konstitutives Heterochromatin ist weitgehend identisch mit polymorphen Bereichen eines Karyotypes, welches definitionsgemäß praktisch frei von Strukturgenen ist (Zernahle, 1983). *Homo sapiens* spezifische polymorphe Bereiche sind z.B. das parazentrische Heterochromatin in 1q12, 9q12 und 16q11.2, welches man bei den anderen *Hominidae* nicht findet. Andererseits liegen in fast der Hälfte aller Schimpansen Chromosomen (*Pan spec*.) und in fast allen Gorilla Chromosomenarmen (*Gorilla spec*.) terminale Heterochromatinbanden vor, die beim Menschen und Orang-Utan (*Pongo pygmaeus supspec.*) fehlen (Yunis und Prakash, 1982). Die unterschiedliche Heterochromatinverteilung wird im Zusammenhang mit der Artbildung als Fertilitätsbarriere diskutiert (Rieseberg und Livingstone, 2003; Oritz-Barrientos *et al*., 2002; Chung, 2001). Bislang gibt es lediglich rein zytogenetische (z.B. de Grouchy, 1987; Haaf und Schmid, 1987; Pellicciari *et al*., 1988) oder kleinere Studien (Marks, 1993; Royle *et al*., 1994; Garcia *et al*., 1999; Hirai, 2001; Mrasek *et al*., 2003) zum Heterochromatin der *Hominidae*.

Das **terminale Heterochromatin** wurde in dieser Arbeit über eine Mikrosezierungssonde untersucht, die Material vom kurzen Arm des Chromosoms 18 vom Schimpansen enthält, der bei den großen Affen der kurze Arm eines akrozentrischen Chromosoms ist (siehe 3.3.2.4). Nach „reverse painting" auf den Schimpansen wurden das terminale sowie das interstitielle Heterochromatin angefärbt. Beim Menschen färbten sich alle kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen, das Heterochromatin in Chromosom 1 sowie der Zentromerbereich von Chromosom 18. Beim Gorilla erzeugt die Sonde hauptsächlich nur Signale auf den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosmen 18, 21 und 22.
Folgende Schlüsse lassen sich aus diesen Beobachtungen ziehen:

- 1) Die heterochromatischen Sequenzen des Schimpansen, vor allem die des terminalen und interstitiellen Heterochromatins, sind sehr ähnlich, was auf einen gemeinsamen Ursprung sowie auf ein Ereignis hinweist, bei dem es zu einer solchen massiven Expansion des Heterochromatins gekommen ist.
- 2) Die Anfärbung der akrozentrischen p-Arme bei Mensch und Gorilla deuten auf einen gemeinsamen Ursprung dieser Sequenzen bzw. einen Austauschmechanismus (Satellitenassoziation) hin, der zu der relativen Uniformität der Sequenzen beiträgt (Schweizer und Loidl, 1987; Garcia *et al*., 2003).
- 3) Die Färbung des Zentromerbereiches beim Menschen belegt, dass bei der evolutionären Inversion vom akrozentrischen Chromosom 18 der Affen zum submetazentrischen Chromosom des Menschen Teile dieses Heterochromatins mit invertiert wurden und der Bruchpunkt folglich in diesem Heterochromatin lokalisiert ist. Diese Beobachtung korrigiert den von Dennehey *et al*., 2004 postulierten Bruchpunkt und erweitert ihn auf den heterochromatischen p-Arm des akrozentrischen Affenchromosoms.
- 4) Die Tatsache, dass das terminale Heterochromatin der Gorillas ungefärbt blieb, deutet auf eine unabhängige Entstehung des terminalen Heterochromatins bei Gorilla. Dies steht im Widerspruch zu der bisherigen Annahme einer gemeinsamen Entstehung bei Gorilla und Schimpanse (Marks, 1993).

Das **parazentrische Heterochromatin** von Chromosom 16 des Schimpansen wurde ebenfalls über eine entsprechende Mikrosezierungssonde untersucht (siehe 3.3.2.3). Diese

färbte beim Schimpansen zusätzlich das terminale sowie das interstitielle Heterochromatin der Schimpansenchromosomen an, was die Schlussfolgerung 1 bestätigt. Der Mensch zeigt nur Signale in verschiedenen Zentromerregionen, und beim Gorilla färben sich neben dem terminalen Heterochromatin weitere Zentromerbereiche.
Es lassen sich weiterhin folgende Schlüsse ziehen.

- 5) Das parazentrische Heterochromatin im Chromosom 16 bei Mensch, Schimpanse und Gorilla zeigt keine Ähnlichkeiten, was auf eine jeweilige eigene Entstehung zurückzuführen ist. Dies steht im Widerspruch zu Literaturangaben, da bislang davon ausgegangen wurde, das es sich um gleiches heterochromatisches Material handelt, dass bei Gorilla und Schimpanse im Vergleich zum Menschen nur invertiert vorliegt (siehe 4.3.16; Yunis und Pakrash, 1982; Marks, 1993; Richard *et al*., 2000).
- 6) Da ebenfalls die heterochromatischen Sonden des Menschen für Chromosom 1, 9 und 16 nicht bei den anderen *Hominidae* hybridisierten (siehe 3.2.1, 3.2.9, 3.2.16), zeichnet sich der Trend ab, dass sich dieses parazentrische Heterochromatin unabhängig und zu verschiedenen Zeitpunkten entwickelt hat, wobei sich das terminale Heterochromatin von Schimpanse und Gorilla jeweils sehr homogen anfärbt, was auf eine jeweils gemeinsame/gleichzeitige Entstehung hindeutet. Dies konnte auch bei Untersuchungen von Garcia *et al*., 1999 und Garcia *et al*., 2003 festgestellt werden.
- 7) Die Beobachtung, dass mit der PTR Midi16 Sonde das terminale Heterochromatin beim Gorilla angefärbt wird, deutet darauf hin, dass die Sequenzen des terminalen Heterochromatins beim Gorilla aus mindestens 2 „Untergruppen“ bestehen, da sie mit der terminalen Sonde PTR Midi18 nicht angefärbt wurden (siehe Schlussfolgerung 4).

Die Mikrosezierungssonden des **interstitiellen Heterochromatins** auf Chromosom 7 (siehe 3.3.2.1.1) und 13 (siehe 3.3.2.2.1) erzeugten jeweils die gleichen Ergebnisse. Beim Schimpansen färbte sich neben dem interstitiellen auch das terminale Heterochromatin an. Bei Gorilla und Mensch wurden nur die euchromatischen Bereiche um die Mikrosezierungsstellen (methodisch bedingt) angefärbt.
Eine Kartierung der Integrations-/Expansionspunkte des interstitiellen Heterochromatins beim Schimpansen erfolgte erstmals durch diese Arbeit. Dabei konnte der BAC RP11-1134K14 in der Bande 7q22.1-22.2 als bruchpunktüberspannend nachgewiesen werden (siehe 3.3.2.1.2). Durch überlappende BACs konnte der Bruchpunkt auf eine 50 kb große Region eingegrenzt werden. In dieser genarmen Region ist lediglich ein Genmodell bekannt. Eine Sequenz für diese Region steht noch nicht zur Verfügung. Der Bruchpunkt in 13q14.1 konnte mit dem BAC RP11-189B4 nachgewiesen werden (siehe 3.3.2.2.2). Es handelt sich um eine repeatreiche und genarme Region. Zudem zeigten Homologieuntersuchungen, dass eine Reihe homologer Sequenzen über das gesamte Genom vorkommen, die nicht allein auf die Repeats in der Sequenz zurückzuführen sind. Diese Beobachtung deutet auf das Vorhandensein von segmentalen Duplikationen hin, die ebenfalls eine Rolle bei den evolutionär fixierten Inversionsbruchpunkten spielen (siehe 4.4.2).

Ein Zusammenhang zwischen Telomersequenzen und konstitutivem Heterochromatin konnte 2001 Hirai nachweisen, der über eine PRINS (primed *in situ*) Reaktion Telomersequenzen auch in C-positiven Banden nachwies. Ähnliche Studien wurden hier nicht durchgeführt.

4.6 Zusammenhang zwischen Tumorbruchpunkten, „fragile sites“ und evolutionären Bruchpunkten

Eine Verbindung zwischen Neoplasie-assoziierten chromosomalen Bruchpunkten mit sogenannten „fragile sites“, die gehäuft bei Tumorpatienten zu beobachten sind, und evolutionär fixierten Chromosomenbruchpunkten wird schon seit langem in der Literatur diskutiert. Einen Überblick liefert die **Tabelle 8.5** im Anhang. Einen schlüssigen DNA-Sequenz-basierenden Beweis sowie die zugrundeliegenden Mechanismen wurden bisher noch nicht aufgeklärt.

Detaillierte zytogenetische Bruchpunktinformationen für eine Vielzahl von neoplastischen Erkrankungen wurden seit Einführung der Bänderungszytogenetik vor ~30 Jahren gesammelt. Internetressourcen wie die Mitelman Datenbank (Mitelman, 2000) geben einen Überblick über mehrere tausend Karyotypveränderungen bei Neoplasien. Diese chromosomalen Veränderungen spielen eine Rolle in der Etiopathogenese von Neoplasien, indem sie die Funktion von Onkogenen, Tumorsupressorgenen oder solchen Genen, die in die Zellzyklus Regulation involviert sind, beeinflussen (Nowell und Croce, 1988; Gumus *et al*., 2002). Beispielsweise kann eine Onkogen Aktivierung über eine reziproke Translokation ein Stimulus für die neoplastische Transformation und Onkogenese sein. So spielt z.B. das ABL Gen in 9q34 durch eine reziproke Translokation t(9;22)(q34;q11) („Philadelphia Chromosom“) eine entscheidende Rolle bei der akuten myeloischen Leukämie und der chronischen myeloischen Leukämie (Aplan , 1999). Bei soliden Tumoren sind chromosomale Bruchpunkte insgesamt weniger untersucht als bei Leukämien und Lymphomen; aber auch hier gibt es Beispiele für Tumor-typische Rearrangements, z.B. ist als eine häufige Chromosomenmutation bei Patientinnen mit Brustkrebs eine reziproke Translokation zwischen einem Chromosom 1 und 16 (t(1;16)(q10;p10)) zu beobachten (Pandis *et al*., 1995). Die meisten dieser Neoplasie-assoziierten Bruchpunkte sind bislang, wohl auch wegen ihrer großen Anzahl, nur zytogenetisch kartiert. Es ist aber zu erwarten, dass, wie in den oben beschriebenen Beispielen, die Identifizierung der Bruchpunktregionen der Schlüssel für den Pathogenesemechanismus der Tumorentstehung zu sehen ist.

„Fragile sites“ sind spezifische chromosomale Regionen, die eine erhöhte Neigung zur spontanen und/oder induzierbaren Bildung von Brüchen zeigen. Die „fragile sites“ stellen sich als Lücken („gaps“) oder Brüche in Chromosomen innerhalb zytogenetischer Präparate dar. Dieses Phänomen kann durch spezifische Kulturbedingungen und Zugabe bestimmter Chemikalien verstärkt werden und tritt gehäuft innerhalb der Karyotypen von Tumorpatienten auf (Sutherland, 1979; Hellman *et al*., 2000; Gumus *et al*., 2002). Die „fragile sites“ werden in seltene („rare“) und häufige („common“) klassifiziert, abhängig von der Frequenz, mit der sie innerhalb einer Population auftreten und der Art, wie sie induzierbar sind (Sutherland, 1986). Seltene „fragile sites“ sind in weniger als 5% der menschlichen Population zu beobachten (ca. 30 im menschlichen Genom) und segregieren in einzelnen Familien. Im Gegensatz dazu werden häufige „fragile sites“ (ca. 90 im menschlichen Genom) als Teil der normalen Chromosomenstruktur betrachtet, die in allen Individuen auftreten. „Fragile sites“ sind involviert in chromosomalen Rearrangements (Hellman *et al*., 2000), Genamplifikationen (Coquelle *et al*., 1997), Schwesterchromatid Austausche (Glover *et al*., 1998) und Integration von Fremd-DNA ins menschliche Genom (Popescu *et al*., 1990; Wilke *et al*., 1996; Mishmar *et al*., 1998). Eine entsprechende genetische Instabilität kann zur Manifestation von Krankheiten, wie z. B. dem Jacobsen Syndrom führen. Hierbei ist eine Repeatexpansion in der „fragile site“ FRA11B ursächlich für die Erkrankung (Jones *et al*., 1995; Gecz *et al*., 1996). Ebenso können solche genetischen Instabilitäten zur Onkogenese beitragen (Yunis und Soreng, 1984; Miró *et al*., 1987; Sankoff *et al*., 2002). Trotz ihres Auftretens in nur einem Teil der Population sind einige der „fragile sites“ konserviert in der Evolution der Hominoidae (Schmid *et al*., 1985; Djalali *et al*., 1987; Smeets und Klundert, 1990; Glover *et al*., 1998; Pevzner und Tesler, 2003). Interessanterweise sind sie ebenfalls fast immer in der gleichen zytogenetischen Region wie evolutionär fixierte Bruchpunkte kartiert (Dutrillaux, 1979; Yunis und Prakash, 1982; Miró *et al*., 1987; Nickerson und Nelson, 1998). Nur ein kleiner Teil der häufigen „fragile sites“ wurde bislang molekulargenetisch charakterisiert (Wilke *et al*., 1994; Huang *et al*., 1998; Mishmar *et al*., 1998).

„Fragile sites“ und chromosomale Rearrangements spielen nicht nur in der Tumorgenese eine große Rolle, sondern auch bei der Artbildung. Bekanntermaßen ist dies auch so innerhalb der phylogenetischen Diversifizierung der *Hominidae*. Offensichtlich sind einige (ca. 30) der evolutionär fixierten Bruchpunkte in den gleichen zytogenetischen Regionen zu finden wie „fragile sites“ (Dutrillaux, 1979; Yunis und Prakash, 1982; Miró *et al*., 1987; Smeets und Klundert, 1990; Pevzner und Tesler, 2003) oder/und typische chromosomale Bruchpunkte von Tumoren (Miró *et al*., 1987; Mitelman *et al*., 1997 und 2000; Gumus *et al*., 2002; Sankoff *et al*., 2002). Aufgrund dieser Daten wurde von o.g. Autoren geschlossen,

dass die Analyse von „fragile sites“ und evolutionären Bruchpunkten als *in situ* Modell für die Tumorgenese nutzbar sind und der gleiche bzw. ähnliche Mechanismus zugrunde liegt.

4.7 Chromosomenevolution und Artbildung

Die häufigsten chromosomalen Unterschiede zwischen den großen Affen und dem Menschen sind neben den perizentrischen Inversionen (siehe 4.4.2 und 4.5), Variationen in der Verteilung des konstituiven Heterochromatins.
Die unterschiedliche Heterochromatinverteilung zwischen den Arten wird oft im Zusammenhang mit der Artbildung als Fertilitätsbarriere diskutiert (Rieseberg und Livingstone, 2003; Oritz-Barrientos *et al*., 2002; Chung, 2001), ebenso können evolutionär manifestierte Inversionen Fertilitätsbarrieren zwischen Arten darstellen (Dutrillaux *et al*., 1986; Noor *et al*., 2001).

Ein Phänomen, das mit chromosomalen Rearrangements und Artbildung zusammenhängt, konnte 2003 durch Rieseberg und Livingston geklärt werden. Sie beobachteten, dass Proteine und Sequenzen auf rearrangierten Chromosomen gegenüber kolinearen Chromosomen sich schneller verändert haben, da diese Bereiche vor „crossing-over“ geschützt sind (Hale, 1986; Rieseberg *et al*., 2001; Hey, 2003). Sie entwickelten daraus ein neues Modell der chromosomalen Artbildung. Demnach treten chromosomale Veränderungen als zufällige Mutationen auf, die die Rekombination und damit den Genfluß in dieser Region unterbinden. Dies führt zu einer Ansammlung von Mutationen in den rearrangierten Bereichen, während der Genfluß in allen kolinearen Chromosomen durch eine fortbestehende Kreuzungsgemeinschaft erhalten bleibt. Erst wenn sich hinreichend Mutationen angesammelt haben, kommt es dann zu einer sexuellen Inkompatibilität, die zu zwei getrennten Arten führt. Eine solche mögliche Konstellation stellen die beiden rezenten Unterarten der Orang-Utans dar, die sich auf chromosomaler Ebene im Chromosom 3 unterscheiden (siehe 4.3.3) und trotzdem fertile Nachkommen zeugen können.
Demnach wirken die chromosomalen Rearrangements, wie die häufigen perizentrischen Inversionen, als Beschleuniger der Artbildung, aber nicht als deren Auslöser.

Die Ansammlung von chromosomalen Veränderungen über die Zeit scheinen nicht kontinuierlich abzulaufen. So gibt es immer wieder Zeiten, in denen solche Rearrangements sich besonders schnell ausgebreitet haben, gefolgt von Zeiten mit einer relativen Konstanz (sprunghafte Evolution). Dies würde z.B. erklären, warum die Unterarten der Schimpansen offenbar molekularzytogenetisch unverändert sind, obwohl die Abspaltung des Bonobos schon vor 2,5 Millionen Jahren stattgefunden hat. Dies bedeutet wiederum, dass sich die gesamten Karyotypunterschiede zwischen Mensch und Schimpanse (17 und terminales Heterochromatin, siehe 4.3.25) in maximal 2,9 Millionen Jahren angesammelt haben (siehe 1.4). Eine Rolle bei der Durchsetzung von chromosomalen Veränderungen in einer Population spielt in diesem Zusammenhang natürlich auch deren Größe („genetic bottleneck“) (Lynch und Conery, 2003).

Wie sich der initiale Prozess abgespielt hat, bei dem z.B. in der Population des gemeinsamen Vorfahrens eine heterozygot auftretende Inversion zu einer homozygoten Form wurde, die an alle Nachkommen vererbt wird, scheint bislang noch ungeklärt.

4.8 Nomenklatur von Chromosomen

4.8.1 Probleme und Grenzen der ISCN 1995

Die Nomenklatur der menschlichen Chromosomen ist im **„International System for Human Cytogenetic Nomenclature“** (= ISCN, 1995; Mitelman, 1995) festgelegt.

Im Wesentlichen sind die Chromosomen nach ihrer Größe geordnet. Ausnahmen bilden die Sonderstellung der Gonosomen, die beim Menschen mit X und Y bezeichnet werden und das Chromosom 21, das eigentlich das kleinste ist aber nicht als letztes zugeordnet wird. Als

chromosomale Banden wird die Abfolge heller und dunkler Bereiche auf den Chromosomen bezeichnet, die nach GTG-Färbung sichtbar werden. Als Sub-Bande beschreibt man die Aufspaltung von Banden in einem höheren Bandenstadium (ISCN, 1995).

Die aktuell gültige Nomenklatur entstand auf der Grundlage von Konferenzen seit 1960 (Denver 1960, London 1963, Chicago 1966, Paris 1971, Paris 1975, Stockholm 1977, Paris 1980, Memphis 1994), bei denen sich Zytogenetiker trafen, um den jeweiligen Wissenszuwachs in die Nomenklatur der Chromosomen aufzunehmen (ISCN, 1995). Der rasche Informationszuwachs, vor allem aus der molekularen Zytogenetik in den letzten 9 Jahren, fand aber bislang noch keinen Zugang in eine aktualisierte ISCN.
So gibt es z.B. Widersprüche in den Subbandennummerierungen mit aktuellen Ergebnissen aus der Forschung. Die Subbandennummerierungen wurden, trotz Unsicherheiten und Kontroversen bei der Konferenz zur ISCN 1985, mehr oder weniger willkürlich vergeben (ISCN, 1995). Mittlerweile gibt es aber Methoden, mit denen es möglich ist nachzuweisen, aus welcher Bande Subbanden entstehen. Eine dieser Methoden ist das sogenannte „chromosome stretching“, bei dem an Studien des Chromosoms 5, 6 und X auf „mechanischem“ Weg belegt werden konnte, dass Subbanden immer nur aus GTG positiven Banden entstehen (Claussen *et al*., 1994; Hliscs *et al*., 1997a, Kuechler *et al*., 2002). Ein zweiter auf DNA-Homologie basierender Nachweis dieser Beobachtungen gelang uns mit dem Einsatz des MCBs auf verschieden lang kondensierten Chromosomen (Daten nicht gezeigt). Dabei konnten die Aussagen der „chromosome stretching“-Untersuchungen bestätigt werden (Lehrer *et al*., 2004). Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zur ISCN, 1995, die für die meisten Subbanden eine Entstehung aus GTG-negativen Banden annimmt.

Des Weiteren wurden Bruchpunktinformationen aus Untersuchungen der *Hominidae* Karyotypen noch nicht berücksichtigt. So konnte bei der Untersuchung an einem Gorillachromosom, das dem menschlichen Chromosom 18 entspricht und bei den großen Affen als akrozentrisches Chromosom vorliegt, nachgewiesen werden, dass bei der evolutionär fixierten Inversion heterochromatisches Material invertiert wurde (Mrasek *et al*., 2001). Dies konnte auch unabhängig durch die Midi PTR 18 Hybridisierung auf den Menschen nachgewiesen werden (siehe 4.3.18). Diese Bande existiert in der aktuellen ISCN nicht.

4.8.2 Nomenklatur der *Hominidae*-Chromosomen

Da eine Nomenklatur auf Banden und Subbandenniveau nur für den Menschen existiert, kommt es bei der Beschreibung von Chromosomen anderer Arten immer wieder zu Problemen. Zudem wurde die Chromosomennummerierung meist nach der Chromosomengröße durchgeführt, und diese ist in den meisten Fällen mit den homologen Chromosomen des Menschen nicht identisch (siehe **Tabelle 8.6** im Anhang und **Abbildung 4.8.2**). So kann es z.B. zu uneindeutigen Beschreibungen kommen oder der Schreiber wird „gezwungen“ einen einfachen Zusammenhang, mit einer Reihe von umständlichen Erklärungen, in mehreren Nebensätzen wiederzugeben.

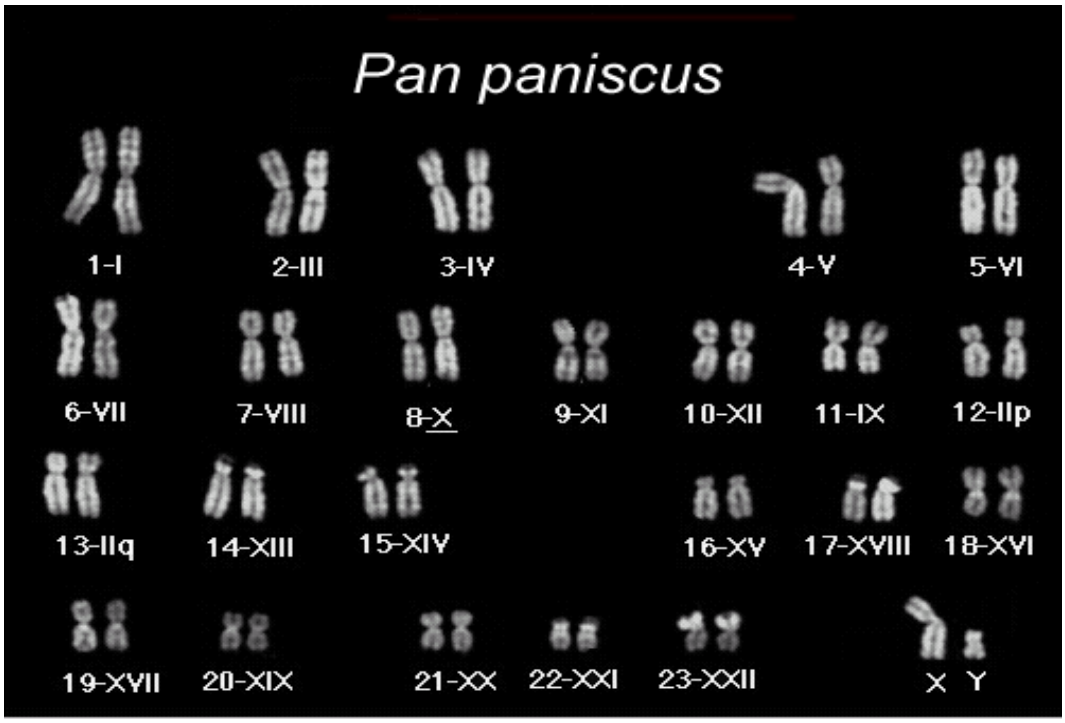


Abbildung 4.8.2: Darstellung eines Bonobo Karyogramms im invertierten DAPI, das im wesentlichen der GTG Bänderung entspricht. Die arabischen Zahlen (jeweils links) geben die konventionelle Affenchromosomennummer wieder und die römischen Zahlen (jeweils rechts) geben das entsprechend homologe Menschenchromosom wieder. Quelle: http://www.biologia.uniba.it/primates.

Wegen der großen Homologien der Chromosomen zwischen dem Menschen und den großen Menschenaffen bietet sich sinnvollerweise ein Abgleich mit der etablierten Nomenklatur der Menschenchromosomen an. Nach Aufklärung der chromosomalen Rearrangements und Eingrenzung der meisten Bruchpunkte durch die in dieser Arbeit neu entwickelten und angewendeten hochauflösenden molekularzytogenetischen Techniken (siehe 3.1.1 und 3.2) wird ein sehr genauer und umfassender Abgleich, z.T. über die zytogenetischen Auflösungsgrenzen hinaus, erstmals ermöglicht.

Grundlage der neuen Nomenklatur ist der in der Diskussion (siehe 4.3) vorgenommene Vergleich der Literatur mit dem mMCB, subCTM und BAC-Kartierungsdaten. Die Chromosomen der großen Menschenaffen werden nach der ISCN, 1995 als derivative Chromosomen des Menschen beschrieben (siehe **Tabelle 3.4**) und graphisch dargestellt (siehe Anhang). Dies entspricht zwar nicht den phylogenetischen Zusammenhängen (siehe 4.3.26), ist aber wegen oben genannter Gründe sinnvoll und hilfreich.
Den zusätzlich auftretenden heterochromatischen Banden bei Schimpanse und Gorilla, sowie veränderten Zentromerpositionen (z.B. Chromosom 11 der Orang-Utans) wurden Subbandennummerierungen der jeweils angrenzenden Bande vergeben (siehe 3.4).

Die Grenzen der auf DNA-Homologie basierenden Nomenklatur der *Hominidae* zeigen sich, wenn es um die Beschreibung sehr komplexer Veränderungen und deren Zuordnung geht. Dies wurde bei der Beschreibung der Chromosomen 3 der Orang-Utan-Unterarten und besonders beim Y Chromosom der *Hominidae* deutlich. Wegen des heterozygoten Charakters dieses Chromosoms und der damit im wesentlichen fehlenden Rekombination wurde es im Vergleich zu den anderen Chromosomen während der *Hominidae*-Evolution so stark und grundlegend verändert, dass mit molekularzytogenetischen Methoden kaum eindeutige Homologiebereiche zuordenbar sind (siehe 4.3.24). Eine systematische molekularzytogenetische Untersuchung z.B. mit BAC Sonden könnte hier weitere Abklärung bringen, wobei man auch berücksichtigen muss, das auf der Auflösungsebene von BACs neben den chromosomalen Umbauten noch weitere kryptische Vorgänge ablaufen und die *Hominidae* Genome unterscheiden (z.B. segmentale Duplikationen, Transpositionen; siehe 4.4.2).

4.9 Ausblicke

Das durch nur eine Hybridisierung sehr Kosten- und Zeit-sparende mMCB Verfahren konnte erfolgreich als ZOO-FISH Sonde eingesetzt werden. Neben diesem Einsatzgebiet, das noch viele unzureichend charakterisierte Genome der Primaten beinhaltet, sind weitere Einsatzgebiete bereits erschlossen oder denkbar. Der Einsatz ist in allen Fällen mit komplexen und/oder kryptischen Rearrangements vorstellbar bzw. dann, wenn nur wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht, wie z.B. bei der Charakterisierung von Zelllinien oder in der humangenetischen Diagnostik.
Eine sinnvolle Erweiterung des mMCB Ansatzes auf 7 Fluorochrome wird die Redundanz der Farbkombinationen reduzieren und die Aussagekraft erhöhen. Weiterhin ist eine Anpassung und Optimierung der Isis-Software nötig, um die Aussagekraft der Pseudofarben besser nutzen zu können.

Der chromosomenspezifische subCTM Mix ist durch seine Zusammensetzung aus Subtelomer- und Subzentromersonden nicht nur besonders geeignet, kryptische Rearrangements in vergleichenden Genomuntersuchungen aufzudecken, sondern kann auch hilfreich bei der Aufklärung von z.B. überzähligen kleinen Markerchromosomen sein. So ist bis heute ungeklärt, ob diese Marker nur zentromernahes, euchromatisches Material enthalten oder, bedingt dadurch, dass die meisten noch Telomere aufweisen, Subtelomere vorhanden sind, die wiederum von klinischer Relevanz wären.

Für ein besseres Verständnis der Entstehung von interstitiellen Heterochromatin sowie Inversionen ist die Identifizierung der bruchpunktüberspannenden BACs nur ein erster Schritt. Für klarere Aussagen müssen diese Sonden weiter zerlegt werden, um den Bruchpunkt auf Basenpaarebene einzugrenzen.

Die Stufe der zytogenetischen und molekularzytogenetischen Vergleiche zwischen *Hominidae* Genomen und der damit verbundenen Aufklärung der chromosomalen Rearrangements wird in Zukunft immer weiter abgelöst werden von molekulargenetischen Sequenz-, Expressions- und Proteinanalysen. Dies wird vor allem neue Einblicke und Erkenntnisse liefern, wenn neben der humanen DNA Sequenz auch die der großen Menschenaffen komplett vorliegt. Dann wird man vielleicht erst herausfinden, was den Mensch zum Mensch macht und vom Affen unterscheidet.
Diese Hoffnung bestand schon bei der Aufklärung der chromosomalen Bruchpunkte, dass man Gene in den Bruchpunkten findet, die die Einzigartigkeit des Menschen erklären. Nachdem fast alle Bruchpunkte zwischen Mensch und Schimpanse aufgeklärt sind, lässt sich in diesen Regionen im wesentlichen nur eine duplizierte „Genwüste“ feststellen. Wenn das Modell von Rieseberg und Livingston (2003) zutrifft (siehe 4.7), ist es jedoch eher lohnend die Regionen in den Rearrangements zu untersuchen, da sich hier positiv selektionierte Unterschiede angesammelt haben müssten.

Die abgeglichene Nomenklatur der *Hominidae* soll vorrangig als Arbeitsgrundlage für Wissenschaftler dienen und mit den Wissenszuwächsen aus den zukünftigen Bruchpunktkartierungen, vor allem bei Gorilla und Orang-Utan, erweitert werden. Ebenso wäre sie auch eine „Navigationsgrundlage“ für die Genomsequenzierungsprogramme der großen Affen, um die sequenzierte Regionen eindeutig und korrekt einzuordnen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Karyotypen der 5 rezenten *Hominidae* mit den zur Zeit modernsten molekularzytogenetischen Methoden systematisch zu vergleichen.
Für diese umfassende und aufwändige Aufgabe war es zunächst notwendig, ein hochauflösendes FISH Bänderungsverfahren, wie das MCB, zu einer Zeit- und Kosten-sparenden Methode weiterzuentwickeln. Dies gelang mit der Etablierung des mMCB, das die Analyse des gesamten Genoms und damit die genaue Beschreibung von Bruchpunkten in nur einem Hybridisierungsschritt erlaubt. Die gleichzeitige Analyse der evolutionär dynamischen Subtelomer- und Subzentromerregionen ermöglichten die speziell für diese Aufgabenstellung entwickelten, chromosomenspezifischen subCTM-Mixe.
Mit diesen zwei neuartigen Methoden gelang es, 16 bislang unentdeckte chromosomale Rearrangements nachzuweisen. Dies gelang vor allem im Orang-Utan-Genom. Hier konnten allein 14 unbeschriebene Bruchpunkte identifiziert werden. Aber auch im bereits gut untersuchten Schimpansengenom gelang es, eine unbekannte zweite perizentrische Inversion im Chromosom 9 aufzuklären. Des Weiteren konnten zusätzlich 15 Bruchpunkte mit dem mMCB genauer beschrieben werden. Allein beim bislang kaum untersuchten Orang-Utan Genom konnte ein Informationszuwachs bei 9 Bruchpunkten erreicht werden. Mit dem mMCB und subCTM allein konnten somit mehr als die Hälfte aller chromosomalen Bruchpunkte der *Hominidae* neu bzw. exakter beschrieben werden.

Anschließend wurden chromosomale Bruchpunkte, die von den mMCB/subCTM Daten abwichen, mit BACs näher untersucht. Eine Kartierung von Bruchpunkten erfolgte für zwei evolutionär fixierte perizentrische Inversionen im Schimpansengenom sowie für zwei der häufigsten beim Menschen auftretenden „Normvarianten“-Inversionen. Die bruchpunktüberspannenden BACs waren im weiteren Grundlage für eine Datenbank-gestützte Sequenzanalyse. Die Ergebnisse wurden mit den bereits vorhandenen Literaturangaben zu Inversionsbruchpunkten verglichen und diskutiert. Dabei zeichnen sich einige Charakteristiken dieser Regionen ab. Es handelt sich vor allem um genarme, Pseudogen- und Repeat-reiche Sequenzen, die oft segmentale Duplikationen aufweisen. Die „Normvarianten“-Inversionen zeichnen sich zudem durch extrem lange Sequenzhomologien in den entgegengelegenen Bruchpunkten aus, die nicht charakteristisch für die evolutionär fixierten Bruchpunkte zu sein scheinen. Inwieweit jeweils das Bruch-Reunions-Modell oder das über Sequenzhomologie-vermittelte „nonallelic crossing-over“ als Entstehungsmechanismus tatsächlich zutrifft, müssen weiterführende Untersuchungen klären.

Im Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen terminalem, interstitiellem und parazentrischem Heterochromatin des Schimpansen untersucht. Zusätzlich wurde es vergleichend am Mensch und am Gorilla analysiert. Hierbei zeigte sich, dass das terminale und interstitielle Heterochromatin beim Schimpansen den gleichen Ursprung hat und vermutlich gemeinsam entstanden ist. Das terminale Heterochromatin der Gorillas ist offenbar unabhängig aber zu einem gemeinsamen Zeitpunkt entstanden. Die parazentrischen Heterochromatine der Hominidae unterscheiden sich voneinander und sind demzufolge unabhängig entstanden. Die kartierten Integrations-/Expansionsstellen des interstitiellen Heterochromatins wiesen eine ähnliche Charakteristik wie die evolutionären Inversionsbruchpunkte auf.

Die aus den vergleichenden mMCB, subCTM und BAC-Kartierungs-Untersuchungen gewonnen Daten wurden mit den Literaturangaben diskutiert und abschließend dazu genutzt, erstmals einen auf Sequenzhomologie beruhenden Nomenklaturabgleich für alle *Hominidae*-Chromosomen durchzuführen.

6 Literaturverzeichnis

Aplan PD (1999) Mechanisms of leukemogenesis: Chromosomal translocations, *Hematology 1999. Am Soc Hemat* 77-82

Archidiacono N, Storlazzi CT, Spalluto C, Ricco AS, Marzella R, Rocchi M (1998) Evolution of chromosome Y in primates. *Chromosoma* 107: 241-246

Arrighi FE und **Hsu TC** (1971) Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86

Arnold J (1879) Über feinere Strukturen der Zelle unter normalen und pathologischen Bedingungen. Virchows *Arch Path Anat* 77: 181-206

Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE (2001) Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res* 11: 1005-1017

Baldini A, Ried T, Shridhar V, Ogura K, D'Aiuto L, Rocchi M, Ward DC (1993) An alphoid DNA sequence conserved in all human and great ape chromosomes: evidence for ancient centromeric sequences at human chromosomal regions 2q21 and 9q13. *Hum Genet* 90: 577-583

Barber JC, Reed CJ, Dahoun SP, Joyce CA (1999) Amplification of a pseudogene cassette underlies euchromatic variation of 16p at the cytogenetic level. *Hum Genet* 104: 211-218

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: 3826-3830

Bloom SE und **Goodpasture C** (1976) An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum Genet* 34: 199-206

Bohlander SK, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Rowley JD, Diaz MO (1992) A method for the rapid sequence-independent amplification of microdissected chromosomal material. *Genomics* 13: 1322-1324

Boveri T (1903) Über die Konstitution der chromatischen Kernsubstanz. In: Verhandlungen der deutschen ZOOlogischen Gesellschaft, 13. Jahresversammlung zu Würzburg. Korschelt E, Hrsg. Leipzig: Wilhelm Engelmann. S. 10-33

Casals F, Caceres M, Ruiz A (2003) The foldback-like transposon Galileo is involved in the generation of two different natural chromosomal inversions of Drosophila buzzatii. *Mol Biol Evol* 20: 674-685.

Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L (1968) Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49: 219-222

Caspersson T, Zech L, Johansson C (1970a) Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 60: 315-319

Caspersson T, Zech L, Johansson C (1970b) Analysis of human metaphase chromosomes set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp Cell Res* 62: 490-492

Caspersson T, De La Chapell A, Schroder J, Zech L (1972) Quinacrin fluorescence of metaphase chromosomes. Identical pattern in diffrent tissues. *Exp. Cell Res* 72: 56-59

Chen FC, Vallender EJ, Wang H, Tzeng CS, Li WH (2001) Genomic divergence between human and chimpanzee estimated from large-scale alignments of genomic sequences. *J Hered* 92: 481-489

Chowdhary BP, Raudsepp T, Fronicke L, Scherthan H (1998) Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by ZOO-FISH. *Genome Res* 8: 577-589

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

Chung IW (2001) Genes and speciation. *J Evol Biol*. 14: 889-891

Claussen U, Mazur A, Rubtsov N (1994) Chromosomes are highly elastic and can be stretched. *Cytogenet Cell Genet* 66: 120-125

Claussen U, Michel S, 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

Clemente IC, Ponsa M, Garcia M, Egozcue J (1990) Evolution of the Simiiformes and the phylogeny of human chromosomes. *Hum Genet* 84: 493-506

Coates PJ, Hall PA, Butler MG, D'Ardenne AJ (1987) Rapid technique of DNA-DNA in situ hybridisation on formalin fixed tissue sections using microwave irradiation. *J Clin Pathol* 40: 865-869

Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M (1997) Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* 89: 215-225

de Grouchy J, Turleau C, Finaz C (1978) Chromosomal phylogeny of the primates. *Ann Rev Genet* 12: 289-328

de Grouchy J (1987) Chromosome phylogenies of man, great apes, and Old World monkeys. *Genetica* 73: 37-52

Dennehey BK, Gutches DG, McConkey EH, Krauter KS (2004) Inversion, duplication, and changes in gene context are associated with human chromosome 18 evolution. *Genomics* 83: 493-501

de Pontbriand A, Wang XP, Cavaloc Y, Mattei MG, Galibert F (2002) Synteny comparison between apes and human using fine-mapping of the genome. *Genomics* 80: 395-401

Djalali M, Steinbach P, Bullerdiek J, Holmes-Siedle M, Verschraegen-Spae MR, Smith A (1986) The significance of pericentric inversions of chromosome 2. *Hum Gene* 72: 32-36

Djalali M, Adolph S, Steinbach P, Winking H, Hameister H (1987) A comparative mapping study of fragile sites in the human and murine genomes. *Hum Genet* 77: 157-162

Dutrillaux B und **Lejeune J** (1971) Sur une novelle technique d'analyse du caryotype humain. *C R Acad Sci* 272: 2638-2640

Dutrillaux B (1979) Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from Microcebus murinus (Prosimian) to man. *Hum Genet* 48: 251-314

Dutrillaux B (1980) Chromosomal evolution of the great apes and man. *J Reprod Fert* 28: 105-111

Dutrillaux B, Couturier J, Sabatier L, Muleris M, Prieur M (1986) Inversions in evolution of man and closely related species. *Ann Genet* 29: 195-202

Eder V, Ventura M, Ianigro M, Teti M, Rocchi M, Archidiacono N (2003) Chromosome 6 phylogeny in primates and centromere repositioning. *Mol Biol Evol* 20: 1506-1512

Eichler EE, Arcidiacono N, Rocchi M (1999) CAGGG repeats and the pericentromeric duplication of the hominoid genome. *Genome Res* 9: 1048-1058

Fan Y, Linardopoulou E, Friedman C, Williams E, Trask BJ (2002) Genomic structure and evolution of the ancestral chromosome fusion site in 2q13-2q14.1 and paralogous regions on other human chromosomes. *Genome Res* 12: 1651-1662

Flemming W (1880) Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen *Arch. mikr. Ana* 18: 151-259

Ford CE, Miller OJ, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH (1959) A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis Turner Syndrome *Lancet* 1: 711

Frazer KA, Elnitski L, Church DM, Dubchak I, Hardison RC (2003) Cross-species sequence comparisons: a review of methods and available resources. *Genome Res* 13: 1-12

Fujiyama A, Watanabe H, Toyoda A, Taylor TD, Itoh T, Tsai SF, Park HS, Yaspo ML, Lehrach H, Chen Z, Fu G, Saitou N, Osoegawa K, de Jong PJ, Suto Y, Hattori M, Sakaki Y (2002) Construction and analysis of a human-chimpanzee comparative clone map. *Science* 295: 131-134

Gall G und **Pardue ML** (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytogenetical preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63: 378-381

Garagna S, Zuccotti M, Redi CA, Capanna E (1997) Trapping speciation. *Nature* 390: 241-242

Garcia F, Nogues C, Garcia M, Egozcue J, Ponsa M (1999) Characterization of constitutive heterochromatin in Cebus apella (Cebidae, Primates) and Pan troglodytes (Hominidae, Primates): comparison to human chromosomes. *Am J Primatol* 49: 205-221

Garcia F, Garcia M, Mora L, Alarcon L, Egozue J, Ponsa M (2003) Qualitative analysis of constitutive heterochromatin and primate evolution. *Biol J Linnean Soc* 80: 107-124

Gardner RJM und **Sutherland GR** (2003) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling Third Edition. Oxford University Press

Gee H (2001) Palaeontology. Return to the planet of the apes. *Nature* 12: 131-132

Gecz J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC (1996) Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 13: 105-108

Glaser B, Grutzner F, Taylor K, Schiebel K, Meroni G, Tsioupra K, Pasantes J, Rietschel W, Toder R, Willmann U, Zeitler S, Yen P, Ballabio A, Rappold G, Schempp W (1997) Comparative mapping of Xp22 genes in hominoids--evolutionary linear instability of their Y homologues. *Chromosome Res* 5: 167-176

Glover TW, Hoge AW, Miller DE, Ascara-Wilke JE, Adam AN, Dagenais SL, Wilke CM, Dierick HA, Beer DG (1998) The murine Fhit gene is highly similar to its human orthologue and maps to a common fragile site region. *Cancer Res* 58: 3409-3414

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

Graw SL, Sample T, Bleskan J, Sujansky E, Patterson D (2000) Cloning, sequencing, and analysis of inv8 chromosome breakpoints associated with recombinant 8 syndrome. *Am J Hum Genet* 66: 1138-1144

Gumus G, Sunguroglu A, Tukun A, Sayin DB, Bokesoy I (2002) Common fragile sites associated with the breakpoints of chromosomal aberrations in hematologic neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet* 133: 168-171

Guy J, Hearn T, Crosier M, Mudge J, Viggiano L, Koczan D, Thiesen HJ, Bailey JA, Horvath JE, Eichler EE, Earthrowl ME, Deloukas P, French L, Rogers J, Bentley D, Jackson MS (2003) Genomic sequence and transcriptional profile of the boundary between pericentromeric satellites and genes on human chromosome arm 10p. *Genome Res* 13: 159-172

Haaf T und **Schmid M** (1987) Chromosome heteromorphisms in the gorilla karyotype. Analyses with distamycin A/DAPI, quinacrine and 5-azacytidine. *J Hered* 78: 287-292

Haaf T und **Bray-Ward P** (1996) Region-specific YAC banding and painting probes for comparative genome mapping: implications for the evolution of human chromosome 2. Chromosoma. 104: 537-44

Hale DW (1986) Heterosynapsis and suppression of chiasmata within heterozygous pericentric inversions of the Sitka deer mouse. *Chromosoma* 94: 425-432

Heizmann EP, Begun DR (2001) The oldest Eurasian hominoid. *J Hum Evol* 41: 463-481

Hellman A, Rahat A, Scherer SW, Darvasi A, Tsui LC, Kerem B (2000) Replication delay along FRA7H, a common fragile site on human chromosome 7, leads to chromosomal instability. *Mol Cell Biol* 20: 4420-4427

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 painting probes. *J Mol Med* 76: 648-655

Hey J (2003) Speciation and inversions: chimps and humans. *Bioessays* 25: 825-828

Hirai H (2001) Relationship of telomere sequence and constitutive heterochromatin in the human and apes as detected by PRINS. *Methods Cell Sci* 23: 29-35

Hliscs R, Mühlig P, Claussen U (1997a) The nature of G-bands analyzed by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 79: 162-166

Hliscs R, Mühlig P, Claussen U (1997b) The spreading of metaphases is a slow process which leads to a streching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 76: 167-71

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 Mol Genet* 10: 2215-2223

Houge G, Liehr T, Schoumans J, Ness GO, Solland K, Starke H, Claussen U, Stromme P, Akre 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

Hsu TC (1952) Mammalian chromosomes in vitro-The karyotype of man. *J Hered* 43: 167-172

Huang H, Qian C, Jenkins RB, Smith DI (1998) Fish mapping of YAC clones at human chromosomal band 7q31.2: identification of YACS spanning FRA7G within the common region of LOH in breast and prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 152-159

ISCN, 1995 – An international System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995 Felix Mitelman (ed) *S. Karger Verlag, Basel*

Istrail S, Sutton GG, Florea L, Halpern AL, Mobarry CM, Lippert R, Walenz B, Shatkay H, Dew I, Miller JR, Flanigan MJ, Edwards NJ, Bolanos R, Fasulo D, Halldorsson BV, Hannenhalli S, Turner R, Yooseph S, Lu F, Nusskern DR, Shue BC, Zheng XH, Zhong F, Delcher AL, Huson DH, Kravitz SA, Mouchard L, Reinert K, Remington KA, Clark AG, Waterman MS, Eichler EE, Adams MD, Hunkapiller MW, Myers EW, Venter JC. (2004) Whole-genome shotgun assembly and comparison of human genome assemblies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1916-1921

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: 205-215

Jacobs PA und **Strong JA** (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism *Nature* 183: 302-303

Jauch A, Wienberg J, Stanyon R, Arnold N, Tofanelli S, Ishida T, Cremer T (1992) Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8611-8615

John HL, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 912-913

Jones C, Penny L, Mattina T, Yu S, Baker E, Voullaire L, Langdon WY, Sutherland GR, Richards RI, Tunnacliffe A (1995) Association of a chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene CBL2. *Nature* 376: 145-149

Kaiser P (1984) Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum Genet* 68: 1-47

Kasai F, Takahashi E, Koyama K, Terao K, Suto Y, Tokunaga K, Nakamura Y, Hirai M (2000) Comparative FISH mapping of the ancestral fusion point of human chromosome 2. *Chromosome Res* 8: 727-735

Kehrer-Sawatzki H, Schreiner B, Tanzer S, Platzer M, Muller S, Hameister H (2002) Molecular characterization of the pericentric inversion that causes differences between chimpanzee chromosome 19 and human chromosome 17. *Am J Hum Genet* 71: 375-388

Kitayama Y, Igarashi H, Sugimura H (2000) Different vulnerability among chromosomes to numerical instability in gastric carcinogenesis: stage-dependent analysis by FISH with the use of microwave irradiation. *Clin Cancer Res* 6: 3139-4316

Knight SJ, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DL, Nguyen H, Hudson TJ, Riethman HC, Ledbetter DH, Flint J. (2000) An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet*. 67: 320-332

Ko E, Rademaker A, Martin R (2001) Microwave decondensation and codenaturation: a new methodology to maximize FISH data from donors with very low concentrations of sperm. *Cytogenet Cell Genet* 95: 143-145

Kobayashi K, Kitayama Y, Igarashi H, Yoshino G, Kobayashi T, Kazui T, Sugimura H (2000) Intratumor heterogeneity of centromere numerical abnormality in multiple primary gastric cancers: application of fluorescence in situ hybridization with intermittent microwave irradiation on paraffin-embedded tissue. *Jpn J Cancer Res* 91: 1134-1141

Koonin EV, Aravind L, Kondrashov AS (2000) The impact of comparative genomics on our understanding of evolution. *Cell* 101: 573-576

Kuechler A, Mueller CR, Liehr T, Claussen U (2002) Detection of microdeletions in the short arm of the X chromosome by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 95: 12-16

Kuechler A, Weise A, Michel S, Schaeferhenrich A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T (2003) Precise breakpoint characterization of the colon adenocarcinoma cell line HT-29 clone 19A by means of 24-color fluorescence in situ hybridization and multicolor banding. *Genes Chromosomes Cancer* 36: 207-210

Lee C, Wevrick R, Fisher RB, Ferguson-Smith MA, Lin CC (1997) Human centromeric DNAs. *Hum Genet* 100: 291-304

Lejeune J (1959) Le Mongolisme: Premier example d`aberration autosomique humaine *Ann Genet Se. Hop* 1: 41-49

Lejeune J, Dutrillaux B, Rethore MO, Prieur M (1973) Comparison of the structure of chromatids of *Homo sapiens* and *Pan troglodytes Chromosoma* 43: 423-444

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). *Cytogen Genom Res* in press

Lemke J, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Muhlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Grummt UW, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Claussen U (2002) The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Am J Hum Genet* 71: 1051-1059

Lengauer C, 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

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

Lichter P und **Cremer T** (1992) Non-isotopic in situ hybridization to metaphase chromosomes and interphase nuclei *EMBO*, Practical Course

Liehr T und **Rautenstrauss B** (1995) Regional localization of rat peripheral myelin protein 22 (Pmp22) gene to chromosome 10q22 by FISH. *Mamm Genome* 6: 489

Liehr T, Heller A, Starke H, Claussen U (2002a) FISH banding methods: applications in research and Diagnostic. *Expert Rev Mol Diagn* 2: 217-225

Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U (2002b) Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 9: 335-339

Liehr T und **Claussen U** (2002) Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr Mol Med* 2: 283-297

Locke DP, Archidiacono N, Misceo D, Cardone MF, Deschamps S, Roe B, Rocchi M, Eichler EE (2003) Refinement of a chimpanzee pericentric inversion breakpoint to a segmental duplication cluster. *Genome Biol* 4: 50

Lynch M und **Conery JS** (2003) The origins of genome complexity. Science 302: 1401-1404

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

Marks J (1993) Hominoid heterochromatin: terminal C-bands as a complex genetic trait linking chimpanzee and gorilla. *Am J Phys Anthropol* 90: 237-246

Martin CL, Wong A, Gross A, Chung J, Fantes JA, Ledbetter DH (2002) The evolutionary origin of human subtelomeric homologies--or where the ends begin. *Am J Hum Genet* 70: 972-984

Marzella R, Viggiano L, Ricco AS, Tanzariello A, Fratello A, Archidiacono N, Rocchi M (1997) A panel of radiation hybrids and YAC clones specific for human chromosome 5. *Cytogenet Cell Genet* 77: 232-237

Marzella R, Viggiano L, Miolla V, Storlazzi CT, Ricco A, Gentile E, Roberto R, Surace C, Fratello A, Mancini M, Archidiacono N, Rocchi M (2000) Molecular cytogenetic resources for chromosome 4 and comparative analysis of phylogenetic chromosome IV in great apes. *Genomics* 63: 307-313

Miró R, Clemente IC, Fuster C, Egozcue J (1987) Fragile sites, chromosome evolution, and human neoplasia. *Hum Genet* 75: 345-349

Miró R, Fuster C, Clemente IC, Caballin MR, Egozcue J (1992) Chromosome inversions involved in the chromosome evolution of the Hominidae and human constitutional chromosome abnormalities. *J Hum Evol* 22: 19-22

Misceo D, Ventura M, Eder V, Rocchi M, Archidiacono N (2003) Human chromosome 16 conservation in primates. *Chromosome Res* 11: 323-326

Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 15: 417-474

Mitelman F (2000) Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 462: 247-253

Mishmar D, Rahat A, Scherer SW, Nyakatura G, Hinzmann B, Kohwi Y, Mandel-Gutfroind Y, Lee JR, Drescher B, Sas DE, Margalit H, Platzer M, Weiss A, Tsui LC, Rosenthal A, Kerem B (1998) Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8141-8146

Monajembashi S, Cremer C, Cremer T, Wolfrum J, Greulich KO (1986) Microdissection of human chromosomes by a laser microbeam. *Exp Cell Res* 167: 262-265

Montefalcone G, Tempesta S, Rocchi M, Archidiacono N (1999) Centromere repositioning. *Genome Res* 9: 1184-1188

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA (1960) Chromosome preperation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20: 613-616

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

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. *Int J Mol Med* 12: 139-146

Mülhardt C (2002) Der Experimentator: Molekularbiologie, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin

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 und **Wienberg J** (2000) Advances in the development of chromosome bar codes: Intergration of M-FISH and Rx-FISH technology *medgen* 12: 474-477

Müller S, Stanyon R, Finelli P, Archidiacono N, Wienberg J (2000a) Molecular cytogenetic dissection of human chromosomes 3 and 21 evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 206-211

Müller S und **Wienberg J** (2001) "Bar-coding" primate chromosomes: molecular cytogenetic screening for the ancestral hominoid karyotype. *Hum Genet* 109: 85-94

Müller S, Eder V, Wienberg J (2004) A nonredundant multicolor bar code as a screening tool for rearrangements in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 39: 59-70

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

Nederlof PM, van der Flier S, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ, Ploem JS, van der Ploeg M (1990) Multiple fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* 11: 126-131

Neizel H (1986) A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 73: 320-326

Nickerson E und **Nelson DL** (1998) Molecular definition of pericentric inversion breakpoints occurring during the evolution of humans and chimpanzees. *Genomics* 50: 368-372

Nickerson E, Gibbs RA, Nelson DL (1999) Sequence analysis of the breakpoints of a pericentric inversion distinguishing the human and chimpanzee chromosome 12. *Am J Hum Genet* 65(Supplement): A56

Nietzel A, Rocchi M, Heller A, Starke H, Wlodarska I, Beensen V, Claussen U, Liehr T (2001) A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: Centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 108: 199-204

Ning Y, Roschke A, Smith ACM, Macha M, Precht K, Rietham H, Ledbetter DH, Flint J, Horsley S, Regan R, Kearney L, Knight S, Kvaloy K, Brown WRA (1996) A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nat Genet* 14: 86-89

Noor MA, Grams KL, Bertucci LA, Reiland J (2001) Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12084-12088

Nowell PC und **Croce CM** (1988) Chromosomal approaches to oncogenes and oncogenesis. *FASEB J* 2: 3054-3060

Olson MV und **Varki A** (2003) Sequencing the chimpanzee genome: insights into human evolution and disease. *Nat Rev Genet* 4: 20-28

Ortiz-Barrientos D, Reiland J, Hey J, Noor MA (2002) Recombination and the divergence of hybridizing species. *Genetica* 116: 167-178

Pandis N, Teixeira MR, Gerdes AM, Limon J, Bardi G, Andersen JA, Idvall I, Mandahl N, Mitelman F, Heim S (1995) Chromosome abnormalities in bilateral breast carcinomas. Cytogenetic evaluation of the clonal origin of multiple primary tumors. *Cancer* 76: 250-258

Park JP, Wojiski SA, Spellman RA, Rhodes CH, Mohandas TK (1998) Human chromosome 9 pericentric homologies: implications for chromosome 9 heteromorphisms. *Cytogenet Cell Genet* 82: 192-194

Pardue ML und **Gall JG** (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64: 600-604

Pellicciari C, Formenti D, Zuccotti M, Stanyon R, Manfredi Romanini MG (1988) Genome size and constitutive heterochromatin in Hylobates muelleri and Symphalangus syndactylus and in their viable hybrid. *Cytogenet Cell Gene* 47: 1-4

Pevzner P und **Tesler G** (2003) Genome rearrangements in mammalian evolution: lessons from human and mouse genomes. *Genome Res* 13: 37-45

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 2934-2938

Popescu NC, Zimonjic D, DiPaolo JA (1990) Viral integration, fragile sites, and proto-oncogenes in human neoplasia. *Hum Genet* 84: 383-386

Pujana MA, Nadal M, Gratacos M, Peral B, Csiszar K, Gonzalez-Sarmiento R, Sumoy L, Estivill X (2001) Additional complexity on human chromosome 15q: identification of a set of newly recognized duplicons (LCR15) on 15q11-q13, 15q24, and 15q26. *Genome Res* 11: 98-111

Richard F, Lombard M, Dutrillaux B (2000) Phylogenetic origin of human chromosomes 7, 16, and 19 and their homologs in placental mammals. Genome Res 10: 644-651

Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Evol* 16: 351-358

Rieseberg LH und **Livingstone K** (2003) Evolution. Chromosomal speciation in primates. *Science* 300: 267-268

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
Royle NJ, Baird DM, Jeffreys AJ (1994) A subterminal satellite located adjacent to telomeres in chimpanzees is absent from the human genome. *Nat Genet* 6: 52-56

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

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 20: 1350-1354

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning“ Band 3, 2. Auflage *Cold Spring Harbor Laborotory Press*, USA

Samonte RV, Conte RA, Ramesh KH, Verma RS (1996) Molecular cytogenetic characterization of breakpoints involving pericentric inversions of human chromosome 9. *Hum Genet* 98: 576-580

Samonte RV, Conte RA, Verma RS (1998) Molecular phylogenetics of the hominoid Y chromosome. *J Hum Genet* 43: 185-186

Samonte RV und **Eichler EE** (2002) Segmental duplications and the evolution of the primate genome. *Nat Rev Genet* 3: 65-72

Sankoff D, Deneault M, Turbis P, Allen C (2002) Chromosomal distributions of breakpoints in cancer, infertility, and evolution. *Theor Popul Biol* 61: 497-501

Schaeferhenrich A, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, Kuechler A, Haag N, Weise A, Liehr T, Claussen U, Marian B, Sendt W, Scheele J, Pool-Zobel BL (2003) Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat Res* 526: 19-32

Shaffer LG und **Lupski JR** (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 34: 297-329

Schempp W, Binkele A, Arnemann J, Glaser B, Ma K, Taylor K, Toder R, Wolfe J, Zeitler S, Chandley AC (1995) Comparative mapping of YRRM- and TSPY-related cosmids in man and hominoid apes. *Chromosome Res* 3: 227-234

Schlessinger D (1990) Yeast artificial chromosomes: tools for mapping and analysis of complex genomes. *Trends Genet* 6: 255-258

Schmid M, Ott G, Haaf T, Scheres JM (1985) Evolutionary conservation of fragile sites induced by 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine in man, gorilla, and chimpanzee. *Hum Genet* 71: 342-350

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497

Schweizer D, Loidl J, Hamilton B (1987) Heterochromatin and the phenomenon of chromosome banding. *Results Probl Cell Differ* 14: 235-254

Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972

Searle JB (1998) Speciation, chromosomes, and genomes. Genome Res 8: 1-3

Senger G, Chudoba I, Friedrich U, Tommerup N, Claussen U, Brondum-Nielsen K (1997) Prenatal diagnosis of a half-cryptic translocation using chromosome microdissection. *Prenatal Diagnosis* 17: 369-374

Senger G, Chudoba I, Plesch A (1998) Multicolor-FISH - the identification of chromosome aberrations by 24 colors. *BIOforum* 9: 499-503

Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Smon M (1992) Cloning and stable maintance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc Natl Aca. Sci USA* 89: 8794-8797

Sibony M, Commo F, Callard P, Gasc JM (1995) Enhancement of mRNA in situ hybridization signal by microwave heating. *Lab Invest* 73: 586-591

Sineo L, Romagno D, Guarducci S, Lapini M, Giovannucci-Uzielli ML, Chiarelli B (2002) Chromosome mapping of Miller-Diecker, Smith-Magenis and RARA loci in non-human primates: implications in the evolution of human chromosome 17. *Genetica* 114: 275-280

Smeets DF und **van de Klundert FA** (1990) Common fragile sites in man and three closely related primate species. *Cytogenet Cell Genet* 53: 8-14

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-375

Spurbeck JL, Zinsmeister AR, Meyer KJ, Jalal SM (1996) Dynamics of chromosome spreading. *Am J Med Genet* 61: 387-393

Stankiewicz P, Park SS, Inoue K, Lupski JR (2001) The evolutionary chromosome translocation 4;19 in Gorilla gorilla is associated with microduplication of the chromosome fragment syntenic to sequences surrounding the human proximal CMT1A-REP. *Genome Res* 11: 1205-1210.

Stanyon R, Wienberg J, Romagno D, Bigoni F, Jauch A, Cremer T (1992) Molecular and classical cytogenetic analyses demonstrate an apomorphic reciprocal chromosomal translocation in Gorilla gorilla. *Am J Phys Anthropol* 88: 245-250

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. (2003) Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet* 114: 51-67

Strachan T und **Read AP** (1996) Molekulare Humangenetik. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag

Sutherland GR (1979) Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet* 31: 125-135

Sutherland GR, Baker E, Richards RI (1986) Fragile sites. *Encyclopedia Molec Med* 2: 313-318

Sutton WS (1903) The chromosome inherity. *Biol Bull* 4: 231-248

Tanabe H (1999) Studies on karyotype evolution in higher primates in relation to human chromosome 14 and 9 by comparative mapping of immunoglobulin C epsilon genes with fluorescence in situ hybridization. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku* 117: 77-90

Telenius H, Pelmear AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjold M, Pfragner R, Ponder BA (1992a) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 257-263

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992b) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer.*Genomics* 13: 718-725

Tjio JH und **Levan A** (1956) The chromosome number in man. *Hereditas* 42: 1-6

Tsend-Ayush E, Grutzner F, Yue Y, Grossmann B, Hansel U, Sudbrak R, Haaf T (2004) Plasticity of human chromosome 3 during primate evolution. *Genomics* 83: 193-202

Turleau C, de Grouchy J, Klein M (1972) Chromosomal phylogeny of a man and the anthropomorphic primates. *Ann Genet* 15: 225-240

van Geel M, Eichler EE, Beck AF, Shan Z, Haaf T, van der Maarel SM, Frants RR, de Jong PJ (2002) A cascade of complex subtelomeric duplications during the evolution of the hominoid and Old World monkey genomes. *Am J Hum Genet* 70: 269-278

von Linné (1758) Systema Naturæ per Regna Tria Naturæ, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Charateribus, Differentiis, Synonymis, Locis. Holmiae: Impensis Direct, Laurentii Salvii,

Verma RS und **Babu A** (1994) Human chromosomes: Principles and techniques. 2nd ed. McGraw-Hill, Inc.

Waldeyer W (1888) Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikrosc Anat* 32: 1-22

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, Starke H, Heller A, Uwe C, Liehr T (2002a) Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis: a multicolor banding analysis. *Int J Mol Med* 9: 359-361

Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T (2003a) Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet Genome Res* 103: 34-39

Weise A, Harbarth P, Claussen U, Liehr T (2003b) Fluorescence in situ hybridization (FISH) on human chromosomes using photoprobe biotin-labeled probes. *J Histochem Cytochem* 51: 549-551

Weise A, Rittinger O, Starke H, Ziegler M, Claussen U, Liehr T (2003c) 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

Weise A, Starke H, Mrasek K, Claussen U, Liehr T (2004) New insights into the evolution of chromosome 1. *Cytogent Genome Res* in press

Weise A, Liehr T, Claussen U, Halbhuber KJ (2004) More efficient fluorescence in situ hybridization (FISH) using microwave. *J Histoch Cytoch* eingereicht

Wheeler DL, Church DM, Edgar R, Federhen S, Helmberg W, Madden TL, Pontius JU, Schuler GD, Schriml LM, Sequeira E, Suzek TO, Tatusova TA, Wagner L (2004) Database resources of the National Center for Biotechnology Information: update *Nucleic Acids Res* 1: 32

Wienberg J, Jauch A, Stanyon R, Cremer T (1990) Molecular cytotaxonomy of primates by chromosomal in situ suppression hybridization. *Genomics* 8: 347-350

Wienberg J, Jauch A, Ludecke HJ, Senger G, Horsthemke B, Claussen U, Cremer T, Arnold N, Lengauer C (1994) The origin of human chromosome 2 analyzed by comparative chromosome mapping with a DNA microlibrary. *Chromosome Res* 2: 405-410

Wienberg J und **Stanyon R** (1997) Comparative painting of mammalian chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 7: 784-791

Wildman DE, Uddin M, Liu G, Grossman LI, Goodman M (2003) Implications of natural selection in shaping 99.4% nonsynonymous DNA identity between humans and chimpanzees: enlarging genus Homo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7181-7188

Wilke CM, Guo SW, Hall BK, Boldog F, Gemmill RM, Chandrasekharappa SC, Barcroft CL, Drabkin HA, Glover TW (1994) Multicolor FISH mapping of YAC clones in 3p14 and identification of a YAC spanning both FRA3B and the t(3;8) associated with hereditary renal cell carcinoma. *Genomics* 22: 319-326

Wilke CM, Hall BK, Hoge A, Paradee W, Smith DI, Glover TW (1996) FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum Mol Genet* 5: 187-195

Wimmer R, Kuhl H, Rottger S, Schempp W (2002) Comparative mapping of CDY and DAZ in higher primates. *Cytogenet Genome Res* 96: 287-289

***WWF** Journal* 3 (2002) Die großen Menschenaffen

Yunis JJ (1976) High resolution of human chromosomes. *Science* 191: 1268-1270

Yunis JJ und **Prakash O** (1982) The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. *Science* 215: 1525-1530

Yunis JJ und **Soreng AL** (1984) Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226: 1199-1204

Zernahle K (1983) Stabilität und Variabilität des menschlichen Karyotyps. *Biol. Rundschau* 21: 39-48

7 Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Aqua ad	Aqua ad iniectabilia (Braun)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAC	bacterial artificial chromosome
BES	BAC end sequence
bp	Basenpaare
BrdU	Brom-deoxy-Uridin
C	Cytosin
CBG	C-Bänderung
CCD-Kamera	*charge-coupled device* -Kamera (= gekühlter, ladungsgekoppelter Bildsensor)
cen/cep	Zentromer
cenM-FISH	Zentromer-spezifisches Muticolor-FISH
CISS	Chromosomen *in situ* Suppressions
chr	Chromosom
Cy	Cyanin
DAPI	4‘,6‘-Diamidino-2-phenylindol
DEAC	Diethylaminocoumarin-5-dUTP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOP	degenerierte Oligonukleotid-Primer
DOP-PCR	Polymerase Kettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotid-Primern
E. coli	*Escherichia coli*
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz)
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fluo	Fluorescein-12-dUTP
FKS	Fötales Kälber Serum
G	Guanosin
G-Bänderung	Giemsa Bänderung
GGO	*Gorilla gorilla*
HLA	*Hylobates lar*
HSA	*Homo sapiens sapiens*
k. A.	keine Angabe
kb	Kilo Basenpaare
KH	Kreuzhybridisierung
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCR	*low-copy-repeat*
LINE	long interspersed repetitive element
LTR	long terminal repeat
Mb	Megabasenpaare
MCB	Multicolor-Bänderung
M-FISH	Multiplex-FISH
Midi	microdissection – Mikrosezierung oder Mikrosezierungsbank
mMCB	multitude-multicolor banding
MTX	Methotrexat
NOR	Nukleolus-organisierende Regionen
OMK	OMK
OT	Objektträger (Einzahl)
OTs	Objektträger (Mehrzahl)
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	*phosphate buffered saline* (Phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung)
pcp	*partial chromosome painting*
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
PHA	Phytohämagglutinin
PMK	*Macaca mulatta*
PPA	*Pan paniscus*
PPY_B	*Pongo pygmaeus pygmaeus* (Borneo)
PPYs	*Pongo pygmaeus pygmaeus* (Sumatra)
PTR	*Pan troglotydes troglotydes*
PTV	*Pan troglotydes versus*
q	langer Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure

RPMI-1640	Wachstumsmedium
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Rx-FISH	cross-species color banding
SA	Strept-Avidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SINE	short interspersed elements
SKY	Spectral karyotyping
SO/SpO	Spectrum Orange-dUTP
SSC	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat
sub-cen-Mix	Sub-Zentromer-Mix
subCTM	Subzentromer-Subtelomer-Mix
subtel	Sub-Telomersonde
T	Thymidin
Tab	Tabelle
Taq-Polymerase	*Thermus aquaticus* DNA Polymerase
tel	Telomer
TR	*Texas Red-12-dUTP*
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Puffer)
Tween	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat
U	Uridin
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
wcp	whole chromosome painting
YAC	yeast artificial chromosome
#	Chromosom

8 Anhang

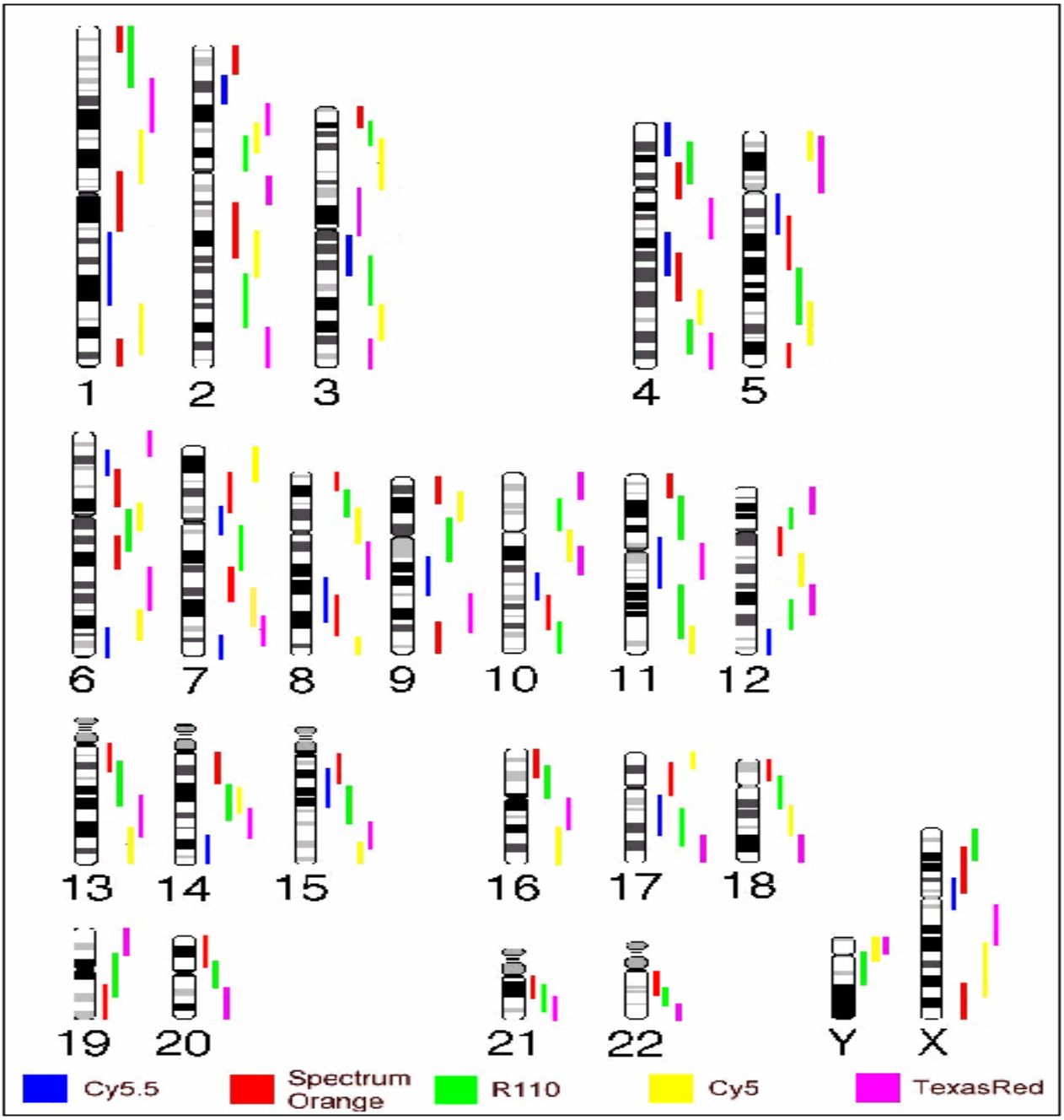


Abbildung 8.1: Darstellung des Markierungsschemas für den mMCB Sondenansatzes. Die verschiedenen Farben geben entsprechend der Bezeichnung im unteren Bildbereich die Markierung mit einem der 5 Fluoreszenzfarbstoffe sowie den chromosomalen Bereich der mit der entsprechenden Mikrosezierungsbank abgedeckt wird wieder.

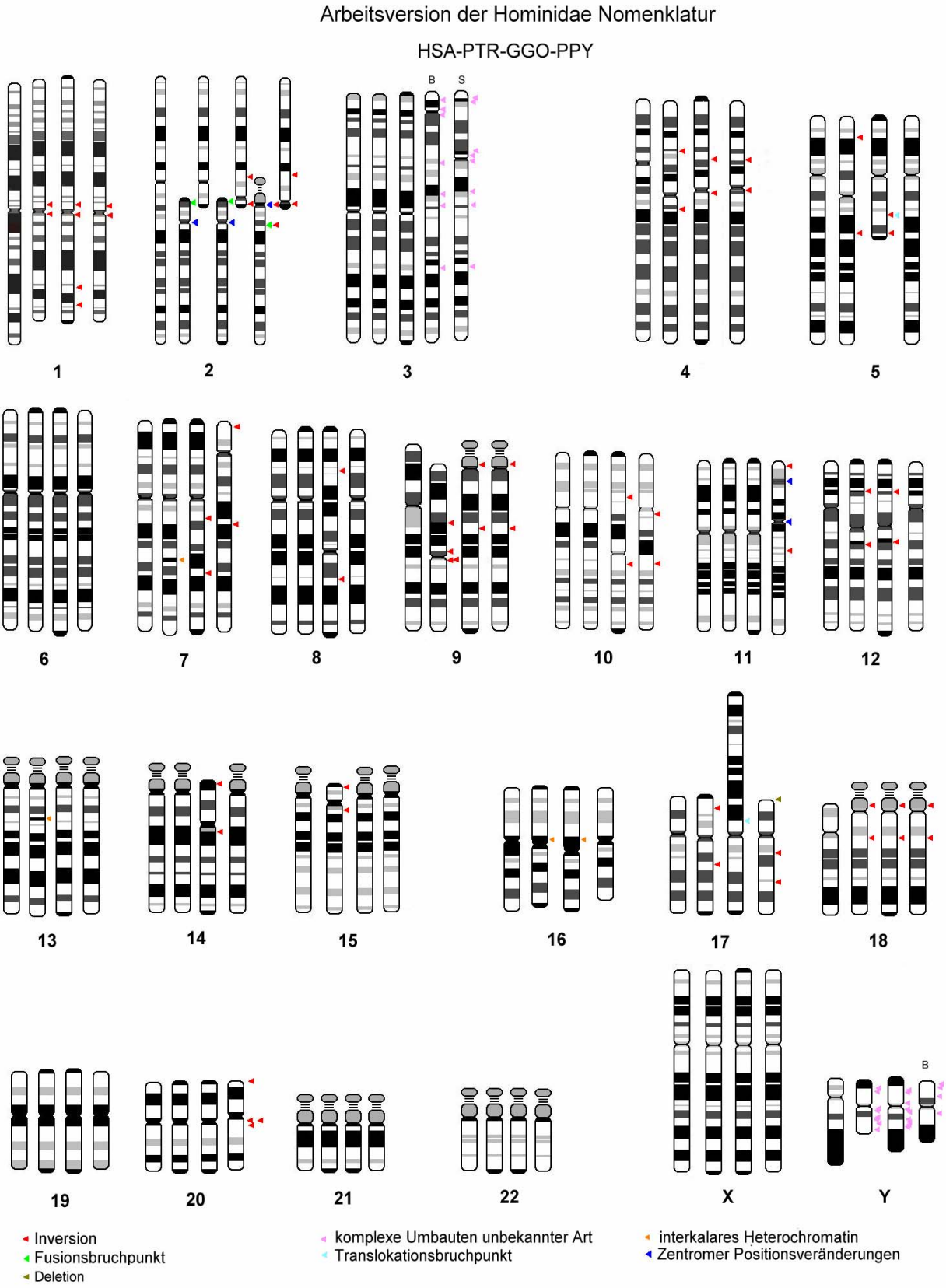


Abbildung 8.2: Arbeitsversion der auf Homologie beruhenden Nomenklatur der *Hominidae*. Es sind jeweils die Chromosomen der Menschen (HSA), Schimpansen (PTR), Gorillas (GGO) und Orang-Utans (PPY) dargestellt. Veränderungen gegenüber dem Menschen sind mit Pfeilen markiert. Die Farbe des Pfeils gibt die Art des Rearrangements wieder (siehe untere Bildbeschriftung).

Bruchpunkte des Schimpansen

(ohne Betrachtung des Heterochromatins in 1q12, 9q12 und 16q11.2)

Bruch-punkt nach Homologie zu HSA	Zytogen. Rearrange-ment	Methode/ Referenz	kb Abstand im Chromo-som von pter	Gene im Bruchpunkt bzw. Bruchpunkt-umgebung +/- 100 kb	Genprodukt bzw. Funktion (NCBI Stand März 2004)	Besonderheiten der Region
1p11.2	Inversion	MCB u. BAC RP11-35B4/ Weise *et al.,* 2003	119.538	- LOC391081 - LOC401560 - LOC128102 - LOC391080 - MGC45731	- 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase /Delta 5-->4-isomerase - glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase * - 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase - glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase * - hypotet. protein MGC45731	- besteht aus einer Vielzahl an sich wiederholenden und abgewandelten segmentalen Duplikationen, homologe Bereiche in 1p36.1, 1q21.1 - Region deshalb zwar sequenziert aber noch nicht geordnet
1q21.2	Inversion	MCB u. BAC RP11-35B4/ Weise *et al.,* 2003	148.790	- CGN - TUFT1	- Cingulin - Tuftelin 1/ Zahnschmelzmineralisierung	- besteht aus einer Vielzahl an sich wiederholenden und abgewandelten segmentalen Duplikationen, homologe Bereiche in 1p36.1, 1q21.1 - Region deshalb zwar sequenziert aber noch nicht geordnet
2q14.1	Fusion	BAC RP11-395L14/ Fan *et al.*, 2002	114.440	- FOXD4L1 - LOC284964 - MGC52000 - RPL23AP7 - RABL2A - bA395L1413	- forkhead box D4 like 1 - phosphoglucomutase like protein - CXYorf1-related protein - ribosomal protein L23a pseudogene 7 - member of RAS oncogene family-like 2A - acrosin-like protease	- Genreiche Region
2q21.2	Zentromer	GTG/ Yunis u.Prakash, 1982	134.000	- LOC401013	- hypothetical gene AK057980; AK092189	- Genarme Region
4p13	Inversion	YAC 806B6/ Nickerson u. Nelson 1998	44.105	- KCTD8	- potassium channel tetramerisation domain containing 8	- besonders Genarme Region - keine sequenzierten BAC Klone in der Umgebung
4q21.3	Inversion	YAC 695H10/ Marzella *et al.*, 2000	93.200			- besonders Genarme Region - keine sequenzierten BAC Klone in der Umgebung
5p15.1	Inversion	BAC RP11-42C9/ nicht publiziert	18.560			- keine Gene

Fortsetzung Tabelle 1: Bruchpunkte des Schimpansen

Bruch-punkt nach Homologie zu HSA	Zytogen. Rearrange-ment	Methode/ Referenz	kbp Abstand im Chromo-som von pter	Gene im Bruchpunkt bzw. Bruchpunkt-umgebung +/- 100 kb	Genprodukt bzw. Funktion (NCBI Stand März 2004)	Besonderheiten der Region
5q15	Inversion	BAC RP11-256D16/ nicht publiziert	96.090	- LOC389311 - CAST - ARTS-1	- hypothetical gen - calpastatin, participate in pathogenic mechanisms of rheumatic diseases - type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	- Genarme Region - schlechte BAC-Abdeckung - Region zwar sequenziert aber noch nicht geordnet
7q22.1	Interkalares Hetero-chromatin	BAC RP11-1134K14/ nicht publiziert	101.920	- POLR2J2 - MGC35361	- DNA directed RNA polymerase II polypeptide J-related gene - Description: hypothetical protein MGC35361	- besonders Genarme Region - keine sequenzierten BAC Klone in der Umgebung
9p11.2	Inversion/ Inversion	distal von BAC RP11-128P23	41.310	- PTS-P1 - LOC389730	- 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase pseudogene - similar to chromosome 9 open reading frame 36	- besonders Genarme Region - keine Sequenzdaten
9q11	Inversion	mMCB, subCTM/ nicht publiziert	48.000			- keine Gene - keine Sequenzdaten - hoch repetetive DNA mit Homologien in 9q13
9q22.1	Inversion	YAC 945F5/ Montefoalcone *et al.,* 1999	82.960	- NTRK2	- neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2/ Regulation der synaptischen Funktion im Gehirn	- besonders Genarme Region
12p11.23	Inversion	YAC 917c9/ Nickerson u. Nelson 1998	28.800			- keine Gene
12q14.3	Inversion	YAC745a10/ Nickerson u. Nelson 1998	66.787	- LOC400051 - LOC341333 - IFNG	- hypothetical gene supported by AK124066 - similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1/ Helix destabilizing protein - interferon gamma/ immunresponse	- besonders Genarme Region
13q14.13	Interkalares Hetero-chromatin	BAC RP11-189B4/ nicht publiziert	44.820	- C13orf18 - LOC81993	- chromosome 13 open reading frame 18 - COX17 pseudogene	- besonders Genarme Region

Fortsetzung Tabelle 1: Bruchpunkte des Schimpansen

Bruch-punkt nach Homologie zu HSA	Zytogen. Rearrange-ment	Methode/ Referenz	kb Abstand im Chromo-som von pter	Gene im Bruchpunkt bzw. Bruchpunkt-umgebung +/- 100 kb	Genprodukt bzw. Funktion (NCBI Stand März 2004)	Besonderheiten der Region
15p11.2	Inversion	Midi54/ nicht publiziert	14.000			- keine Gene - keine Sequenzdaten - hoch repetetive DNA mit Homologien in kurzen Armen akrozentrischer Chromos.
15q13.1	Inversion	BAC RP11-422F16/ Locke *et al.,* 2003	28.580	- LOC338978 - LOC401808 - LOC342167 - LOC39560 - LOC400342	- similar to M-phase phosphoprotein 10 - similar to hypothetical protein FLJ36144 - similar to hypothetical protein FLJ35785 - similar to Dynamin-1 (D100) (Dynamin, brain) (B-dynamin) - similar to RIKEN cDNA 6530401L14 gene	- besteht aus einer Vielzahl an sich wiederholenden und abgewandelten segmentalen Duplikationen - Region deshalb zwar sequenziert aber noch nicht geordnet
17p13.2	Inversion	BAC RP1-179H24/ Kehrer-Sawatzki *et al.*, 2002	8.134	- LIP8 - TRAPPC1 - GUCY2D - ALOX15B - LOC388322 - ALOX12B - ALOXE3 - HES7	- LYST-interacting protein LIP8 - trafficking protein particle complex 1 - guanylate cyclase 2D, second messenger regulating phototransduction - arachidonate 15-lipoxygenase, production of fatty acid hydroperoxides - similar to Gag-Pro-Pol protein - arachidonate 12-lipoxygenase - arachidonate lipoxygenase 3 - hairy and enhancer of split 7	- besteht aus einer Vielzahl an sich wiederholenden und abgewandelten segmentalen Duplikationen/ Repeats - Region deshalb nicht sequenziert sowie schlechte und nicht geordnet BAC Abdeckung
17q21.33	Inversion	BAC RP5-1029K10/ Kehrer-Sawatzki *et al.*, 2002	48.430	- NGFR - NXPH3 - SPOP	- nerve growth factor receptor - neurexophilin 3, signaling molecules that resemble neuropeptides - speckle-type POZ protein, contains a poxvirus and zinc finger (POZ) domain	- Genarme Region - viele SINES und LTRs

Fortsetzung Tabelle 1: Bruchpunkte des Schimpansen

Bruch-punkt nach Homologie zu HSA	Zytogen. Rearrange-ment	Methode/ Referenz	kb Abstand im Chromo-som von pter	Gene im Bruchpunkt bzw. Bruchpunkt-umgebung +/- 100 kb	Genprodukt bzw. Funktion (NCBI Stand März 2004)	Besonderheiten der Region
18pter	Inversion	zw. USP14 u. Tel/ Dennehey et al., 2004	148	- LOC260334 - IL9RP4 - USP14 - THOC1	- beta-tubulin 4Q pseudogene - interleukin 9 receptor pseudogene 4 - ubiquitin specific protease 14 - THO complex 1	- Genarme Region - segmentale Duplikationen
18q11.1	Inversion	zw. ROCK1 und cen/ Dennehey et al., 2004	16.870	- ROCK1 - LOC388471	- Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 - similar to 60S Ribosomal Protein L21	- besonders Genarme Region - segmentale Duplikationen - keine Sequenzdaten sowie BAC Abdeckung der Region - unmittelbar ans Zentromer angrenzend

Tabelle 1: Auflistung aller bekannten sowie neuen Bruchpunkte des Schimpansen. Jeweils aufgelistet sind die zytogenetische Lage, Rearrangement, Quelle, Abstand von pter, Gene, Genprodukt, Besonderheiten der Region

Bruchpunkte des Gorilla

(ohne Betrachtung des Heterochromatins in 1q12, 9q12 und 16q11.2)

Bruch-punkt nach Homologie zu HSA	Zytogen. Rearrange-ment	Methode/ Referenz	kb Abstand im Chromo-som von pter	Gene im Bruchpunkt bzw. Bruchpunkt-umgebung +/- 100 kb	Genprodukt bzw. Funktion (NCBI Stand März 2004)	Besonderheiten der Region
1p11.2	Inversion	siehe Schimpanse				
1q21.2	Inversion	siehe Schimpanse				
1q32.3	Inversion	MCB/ Mrasek *et al.*, 2001	210.230	- FLJ12505 - LOC90806 - RPS6KC1	- hypothetical protein FLJ12505 - similar to RIKEN cDNA 2610307I21 - ribosomal protein S6 kinase	- besonders Genarme Region - keine sequenzierten BAC Klone in der Umgebung
1q42.13	Inversion	MCB/ Mrasek *et al.*, 2001	233.590	- EDARADD	- EDAR-associated death domain	- besonders Genarme Region - keine sequenzierten BAC Klone in der Umgebung
2p11.2	Inversion	BAC RP11-433C18/ nicht publiziert	90.060	- IGKV3D-11 - IGKV2D-10 - IGKV1D-42 - IGKV1D-43 - IGKV1D-8 - IGKV3D-7	- immunoglobulin kappa variable 3D-11 - immunoglobulin kappa variable 2D-10 - immunoglobulin kappa variable 1D-42 - immunoglobulin kappa variable 1D-43 - immunoglobulin kappa variable 1D-8 - immunoglobulin kappa variable 3D-7	- Genarme Region - nur Immunglobulin kappa Gene - proximal vom BAC eine ca. 1Mb große BAC, Gen und Sequenzierungs“lücke“ - gleicher BAC ist in die Normvarianten Inversion am Chromosom 2 des Menschen involviert
2q14.1	Fusion/ Inversion	siehe Schimpanse				
2q21.2	Zentromer	siehe Schimpanse				
4p12	Inversion	zw. BAC RP11-700D1 u. cen/ nicht publiziert	49.300			- keine bekannten Gene - Lückenhafte BAC-Abdeckung - keine Sequenzdaten
4q13.3-21.1	Inversion	distal von BAC RP11-498E11/ nicht publiziert	71.900	- ENAM	- Enamelin	- besonders Genarme Region - kaum Sequenzdaten - schlechte BAC Abdeckung
5q14.3	Translokation	BAC CTC-428H11/ Stankiewicz *et al.,* 2001	86.800	- RASA1 - CCNH	- RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1 - cyclin H, cell cycle-associated kinase	- besonders Genarme Region

Fortsetzung Tabelle 2: Bruchpunkte des Gorilla

Bruch-punkt nach Homologie zu HSA	Zytogen. Rearrange-ment	Methode/ Referenz	kb Abstand im Chromo-som von pter	Gene im Bruchpunkt bzw. Bruchpunkt-umgebung +/- 100 kb	Genprodukt bzw. Funktion (NCBI Stand März 2004)	Besonderheiten der Region
7q11.23	Inversion	MCB/ Mrasek *et al*., 2001	76.000			- keine bekannten Gene
7q22.3	Inversion	MCB/ Mrasek *et al*., 2001	108.500			- keine bekannten Gene
8p21.1	Inversion	MCB/ Mrasek *et al*., 2001	29.500	- LOC392208	- similar to Ac2-210	- besonders Genarme Region - kaum Sequenzdaten - schlechte BAC Abdeckung
8q22.3	Inversion	MCB/ Mrasek *et al*., 2001	114.600			- keine bekannten Gene - keine BAC-Abdeckung - keine Sequenzdaten
9q13	Inversion	zw. BAC RP11-262H14 u. cen/ nicht publiziert	62.400			- keine bekannten Gene - keine BAC-Abdeckung - keine Sequenzdaten - bei HSA kreuzhybridisierende Region in 9p11.2
9pter	Inversion	zw. Subtelomer 9p u. tel/ nicht publiziert	100	- LOC401487 - FLJ00038 - LOC401488 - LOC401489 - FOXD4 - LOC55871	- similar to DDX11 protein - CXYorfl-related protein - hypothetical gene supported by AK093004 - hypothetical gene supported by AY343891 - forkhead box D4, transcription factor - COBW-like protein	
10p11.23	Inversion	MCB/ Mrasek *et al*., 2001	32.500	- LOC401639 - EPC1	- similar to peptidylprolyl isomerase A, cyclophilin A - enhancer of polycomb homolog 1	- besonders Genarme Region
10q22.3	Inversion	MCB/ Mrasek *et al*., 2001	77.800			- keine bekannten Gene
12p11.23	Inversion	siehe Schimpanse				

Fortsetzung Tabelle 2: Bruchpunkte des Gorilla

Bruch-punkt nach Homologie zu HSA	Zytogen. Rearrange-ment	Methode/ Referenz	kb Abstand im Chromo-som von pter	Gene im Bruchpunkt bzw. Bruchpunkt-umgebung +/- 100 kb	Genprodukt bzw. Funktion (NCBI Stand März 2004)	Besonderheiten der Region
12q14.2	Inversion	proximal von YAC745a10/ Nickerson u. Nelson 1998	**64.000**	- MAN1 - LOC253827	**- integral inner nuclear membrane protein** - hypothetical protein LOC253827	- besonders Genarme Region - kaum Sequenzdaten - schlechte BAC Abdeckung
14p11.2	Inversion	**Midi54/** Mrasek *et al.,* 2001	**12.000**			- keine bekannten Gene - heterochromatisches Material vom kurzen Arm
14q21.1	Inversion	**mMCB/** nicht publiziert	**41.000**			- keine bekannten Gene - lückenhafte BAC-Abdeckung - kaum Sequenzdaten
16p13.3	Inversion	MCB/ Mrasek *et al*., 2001	4.000	- CREBBP - ADCY9	- CREB binding protein, Rubinstein-Taybi syndrome - adenylate cyclase 9	- besonders Genarme Region - kaum Sequenzdaten - schlechte BAC Abdeckung
16p11.2	Inversion	MCB/ Mrasek *et al*., 2001	34.600			- keine bekannten Gene - lückenhafte BAC-Abdeckung - kaum Sequenzdaten
17p13.3	Inversion	MCB, subCTM/ Mrasek *et al*., 2001, nicht pzbliziert	1.200			- keine bekannten Gene - lückenhafte BAC-Abdeckung - keine Sequenzdaten
17p11.2	Inversion/ Translokation	RP11-640I15/ Stankiewicz *et al.,* 2001	15.780	- CDRT1 - TRIM16 - LOC246719 - ZNF286 - MGC51025 - LOC147151	- CMT1A duplicated region transcript - tripartite motif containing 16 - ubiquitin carrier protein E2-EPF pseudogen - zinc finger protein 286 - hypothetical protein MGC51025 - hypothetical protein LOC147151	- Genreiche Region
18pter	Inversion	siehe Schimpanse				
18q11.1	Inversion	siehe Schimpanse				

Bruchpunkte des Orang-Utan

(ohne Betrachtung des Heterochromatins in 1q12, 9q12 und 16q11.2)

Bruch-punkt nach Homologie zu HSA	Zytogen. Rearrange-ment	Methode/ Referenz	kb Abstand im Chromo-som von pter	Gene im Bruchpunkt bzw. Bruchpunkt-umgebung +/- 100 kb	Genprodukt bzw. Funktion (NCBI Stand März 2004)	Besonderheiten der Region
1p11.2	Inversion	siehe Schimpanse				
1q21.2	Inversion	siehe Schimpanse				
2p11.2	Inversion	zw. BAC RP11-575H3 u. cen/ nicht publiziert	91.800	- LOC391405	- similar toIg kappa chain V region(Z4)	- besonders Genarme Region
2q14.1	Fusion/Inver-sion/Inversion	siehe Schimpanse				
2q21.2	Zentromer/ Inversion	siehe Schimpanse				
Wegen der komplexen und verschiedenen Umbauten am Chromosom 3 Homologen des Borneo und Sumatra Orang-Utans und der relativen Bruchpunktungenauigkeit des MCBs auf Basenpaarebene wurde auf die Aufzählung der Bruchpunkte in dieser Tabelle verzichtet!						
4p12	Inversion	siehe Gorilla				
4q13.3	Inversion	distal von BAC RP11-498E11/ nicht publiziert	66.075			- keine bekannten Gene
7p22.3	Inversion	mMCB, subCTM/ nicht publiziert	1.100			- keine bekannten Gene
7q21.11	Inversion	mMCB, subCTM/ nicht publiziert	79.000			- keine bekannten Gene
9q13	Inversion	siehe Gorilla				
9pter	Inversion	siehe Gorilla				
10q11.23	Inversion	mMCB / nicht publiziert	50.400			- keine bekannten Gene - keine BAC-Abdeckung - keine Sequenzdaten
10q22.3	Inversion	mMCB / nicht publiziert	77.800			- keine bekannten Gene - keine BAC-Abdeckung - keine Sequenzdaten

Fortsetzung Tabelle 3: Bruchpunkte des Orang-Utan

Bruch-punkt nach Homologie zu HSA	Zytogen. Rearrange-ment	Methode/ Referenz	kb Abstand im Chromo-som von pter	Gene im Bruchpunkt bzw. Bruchpunkt-umgebung +/- 100 kb	Genprodukt bzw. Funktion (NCBI Stand März 2004)	Besonderheiten der Region
11p15.5	Inversion	mMCB / nicht publiziert	2.900	- KCNQ1	- potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member1	- besonders Genarme Region - kaum Sequenzdaten - schlechte BAC Abdeckung
11p14.2	Neozentromer	mMCB, subCTM/ nicht publiziert	26.200			- keine bekannten Gene - keine BAC-Abdeckung - keine Sequenzdaten
11p11.11-q11	Zentromer-inaktivierung	mMCB, subCTM/ nicht publiziert	53.600			- Zentromerheterochromatin, Repeats - keine BAC-Abdeckung, bekannten Gene, Sequenzdaten
11q12.2	Inversion	mMCB / nicht publiziert	60.100	- MS4A1 - MS4A12 - MGC39681	- membrane spanning 4-domains, subfamily A, member 1 -membrane spanning 4-domains, subfamily A, member 12 - hypothetical protein MGC39681	
17pter	Deletion	PAC GS-202-L17/ nicht publiziert	60	- LOC390752 - RPH3AL	- similar to Buccalin precursor - rabphilin 3A-like	- sehr Genarme Region - Gene beginnen erst ab 90 kb
17q21.1	Inversion	zw. BAC RP11-294G4 u. RP11-749I16/ nicht publiziert	36.600			- keine bekannten Gene - lückenhafte BAC-Abdeckung - kaum Sequenzdaten
17q24.2	Inversion	mMCB / nicht publiziert	64.400	- MGC33887	- hypothetical protein MGC33887	- besonders Genarme Region
18pter	Inversion	siehe Schimpanse				
18q11.1	Inversion	siehe Schimpanse				
20pter	Inversion	distal von Subtelo 20p/ nicht publiziert	100	- DEFB125 - DEFB126 - DEFB127	- defensin, beta 125 - defensin, beta 126 - defensin, beta 127	- Genarme Region
20p13	Inversion	zw. Subtelo 20p u. BAC RP11-318P23/ nicht publiziert	4.400			- keine bekannten Gene

Fortsetzung Tabelle 3: Bruchpunkte des Orang-Utan

Bruch-punkt nach Homologie zu HSA	Zytogen. Rearrange-ment	Methode/ Referenz	kbp Abstand im Chromo-som von pter	Gene im Bruchpunkt bzw. Bruchpunkt-umgebung +/- 100 kb	Genprodukt bzw. Funktion (NCBI Stand März 2004)	Besonderheiten der Region
20q11.21	Inversion/ Inversion	zw. BAC RP11-310O13 u. RP11-243J16/ nicht publiziert	31.210	- XPX2 - MYLK2 - FKHL18 - DUSP15 - LOC164395 -C20orf126	- microtubule-associated protein homolog - myosin light chain kinase 2, skeletal muscle - forkhead-like 18 - dual specificity phosphatase-like 15 - hypothetical protein LOC164395 - chromosome 20 open reading frame 126	- Genreiche Region

Tabelle 8.3: Auflistung aller bekannten sowie neuen Bruchpunkte des Orang-Utans. Jeweils aufgelistet sind die zytogenetische Lage, Rearrangement, Quelle, Abstand von pter, Gene, Genprodukt, Besonderheiten der Region

Locus/ contig	Position on chr. 1 [kb]	Size [kb]	Homo-logy [%]	Identified genes or (predicted genes)	Gene with similarity to
1p36.1					-
NT 030584	16181.5-16183	0.5	92	-	-
	16184-16184.2	0.2	82	-	-
NT 077920	16062.7-16063.2	0.5	92	-	-
	16108-16123	15	91	-	-
	16129.5-16134	4.5	92	-	-
NT 004610	20886-20900.4	14.4	91	(LOC284666)	-
	20937-20959	22	90	DKFZp434D177*	LOC350719
1p12					-
NT 029860	107921-107922	1	84	FLJ32833*	LOC348474
	107940-107947	7	85	FLJ32833*	LOC348474
NT 004754	119520-119538	18	90	(LOC343505)	-
1q21					-
NT 077931	141970.5-141971	0.5	84	RNU1P10*, RNU1P6*	M25188, M25189
	141973-141974	1	79	RNU1P10*, RNU1P6*	M25188, M25189
	141996-141997	1	85	RNU1P10*, RNU1P6*	M25188, M25189
	142010-142017	7	87	RNU1P10*, RNU1P6*	M25188, M25189
	142023-142023.5	0.5	75	-	-
NT 077932	142201-142207	6	91	(LOC350856)*	-
	142222-142222.5	0.5	75	-	-
NT 077933	142339-142340	1	75	-	-
	142355-142362	7	90	(LOC348474)*	FLJ32833
	142459-142460	1	90	-	-
	142484-142492	8	97	(LOC348475/ KIAA1245)	KIAA1693/FLJ20719
NT 004434 = BAC RP11-35B4	142542-142572.5	30.5	98	KIAA1693/FLJ20719*	-
	143017-143182.3	165.3	98	(LOC148738)	-
NT 034398	143572.8-143573.4	0.6	86	-	-
	143580.5-143580.8	0.3	84	-	-
	143640-143669	29	96	(LOC200030)	KIAA1693/FLJ20719
NT 034400	143780.8-143822.7	41.9	96	(LOC149013/AB25)	DJ328E19.C1.1
	143900.3-143900.8	0.5	97	(LOC343232)*	-
	143914.5-143915.4	0.9	85	(LOC343232)*	-
	143927-143937	10	86	(LOC343232)*	-
	143939.2-143940.4	1.2	87	-	-
	143943.5-143944.5	1	85	-	-
NT 077935	145221-145221.5	0.5	81	(LOC286635)*	-
	145245-145247	2	89	-	-
NT 077936	145324-145325	1	85	-	-
	145386-145387	1	83	-	-
	145424-145425	1	90	(LOC343237)*	-

Fortsetzung Tablle 8.4

Locus/ contig	Position on chr. 1 [kb]	Size [kb]	Homo-logy [%]	Identified genes or (predicted genes)	Gene with similarity to
NT 034403	146067-146099.5	32.5	90	(LOC343241), (LOC339432)	KIAA1693
	145447-145448	1	88	-	-
	145460-145467	7	94	-	-
	145580.9-145610.2	29.3	94	(LOC343238)*, DJ328E19.C1.1	LOC285622
NT 034401	145700-15700.6	0.6	90	-	-
	145728-145747.7	19.7	97	MGC8902	-
	145756-145756.3	0.3	85	(LOC350717)*	-
	146174-146174.6	0.6	92	-	-
	146183.3-146183.6	0.3	89	RNU1P9*	-
	146205-146205.2	0.2	83	RNU1P9*	-
	146206-146206.4	0.4	93	RNU1P9*	-
	146213.5-146214	0.5	93	RNU1P9*	-
	146228.5-146228.8	0.3	89	RNU1P9*, (LOC284568)*	KIAA0493
NT 032962	146230-146240	10	89	-	-
	146370-146390	20	91	KIAA0493*	-
	146400-146410	10	75	-	-
	148760-148790	10	88	S100A10*	-

Tabelle 8.4: Ergebnis der Datenbankanalyse (NCBI) auf Homologien zur BAC RP11-35B4 Sequenz. Zeichenerklärung: *= nur Teile des Gens sind homolog zur BAC Sequenz, chr=Chromosom, miteinander verwandte Gene sind jeweils mit der gleichen Farbe markiert

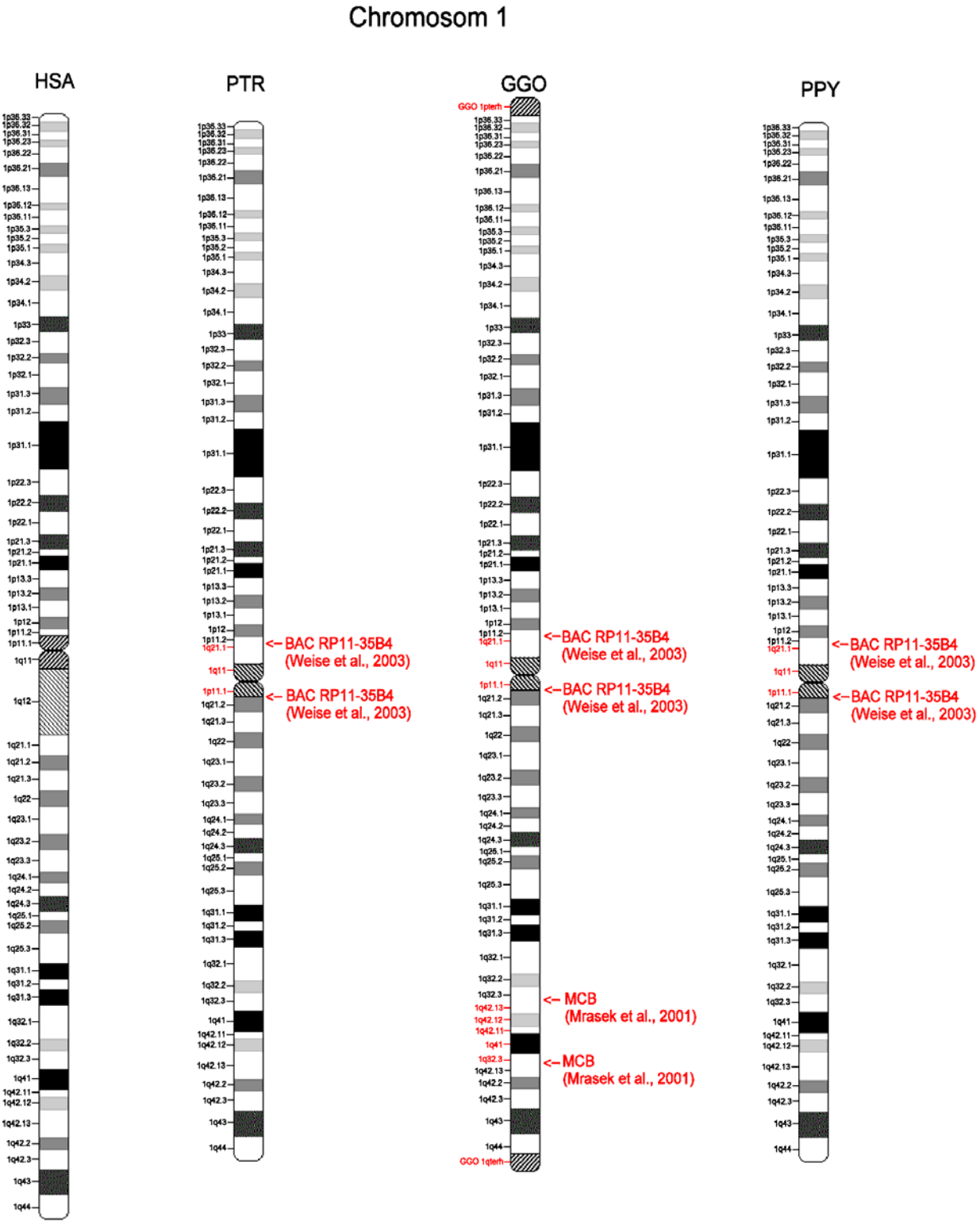
Nr.	Chr. Bande	Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte/ Erkrankungen (Quelle: Mitelman Datenbank)	"fragile sites" (Quelle: NCBI-Datenbank)	Evolutionär fixierte Bruchpunkte
1	1p36	del, t(1;3), add/ z.B. in AdenoCA, MDS, CML	FRA1A, microdel	Inversion bei HSA, PTR, GGO, PPY (Weise et al., in press)
2	1q21	del, dup, t(1;14), 1(1;19)/ z.B. AdenoCA, Malignes Melanom, ALL	FRA1F, "jumping translocation" Bruchpunkt	Inversionsbruchpunkt bei HSA im Vgl. zu PTR, GGO, PPY (Weise et al., in press)
3	2q13	del, t(2;3)/ z.B. AML, AdenoCA	FRA2B	Fusionsbruchpunkt des HSA 2; Inversionsbruchpunkt bei GGO im Vgl. zu PTR, terminales Heterochromatin bei PTR 12, 13; GGO 11,12 und PPY 11,12 (Yunis und Prakash, 1982)
4	2q37	add, t(2;13)/ z.B. AML, AdenoCA, Alveolar Rhabdomyosarkom	c-fra 2q37.3	terminales Heterochromatin bei GGO 11 (Yunis und Prakash, 1982)
5	5p13	add, del, t(5;9;22)/ z.B. Leiomyosarkom, PLL, CML	FRA5A	Inversionsbruchpunkt bei PTR 4 im Vgl. zu HSA (Yunis und Prakash, 1982)
6	7p22	add, t(7;22)/ z.B. ALL, MM, CML	FRA7B	terminales Heterochromatin bei PTR und GGO (Yunis und Prakash, 1982)
7	7q22	add, del, t(7;22)/ z.B. AML, ALL, AdenoCA, MDS, Leiomyom	FRA7F	interkalares Heterochromatin bei PTR 6 , Inversionsbruchpunkt bei GGO 6 im Vgl. zu HSA (Yunis und Prakash, 1982)
8	8q22	del, t(8;21)/ z.B. AdenoCA, AML, MDS	c-fra 8q22.1	Inversionsbruchpunkt bei GGO 7 im Vgl. zu HSA (Yunis und Prakash, 1982)
9	8q24	add, del, t(2;8), t(8;22), t(8;9)/ z.B. AML, AdenoCA, Burkitt Lymphom, ALL, MM,	c-fra 8q24.3	terminales Heterochromatin bei GGO (Yunis und Prakash, 1982)
10	11q13	add, del, t(11;14), / z.B. Adenome, ALL, B-CLL, MM, PCL, ML,	FRA11H	Inversionsbruchpunkt bei PPY 8 im Vgl. zu HSA (Yunis und Prakash, 1982)
11	17p12	add, del/ z.B. CML, ALL, AdenoCA	FRA17A, microdel	Translokationsbruchpunkt bei GGO t(4;19) (Yunis und Prakash, 1982)

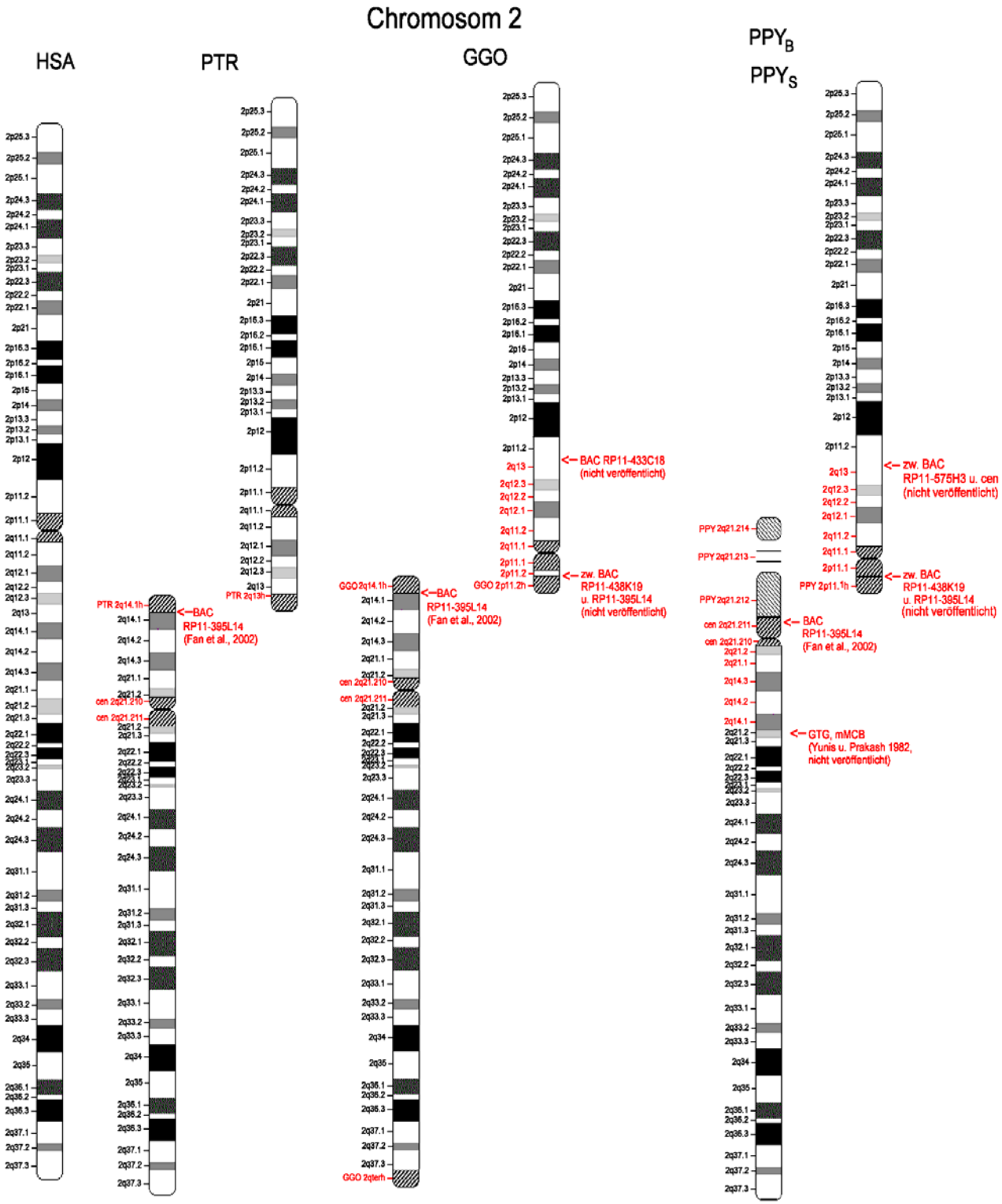
Tabelle 8.5: Gegenüberstellung chromosomaler Regionen, die neben Tumorassoziierten Bruchpunkten auch „fragile sites" und evolutionäre Bruchpunkte aufweisen. **add**, zusätzliches Material unbekannter Herkunft; **ALL**, akute lymphatische Leukämie; **CA**, Karzinom; **c-fra**, common „fragile site; **CLL**, chronisch lymphatische Leukämie;"; **CML**, chronisch myeloische Leukämie; **del**, Deletion; **dup**, Duplikation; **GGO**, *Gorilla gorilla*; **HSA**, *Homo sapiens*; **t**, Translokation; **MDS**, Myelodysplastisches Syndrom; **microdel**, Mikrodeletion; **MM**, multiples Melanom; **PCL**, Plasmazell Leukämie; **PLL**, Prolymphozyten Leukämie; **PPY**, *Pongo pygmaeus*; **PTR**, *Pan troglodytes*;

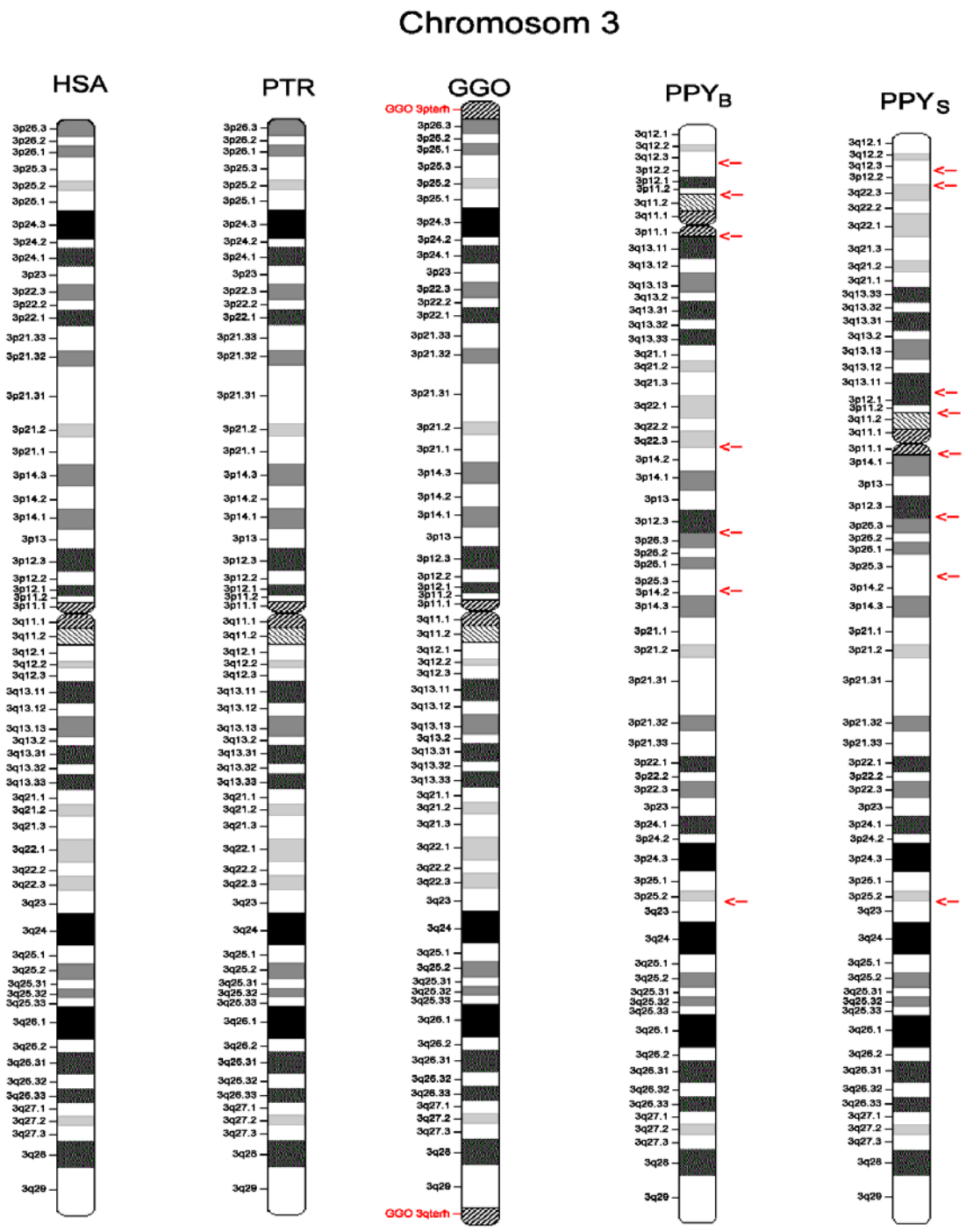
Konventionelle Chromosomennomenklatur der *Hominidae*

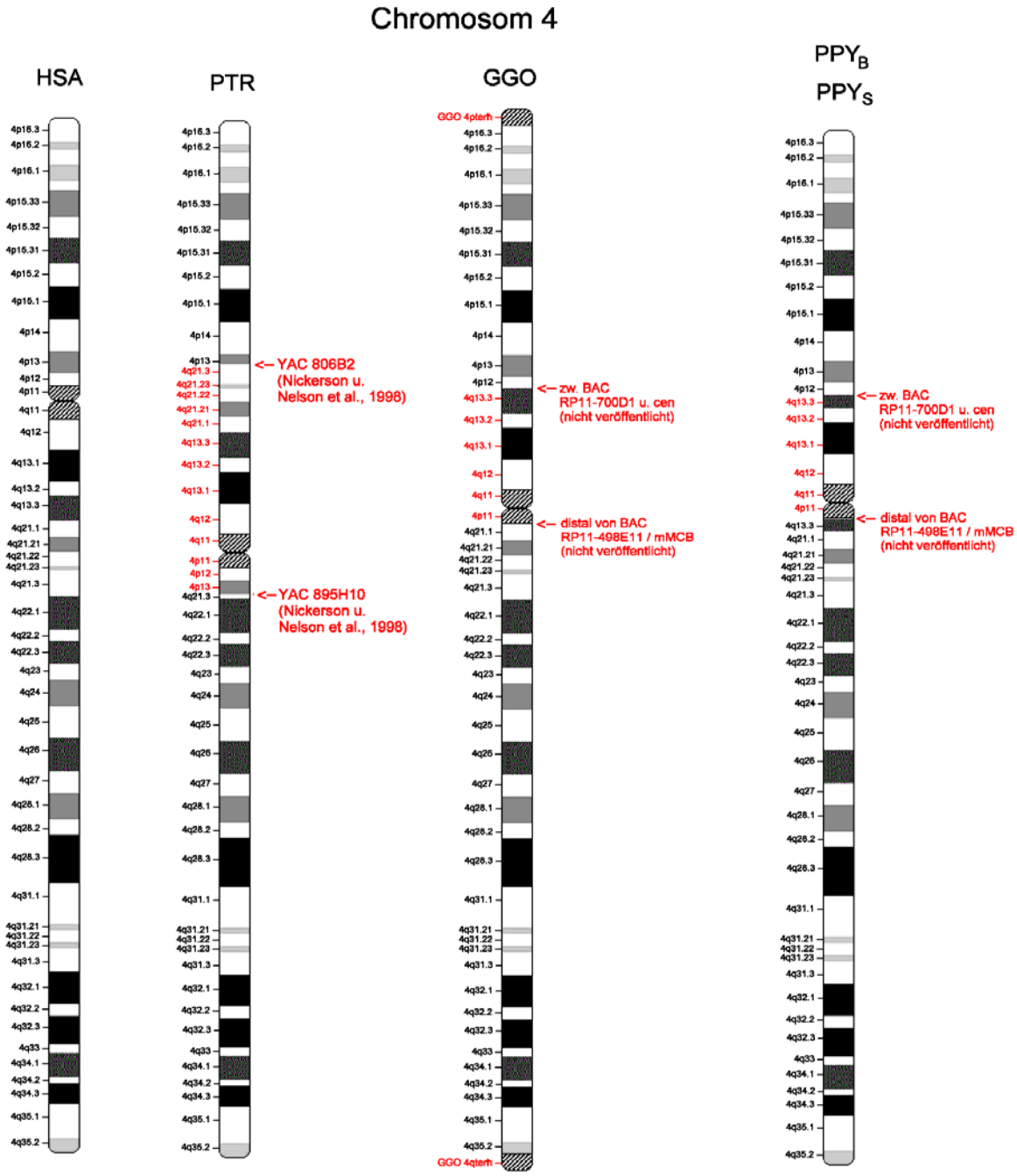
HSA	PTR	GGO	PPY
1	1	1	1
2p/2q	12/13	12/11	12/11
3	2	2	2
4	3	3	3
5	4	4	4
6	5	5	5
7	6	6	10
8	7	7	6
9	11	13	13
10	8	8	7
11	9	9	8
12	10	10	9
13	14	14	14
14	15	18	15
15	16	15	16
16	18	17	18
17	19	19	19
18	17	16	17
19	20	20	20
20	21	21	21
21	22	22	22
22	23	23	23
X	X	X	X
Y	Y	Y	Y

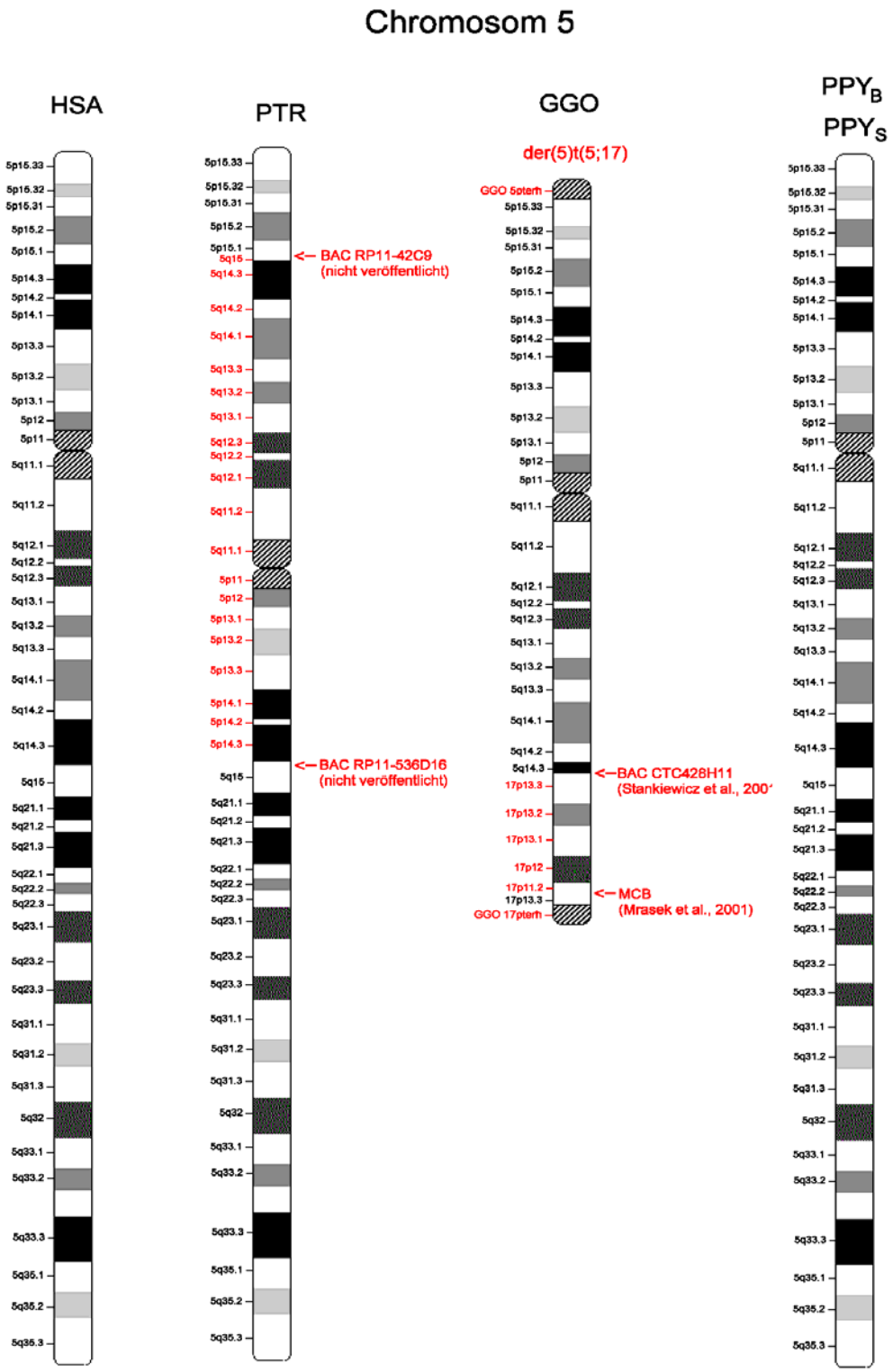
Tabelle 8.6: Tabellarische Gegenüberstellung der konventionellen Chromosomennomenklatur der *Hominidae* nach Yunis und Prakash, 1982.

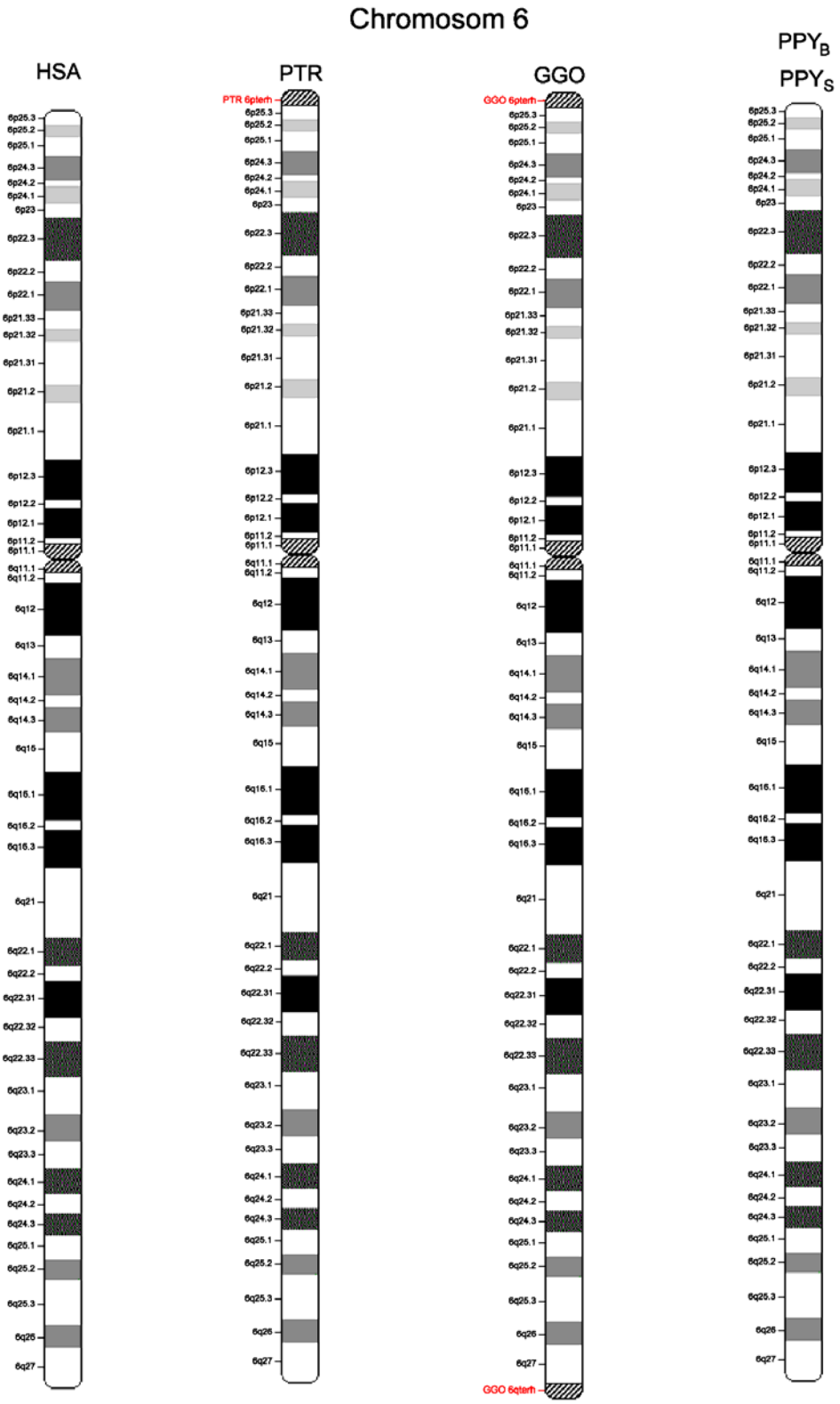

Chromosom 1
HSA
PTR
GGO
PPY
<-- BAC RP11-35B4 (Weise et al., 2003)
<-- BAC RP11-35B4 (Weise et al., 2003)
<-- MCB (Mrasek et al., 2001)
<-- MCB (Mrasek et al., 2001)

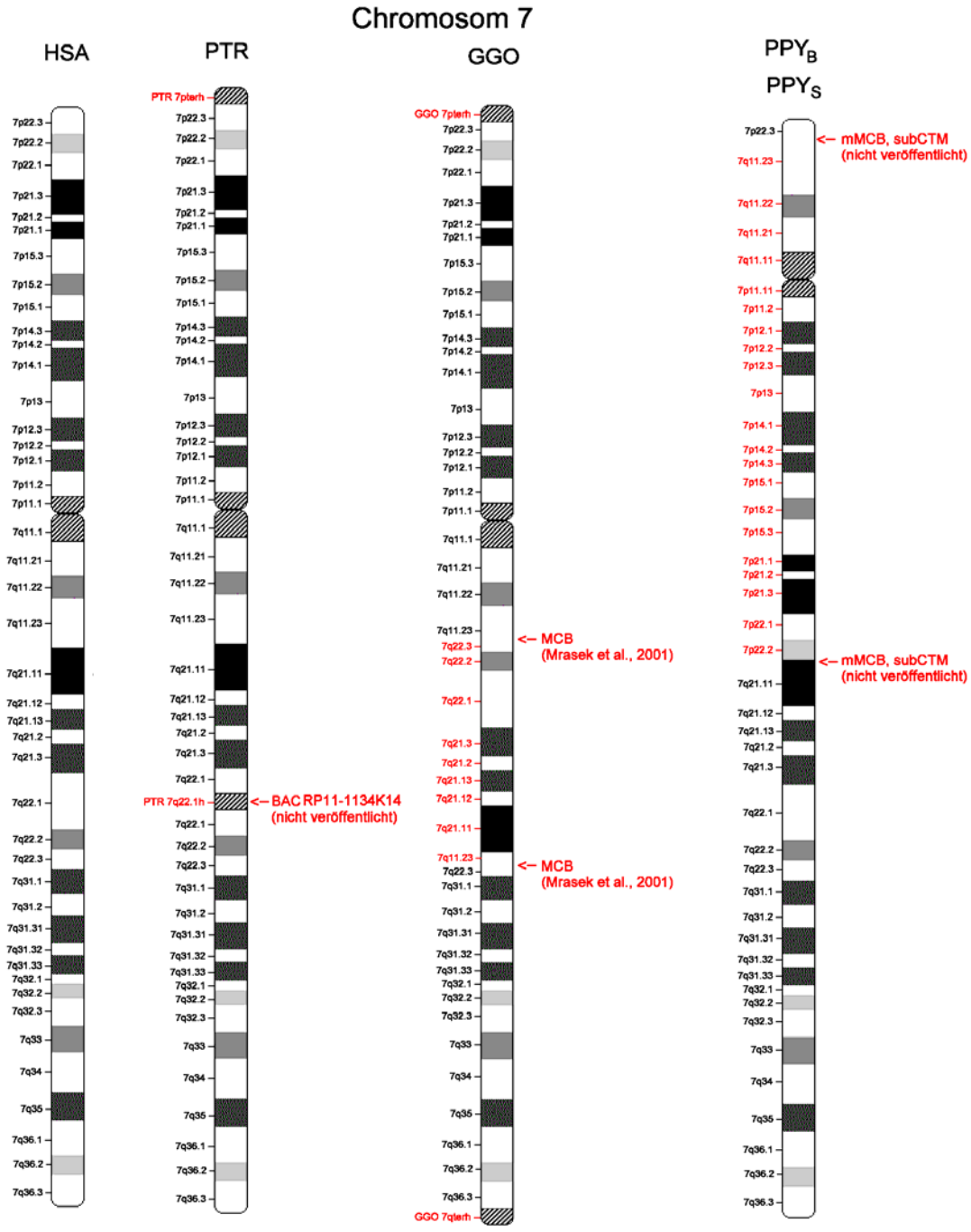

Chromosom 2
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
PTR 2q14.1h
PTR 2q13h
BAC
RP11-395L14
(Fan et al., 2002)
cen 2q21.210
cen 2q21.211
BAC RP11-433C18
(nicht veröffentlicht)
zw. BAC
RP11-438K19
u. RP11-395L14
(nicht veröffentlicht)
GGO 2q14.1h
GGO 2p11.2h
GGO 2qterh
zw. BAC
RP11-575H3 u. cen
(nicht veröffentlicht)
PPY 2q21.214
PPY 2q21.213
PPY 2q21.212
PPY 2p11.1h
GTG, mMCB
(Yunis u. Prakash 1982,
nicht veröffentlicht)

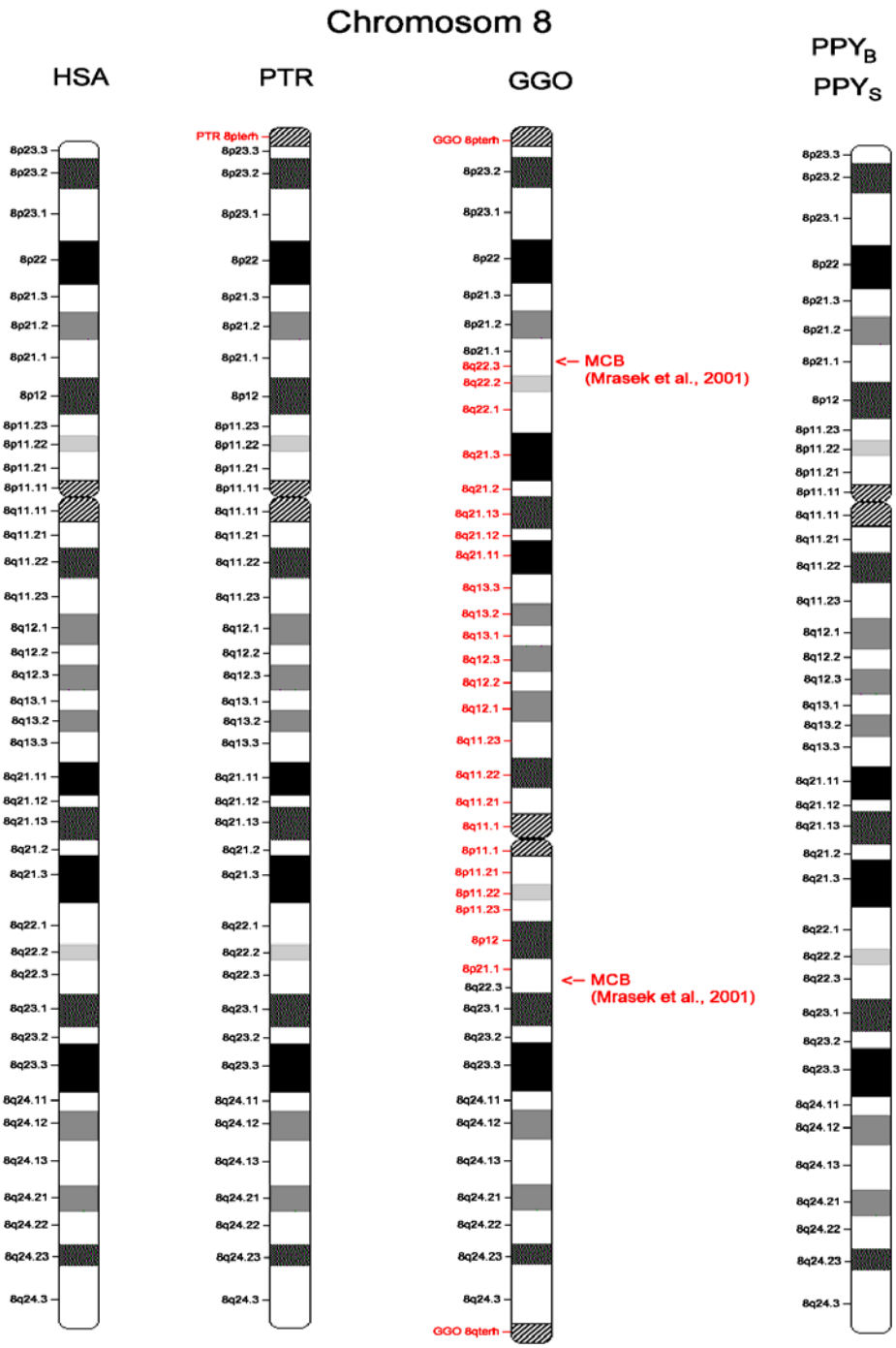

Chromosom 3
HSA
PTR
GGO
PPYB
PPYS
GGO 3pterh
GGO 3qterh

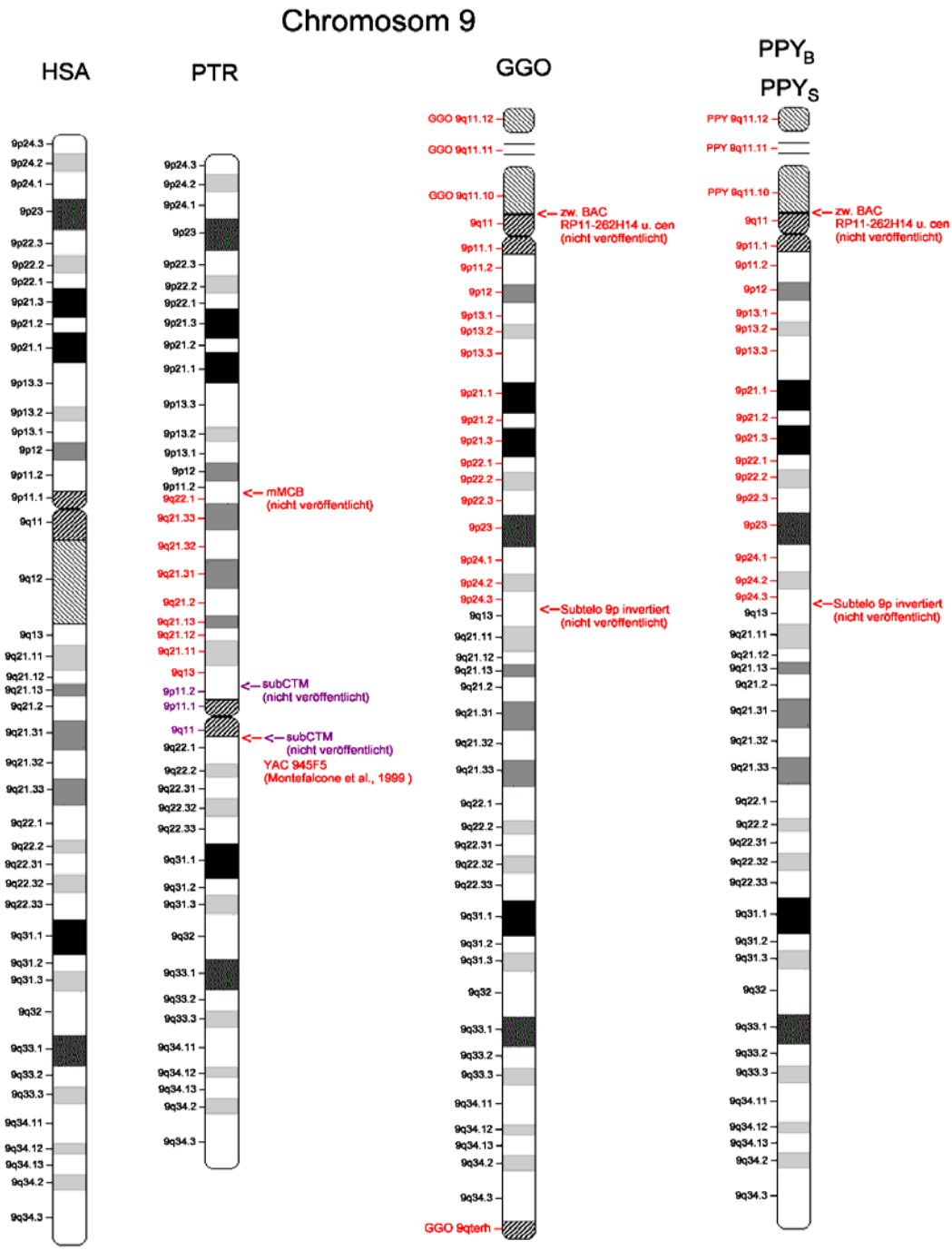

Chromosom 4
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
<-- YAC 806B2 (Nickerson u. Nelson et al., 1998)
<-- YAC 895H10 (Nickerson u. Nelson et al., 1998)
<-- zw. BAC RP11-700D1 u. cen (nicht veröffentlicht)
<-- distal von BAC RP11-498E11 / mMCB (nicht veröffentlicht)

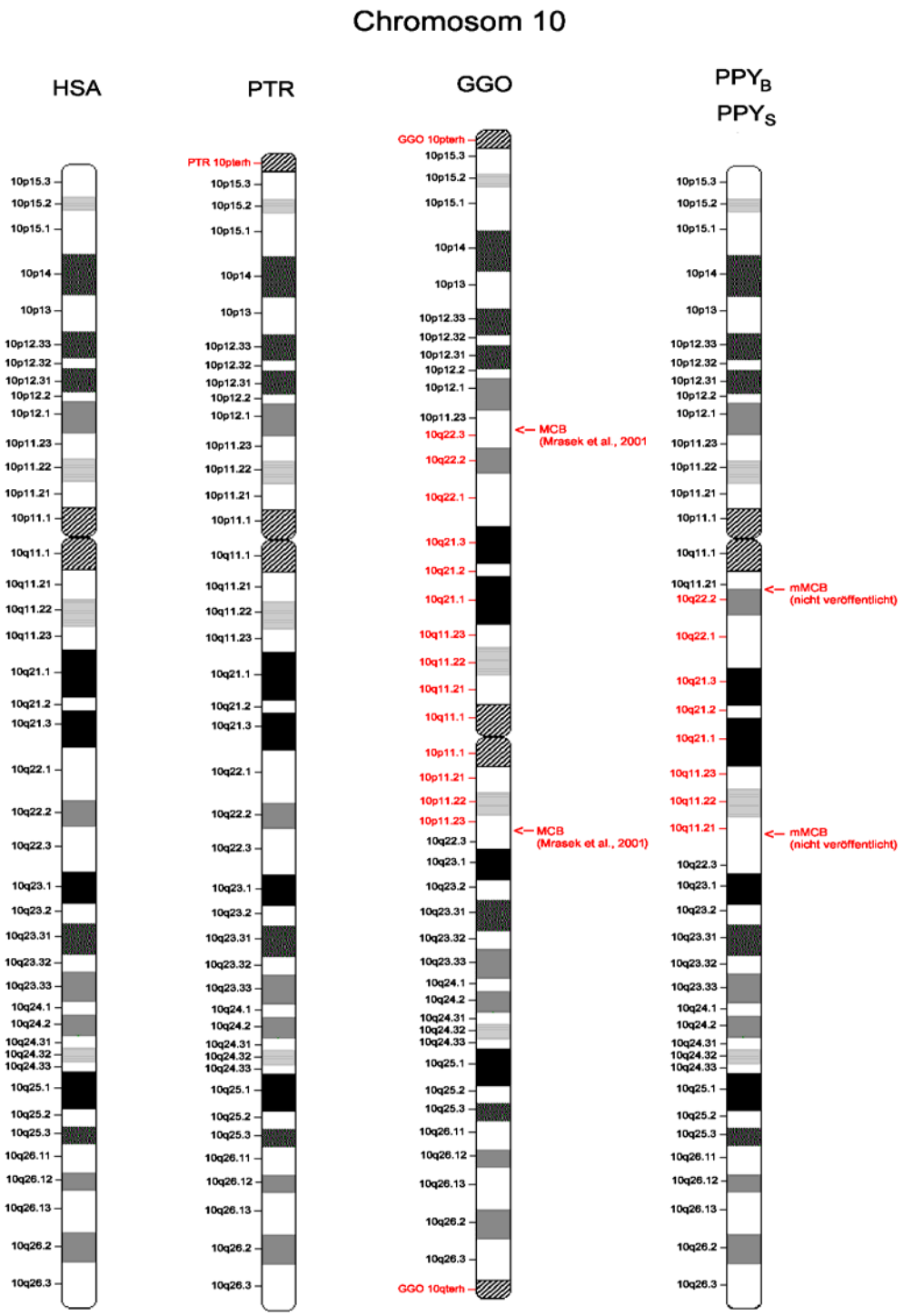

Chromosom 5
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
der(5)t(5;17)
<— BAC RP11-42C9
(nicht veröffentlicht)
<— BAC RP11-536D16
(nicht veröffentlicht)
<—BAC CTC428H11
(Stankiewicz et al., 200
<— MCB
(Mrasek et al., 2001)

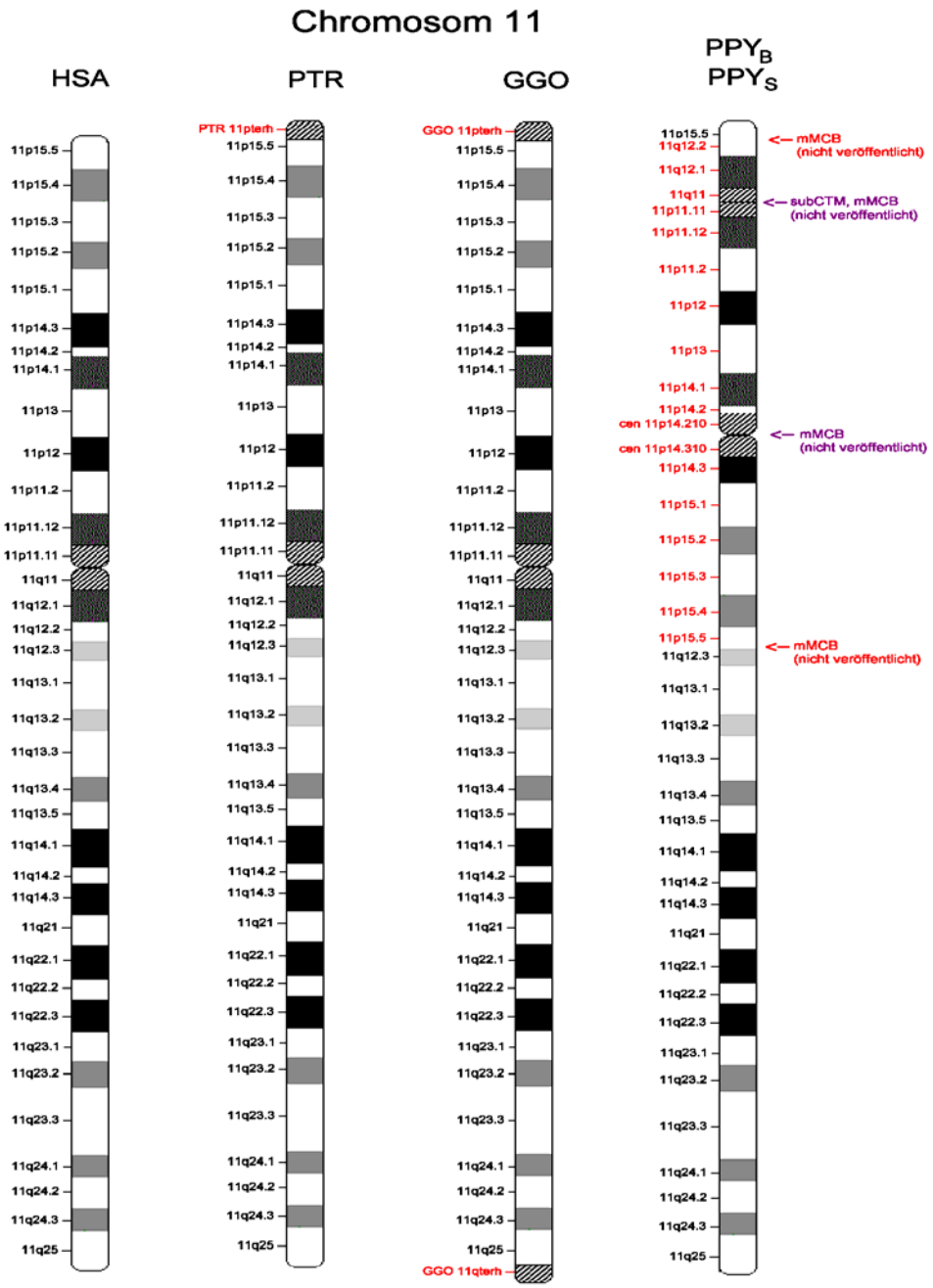

Chromosom 6
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
PTR 6pterh
GGO 6pterh
GGO 6qterh

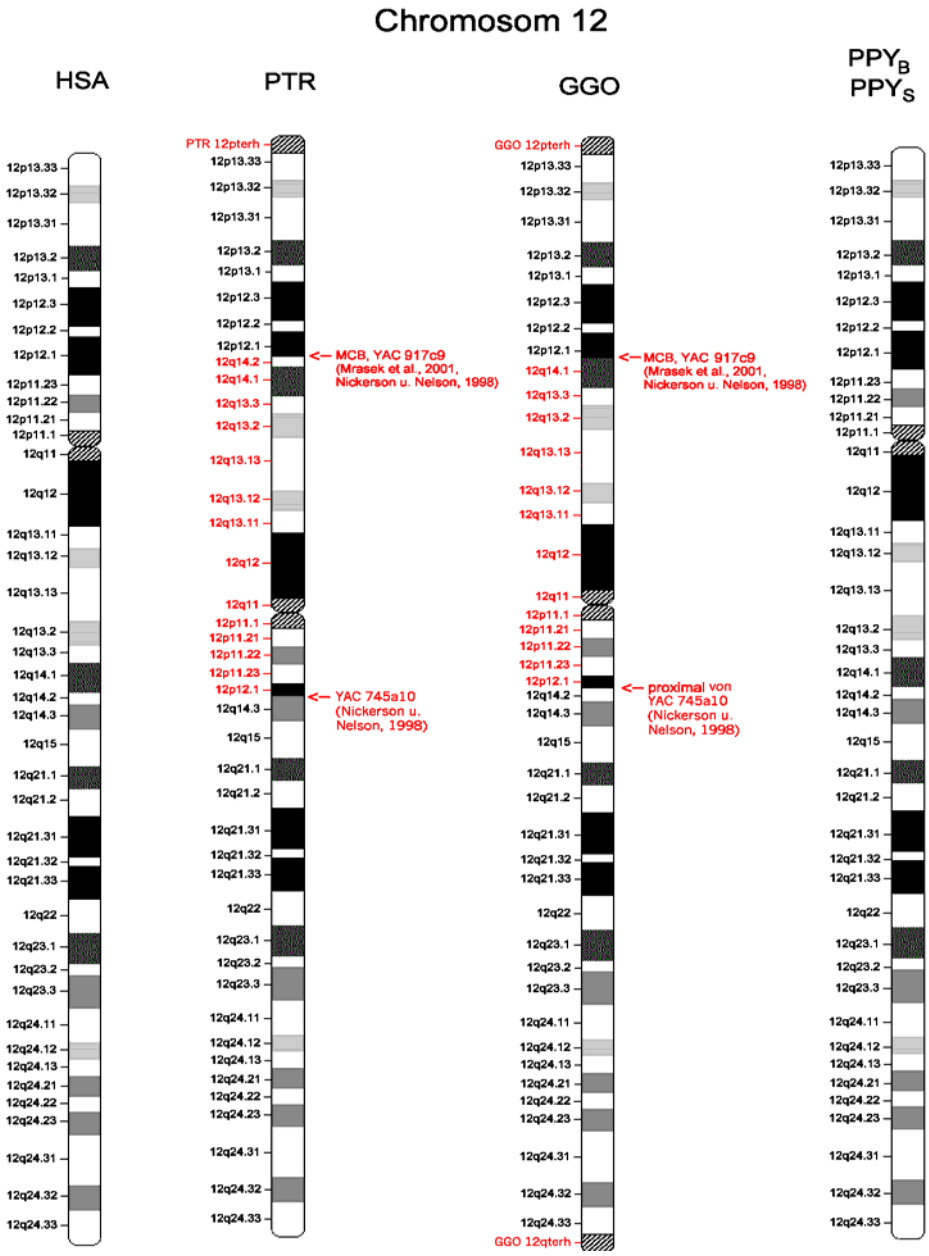

Chromosom 7
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
PTR 7pterh
PTR 7q22.1h
<– BAC RP11-1134K14
(nicht veröffentlicht)
GGO 7pterh
GGO 7qterh
<– MCB
(Mrasek et al., 2001)
<– MCB
(Mrasek et al., 2001)
<– mMCB, subCTM
(nicht veröffentlicht)
<– mMCB, subCTM
(nicht veröffentlicht)

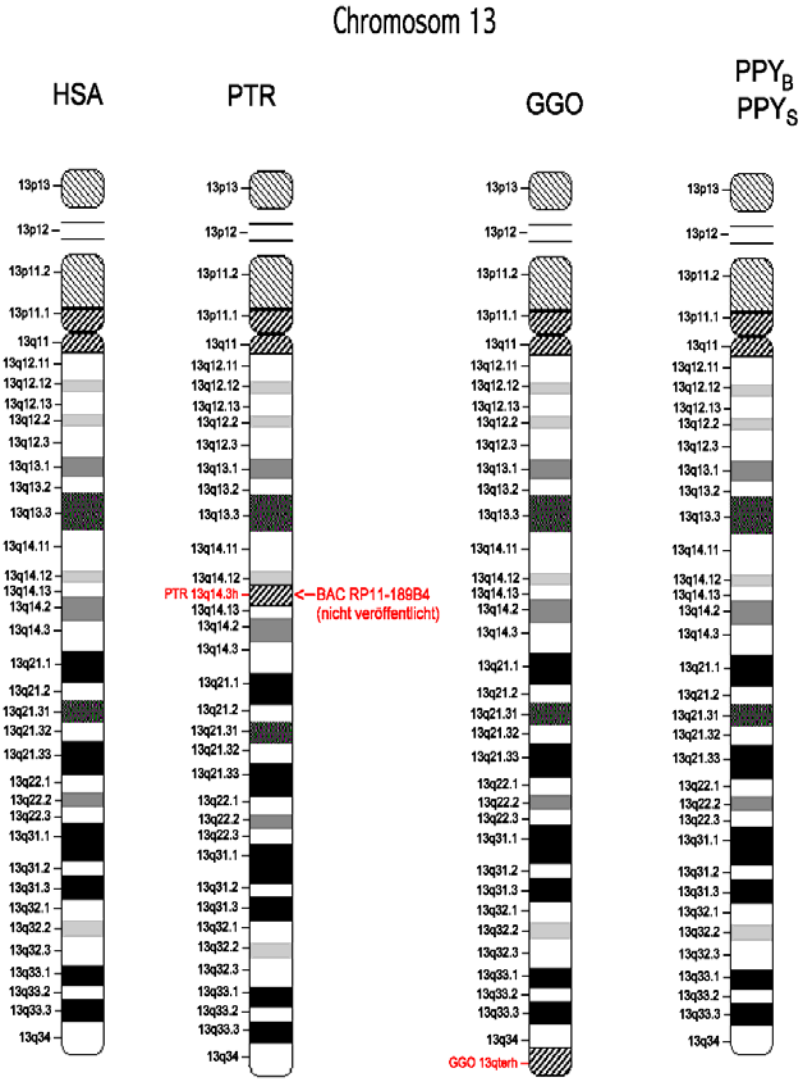

Chromosom 8
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
PTR 8pterh
GGO 8pterh
GGO 8qterh
<-- MCB
(Mrasek et al., 2001)
<-- MCB
(Mrasek et al., 2001)

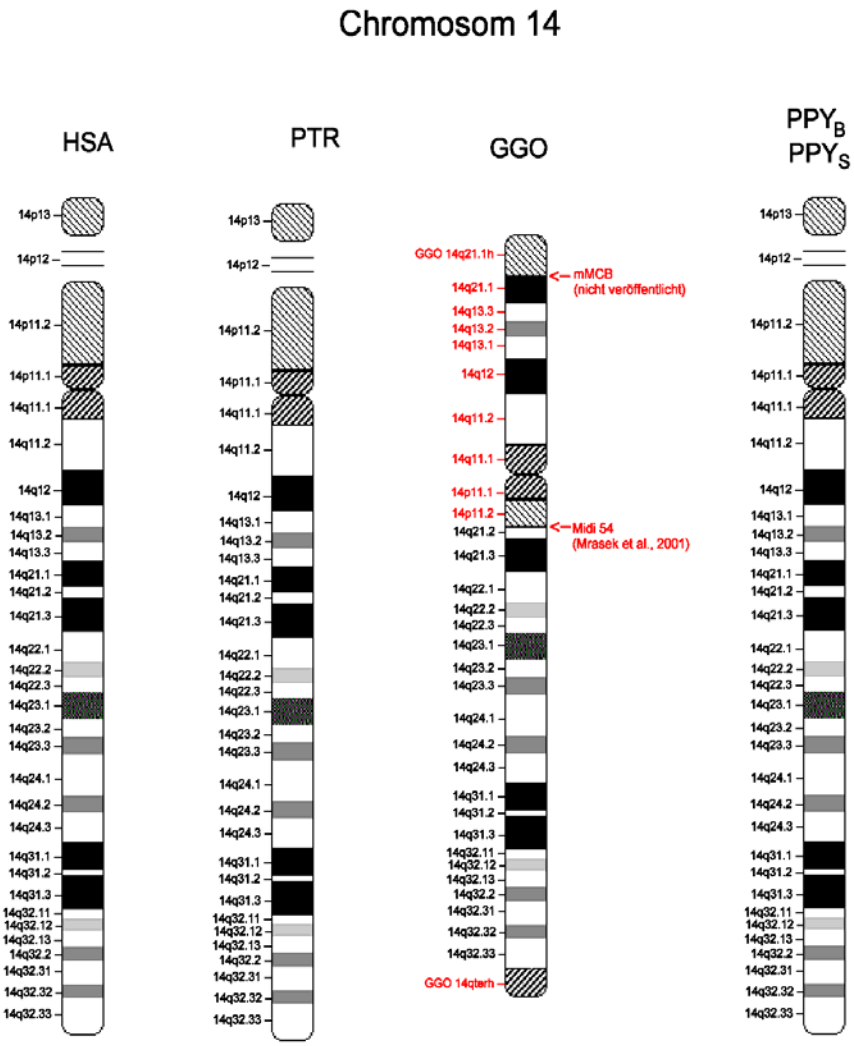

Chromosom 9
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
<-- mMCB
(nicht veröffentlicht)
<-- subCTM
(nicht veröffentlicht)
<-- subCTM
(nicht veröffentlicht)
YAC 945F5
(Montefalcone et al., 1999)
<-- zw. BAC
RP11-262H14 u. cen
(nicht veröffentlicht)
<--Subtelo 9p invertiert
(nicht veröffentlicht)
<-- zw. BAC
RP11-262H14 u. cen
(nicht veröffentlicht)
<--Subtelo 9p invertiert
(nicht veröffentlicht)

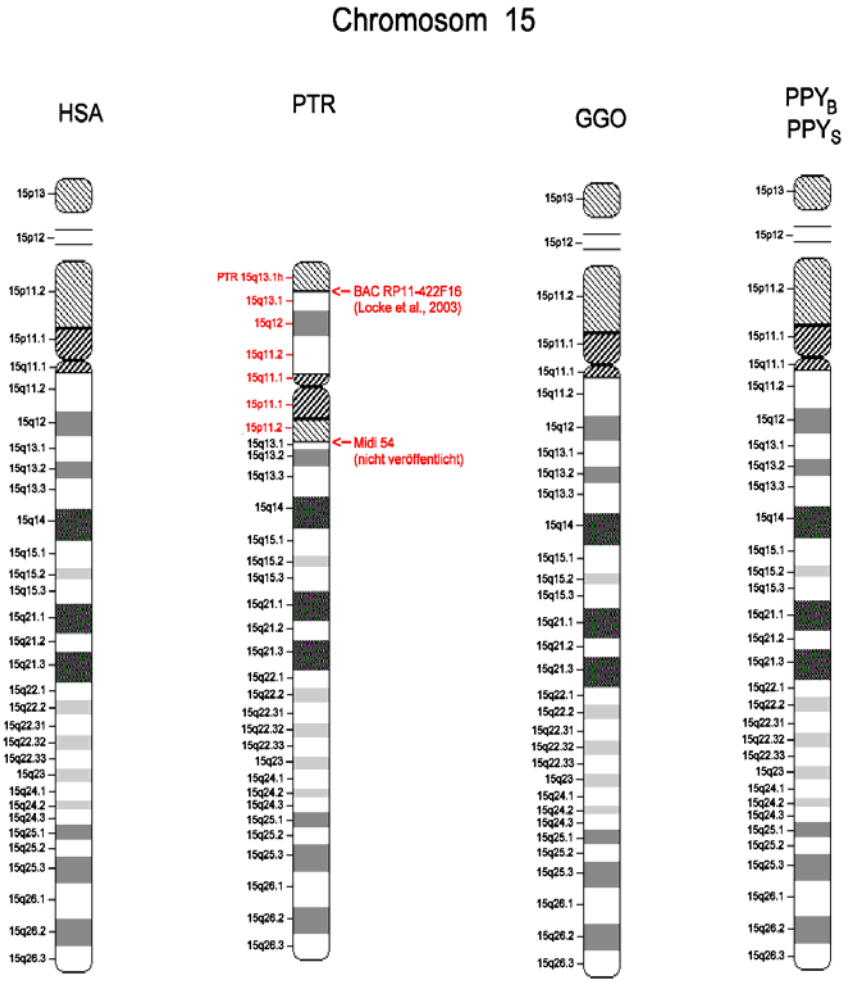

Chromosom 10
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
PTR 10pterh
GGO 10pterh
GGO 10qterh
MCB
(Mrasek et al., 2001
MCB
(Mrasek et al., 2001)
mMCB
(nicht veröffentlicht)
mMCB
(nicht veröffentlicht)

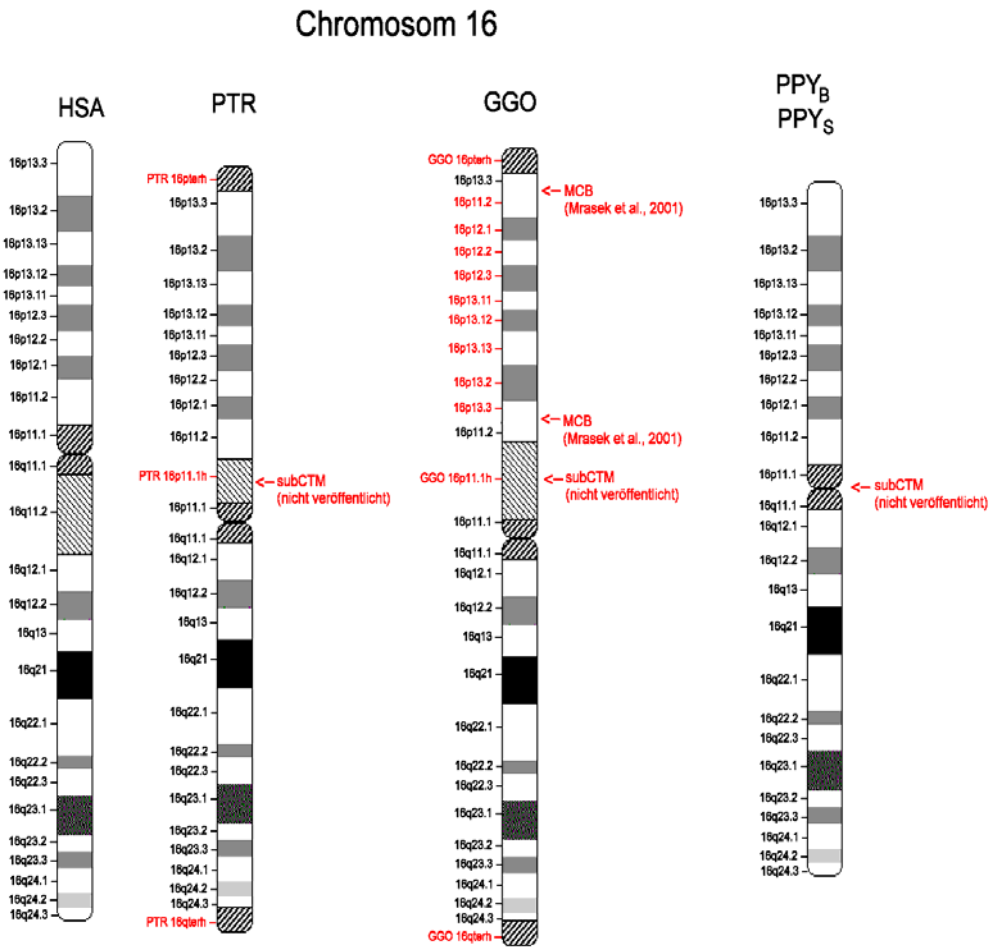

Chromosom 11
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
PTR 11pterh
GGO 11pterh
GGO 11qterh
11p15.5
11p15.4
11p15.3
11p15.2
11p15.1
11p14.3
11p14.2
11p14.1
11p13
11p12
11p11.2
11p11.12
11p11.11
11q11
11q12.1
11q12.2
11q12.3
11q13.1
11q13.2
11q13.3
11q13.4
11q13.5
11q14.1
11q14.2
11q14.3
11q21
11q22.1
11q22.2
11q22.3
11q23.1
11q23.2
11q23.3
11q24.1
11q24.2
11q24.3
11q25
11q12.2
11q12.1
11q11
11p11.11
11p11.12
11p11.2
11p12
11p13
11p14.1
11p14.2
cen 11p14.210
cen 11p14.310
11p14.3
11p15.1
11p15.2
11p15.3
11p15.4
11p15.5
11q12.3
<— mMCB (nicht veröffentlicht)
<— subCTM, mMCB (nicht veröffentlicht)
<— mMCB (nicht veröffentlicht)
<— mMCB (nicht veröffentlicht)

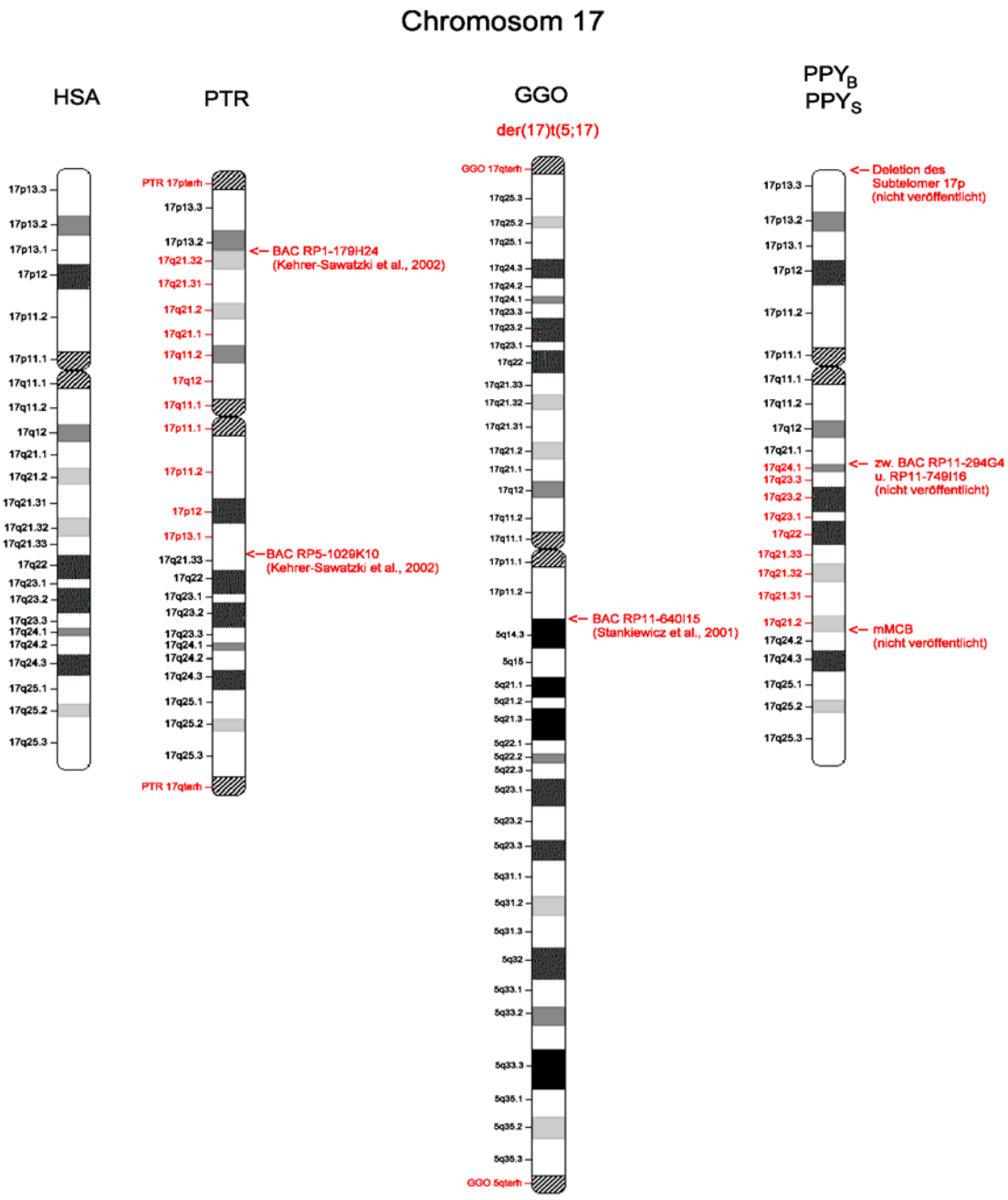

Chromosom 12
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
PTR 12pterh
GGO 12pterh
GGO 12qterh
<-- MCB, YAC 917c9 (Mrasek et al., 2001, Nickerson u. Nelson, 1998)
<-- YAC 745a10 (Nickerson u. Nelson, 1998)
<-- proximal von YAC 745a10 (Nickerson u. Nelson, 1998)

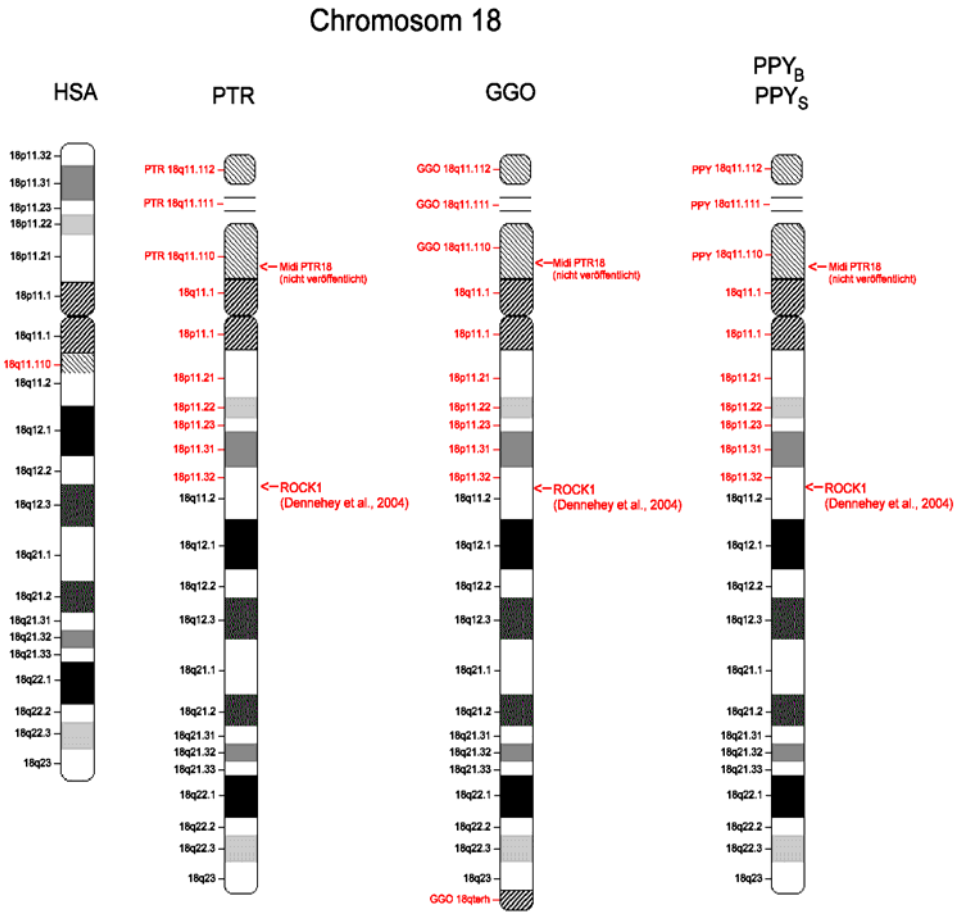

Chromosom 13
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
PTR 13q14.3h
<—BAC RP11-188B4
(nicht veröffentlicht)
GGO 13qterh

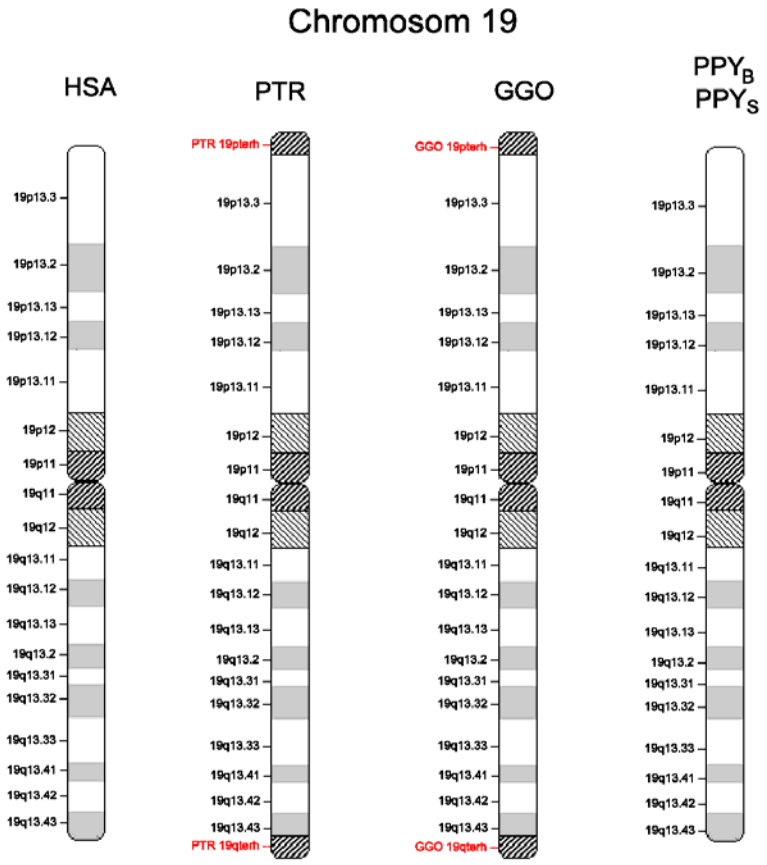

Chromosom 14
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
GGO 14q21.1h
mMCB
(nicht veröffentlicht)
Midi 54
(Mrasek et al., 2001)
GGO 14qterh


Chromosom 15
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
PTR 15q13.1h
BAC RP11-422F16
(Locke et al., 2003)
Midi 54
(nicht veröffentlicht)

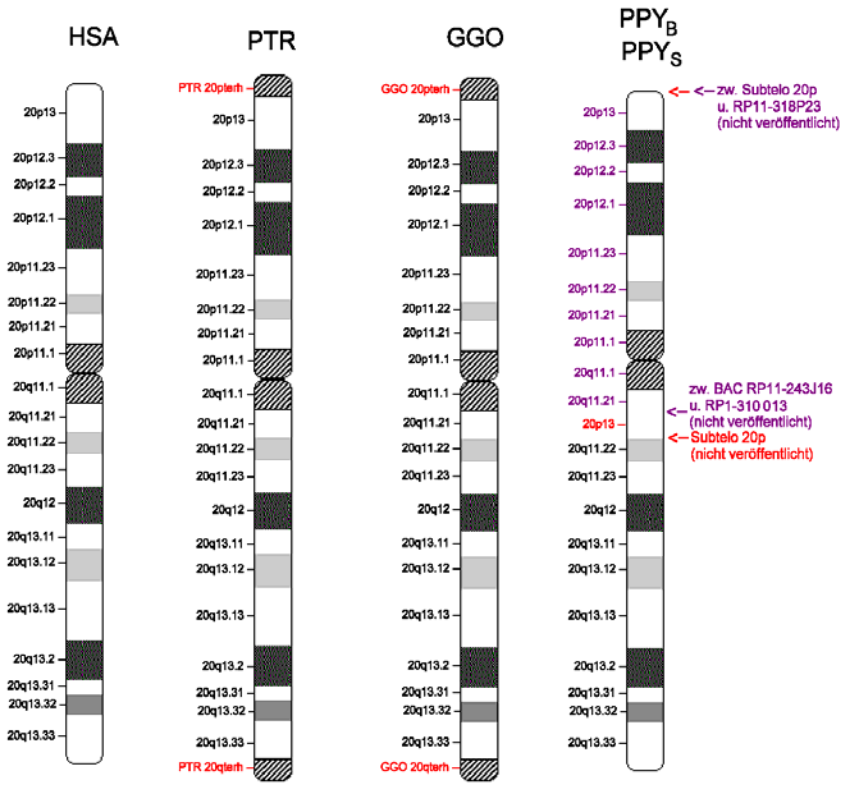

Chromosom 16
HSA
PTR
GGO
PPY_B
PPY_S
PTR 16pterh
PTR 16p11.1h
PTR 16qterh
subCTM
(nicht veröffentlicht)
GGO 16pterh
GGO 16p11.1h
GGO 16qterh
MCB
(Mrasek et al., 2001)
MCB
(Mrasek et al., 2001)
subCTM
(nicht veröffentlicht)
subCTM
(nicht veröffentlicht)


Chromosom 17
HSA
PTR
GGO
der(17)t(5;17)
PPY$_B$
PPY$_S$
<— BAC RP1-179H24
(Kehrer-Sawatzki et al., 2002)
<—BAC RP5-1029K10
(Kehrer-Sawatzki et al., 2002)
<— BAC RP11-640I15
(Stankiewicz et al., 2001)
<— Deletion des
Subtelomer 17p
(nicht veröffentlicht)
<— zw. BAC RP11-294G4
u. RP11-749I16
(nicht veröffentlicht)
<— mMCB
(nicht veröffentlicht)

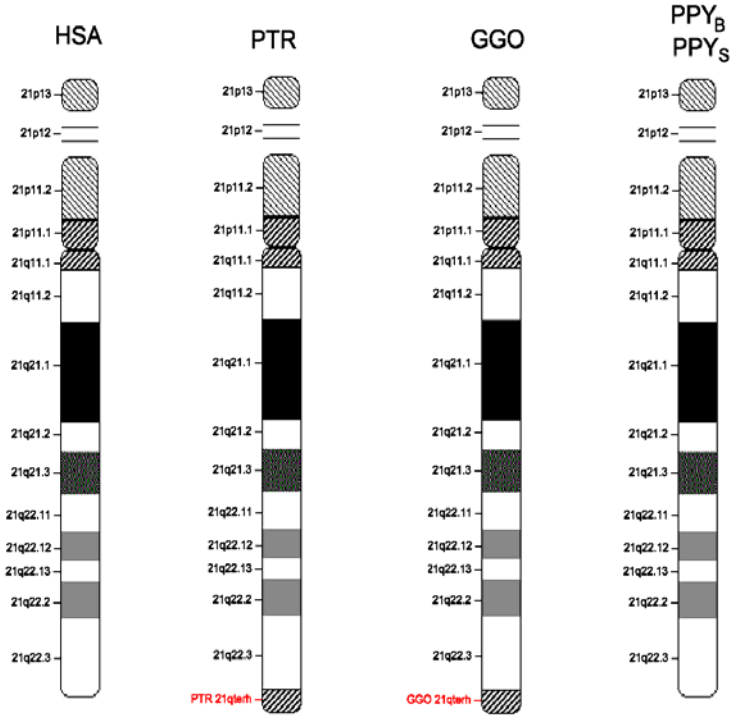

Chromosom 18
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
Midi PTR18
(nicht veröffentlicht)
ROCK1
(Dennehey et al., 2004)

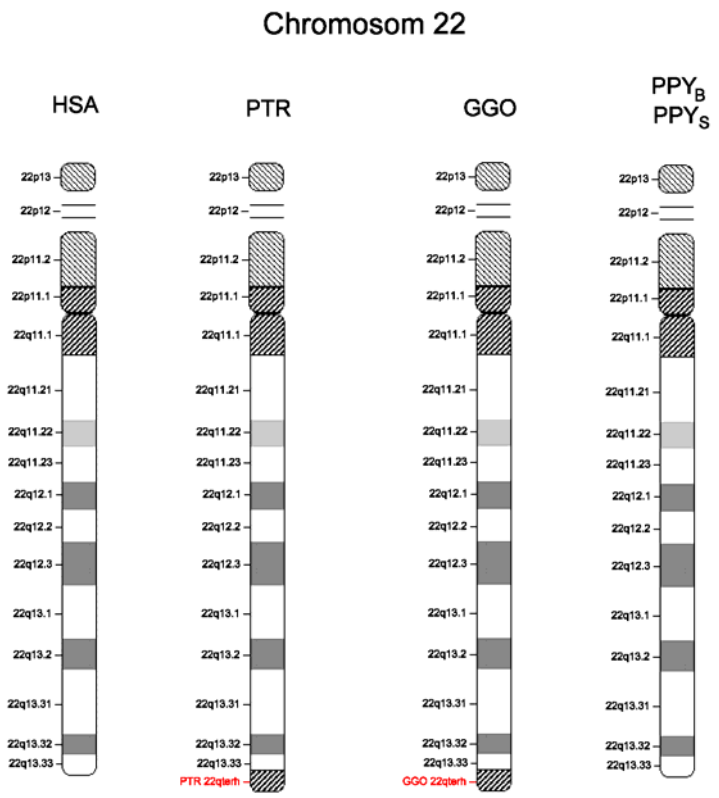

Chromosom 19
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$

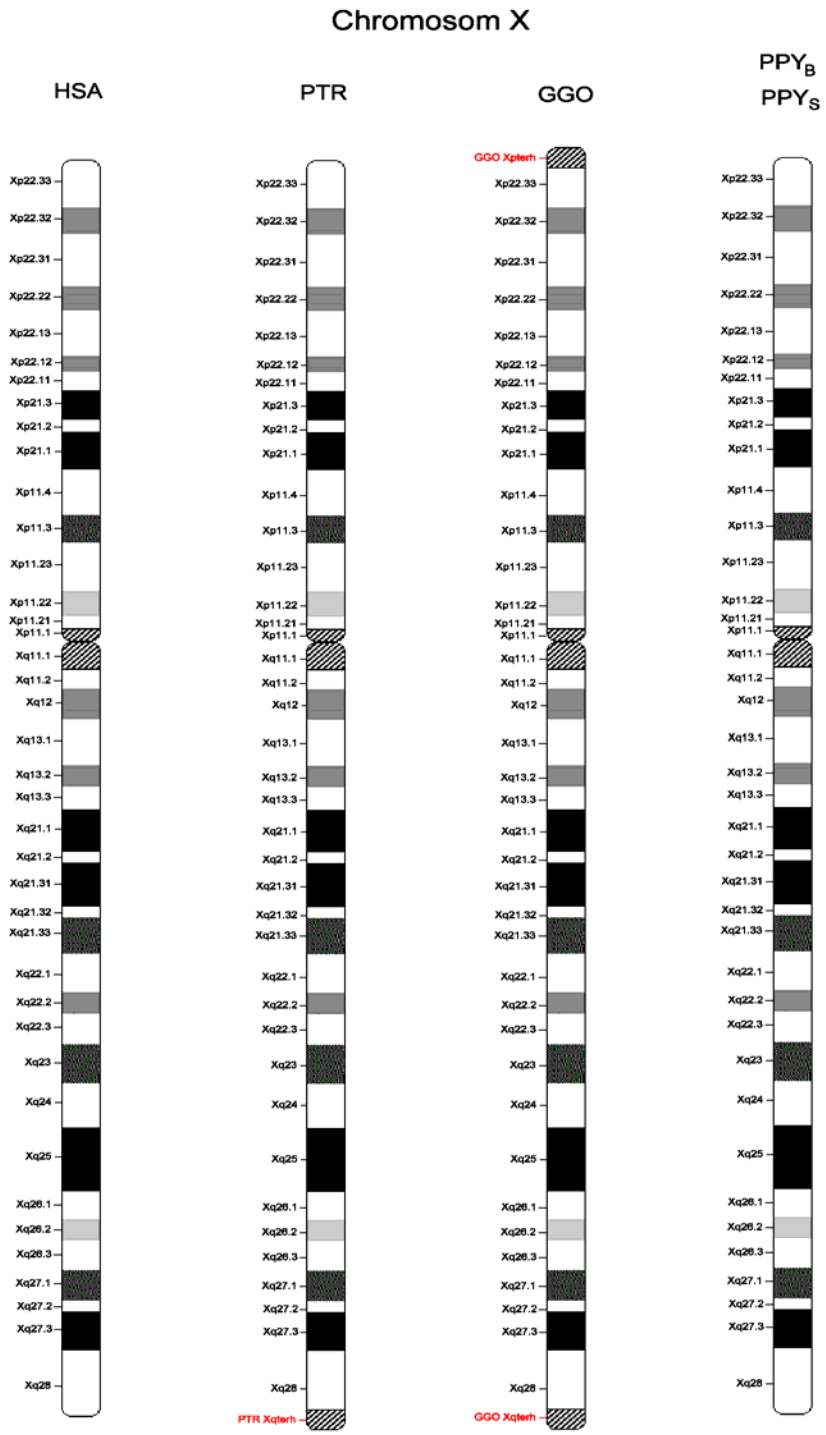
Chromosom 20



Chromosom 21




Chromosom 22
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
22p13
22p12
22p11.2
22p11.1
22q11.1
22q11.21
22q11.22
22q11.23
22q12.1
22q12.2
22q12.3
22q13.1
22q13.2
22q13.31
22q13.32
22q13.33
PTR 22qterh
GGO 22qterh


Chromosom X
HSA
PTR
GGO
PPY$_B$
PPY$_S$
GGO Xpterh
PTR Xqterh
GGO Xqterh
Xp22.33
Xp22.32
Xp22.31
Xp22.22
Xp22.13
Xp22.12
Xp22.11
Xp21.3
Xp21.2
Xp21.1
Xp11.4
Xp11.3
Xp11.23
Xp11.22
Xp11.21
Xp11.1
Xq11.1
Xq11.2
Xq12
Xq13.1
Xq13.2
Xq13.3
Xq21.1
Xq21.2
Xq21.31
Xq21.32
Xq21.33
Xq22.1
Xq22.2
Xq22.3
Xq23
Xq24
Xq25
Xq26.1
Xq26.2
Xq26.3
Xq27.1
Xq27.2
Xq27.3
Xq28

9 Lebenslauf

Name:	Anja Weise
Geboren am:	19.12.1977 in Karl-Marx-Stadt
Familienstand:	ledig
Adresse:	Leipziger Straße 72, 07743 Jena
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulausbildung:	
1984-1991	Polytechnische Oberschule V Oelsnitz/Erzgeb.
1991-1996	Gymnasium Oelsnitz
Hochschulausbildung:	
1996-2001	Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Genetik, Medizinische Mikrobiologie, Ökologie
2001-2002	Diplomarbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena mit dem Thema: "Molekularzytogenetische Feinanalyse des menschlichen Chromosoms 2 unter besonderer Berücksichtigung des High resolution multi-color-banding (MCB)“
Oktober 2002	Erlangung des akademischen Grades der Diplom-Biologin
ab Oktober 2002	Promotionsstudentin am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
Wissenschaftliche Laufbahn:	
August 2002-Juli 2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekts mit dem Thema: „Bio-Geo-Interaktionen zu Mobilisierung, Transport und langfristiger Immobilisierung von Schwermetallen unter besonderer Berücksichtigung von Radionukleotiden am Beispiel der ostthüringischen Uranbergbauregion“. Teilprojekt: “Gen-Umwelt-Interaktionen durch SDAG-Wismutrelevante Wasserproben an Humanzellen“
April 2002	Forschungsaufenthalt am Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, Frankreich bei Dr. Franck Pellestor, gefördert durch Boehringer Ingelheim Fonds

Jena, den 02.06.04

10 Publikationsliste

Originalarbeiten

2002

P1 **Weise A**, Starke H, Heller A, Claussen U, Liehr T. Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis – a multicolor banding (MCB) analysis. Int J Mol Med 2002, Vol 9, pp 359-361.

P2 Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, **Weise A**, Kuechler A, Claussen U. Microdissection based high resolution multicolor banding (MCB) for all 24 human chromosomes. Int J Mol Med 2002, Vol 9, pp 335-339.

P3 **Weise A**, Starke H, Heller A, Tönnies H, Volleth M, Stumm M, Senger G, Nietzel A, Claussen U, Liehr T. Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterized by high resolution multicolor banding (MCB) and region specific FISH probes. J Med Genet 2002, Vol 39, pp 434-439.

P4 Liehr T, **Weise A**, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Weier HU, Claussen U. Multi-color chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. Cytogenet Genome Res 2002, Vol. 97, pp 43-50.

P5 Trappe R, Bohm D, Kohlhase J, **Weise A**, Liehr T, Essers G, Meins M, Zoll B, Bartels I, Burfeind P. A novel family-specific translocation t(2;20)(p24.1;q13.1) associated with recurrent abortions: molecular characterization and segregation analysis in male meiosis. Cytogenet Genome Res. 2002;98(1):1-8.

2003

P6 Liehr T, Nietzel A, **Weise A**, Mrasek K, von Eggeling F, Claussen U, Starke H. A stratagy for the characterization of small supernumerary marker chromosomes (SMC). 2003 BJMG, 6 (3&4), Supplement

P7 **Weise A**, Rittinger O, Starke H, Ziegler M, Claussen U, Liehr T. 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. 2003;103(1-2):14-16

P8 Liehr T, Starke H, Heller A, **Weise A**, Beensen V, Senger G, Kittner G, Prechtel M, Claussen U, Seidel J. Evidence for a new microdeletion syndrome in 15q21. Int J Mol Med 2003, Vol. 11, pp 575-577.

P9. 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. Small supernumerary marker chromosomes (SMC): genotype – phenotype correlation and classification. Hum Genet. 2003 Dec;114(1):51-67. Epub 2003 Sep 16

P10 **Weise A**, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. Cytogenet Genome Res. 2003;103(1-2):34-39.

P11 Sauter S, von Beust G, Burfeind P, **Weise A**, Starke H, Liehr T, Zoll B. Autistic disorder and chromosomal mosaicism 46,XY[123]/46,XY,del(20)(pter --> p12.2)[10]. Am J Med Genet. 2003 Aug 1;120A(4):533-536.

P12 von Eggeling F, Langer S, Hoppe C, Liehr T, **Weise A**, Lederer G, Kotzot D. Presumed mutation in a microsatellite marker mimicking segmental uniparental disomy in a case of a small supernumerary marker chromosome detected at prenatal diagnosis. Clin Genet. 2003 Aug;64(2):168-171.

P13 Schaeferhenrich A, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, Kuechler A, Haag N, **Weise A**, Liehr T, Claussen U, Marian B, Sendt W, Scheele J, Pool-Zobel BL. Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. Mutat Res. 2003 May 15;526(1-2):19-32.

P14 **Weise A**, Liehr T, Efferth T, Kuechler A, Gebhart E. Comparative M-FISH and CGH analyses in sensitive and drug-resistant human T-cell acute leukemia cell lines. Cytogenet Genome Res. 2002;98(2-3):118-125.

P15 Kuechler A, **Weise A**, Michel S, Schaeferhenrich A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T. Precise breakpoint characterization of the colon adenocarcinoma cell line HT-29 clone 19A by means of 24-color fluorescence in situ hybridization and multicolor banding. Genes Chromosomes Cancer. 2003 Feb;36(2):207-210.

P16 **Weise A**, Harbarth P, Claussen U, Liehr T. Fluorescence in situ hybridization (FISH) on human chromosomes using photoprobe biotin-labeled probes. J Histochem Cytochem. 2003 Apr;51(4):549-551

2004

P17 Mrasek K, **Weise A**, Starke H, Liehr T. Molecular cytogenetic characterization of the colorectal cell line SW480. in press

P18 Liehr T, Starke H, **Weise A**, Lehrer H, Claussen U. Multicolor FISH probe sets and their applications. Histol Histopathol. 2004 Jan;19(1):229-237.

P19 Liehr T, Mrasek K, **Weise A**, Kuechler A, von Eggeling F, Claussen U, Starke H. Charakterisation of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in human. Curr Genom. 2004, 5, 279-286.

P20 **Weise A**, Starke H, Mrasek K, Claussen U, Liehr T New insights into the evolution of chromosome 1. Cytogenet Genome Res 2004 in press

P21 **Weise A**, Liehr T, Claussen U, Halbhuber KJ More efficient fluorescence in situ hybridization (FISH) using microwave. J Histochem Cytochem 2004 eingereicht

P22 Lehrer H, **Weise A**, Michel S, Starke H, Mrasek K, Heller A, Kuechler A, Claussen U, Liehr T GTG-dark bands split into dark and light sub-bands as demonstrated by multicolor banding (MCB). Cytogenet Genome Res 2004 in press

Kongressbeiträge

2001

K1 **A Weise**, H Starke, M Volleth, M Stumm, A Heller, N Rubtsov, V Trifonov, M Rocchi, K Mrasek, U Claussen, T Liehr. Chromosome 2 rearrangements precisely characterized by multicolor banding (MCB) and simultaneously with region specific probes. Europ J Hum Genet 2001, Vol 9/S1, p138, Abstractnr. P0212

K2 T Liehr, A Heller, H Starke, **A Weise**, K Mrasek, V Trifonov, N Rubtsov, U Claussen. Multicolor banding (MCB) of all human chromosomes based on region specific microdissection libraries. Europ J Hum Genet 2001, Vol 9/S1, p138, Abstractnr. P0207.

K3 T Liehr, A Heller, H Starke, **A Weise**, K Mrasek, V Trifonov, N Rubtsov, U Claussen. Multicolor banding (MCB) of all human chromosomes using region specific midi libraries. Ann Genet 2001, Vol 44/S1, p161, Abstractnr. 3-601.

K4 **A Weise**, H Starke, M Rocchi, A Heller, U Claussen, T Liehr. Chromosome 2 Rearrangements characterized by MCB combined with reguion specific probes. Ann Genet 2001, Vol 44/S1, p69, Abstractnr. 1-178.

K5 T Liehr, A Heller, H Starke, **A Weise**, K Mrasek, V Trifonov, N Rubtsov, U Claussen. Application of the complete human multicolor banding (MCB) set in cancer and clinical cytogenetics. Am J Hum Genet 2001, Vol 69/S1, p335, Abstractnr 895.

2002

K6 T Liehr, A Heller, H Starke, **A Weise**, K Mrasek, V Trifonov, N Rubtsov, U Claussen. Multicolor banding (MCB) - a versatile tool for characterization of exact chromosomal breakpoints. Abstracts of the HGM2002 (Human Genome Meeting) 14.-17.04.2002, Schanghai, China, p 63, Abstractnr. 80.

K7 **A Weise**, H Starke, A Heller, U Claussen, T Liehr. Reexamination of chromosome 2 rearrangements characterized by multicolor banding (MCB) by region-specific FISH probes Europ J Hum Genet 2002, Vol. 10 Suppl. 1, p 94; Abstractnr P0097.

K8 A Kuechler, **A Weise**, S Michel, B Pool-Zobel, A Schaeferhenrich, A Heller, H Starke, TG Wendt, U Claussen, T Liehr. Precise characterization of chromosomal rearrangements of the colon cancer cell line HT29 clone 19A by multicolor banding (MCB). Europ J Hum Genet 2002, Vol. 10 Suppl. 1, p 87; Abstractnr P0064.

K9 H Starke, **A Weise**, A Nietzel, A Heller, U Claussen, T Liehr. A new probe set for the characterization of centromere-near rearrangements. Europ J Hum Genet 2002, Vol. 10 Suppl. 1, p 147; Abstractnr P0346.

K10 T Liehr, A Nietzel, H Starke, A Heller, **A Weise**, K Mrasek, U Claussen. 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 2002, Vol. 62 Supp 236, pp 19-20.

K11 Trappe R, Kohlhase J, Böhm D, **Weise A**, Liehr T, Esser G, Meins M, Zoll B, Bartels I, Burfeind P. „Partial monosomy 20q13.1-qter and 2p24.1-pter is associated with multiple abortions: molecular characterization and segregation analysis in a family bearing a t(2;20) translocation. Med Genetik 2002; Vol 14, p 283; Abstractnr P1-04 05.

K12 **Weise A**, Belitz B, Pfeiffer L, Claussen U, Liehr T. Deletion 2p12-2p11.2 without abnormal clinical findings detected over three generations. Med Genetik 2002; Vol 14, p 284; Abstractnr P1-04 12.

K13 Walter C, Wieczorek D, **Weise A**, Liehr T, Gillessen-Kaesbach G. Deletion of 16q23: A recognizable facial phenotype. Med Genetik 2002; Vol 14, p 283; Abstractnr P1-04 06.

K14 Hoppe C, Kotzot D, Langer S, Starke H, Liehr T, Ziegler M, Weise A, Ernst G, von Eggeling F. Oitfalls in prenatal diagnosis of a supernumerary marker chromosome and exclusion of uniparental disomy. Med Genetik 2002; Vol 14, p 356; Abstractnr P2-27 03.

K15 T Liehr, A Nietzel, M Oliver Bonet, H Starke, A Heller, **A Weise**, F v Eggeling, U Claussen. Characterization of human small marker-chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH) and high resolution multicolor banding (MCB). Med Genetik 2002; Vol 14, p 253; Abstractnr W2-03.

K16 H Starke, A Heller, **A Weise**, A Nietzel, U Claussen, T Liehr. A new subcentromeric probe set for the characterization of centromere-near rearrangements. Med Genetik 2002; Vol 14, p 262; Abstractnr W11-04.

2003

K17 **Weise A**, Starke H, Mrasek K, Claussen U, Liehr T. 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 2003, Vol. 11 Suppl. 1, p 135; Abstractnr P342.

K18 Liehr T, Starke H, Nietzel A, **Weise A**, Heller A, Mrasek K, Kuechler A, Claussen U, von Eggeling F. Small supernumerary marker chromosomes (SMC): genotype-phenotype correlation and classification. Med Genetik 2003; Vol 15, p 301; Abstractnr P 035.

K19 Mrasek K, **Weise A**, Starke H, Claussen U, Liehr T. 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 2003; Vol 15, p 315; Abstractnr P 098.

K20 Starke H, **Weise A**, Nietzel A, Kuechler A, Heller A, Claussen U, Liehr T. SubcenM-FISH defines up to present hardly characterizable centromer-near rearrangements. Med Genetik 2003; Vol 15, p 315; Abstractnr P 099.

K21 **Weise A**, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Heller A, Claussen U, Liehr T, Multicolor-banding (MCB) for all human chromosomes in one hybridization step with a resolution of 450 bands or more. Med Genetik 2003; Vol 15, p 273; Abstractnr W2 01.

K22 Lehrer H, **Weise A**, Michel S, Starke H, Mrasek K, Heller A, Kuechler A, Claussen U, Liehr T. Giemsa-dark bands split into dark and light subbands as demonstrated by multicolour banding (MCB). Med Genetik 2003; Vol 15, p 274; Abstractnr W2 04.

K23 G Lefort, AM Chaze, A Weise, T Liehr, H Starke, F Pellestor, M Claustre, P Sarda. Partial trisomy 20q11.2 characterized by FISH in a child with dysmorphic features and developmental delay. Annales de Génétique 2003, Vol 46, pp 245-246 (Abstract No 7.53.)

2004

K24 Starke H, Liehr T, **Weise A**, Heller A, Mrasek K, Claussen U, von Eggeling F. Small supernumerary marker chromosomes (SMC) and new FISH methods for their characterization. Med Genetik 2004; Vol 16, p 106; Abstractnr P06 010.

K25 **Weise A**, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Heller A, Claussen U, Liehr T, Multicolor-banding (MCB) for all human chromosomes in one hybridization step with a resolution of 450 bands or more. Med Genetik 2004; Vol 16, p 108; Abstractnr P06 017.

11 Danksagung

Prof. Dr. U. Claussen danke ich für die Ermunterung zur Durchführung der vorliegenden Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. T. Liehr für seine hilfsbereite Unterstützung, die vielen praktischen Anregungen und Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Durchführung unterstützt haben.

Besonderen Dank möchte ich an meine Diplomanden Frau Madeleine Gross und Frau Sabine Schmidt sowie an meine Medizin Doktorandin Frau Heike Lehrer richten, die Ihre jeweiligen Arbeiten zum Teil im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt haben.

Für die Mikrosezierung des Schimpansenheterochromatins danke ich besonders Herrn Dr. Trifonov.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern des molekular zytogenetischen Labors, Frau Dipl. Biol. Heike Starke, Frau Dipl. Biol. Kristin Mrasek, Frau Dipl. Bio. Constanze Karst, Frau Dr. rer. nat. A. Heller, Frau Dr. med. Alma Küchler, Herrn Ulf Steinhäuser, Frau M. Ziegler und Frau Melanie Glaser für ihre praktischen Hilfestellungen danken.

Für die Aufarbeitung der Zellsuspensionen gilt mein Dank Frau Susanne Michel.

Für die Bereitstellung der Affen Zelllinien bedanke ich mich bei Prof. Rocchi/ Bari, Italien; Prof. Schempp/ Freiburg; Prof. Pääbo/ Leipzig; Prof. Hameister/ Ulm und Prof. Vermeesch/ Belgien.

Ich danke weiterhin Herrn Dr. M. Rocchi, Bari/Italien; Frau Dr. L. Kearney, London/ England und Herrn Dr. H. Engels, Bonn für die Bereitstellung von BAC bzw. PAC und Cos Proben.

Für die Bereitstellung des verwendeten DOP-Primers danke ich Herrn Dr. Birch-Hirschfeld vom Institut für Virologie Jena.

Auf diesem Wege möchte ich besonders meiner Studienkollegin Kristin Mrasek für die gute Zusammenarbeit während des Studiums und ihren freundschaftlichen Beistand in allen Lebenslagen danken.

Bedanken möchte ich für die finanzielle Unterstützung durch ein DFG gefördertes Projekt von Frau Prof. Pool-Zobel und Herrn Prof. Claussen.

Für die Finanzierung meines Aufenthaltes in Montpellier/ Frankreich bedanke ich mich bei dem Boehringer Ingelheim Fonds.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Franck Pellestor für seine herzliche Aufnahme und Betreuung in Montpellier bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund und seiner Familie sowie meiner Familie für deren immerwährende geduldige und liebevolle Unterstützung.

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Jena, den 18.05.04

Anja Weise