

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. Höhn

**Zytogenetische Analysen von  
multiplen Chromosomen- Translokationen  
bei der Maus mit spektraler Karyotypenanalyse**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Christine Kern  
aus Rimpar  
Würzburg, Dezember 2006

Referent: Prof. Dr. rer. biol. hum. M. Schmid  
Korreferent: Prof. Dr. med. H. Höhn  
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 27.6.2006

Die Promovendin ist Ärztin

**Meinen Eltern  
in Dankbarkeit gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Mäuse mit Robertson'schen Translokationen im Fokus der Wissenschaft.....	1
1.1.1.	Bedeutung und Mechanismus der Robertson'schen Translokationen.....	1
1.1.2.	Überblick über Mauspopulationen mit unterschiedlichen Robertson'schen Translokationen.....	4
1.2.	Die Spektrale Karyotypisierung (SKY)- eine neue molekularzytogenetische Technik zur Chromosomenanalyse.....	6
1.2.1.	Meilensteine der modernen Zytogenetik.....	6
1.2.2.	Fortschritt SKY.....	7
1.2.2.1.	Geschichte der Entwicklung.....	7
1.2.2.2.	Vorteile und Bedeutung der Spektralen Karyotypenanalyse.....	11
1.2.2.3.	Bandbreite und Anwendungsmöglichkeiten der SKY- Technik.....	13
1.2.2.3.1.	Klinische Zytogenetik.....	13
1.2.2.3.2.	Tumorzytogenetik.....	14
1.2.2.3.3.	Vergleichende Zytogenetik.....	15
1.2.2.4.	Ausblick: Die Weiterentwicklung der Technik.....	16
1.3.	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2.	Material und Methoden.....	18
2.1.	Untersuchte Organismen.....	18
2.2.	Zellsubstrate.....	20
2.2.1.	Somatische Zellen.....	20
2.2.1.1.	Anlegen der Vollblutkulturen.....	20
2.2.1.2.	Aufarbeiten der Vollblutkulturen.....	20
2.2.2.	Spermatogenese Zellen.....	21
2.2.3.	Herstellen der Chromosomenpräparate.....	21
2.2.3.1.	Herstellung der Chromosomen- Präparate zur in- situ Hybridisierung.....	21
2.2.3.1.1.	Vorbehandlung der Objektträger.....	22
2.2.3.1.2.	Chromosomen Denaturierung.....	22
2.2.3.1.3.	Sonden- Denaturierung und Hybridisierung.....	22
2.2.3.1.4.	Antikörper- Behandlung zur Detektion.....	23
2.3.	SKY- Spektrale Karyotypen Analyse.....	24
2.3.1.	SKY- Anwendung speziell bei der Maus.....	28
2.4.	Puffer, Lösungen und Ansätze.....	29
2.5.	Chemikalien:.....	31
3.	Ergebnisse.....	32
3.1.	Kreuzungsansätze.....	32
3.2.	CD/CD mit NMRI- Labormaus.....	32
3.2.1.	Labormaus.....	32
3.2.2.	CD/CD.....	36
3.2.3.	F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit NMRI- Labormaus, Mitosepräparat.....	39
3.2.4.	F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit NMRI- Labormaus, Meiosepräparat.....	42
3.3.	CD/CD mit Cremona.....	45
3.3.1.	Cremona.....	45
3.3.2.	F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit Cremona, Mitosepräparat.....	48
3.3.3.	F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit Cremona, Meiosepräparat.....	51
3.4.	CD/CD mit TA/TA.....	58
3.4.1.	TA/TA- Population.....	58
3.4.2.	F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit TA/TA, Mitosepräparat.....	61
3.4.3.	F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit TA/TA, Meiosepräparat.....	64
4.	Diskussion.....	68
4.1.	Spektrale Karyotypenanalyse am Mausmodell.....	68
4.2.	Etablierung der Spektralen Karyotypisierung für Meiosepräparate der Maus.....	69
4.3.	Bestätigung der erwarteten Karyotypen der in den Kreuzungsansätzen verwendeten Mauspopulationen.....	70
4.4.	Interpretation der Multivalent- Formationen der untersuchten F1- Generationen.....	73
4.4.1.	Stabilität der Meiosefiguren.....	73
4.4.2.	Konfiguration der Meiosefiguren.....	74
4.4.3.	Lagebeziehungen der Chromosomen X, Y und 19 während der Meiose.....	74
4.5.	Zusammenfassung.....	77
5.	Literaturverzeichnis.....	78

## **Abkürzungsverzeichnis**

SKY	Spektrale Karyotypisierung
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase- Ketten- Reaktion
DOP- PCR	degenerate oligonucleotide- primed- polymerase chain reaction
FISH	Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung
AMCA	7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
PHA	Phytohämagglutinin
Dapi	4` - 6` - diamidino- 2- phenylindol
PBS	Phosphate Buffered Saline
N	Anzahl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
KCl	Kaliumchlorid
HCl	Salzsäure
CCD camera	charge-coupled device camera
NMRI	Naval Medical Research Institute

# **1. Einleitung**

## **1.1. Mäuse mit Robertson`schen Translokationen im Fokus der Wissenschaft**

### **1.1.1. Bedeutung und Mechanismus der Robertson`schen Translokationen**

Der diploide Chromosomensatz der europäischen Hausmaus *Mus musculus* und der gängigen Labormaus besteht aus 40 Chromosomen, 38 Autosomen und zwei Geschlechtschromosomen. Anders als bei den menschlichen Chromosomen befindet sich das Zentromer bei allen Mauschromosomen an einem Ende oder sehr nahe an einem Ende des Chromosoms, das heißt es handelt sich hierbei ausschließlich um akrozentrische Chromosomen (Ohno 1986).

Die Maus war und ist noch immer das bevorzugte Modellsystem in der Säugetiergenetik. Ein Grund hierfür ist wohl die Existenz zahlreicher Mausmutanten (Lyon et al. 1989). Die Vielfalt der Mausstämme mit genetisch bedingten Veränderungen ist beachtlich. Diese Mausstämme werden gezielt gezüchtet und stehen für Forschungszwecke zur Verfügung. Für das Studium biologischer Prozesse stellen die Mausmutanten ein Modellsystem von beinahe unschätzbarem Wert dar. Viele der chromosomalen Abweichungen der Mausmutanten entsprechen Mutationen im menschlichen Karyotyp, die bekannte Erbkrankheiten nach sich ziehen. Die große Anzahl der chromosomalen Anomalien, die bei der Maus identifiziert wurden, reichen von Abweichungen in der Anzahl einzelner Chromosomen (Aneuploidie), des vollständigen Chromosomensatzes (Polyploidie), bis hin zu chromosomenspezifischen Änderungen (wie z. B. Translokationen, Deletionen, Inversionen). Die davon am meisten untersuchten chromosomalen Abweichungen stellen die reziproken und Robertson`schen Translokationen dar. Bei den reziproken Translokationen handelt es sich um den wechselseitigen Austausch von Teilen nichthomologer Chromosomen. Im Gegensatz dazu sind Robertson`sche Translokationen, auch zentrische Fusionen genannt, Fusionen zweier ganzer akrozentrischer Chromosomen im Zentromerbereich (Abbildung 1).

Abbildung 1

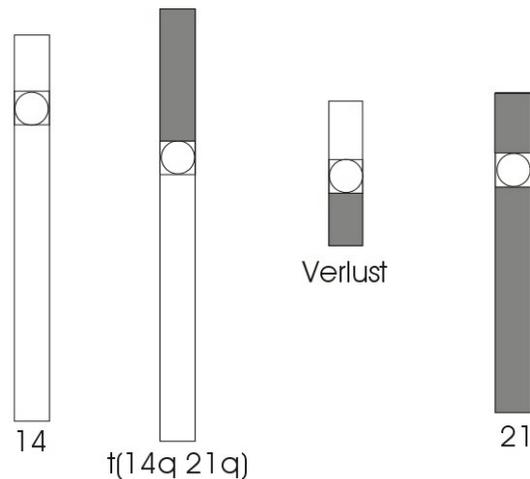


Abb. 1: Robertson'sche Translokation am Beispiel  $t(14q21q)$ . Vereinigung zweier akrozentrischer Chromosomen (Chromosom 14 und 21) nach Brüchen im oder unmittelbar neben dem Zentromer. Ihre kurzen Arme gehen verloren. (Murken, Cleve 1996)

Es resultiert also ein metazentrisches, zweiarmiges Chromosom. Der Prozess der Translokation führt so zu einer Reduktion der Chromosomenzahl. Als Mechanismus der Robertson'schen Translokation werden gleichzeitig auftretende Brüche in zwei der akrozentrischen Chromosomen beschrieben (Haaf, 1989; John et al. 1975). In der europäischen Hausmaus oder der gängigen Labormaus findet man normalerweise keinen derartig mit zentrischen Fusionen veränderten Karyotyp. Aber in anderen freilebenden Populationen der Hausmaus (*M. musculus domesticus*) findet man durchaus eine beträchtliche Anzahl derartiger Translokationen. Man kann in unterschiedlichen geographischen Regionen Rassen mit jeweils verschiedenen Translokationen beobachten. Homozygot vorkommende Translokationen sind zytogenetisch vollkommen stabil. Kreuzt man jedoch zwei Rassen mit unterschiedlichen Robertson'schen Translokationen, entstehen unbalancierte Zygoten entweder mit Monosomien oder mit Trisomien, deren Embryonalentwicklung gestört ist. Interessant sind vor allem Kreuzungen zwischen zwei Rassen, in denen ein bestimmtes Chromosom jeweils in den verschiedenen Rassen mit einem anderen Fusionspartner eine Translokation eingegangen ist. Mit Hilfe derartiger Kreuzungsversuchen lassen sich Monosomien bzw. Trisomien für bestimmte Chromosomen erzeugen und dann hinsichtlich ihrer morphogenetischen Auswirkungen untersuchen. Auch nach Kreuzungen von Mäusen mit Robertson'schen Translokationen und Mäusen nur mit akrozentrischen Chromosomen treten während der Meiose eine Vielzahl von Chromosomenfehlverteilungen wie Nullisomien oder Disomien auf.

In der Chromosomen- Pathologie des Menschen sind Robertson`sche Translokationen ebenfalls sehr häufig (Hansteen et al., 1982; Nielsen et al. 1982). Es ist bekannt, dass aneuploide Kinder mit entsprechenden Schädigungssyndromen geboren werden, wenn ein (phänotypisch unauffälliger) Elternteil Träger einer Robertson`schen Translokation ist (Seyffert, 1998, S.654). Die Träger solcher balancierter Translokationen werden oft erst dann erkannt, wenn zum Beispiel ein Kind mit Down- Syndrom zu Welt kommt, oder wenn eine Sterilität vorliegt (Murken, Cleve, 1996, S.73). Besonders häufig ist das Chromosom 21 an derartigen Translokationen beteiligt (Seyffert, 1998, S.654). Bei solchen Strukturumbauten bleiben die mitotischen Teilungen offenbar unbeeinflusst, allerdings kommt es bei den meiotischen Teilungen während der Keimzellreifung zu Problemen: Anstatt der üblichen Bivalente bilden sich bei Robertson`schen Translokationen Trivalente zur Paarung der homologen Abschnitte (Murken, Cleve, 1996, S.73). Für die F1 Tochtergeneration bei einem Elternteil mit balancierter Robertson`schen Translokation und einem ohne chromosomalen Strukturveränderungen gibt es folgende Möglichkeiten der Neukombination der Chromosomen (Seyffert, 1998, S.656): Es resultiert entweder ein normaler Karyotyp, zum anderen ein chromosomal balancierter, aber phänotypisch unauffälliger, Karyotyp (Murken, Cleve, 1996, S.73), oder es entstehen Trisomien bzw. Monosomien, die unter Umständen letal sein können (Seyffert, 1998, S.656).

Nicht nur in der Pathologie spielen die Robertson`schen Translokationen eine entscheidende Rolle, auch in der Chromosomen- Evolution sind sie von großer Wichtigkeit. Ihre Bedeutung erlangen die Robertson`schen Translokationen durch die Errichtung sogenannter Fertilitätsschranken, die durch das homozygot Werden von entsprechend translozierten Chromosomen entstehen. Diese Fertilitätsbarrieren wiederum tragen entscheidend zur Speziation bei (Seyffert, 1998, S.313; Capanna et al. 1976, Fredga 1977, Dutrillaux 1979). In diesem Sinne werden die Robertson`schen Chromosomen in wilden Maus- Populationen aus verschiedenen geographischen Isolaten als erste Schritte einer stattfindenden Speziation angesehen (Haaf 1989). Dem Robertson`schen Translokations- Prozess wird vor allem deshalb eine so wichtige Funktion bei der Umstrukturierung der Chromosomen in der Karyotypen- Evolution zugeschrieben, weil dadurch entstandene metazentrische Chromosomen eine große Verbreitung fanden (Capanna et al. 1976; Fredga 1977; Dutrillaux 1979). Bezeichnend dafür ist die überproportionale Häufung balancierter Nachkommen bei mütterlicher und väterlicher Robertson`scher Translokation. In der Karyotypenevolution der Phylogenese ist die Reduktion der Chromosomenzahl durch Bildung eines metazentrischen aus zwei akrozentrischen Chromosomen daher ein bekannter Entwicklungsschritt (Murken,

Cleve, 1996, S.73). Als Beispiel hierfür kann man das submetazentrische Chromosom 2 des Menschen anführen. Es entstand während der Primatenevolution aus zwei akrozentrischen Chromosomen, nämlich dem Chromosom 11 und 12 bei Gorilla und Orang- Utan (Murken, Cleve, 1996, S.73). Chromosomen- Umbauten sind sozusagen für das Fortschreiten der Karyotypen- Evolution im Sinne einer Weiterentwicklung unabdingbar.

### **1.1.2. Überblick über Mauspopulationen mit unterschiedlichen Robertson`schen Translokationen**

In Europa können aufgrund morphologischer und biochemischer Eigenschaften zwei Untergruppen der *Mus musculus* Spezies unterschieden werden (Winking et al. 1988, Thaler et al. 1981). Eine gedachte Linie vom Baltischen Meer durch Deutschland bis hinunter zum Schwarzen Meer trennt diese beiden Gruppen geographisch. Die eine dieser Untergruppen, westlich dieser Linie angesiedelt, lässt sich weiter in drei Unterarten gliedern: *domesticus*, *brevirostris* und *praetextus*. Die zweite, östlich der Grenze verbreitete Gruppe wird der Taxonomie entsprechend unter *M. M. musculus* eingegliedert (Winking et al. 1988, Orsini et al. 1983). Neben *Mus musculus* gibt es mindestens noch zwei weitere Mus Arten, nämlich *Mus spretus* im südwestlichen Europa vorkommend und *Mus 4* im südöstlichen Europa vorkommend (Winking et al. 1988, Thaler et al. 1981). Allen dieser Arten gemeinsam ist der nur aus akrozentrischen Chromosomen bestehende Karyotyp.

Abbildung 2

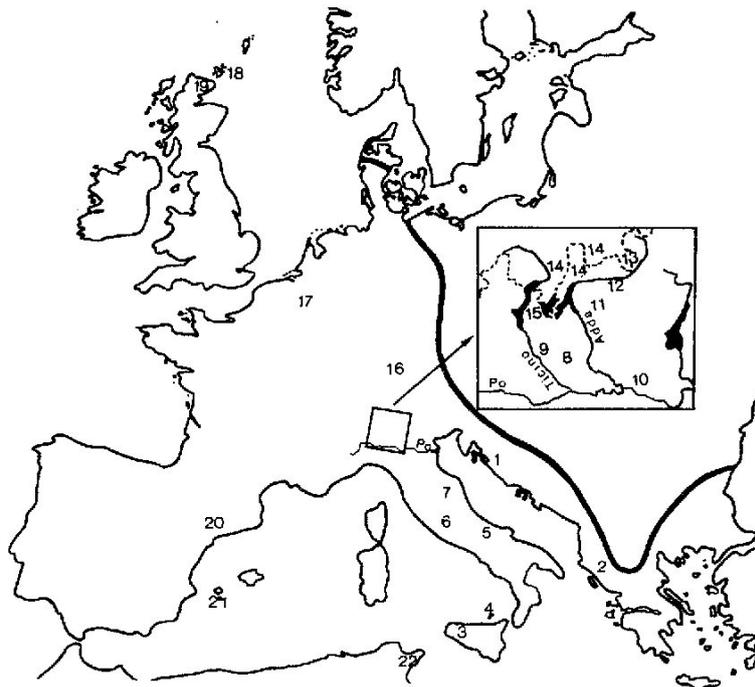


Abb. 2: Geographische Verteilung der Hausmaus- Populationen mit Robertson`schen Translokationen in Westeuropa und Nordafrika. Die schwarz durchgezogene Linie markiert die Grenze zwischen westlichen und östlichen Subspezies von *Mus musculus*. Nummer 6: Cittaducale, Region aus der die in dieser Arbeit beschriebenen „CD“- Mäuse zuerst beschrieben wurden. Nummer 10: Cremona, Region aus der die in dieser Arbeit beschriebenen „CRE/ Cremona“- Mäuse zuerst beschrieben wurden (Orsini et al 1983; Winking et al. 1988).

Robertson`sche Translokationen dagegen kommen gewöhnlich nur in den Untergruppen *Mus musculus domesticus*, *brevitorius* und *praetextus* und auch nur in Gebieten in Europa und Afrika vor. Es gibt nur wenige in der Literatur beschriebene Beispiele von außerhalb Europas wildlebenden Mäusen mit entsprechenden Translokationen. Zu nennen sind Berichte über natürliche Populationen auf Marion Island (eine Insel südlich von Südafrika, im Indischen Ozean gelegen) und auch in Asien sind selten ähnliche Beobachtungen gemacht worden (Winking et al. 1988, Robinson 1978; Chakrabarti et al. 1977; Moriwaki et al. 1984). Laut Nachmann & Searle wurden ca. 90 verschiedene metazentrische Chromosomen bei der Hausmaus beschrieben, kürzlich wurde eine Robertson`sche Translokation das Chromosom 19 neu entdeckt (Catalan et al. 2000, Nachman et al. 1995). Letztere ist die einzig bekannte zentrische Fusion mit Beteiligung des Chromosoms 19 in freilebenden Mäusen (Catalan et al. 2000).

Die ersten Berichte über ein metazentrisches Chromosom in Stämmen von Labormäusen erschienen 1967 (Winking et al. 1988, Evans et al 1967; Leonard et al. 1967). In den

folgenden Jahren wurden weitere derartige Beobachtungen beschrieben (Winking et al. 1988, Gropp et al. 1981). Auch wildlebende Mäuse aus bestimmten Gebieten wie zum Beispiel dem Poschiavo Tal im Süden der Schweiz oder den Rhätischen Alpen (Schweiz) zeigten ähnliche chromosomalen Veränderungen, die bald darauf entdeckt wurden (Winking et al. 1988, Gropp et al. 1970; Gropp et al. 1972). Es handelte sich dabei um verschiedene balancierte Robertson'sche Translokationen, das heißt um die zentrische Fusion zweier akrozentrischer Chromosomen mit entsprechender Reduktion der Chromosomenzahl (Winking et al. 1988, Matthey 1966). In den zahlreichen Veröffentlichungen darüber werden die unterschiedlichen Robertson'schen Translokationen der verschiedenen geographischen Regionen genau beschrieben und charakterisiert (Winking et al. 1988, Capanna et al. 1976, Lehmann et al. 1977, Dulic` et al. 1980, Adolph et al. 1981, Adolph et al. 1983, Gropp et al. 1982, Said et al. 1986).

## **1.2. Die Spektrale Karyotypisierung (SKY)- eine neue molekularzytogenetische Technik zur Chromosomenanalyse**

### **1.2.1. Meilensteine der modernen Zytogenetik**

Schon immer war die Geschichte der Zytogenetik auch fest mit der Entwicklung neuer Arbeitstechniken verbunden. Nachdem in der ersten Hälfte des 20.ten Jahrhunderts entsprechend sensible Techniken für die Chromosomenanalyse zur Verfügung standen, begann die moderne Zytogenetik 1956 mit der korrekten Bestimmung der menschlichen Chromosomenzahl. Tjio und Levan konnten als erste dieses Ergebnis anhand der Untersuchung von embryonalen Lungenzellen vorlegen (Tjio et al. 1956), bevor es kurze Zeit später auch Ford und Hamerton mit Hilfe menschlicher Spermatozyten gelang (Ford et al. 1956). Voraussetzung hierfür war vor allem die Etablierung einer geeigneten Präparation von Säuger- Chromosomen. Dazu zählte die Entwicklung der Quetsch- Technik (Levan et al. 1953), die Möglichkeit mittels Chemikalien die Chromosomen im Metaphase- Stadium zu halten (Bayreuther 1952) und nicht zuletzt als entscheidender Fortschritt die Einführung der hypotonischen Behandlung von Zellen (Hsu 1952).

Die routinemäßige Untersuchung von menschlichen Karyotypen, die durch weiterentwickelte Chromosomen- Präparationsverfahren und die Möglichkeit der einfachen Anreicherung von Metaphase- Zellen erlaubt wurde, führte zur Entdeckung von Chromosomen- Krankheiten (Rothfels et al. 1958, Nowell 1960, Moorhead et al. 1960). 1959 wurde die Trisomie 21 als alleinige Ursache des Down- Syndroms erkannt (Lejeune et al. 1959) und wichtige Aberrationen der Geschlechtschromosomen wie das Turner- Syndrom (Ford et al. 1959), das Klinefelter- Syndrom (Jacobs et al. 1959(1)) und die X- Polysomie wurden beschrieben

(Jacobs et al. 1959(2)). Ein Jahr später wurde die Trisomie von Chromosom 13 (Patau-Syndrom) und von Chromosom 18 (Edwards-Syndrom) entdeckt (Patau et al. 1960, Edwards et al. 1960). Etwa zur selben Zeit wurde die Rolle von Chromosomen-Umbauten bei der Entstehung von Krebs durch die Untersuchung maligne entarteter Zellen erforscht. In diesem Zusammenhang konnte das Philadelphia-Chromosom bei der chronisch myeloischen Leukämie als erste Tumor-spezifische Chromosomen-Aberration identifiziert werden (Nowell et al. 1960).

Im Jahre 1970 gelang der Nachweis multipler Bandenmuster in den Metaphase-Chromosomen (Caspersson et al. 1970). Bis dahin war eine exakte morphologische Identifizierung der Chromosomen nicht immer möglich. Die Bandenmuster sind für jedes Chromosomen-Paar spezifisch und erlauben so die Analyse einzelner Chromosomen. Mit Einführung und Standardisierung der Bandenmuster 1971 begann die sogenannte „Bänderungs-Ära“ der Zytogenetik (Paris Conference 1971). Einer ständigen Verbesserung und Verfeinerung unterlagen die Techniken zur Darstellung der unterschiedlichen Bandenmuster in den folgenden Jahren. Dabei entstanden verschiedene Methoden, die auf Behandlung der Chromosomen mit Fluoreszenz-Farbstoffen, proteolytischen Enzymen oder thermischer Denaturierung beruhen (Macgregor et al. 1988). Bei höchster Auflösung können im menschlichen Karyotyp 2000 verschiedene Banden lokalisiert werden. Bei Routine-Untersuchungen sind weit weniger (200-300) Banden notwendig, um strukturelle Chromosomen-Umbauten nachzuweisen. In der Evolutionsforschung konnte bei Interspezies-Vergleichen mittels Bänderungsanalyse Chromosomen-Umbauten als ein wichtiger Faktor bei der Speziation erkannt werden (Dutrillaux 1979, Seuanez 1979).

In den letzten Jahren konnte man eine zunehmende Orientierung hin zur Molekulargenetik und ihren Techniken beobachten. Mit Hilfe der in-situ-Hybridisierung von markierten DNA- oder RNA-Proben an Metaphase-Chromosomen erfolgte die Kartierung von Genen im Karyotyp. Auch auf diesem Gebiet wurden zahlreiche Fortschritte erzielt (Pardue et al. 1970, Evans et al. 1978). Heute ist die in-situ-Hybridisierung eine Standardtechnik der Zytogenetik, die Ursprung oder Grundlage vieler neuer Technologien ist.

## **1.2.2. Fortschritt SKY**

### **1.2.2.1. Geschichte der Entwicklung**

Die prä- und postnatale zytogenetische Diagnostik wandte ursprünglich für die Identifikation von numerischen oder strukturellen Chromosomen-Aberrationen hauptsächlich die oben genannte Bandentechnik an. Doch die Auflösung des Lichtmikroskops schränkte die Möglichkeiten dieser Standardmethode erheblich ein. Große Schwierigkeiten mit unter sogar

unmöglich war die Charakterisierung von Markerchromosomen, bestimmten Translokationen oder komplexen Chromosomen- Aberrationen (Schröck et al. 1997).

Eine neue Technik sollte hier den Ausweg schaffen. Diese molekularzytogenetische Methode basiert auf markierten DNA- Sonden, die auf Chromosomen- Präparaten hybridisiert werden und durch Fluoreszenzsignale sichtbar gemacht werden.

Den Grundstein dieses sogenannten „Chromosome painting“ legten unabhängig voneinander Forscherteams der Lawrence Livermore National Laboratories und der Yale University (Ried et al. 1998). Möglich gemacht wurde diese Entwicklung vor allem durch die Verfügbarkeit so genannter Klon- Bibliotheken. Darunter versteht man eine Art physikalische Kartierung. Das heißt Chromosomen oder komplette Genome werden in DNA- Fragmente, die einander überlappen zerschnitten. Die Sammlung bzw. die Gesamtheit der daraus entstehenden Bruchstücke wird als DNA- Bibliothek bezeichnet. Erstellt werden diese DNA- Bibliotheken mit Hilfe der „flow- sorted“ Technik, die eine sehr schnelle quantitative Karyotypisierung durch Aufspaltung der Chromosomen nach DNA Gehalt erlaubt (Ried et al. 1998, Gray et al. 1975). Ein Problem, das bezüglich der Spezifizierung der Chromosomen auftrat, konnte mit Hilfe der Suppressions- Hybridisierung gelöst werden. In jedem Chromosom liegen neben Chromosomen- spezifischen DNA- Sequenzen auch unspezifische (repetitive) Sequenzen vor, die nach Hybridisierung mit markierter DNA auf allen Chromosomen Signale geben würden. Folglich müssen unspezifische Sequenzen unterdrückt werden. Dazu erfolgt eine Art Vorhybridisierung der markierten DNA mit kompletter, unmarkierter DNA. Dieser Vorgang wird als Suppression bezeichnet. Die Vorhybridisierungsbedingungen werden so gewählt, dass die markierten spezifischen Sequenzen im Überschuss vorhanden sind. Daher werden sie nicht abgedeckt und stehen zur endgültigen Hybridisierung zur Verfügung (Murken, Cleve, 1996, S.44).

Die erste Generation der Sonden, die mit Hilfe der sogenannten Phagen DNA- Bibliothek hergestellt wurde, war noch fehleranfällig und in der Handhabung oft schwierig (Ried et al. 1998). Phagen enthielten die spezifischen DNA- Fragmente in Form von sogenannten „inserts“. Problematisch war das niedrige „insert- vector“ Verhältnis, das eine relativ hohe Hintergrund- Anfärbung mit sich brachte und somit die Auswertung erheblich erschwerte. Eine Verbesserung auf diesem Sektor brachten die Plasmid- DNA- Bibliotheken mit einem guten „insert- vector“ Verhältnis und einer erleichterten Herstellung der Sonden (Collins et al. 1991). Allerdings wurden einige Teilregionen bestimmter Chromosomen schwächer angefärbt als andere, was bei der Interpretation der Ergebnisse Schwierigkeiten bereitete. Schließlich ermöglichte die Polymerase- Ketten- Reaktion- Technik (PCT) die Herstellung von Sonden

sehr hoher Qualität. Kombiniert wurde diese sogenannte DOP- PCR (degenerate oligonucleotide- primed- polymerase chain reaction) mit der bereits oben erwähnten „flow-sorting“ Technik (Telenius et al. 1992(1), Telenius et al. 1992(2)). Die für die DOP- PCR verwendeten Primer haben definierte Sequenzen am 5'- und 3'- Ende, dazwischen ein „random hexamer“, d.h. ein Oligonukleotid aus sechs Basenpaare mit zufälliger Sequenz. In den verschiedenen „random hexamers“ werden alle statistisch möglichen Sequenzen abgedeckt. Mit der „flow- sorted“ Technik lässt sich die Zielanzahl für die spätere DNA-Amplifikation leicht erweitern und so eine hohe Komplexität der Sonden sicherstellen (manuals auf <http://www.roche-applied-science.com>). Der Einsatz dieser Sonden gewährleistete eine homogene Anfärbung der einzelnen Chromosomen bei gleichzeitig geringem Hintergrund Rauschen und sonstigen Verunreinigungen.

Sonden ähnlicher Qualität lassen sich durch Mikrodisektion erzeugen. Die Mikrodisektion von spezifischen Abschnitten normaler Metaphase- Chromosomen wird unter einem Invertmikroskop mit Glaskapillaren unter Verwendung eines Mikromanipulators durchgeführt. Das dissektierte Material wird anschließend amplifiziert (Meltzer et al. 1992, Meltzer 1995). Vorteil ist hierbei, dass sowohl für ganze Chromosomen Sonden hergestellt werden können, als auch für bestimmte chromosomale Teilregionen, wie zum Beispiel einzelne Chromosomenarme oder Banden (Guan et al. 1993, Guan et al. 1996). Die aus den beiden letzt genannten Techniken resultierenden Sonden sind auch für das sogenannte „reverse chromosome painting“ einsetzbar. Flow- sorted oder mikrodisektierte aberrante Chromosome werden hier als Sonden auf normale Metaphasen- Chromosomen hybridisiert, um den chromosomalen Ursprung von Markerchromosomen etc. herauszufinden (Carter et al. 1992, Blennow et al. 1992, Joos et al. 1993).

Heute stehen Sonden für eine Vielzahl an Mausstämmen (Miyashita et al. 1994, Weier et al. 1994, Rabbitts et al.1995, Liechty et al. 1995, Xiao et al.1996) und Ratten (Shepel et al. 1994, Ferguson-Smith 1997) zur Verfügung. Auch durch die ständige technische Weiterentwicklung auf dem Gebiet der optischen Filtersysteme, der digitalen Bildverarbeitung und Molekularbiologie, und durch die uneingeschränkte Verfügbarkeit aller menschlichen Chromosomen in den sogenannten Chromosomen- Bibliotheken, fand „chromosome painting“ in den Labors eine immer weitere Verbreitung. Zusammen mit den beschriebenen technischen und methodischen Verfeinerungen bildete dies schließlich den Grundstein zur Entwicklung der Spektralen Karyotypenanalyse (Speicher et al. 1996, Schröck et al. 1996, Liyanage et al. 1996, Coleman et al. 1997).

Zwei unabhängige Forscherteams, die Gruppe um Ried und Schröck vom National Center for Human Research und an der Universität Yale die Forschergruppe um Ward, entwickelten dieser Technik. Als Ausgangspunkt beider Teams diente Fluorescent in situ Hybridization (FISH) (Marx 1996, Ried et al. 1998).

Bei der FISH Technik werden Fluoreszenz- Farbstoff in DNA- Fragmente, die spezifisch an eine bestimmte chromosomale Stelle binden, eingebaut. Eine Abwandlung hiervon ist das oben beschriebene „Chromosome Painting“. Beim „Chromosome Painting“ werden Fluoreszenz- markierte DNA- Fragmente hergestellt, die alle an Abschnitte eines spezifischen Chromosoms binden (Marx 1996). Eine darauf aufbauende Weiterentwicklung stellten 1989 Nederlof et al. vor. Ihnen gelang es, zu beweisen, dass man mit unterschiedlichen Fluoreszenz- Farbstoffen markierte FISH- Sonden gleichzeitig darstellen und unterscheiden kann. Die von Ihnen benutzten drei Fluorochrome waren 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid (AMCA), Fluoreszein-isothiocyanat (FITC) und Rhodamin (Nederlof et al. 1989). Einen Durchbruch konnte dieselbe Gruppe kurze Zeit später durch den Nachweis erzielen, dass auch durch Kombinations- Farbstoffe gekennzeichnete DNA- Zielbereiche erkannt werden können. Das heißt, für die Sonden- Herstellung standen nicht mehr nur die reinen Fluoreszenz- Farbstoffe, sondern auch Kombinationen aus diesen zur Verfügung (Nederlof et al. 1990). Schließlich war es sogar möglich allein aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenz- Farbstoff- Anteile die Sonden spezifisch zu markieren (Nederlof et al. 1992). Gestützt auf diese Erkenntnisse und durch die Anwendung sogenannter „triple bandpass optical filters“ waren 1992 schon bis zu zwölf Chromosomen gleichzeitig darstellbar (Dauwerse et al. 1992, Ried et al. 1992(1), Ried et al. 1992(2), Lengauer et al. 1993, Popp et al. 1993, Wiegant et al. 1993). Die Fluoreszenz- Farbstoffe waren direkt an die Sonden gebunden (Wiegant et al. 1993). Die digitale Bildverarbeitung erweiterte das Spektrum der verfügbaren Farbstoffe in die Nähe des Infrarot- Bereiches und bis zu sieben Zielbereiche konnten damit unterschieden werden (Ried et al. 1992(1)). Schröck und Ward gelang 1996 die Darstellung aller 24 menschlichen Chromosomen in spezifischen Farben (Speicher et al. 1996, Schröck et al. 1996).

Beide Forschergruppen markierten jedes Chromosom mit einer variablen Auswahl an Fluoreszenz- Farbstoffen. Bei einer verfügbaren Anzahl von (N) Farbstoffen ergeben sich  $2^N - 1$  mögliche Farbstoff- Kombinationen, das heißt für die differenzierte Darstellung aller 24 menschlichen Chromosomen reichen fünf Farbstoffe aus. Allerdings waren die spezifischen Kennzeichnungen für das menschliche Auge nicht zu unterscheiden (Marx 1996). Auf jeweils unterschiedliche Art lösten Schröck et al. bzw. Ward et al. dieses Problem.

Einmal Ward und seine Mitarbeiter mit der sogenannten „multicolor FISH“- Technik: Sie benutzten spezifische optische Filter für jeden Fluoreszenz- Farbstoff. Jeder dieser Filter ist nur für das Licht mit der Wellenlänge, die ein bestimmter Fluoreszenz- Farbstoff emittiert, durchlässig. Die Detektion der gefärbten Chromosomen wird für jeden spezifischen Farbstoff mit dem jeweiligen Filter separat aufgenommen. Ein Computerprogramm setzt die mit den entsprechenden Filtern erhaltenen Daten zusammen, und entscheidet, ob ein einzelner Pixel nun lediglich Signal eines einzelnen Farbstoffs, oder einer Farbstoff- Kombination enthält (Marx 1996, Speicher et al. 1996).

Im Gegensatz dazu verwendeten Schröck et al. ein Interferometer, um die Nuancen der Markierungen zu differenzieren. Es handelt sich dabei um ein Gerät, das auch in der Astronomie gebraucht wird, um emittierte Lichtspektra entfernter Sterne zu messen. Die drei Säulen der von dieser Forschergruppe entwickelten Spektralen Karyotypisierung kurz SKY genannt, sind die Spektroskopie, die CCD- Kameraaufnahmetechnik und die konventionelle Mikroskopie (Schröck et al. 1996). Für jeden mit der Kamera aufgenommenen Pixel wird ein entsprechendes Interferogramm erstellt, aus welchem mittels Fourier Transformation das Spektrum exakt berechnet werden kann. Das ganze Fluoreszenz- Emissions- Spektrum kann für alle Bildpunkte gleichzeitig abgebildet werden. Man braucht also nur eine einzige Aufnahme, um die Chromosomen in unterschiedlicher Farbe darzustellen. Ein Computerprogramm ordnet anschließend den einzelnen Spektraldaten diskrete Farben zu (Garini et al. 1996, Malik et al. 1996). Das heißt, jede Farbe, charakterisiert durch die einzelnen Spektraldaten, wird von der Software als ein bestimmtes Chromosom klassifiziert. Diese Art Code ermöglicht die Zuordnung der genauen chromosomalen Herkunft bestimmten chromosomalen Materials. Auf die genaue Funktionsweise und den Aufbau der Spektralen Karyotypenanalyse wird später noch im Material- Methodenteil eingegangen.

Mit der Entwicklung des „Spectral Karyotyping“ war somit ein neues molekularzytogenetisches Verfahren zur Chromosomenanalyse vorhanden, das breite Anwendung in Klinik und Forschung finden sollte.

#### **1.2.2.2. Vorteile und Bedeutung der Spektralen Karyotypenanalyse**

Obwohl FISH bereits eine wesentliche Verbesserung auf dem Gebiet der Chromosomenanalyse darstellte, waren die Grenzen dieser Technik doch klar definiert (Jauch et al. 1990, Schröck et al. 1997). Zwar konnte FISH mit hoher Spezifität und Sensitivität das Vorhandensein von vermuteten Chromosomenaberrationen beweisen, aber die Experimente setzten stets eine gewisse Vorstellung von den chromosomalen Abweichungen voraus (Le Beau 1993, Spikes et al. 1995; Lichter et al. 1988, Schröck et al. 1997). Ausgewählte,

bekannte Genombereiche, das heißt einzelne Chromosomen, Chromosomenabschnitte oder Einzelgene, konnten damit markiert und untersucht werden. Diese Technik eignet sich also nicht zum Screening, sondern vielmehr zur Bestätigung von Hypothesen. Ähnlich sah es bei der Anwendung von Mikrodisektions- Verfahren und dem sogenannten „reverse chromosome painting“ zur Chromosomen- Analysen aus (Lüdecke et al. 1989, Müller-Navia et al. 1996, Schröck et al. 1997).

Die gleichzeitige Darstellung aller 24 menschlicher Chromosomen mittels der Spektralen Karyotypen- Analyse erlaubt es dagegen schnell und präzise Chromosomen- Aberrationen zu lokalisieren und zu identifizieren (Schröck et al. 1996, Schröck et al. 1997). Damit steht mit SKY heute ein Verfahren zur Verfügung, dass eine vollständige Karyotypen- Analyse im Sinne eines Screeningtests erlaubt (Köhler, Gräve, 1999). SKY stellt damit zur Chromosomenbänderung, das als Screening- Methode jahrelang alleiniges Standardverfahren war, eine sehr effiziente Alternative und eine Verbesserung dar (Schröck et al. 1997). In mehreren Studien konnte das Potential dieser Technik schon demonstriert werden. Vor allem Markerchromosome, unbekannte Translokationen und komplexe Chromosomenumbauten konnten sicher charakterisiert werden (Schröck et al. 1996, Haddad et al. 1998). Sogar von Bänderungs- Analysen verkannte Chromosomen- Aberrationen konnten mit SKY nachgewiesen werden (Schröck et al. 1997). Man kann der Methode der Spektralen Karyotypisierung bezüglich der Erkennung interchromosomaler Umbauten eine Sensitivität im Bereich 1.5 Mb zusprechen (Schröck et al. 1996; Schröck et al. 1997). Grenzen werden dem Verfahren bei der Untersuchung intrachromosomaler Strukturveränderungen gezeigt. Inversionen oder Deletionen zum Beispiel sind verständlicher Weise sehr schwierig zu erkennen (Lee et al. 2001), da die Farbe der umgebauten Chromosomen gleichbleibt (Ning et al. 1996). Dennoch hat die Spektrale Karyotypen- Analyse in vielen Forschungsbereichen und auch der klinischen Diagnostik Einzug erhalten vor allem auch wegen der geringen Anfälligkeit und der verhältnismäßig einfachen Handhabung (Schröck et al 1996; Schröck et al 1997). Seine Bedeutung erlangt SKY aber nicht nur als einzelne Technik für sich genommen, sondern vor allem im Zusammenspiel mit bereits etablierten Methoden wie Chromosomenbänderung und FISH (Lee et al. 2001, Guttenbach et al. 2001). Durch gegenseitige Ergänzung und Ausgleich der jeweiligen Nachteile stellen diese Techniken wohl die Grundlage der zukünftigen molekularzytogenetischen Forschung dar (Schröck et al 1997).

### **1.2.2.3. Bandbreite und Anwendungsmöglichkeiten der SKY- Technik**

Die Spektrale Karyotypen- Analyse ist mit großer Flexibilität in den unterschiedlichsten Bereichen einsetzbar. Sie entwickelte sich nicht nur zu einem unentbehrlichen Werkzeug in der Chromosomen- Analyse der Grundlagenforschung, sondern wurde auch unverzichtbar in der Diagnostik.

#### **1.2.2.3.1. Klinische Zytogenetik**

Ungefähr 5% aller angeborenen Fehlbildungen lassen sich auf bereits bekannte chromosomale Anomalien zurückführen (Tolmie 1995). Entwicklungsretardierung, Dysmorphiezeichen, Mißbildungen, geistige Retardierung, aber auch Fehlgeburten und Unfruchtbarkeit geben Anlaß zur Chromosomenanalyse. Wie bereits erwähnt, war bisher die Chromosomenbänderung in diesen Fällen das Standarduntersuchungsverfahren.

Doch gerade auf diesem Gebiet zeigen sich auch die Schwachstellen der etablierten Methode: beim Auftreten von Marker- und Ringchromosomen, deren chromosomaler Ursprung mit dieser Technik nicht geklärt werden konnte (Sachs et al. 1987, Warburton 1991). Ein entscheidender Nachteil, denn lediglich die Identifizierung des chromosomalen Ursprungs kann Auskunft darüber geben, ob eine strukturelle Anomalie überhaupt phänotypisch in Erscheinung tritt. So ziehen zum Beispiel kleine Markerchromosomen, die sich vom Chromosom 14 ableiten lassen, kaum Konsequenzen nach sich, währenddessen Markerchromosomen, die Material von Chromosom 15 enthalten, mit einem hohen Fehlbildungsrisiko einhergehen (Blennow et al. 1995). Besonders in der pränatalen Diagnostik kann dies von entscheidender Bedeutung sein. In einem beschriebenen Fall wurde aufgrund von auffälligen mütterlichen Alphafetoprotein- Werten zur pränatalen Diagnostik eine Chromosomenanalyse mittels Bänderungsverfahren durchgeführt. Aber sowohl diese Untersuchung, als auch die nach der Geburt wiederholte Bänderungsanalyse, ergab einen normalen Karyotyp. Dennoch zeigte das Kind Entwicklungsretardierung, Mikrozephalie, Hypogonadismus und andere unspezifische körperliche Auffälligkeiten. Von diesem Fall mittels SKY und FISH untersuchte Proben, ergaben eine Translokation mit Beteiligung von Chromosom 18 und dem X- Chromosom. Der Karyotyp lautet demnach 46,XY, der(18)t(X;18)(q28;q23). Die phänotypischen Auffälligkeiten waren im Nachhinein auch vergleichbar mit einem 18q- Syndrom (Schröck et al. 1997).

Dies zeigt, was für eine effiziente Ergänzung die Spektrale- Karyotypisierung in der prä- und postnatalen klinischen Diagnostik darstellt (Lee et al. 2001, Tanemura et al. 2001). Einmal kann damit im Bereich der genetischen Beratung eine differenziertere, detailliertere und vor allem auch aussagekräftigere Befunderhebung und Beschreibung stattfinden. Zum anderen

können bisher nicht erklärbare chromosomale Ursachen bestimmter Krankheitsbilder erforscht werden und darauf aufbauend nach Therapiemöglichkeiten gesucht werden.

#### **1.2.2.3.2. Tumorzytogenetik**

Die Tumorzytogenetik war eines der ersten Forschungsgebiete, in dem die Spektrale-Karyotypenanalyse praktische Anwendung fand. Vorher schränkten vor allem die niedrigen Mitose- Indizes (in Kulturen), die schlechte Qualität der Metaphase- Proben und das Vorhandensein vieler unidentifizierbarer Markerchromosome die Untersuchung von Krebszellen mit Standardmethoden ein. Die Analyse mittels Bänderung scheiterte dabei besonders an der hohen Rate struktureller Chromosomenumbauten, weil die damit verbundene Chromatin- Durchmischung das ursprüngliche Bandenmuster verdeckt. Die niedrige Mitose- Rate der Krebszell- Kulturen wiederum hat zur Folge, dass nur wenige Metaphase Proben für die Analyse zur Verfügung stehen, die klonale Heterogenität der einzelnen Tumorzelllinien ist aber, bedingt unter anderem durch Markerchromosome, sehr hoch (Heim et al. 1995).

Ein gemeinsames Merkmal vieler Tumorarten sind auch azentrische Chromosomen-Fragmente, sogenannte "double minute chromosomes". Diese Chromosomen- Fragmente tragen zur Entstehung von Tumoren bei, indem sie amplifizierte Onkogene oder Medikamenten- Resistenz Gene bereitstellen, die den entsprechenden Zellen einen Wachstumsvorteil verschaffen (Sullivan et al. 2001). Diese besonders bei soliden Tumoren vorkommenden Charakteristika sind ebenfalls durch die Bandentechnik alleine nicht darstellbar (Ried et al. 1998). In einem gewissen Umfang schafft die Spektrale Karyotypisierung hier Lösungsmöglichkeiten. Gerade durch die simultane Darstellung aller Chromosomen in unterschiedlicher Farbe wird die Aufklärung komplexer Chromosomen-Aberrationen vereinfacht (Ning et al. 1998, Macville et al. 1997, Bigner et al. 1997). Auch in der hämatologischen Tumorzytogenetik findet SKY breite Anwendung (Veldman et al. 1997). Das hängt insbesondere damit zusammen, dass SKY die Analyse feiner telomerischer Translokationen erlaubt, bei denen Chromatin mit ähnlichem Bandenmuster ausgetauscht wird. Zusätzlich können Markerchromosomen charakterisiert werden, die kaum die Größe einer Bande erreichen. Und außerdem ermöglicht die Spektrale Karyotypisierung eine verbesserte Kartierung sogenannter chromosomaler „breakpoints“, die in der hämatologischen Tumorentstehung die Position von Genen anzeigen, deren Translokationen häufig in Überexpression oder Erzeugung von Fusionsproteinen mündet. Dies ist zum Beispiel hilfreich für die Klonierung von Krankheitsgenen. Auch in diesem Bereich erweitert SKY also die

Möglichkeit der Aufklärung bisher nicht identifizierter Chromosomenaberrationen (Veldman et al. 1997, Ried et al. 1997, Marx 1996).

Einen weiteren Fortschritt auf diesem wissenschaftlichen Sektor bringt das Verfügbarwerden entsprechender DNA- Proben weiterer Spezies wie der Maus und der Ratte (Miayashita et al. 1994, Weier et al. 1994, Rabbitts et al. 1995, Liechty et al. 1995, Xiao et al. 1996, Shepel et al. 1994, Ferguson-Smith 1997 Liyanage et al. 1996). Untersuchungen menschlicher Krankheiten am Tiermodell sind hier möglich (Coleman et al. 1997, Schröck et al. 1996). Grundlegende Mechanismen von Chromosomen- Aberrationen zum Beispiel in der Tumorentstehung können damit erklärt werden (Ried et al. 1998).

Man kann davon ausgehen, dass die Spektrale Karyotypenanalyse in der Tumorzytogenetik Fortschritte im Bereich Diagnose und Differentialdiagnose durch die Identifizierung von Tumormarkern und im folgenden eine Verbesserung der Prognose durch neue Therapiemöglichkeiten mit sich bringt (Ried et al. 1998, Marx 1996).

#### **1.2.2.3.3. Vergleichende Zytogenetik**

Als Fortschritt erwies sich die Einführung dieser Technik für Vergleichsstudien zwischen verschiedenen Spezies im Zuge der Evolutionsforschung (Wienberg et al. 1990). Besonderes Augenmerk richtet sich dabei auf im Laufe der Evolution der Spezies aufgetretenen chromosomalen Änderungen und deren Bedeutung. Zahlreiche Experimente wurden in diesem Zusammenhang durchgeführt und die kompletten Karyotypen vieler Säugetiere dahingehend untersucht (Wienberg et al. 1992, Stanyon et al. 1992, Jauch et al. 1992, Ried et al. 1997, Yang et al. 1995, Yang et al. 1997(1), Yang et al. 1997(2), Müller et al. 1997). Auch „Chromosome painting“ fand hier ein breites Anwendungsgebiet. Es gelang die Identifizierung homologer Chromosomen Abschnitte verschiedener Spezies und damit eine Art regelrechter Kartographierung definierter menschlicher Gene, die in verschiedenen Primaten- Arten ebenfalls vorkommen (Ried et al. 1993). Obwohl „Chromosome painting“ zu entscheidenden Erkenntnissen der Entwicklungsgeschichte verschiedener Spezies wie zum Beispiel der Hirschart „Indian muntjac“ oder einiger Gibbon- Arten führte, war die Handhabung dieser Technik oft sehr umständlich und langwierig (Yang et al. 1995, Yang et al. 1997(1), Yang et al. 1997(2), Müller et al. 1997, Jauch et al. 1992, Koehler et al. 1995(1), Koehler et al. 1995(2)).

Demgegenüber brachte die Spektrale Karyotypisierung natürlich erhebliche Vorteile mit sich. Nach nur einer Hybridisierung von Chromosomen der Gibbon- Affen mit den für menschliche Chromosomen hergestellten Sonden, konnte der durch Translokationen und verschiedenen Aberrationen stark veränderten Karyotyp des Gibbon- Affen mittels SKY dargestellt werden.

Mit einem derartigen Experiment ließ sich feststellen, welche Chromosomen der Affen im menschlichen Karyotyp unverändert vorkommen, oder welche Chromosomen der Affen aus Translokationen der menschlichen chromosomalen Gegenstücke bestehen (Schröck et al. 1996). Damit bestätigte SKY auch mit Routineverfahren bereits erzielte Ergebnisse (Koehler et al. 1995(2), van Tuinen et al. 1983). Darüber hinaus wurden einige kleinere vorher noch nicht erkannte Chromosomenaberrationen beschrieben (Ried et al. 1998). Auch Erkenntnisse über den Chromosomen Polymorphismus im Karyotypen dieses speziellen Individuums konnten mittels SKY gewonnen werden, die mit anderen Techniken nicht erreicht werden konnten (Ried et al. 1998).

Die auf diesem wissenschaftlichen Sektor im Laufe der vergangenen Jahre bereits erworbenen Resultate, geben Anlass, große Erwartungen in die Zukunft mit verstärktem Einsatz von SKY zulegen. Dieses Verfahren sollte in der Lage sein, das Wissen und Verständnis der Stammesgeschichte und der Evolution zu verbessern.

#### **1.2.2.4. Ausblick: Die Weiterentwicklung der Technik**

Über alle diese beschriebenen Anwendungsgebiete hinaus, gibt es sicherlich noch mehr Fragestellungen bei denen die Spektrale Karyotypisierung hilfreich sein kann. Vor allem durch technische Weiterentwicklung soll diese Technologie größere Verbreitung finden. In Reichweite steht bereits ihre Automatisierung (Köhler, Gräve, 1999; Marx 1996). Im Bereich der prä- und postnatalen Diagnostik scheint ein solches Projekt schon in näherer Zukunft realisierbar, ähnliches ist in der Tumorzytogenetik geplant (Marx 1996). Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit zielt darauf ab, eine noch speziellere und detailliertere Chromosomen- Analyse zu ermöglichen. Dies soll vor allem durch Entwicklung spezieller Chromosomen- Arm und Chromosomen- Banden Färbemethoden, und auch durch die Herstellung Region- spezifischer Sonden in die Tat umgesetzt werden (Ried et al. 1998). So können zum Beispiel Sonden, die spezifisch für häufig deletierte chromosomale Regionen sind, mit Sonden von allen menschlichen Telomeren kombiniert werden und daraus sogenannte Mikrodeletionssonden hergestellt werden. Derartige Sonden würden die Charakterisierung und Identifizierung von submikroskopisch kleinen Mikrodeletionen erlauben (Ried et al. 1998). Mit Hilfe derartiger Methoden wäre dann auch die Detektion intrachromosomaler Umstrukturierungen erreicht (Meltzer et al. 1992). Die Grundlagen hierfür sind bereits vorhanden.

Auch in der Histologie und Immunhistologie sind Anwendungen dieser Technik geplant. Untersuchungen histochemischer oder immunhistochemischer gefärbter Präparate aus

Pathologie und Zytologie in Verbindung mit der Analyse genetischer Marker sind bereits in der Entwicklung. Das Spektral- Imaging- Verfahren ist also nicht nur auf die Messung von Fluoreszenzspektren beschränkt, sondern auch im Hellfeldbereich anwendbar (Köhler, Gräve, 1999).

Die Zukunft dieser Technologie liegt also nicht nur in der Optimierung und Verbesserung bereits entwickelter und erprobter Anwendungsbereiche. Darüber hinaus drängt der Fortschritt diese universell einsetzbare Technik in ganz andere wissenschaftliche Gebiete als jene welche den Ursprung bildeten.

### **1.3. Zielsetzung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit soll in erster Linie die neuartige molekularzytogenetische Technik der Spektralen Karyotypen- Analyse am Maus- Modell demonstrieren. Darüber hinaus soll die Untersuchung von Meiose- Präparaten mittels SKY etabliert werden. Dies erfordert vor allem eine entsprechende Änderung der bisher für Metaphase- Präparate erstellten und angewandten Protokolle. Die in der Handhabung weitaus empfindlicheren Meiose- Proben setzen eine angepasste Behandlung der Chromosomen- Präparate zur in-situ Hybridisierung voraus. Durch die Erforschung meiotischer Chromosomen mittels SKY soll die Anwendungsbreite dieser relativ neuen zytogenetischen Methode erweitert und gleichzeitig ihre universellen Einsatzmöglichkeiten gezeigt werden.

Ein zweiter Schwerpunkt liegt in der Darstellung durch Robertson`sche Translokationen veränderter Mausekaryotypen mittels Spektraler Karyotypenanalyse. Dabei wurden Kreuzungsversuche zwischen verschiedenen Wildpopulationen beziehungsweise zwischen einer Wildpopulation und Labormaus durchgeführt. Bei den F1- Generationen wurden anschließend jeweils Meiose- und Mitose- Präparate untersucht und miteinander verglichen. Besonderes Augenmerk richtete sich dabei auf die durch Kreuzung einzelner Mäusestämme entstandenen meiotischen Trivalente und Multivalente. Zum einen sollte damit die vermutete Chromosomen Anordnung innerhalb der Trivalente und Multivalente bestätigt werden. Zum anderen sollte der Mechanismus der Robertson`schen Translokationen mittels der neuen Methode zur Chromosomen Darstellung eingehend untersucht werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Untersuchte Organismen**

Für die Untersuchung wurden einmal NMRI- Han- Labormäuse mit 40 akrozentrischen Chromosomen verwendet. Zum anderen von verschiedenen Wildpopulationen der Hausmaus *Mus musculus domesticus* abstammende Populationen die homozygot für multiple Robertson'sche Chromosomen sind (Capanna et al. 1976, Gropp et al. 1981) Die Bezeichnung der durch Robertson'sche Translokationen veränderten Karyotypen richtet sich dabei nach dem vom "Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice 1972, 1974" erstellten Standard (Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice 1972, 1974; Gropp et al. 1982, Winking et al. 1988). Formal schreibt man "Rb" für Robertson'sche Translokation, dahinter in Klammern, getrennt durch einen Punkt, die an der Translokation beteiligten Chromosomen bzw. die Position der Chromosomen im akrozentrischen Karyotyp. Zusätzlich erhält jedes Rb Chromosom ein Kürzel, das den Ort der Erstbeschreibung kennzeichnet. Vom Bandenmuster her identische Translokationschromosomen, die in verschiedenen Wildpopulationen vorkommen, bekommen ebenfalls unterschiedliche Symbole, wie zum Beispiel Rb(5.15) in der Milano I Population als Rb(5.15)27Lub, aber in Milano II als Rb(5.15)42Lub bezeichnet wird. Dieser Unterscheidung in der Nomenklatur wird gemacht, da trotz der ähnlichen Bandenmuster strukturelle Unterschiede nicht auszuschließen sind (Capanna et al. 1976, Gropp et al. 1981).

In der vorliegenden Arbeit werden Robertson'sche Mäuse aus der Zucht von Heinz Winking, Lübeck, benutzt. Es handelt sich dabei um Stämme die sich aus Wildpopulationen ableiten. Die Robertson'schen Mäuse werden in homozygoten Linien gehalten. Insgesamt wurden drei verschiedene Linien aus dieser Zucht für die Versuche verwendet.

Zum einen ursprünglich aus Cittaducale (Zentralitalien) stammende Mäuse. Die mit "CD" abgekürzten Mäuse wurden 1976 von Capanna et al. beschrieben (Capanna et al. 1976) Sie haben neun Paare metazentrischer Chromosomen. Die Zusammensetzung der Chromosomenarme und die genaue Nomenklatur der Robertson'schen Chromosomen lautet wie folgt:

Rb (1.7) 1 Rma

Rb (3.8) 2 Rma

Rb (6.13) 3 Rma

Rb (4.15) 4 Rma

Rb (10.11) 5 Rma

Rb (2.18) 6 Rma

Rb (5.17) 7 Rma

Rb (12.14) 8 Rma

Rb (9.16) 9 Rma

Die Geschlechtschromosomen und die Autosomen 19 liegen jeweils frei vor.

Die Wildmäuse mit der Bezeichnung Cremona, das Kürzel hierfür CRE, stammen, wie der Name schon sagt aus der Nähe von Cremona (Norditalien). In der Literatur werden sie erstmals 1981 von Gropp und Winking et al. dargestellt (Gropp et al. 1981). Diese Tiere besitzen ebenfalls neun Paare metazentrischer Chromosomen. Folgende Chromosomenzusammensetzung wird für diese Population postuliert:

Rb (1.6) 47 Lub

Rb (3.4) 48 Lub

Rb (2.8) 49 Lub

Rb (5.15) 50 Lub

Rb (10.12) 51 Lub

Rb (11.13) 52 Lub

Rb (9.14) 53 Lub

Rb (16.17) 54 Lub

Rb (7.18) 55 Lub

X, Y und die Autosomen 19 liegen jeweils frei vor.

Schließlich noch die aus dem Puschlavtal (bzw. Poschavio, Schweiz) stammenden Mäuse mit sieben Paaren metazentrischer Chromosomen. Diese mit "TA" abgekürzte Wildpopulation wurde von Gropp et al. ausführlich charakterisiert (Gropp et al. 1970, Gropp et al. 1982). Der Karyotyp ist aus folgenden Robertson'schen Translokationen aufgebaut:

Rb (1.3) 1 Bnr

Rb (4.6) 2 Bnr

Rb (5.15) 3 Bnr

Rb (11.13) 4 Bnr

Rb (8.12) 5 Bnr

Rb (9.14) 6 Bnr

Rb (16.17) 7 Bnr

Bei dieser Population liegen jeweils die Geschlechtschromosomen und die Autosomen 2, 7, 10, 18 und 19 in freier Form vor.

## **2.2. Zellsubstrate**

### **2.2.1. Somatische Zellen**

Um für die SKY- Analyse von Metaphase- Präparaten eine ausreichende Zahl von mitotisch sich teilenden Zellen zu gewinnen, eignen sich am besten in- vitro- Zellkulturen. Zur Darstellung der mitotischen Mäuse- Chromosomen wurden Blutlymphozyten benutzt.

#### **2.2.1.1. Anlegen der Vollblutkulturen**

Die Blutkulturen werden nach der Methode von Pfeiffer (1970) aus heparinisiertem Vollblut hergestellt. Zur Gewinnung einer ausreichenden Menge ist bei der Maus eine direkte Punktion des Herzens erforderlich.

0.4ml Vollblut werden zu 5ml RPMI-Medium 1640 sowie 0.1ml Phytohämagglutinin (PHA) gegeben. Diese Kulturen werden für 72 Stunden bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank inkubiert.

Entsprechende Präparate werden auch aus Blutlymphozyten der Milz hergestellt. Hierzu wird die Milz vollständig aus der Maus herauspräpariert und anschließend in eine Petrischale, die drei Tropfen 1x PBS enthält, gefügt. Mit einer Schere wird die Milz zerkleinert bis eine Art Suspension in der Petrischale entsteht. Diese Suspension wird wie oben beschrieben mit RPMI- Medium 1640 und Phytohämagglutinin behandelt und inkubiert.

#### **2.2.1.2. Aufarbeiten der Vollblutkulturen**

a) Zur Arretierung der Chromosomen im Metaphasestadium wird den Kulturen 1 Stunde vor Abbruch 90µl einer Colcemidlösung zugegeben.

b) Danach werden die Kulturen in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1400 upm für 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand sorgfältig abgesaugt und das Sediment in auf 37°C erwärmter 0.075M KCl-Hypotonielösung suspendiert.

c) Nach 10-minütiger Inkubation der Zellen bei 37°C im Brutschrank wird wieder bei 1400 upm für 8 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

d) Dem Sediment wird unter ständigem Schütteln tropfenweise frisch angesetzte, eisgekühlte Fixierlösung (Methanol- Eisessig im Volumenverhältnis 3:1) zugegeben. Um eine vollständige Suspension der Zellen in der Fixierlösung zu erreichen, erfolgt wiederholtes Durchmischen auf einem Vortexmixer.

e) Anschließend werden die Zellen für mindestens 24 Stunden bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der weiteren Verarbeitung wird die Zellsuspension noch zwei- bis dreimal in frischer Fixierlösung gewaschen.

### **2.2.2. Spermatogenese Zellen**

Die Hodenpräparation folgt der Anleitung von Evans et al. Die Tubuli werden in 1%- igem Natrium-Citrat mit Hilfe von gebogenen Nadeln und Pinzette ausgestrichen, um eine Zellsuspension mit den erforderlichen Zellen zu bekommen. Die Zellen verbleiben etwa 17 min in der 1%- igen Lösung. Danach wird zentrifugiert bei etwa 700 Umdrehungen. Der Überstand wird verworfen, das Sediment mit Methanol- Eisessig (3:1) fixiert. Fixierschritte wiederholen. Der Bodensatz wird resuspendiert und zum letzten Mal zentrifugiert. Danach Überstand verwerfen, das Sediment mit einigen Topfen Fixativ gut vermischen (Menge des Fixativs richtet sich nach der Sedimentmenge) und auf einen fettfreien Objektträger bringen.

### **2.2.3. Herstellen der Chromosomenpräparate**

Objektträger werden für mindestens 24 Stunden in konzentrierter Chromschwefelsäure aufbewahrt, danach werden sie 5 Minuten unter fließendem Wasser gespült, anschließend mit destilliertem Wasser nachgespült und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Vor dem Auftropfen werden die Objektträger in einem Becherglas mit Eis auf 0°C abgekühlt. Das fixierte Zellmaterial wird vor dem Auftropfen nochmals mit frischer Fixierlösung gewaschen, zentrifugiert und je nach Menge des Sediments in soviel Fixativ aufgenommen, dass die Suspension eine milchig-trübe Farbe annimmt.

Diese Suspension wird mit einer Pasteurpipette aus einer Entfernung von 20 bis 30 cm auf die feuchten Objektträger aufgetropft und durch vorsichtiges Blasen verteilt. Die Präparate werden dann an der Luft getrocknet oder zur besseren Verteilung der Chromosomen dreimal kurz durch die nicht leuchtende Flamme eines Bunsenbrenners gezogen.

#### **2.2.3.1. Herstellung der Chromosomen- Präparate zur in- situ Hybridisierung**

Um die entsprechenden Aufnahmen zur Spektralen Karyotypisierung möglich zu machen, müssen die Slides vorher mit verschiedenen Verfahren vorbehandelt werden. Die dafür erforderlichen Schritte erstrecken sich über insgesamt drei Tage. Der erste Tag beinhaltet die Vorbereitung der Slides, mit Pepsin- Behandlung, Chromosomen Denaturierung, Sonden Denaturierung und Hybridisierung. Über den zweiten Tag hin erstreckt sich die Hybridisierung, die insgesamt 36- 48 Stunden dauern sollte. Als letzter Schritt erfolgt am dritten Tag schließlich die für die endgültige Detektion notwendige Antikörper- Behandlung der Präparate. Gleich nach Abschluß dieser Verfahren, stehen die Objektträger für die Bildaufnahmen mit “SkyVision<sup>TM</sup> spectral imaging system” zur Verfügung.

#### **2.2.3.1.1. Vorbehandlung der Objektträger**

Diese Prozedur ist eine wesentliche Voraussetzung für eine effiziente Hybridisierung. Sie dient vor allem der vollständigen Entfernung der Zytoplasmareste, die in vielen Fällen als Störfaktor das Hybridisierungssignal überdecken.

Zu Beginn werden die entsprechenden Objektträger in einer 2 x SSC- Lösung gewaschen. Danach folgt die Pepsinisierung der Präparate.

Zuerst stellt man dafür eine Lösung aus 4 µl 10%-tigem Pepsin, 100 ml Aqua dest. und 1ml 1N HCL her. Man sollte dabei darauf achten, das Pepsin vor HCL zum destillierten Wasser zugeben, da es sonst zu einer Fällungsreaktion kommen würde. Diese vorgemischte Lösung gibt man in einer Küvette in ein 37° C Wasserbad. Die Präparate werden anschließend in dieser vorgewärmten Lösung für 3 Minuten inkubiert. Nach dieser Pepsinisierung werden die Präparate jeweils zweimal 5 Minuten in 1 x PBS Lösung und einmal 5 Minuten in 1 x PBS/ 50 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen.

Zur Nachfixierung werden 2,7 ml von 37%- tigem Formaldehyd mit 1 x PBS/ 50 mM MgCl<sub>2</sub> auf 100ml aufgefüllt. In einer damit gefüllten Küvette werden die Präparate bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Danach das Ganze einmal 5 Minuten in 1 x PBS waschen. Zur Dehydratation gibt man die Objektträger jeweils 5 Minuten in 70%-, 80%-, 90%- und 100%-igen Alkohol. Die Slides anschließend an der Luft trocknen lassen.

#### **2.2.3.1.2. Chromosomen Denaturierung**

Man erwärmt die sogenannte Denaturierungslösung in einer Glasküvette auf 70° C (+ 2° C). Hat die Lösung die gewünschte Temperatur erreicht, taucht man die Slides ein. Je nach Art der Präparate wählt man dabei die Dauer, die sie in der Denaturierungslösung bleiben. Die mitotischen Metaphase- Präparate belässt man 2 bis maximal 4 Minuten darin, während die Meiose- Präparate mit den Ring- und Kettenstrukturen 6- 10 Minuten in die Lösung eingetaucht werden. Danach kommen die Objektträger sofort in eisgekühlten Alkohol und zwar in einer aufsteigenden Reihe jeweils 3 Minuten in 70%-, 80%-, 90%- und 100%-igem Alkohol. Anschließend wieder Lufttrocknen lassen.

#### **2.2.3.1.3. Sonden- Denaturierung und Hybridisierung**

Zuerst zentrifugiert man kurz die im Behältnis #1 enthaltene "SkyPaint™ mixture". Diese Probe wird zur Denaturierung in einem 80° C heißen Wasserbad für 7 Minuten inkubiert. Für jeden Objektträger, den man mittels Spektraler Karyotypisierung analysieren will, benötigt man 6 µl der von der Firma ASI (Applied Spectral Imaging) gelieferten "SkyPaint™ mixture" im Behältnis #1 (Applied Spectral Imaging).

Schließlich kommt die denaturierte Probe für 2 Stunden in ein 37° C warmes Wasserbad, bevor je 6 µl davon auf die Objektträger mit den denaturierten Chromosomen pipettiert werden. Man bezeichnet dies als "Reannealingphase". Sie soll im Überschuß vorhandene repetitive DNA- Sequenzen supprimieren (Köhler, Gräve, 1999).

Zuletzt kommt auf die so vorbereiteten Slides noch ein 18 x 18mm<sup>2</sup> Deckglas. Dabei möglichst Blasenbildung unter dem Deckglas vermeiden. Danach werden die Deckglas-Kanten noch mit Gummi- Kleber versiegelt und die Slides in eine befeuchtete Kammer gelegt.

Nun sind die Objektträger für die 36 bis 48-stündige Inkubation im 37° C warmem Brutschrank entsprechend präpariert.

#### **2.2.3.1.4. Antikörper- Behandlung zur Detektion**

Holt man die Präparate nach der Inkubationszeit aus dem Brutschrank, muss man darauf achten, die Slides während der ganzen nachfolgenden Behandlung stets feucht zu halten und vor Licht zu schützen.

Im abgedunkelten Raum nimmt man die Objektträger aus der Feuchtkammer und entfernt den Gummikleber von den Deckglas- Kanten. Nun wäscht man die Präparate in der Waschlösung I, 50%- iges Formamid in 2x SSC, für 5 Minuten. Die ganze Prozedur wiederholt man dreimal. Die Küvette mit der Lösung befindet sich dabei in einem 45° C warmen Wasserbad. Unter denselben Bedingungen, 45° C warmes Wasserbad, werden die Slides anschließend in der 1x SSC enthaltenden Lösung II zweimal für je 5 Minuten gewaschen.

Zum Abschluss werden die Objektträger bei Raumtemperatur für 2 Minuten in die Waschlösung III, die 4x SSC und 0,1%- iges Tween 20 enthält, eingetaucht.

Um hochrepetitive Sequenzen zu blocken trägt man pro Slide 80 µl des sogenannten Block-Reagens, Behältnis # 2 von ASI, auf. Man deckt das Ganze dann mit einem 24 x 60 mm<sup>2</sup> Deckglas ab und inkubiert im Brutschrank für 30 Minuten.

Durch Kippen der Objektträger lässt man die Flüssigkeit abfließen und entfernt auf diese Weise gleichzeitig die Deckgläser. Als nächstes bringt man 80 µl der Pufferlösung I, Behältnis # 3 von ASI, auf die Slides. Mit einem 24 x 60 mm<sup>2</sup> Deckglas versehen, inkubiert man dann für 45 Minuten bei 37° C.

Nach abgeschlossener Inkubation kommt Waschlösung III erneut zum Einsatz. Dreimal für jeweils 3 Minuten werden die Slides in einer mit Waschlösung III gefüllten Küvette in einem Wasserbad von 45° C durchgespült, bevor der Puffer II, wieder 80 µl pro Präparat, aufgetragen wird. Wie gehabt folgt nach Deckglas- Applikation (24 x 60 mm<sup>2</sup>) eine 45-minütige Inkubation bei 37° C.

Danach wiederholt man den Wasch- Schritt mit Lösung III wie oben schon beschrieben: Im 45° C Wasserbad dreimal für je 3 Minuten in die Küvette mit der Waschlösung geben.

Um die Slides mit der Dapi- Lösung (4'- 6'- diamidino- 2- phenylindol) zu behandeln, müssen sie vorher noch kurz für 1 bis 2 Minuten in 2 x SSC bei Raumtemperatur eingetaucht werden. Schließlich kommen 150 µl Dapi- Lösung und Deckglas auf die Präparate. Die Inkubationszeit für die Dapi- Lösung beträgt bei Raumtemperatur 10 Minuten. Danach werden die Slides für 1 Minute in 2 x SSC gewaschen.

Als letzter Schritt wird die DAPI/Antifade- Lösung, Verhältnis # 5 von ASI, angewendet. 30 µl dieser Lösung benötigt man für jeden Objektträger. Bringt man das 24 x 60 mm<sup>2</sup> Deckglas auf die Oberfläche, sollte man darauf achten, Luftblasen zu vermeiden bzw. gegebenenfalls zu entfernen.

Nach kurzem Trocknen mit Fließpapier, sind die Präparate nun für die Spektrale Karyotypen-Analyse bereit.

### **2.3. SKY- Spektrale Karyotypen Analyse**

Der Hauptbestandteil der SKY Technik ist ein zusammengesetztes System aus Fluoreszenz-Mikroskopie, Spektroskopie und die auch "Spectral Imaging" genannte hochauflösende CCD-Kameratechnik (Garini et al. 1996, Malik et al. 1996(2)).

Zunächst sollen die einzelnen Komponenten des Systems vorgestellt werden.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben werden die als Sonden verwendeten DNA-Proben mittels der "flow- sorted" Technik hergestellt. Es handelt sich hierbei um chromosomenspezifische DNA- Proben, die über die DOP- PCR amplifiziert und auch fluoreszenzmarkiert werden. Sie werden mit Nukleotiden, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen verbunden sind, gelabelt: Fluorochrom- konjugierten dUTPs sowie biotinylierten- und digoxigenierten- dUTP- Moleküle. Die letztgenannten werden nach der Hybridisierung über indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht (Köhler, Gräve, 1999). Man verwendet hierbei fünf verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (Ried et al. 1992(2), Schröck et al. 1996). In dem vorliegende Versuch waren dies Rhodamin, FITC (Fluoreszein-isothiocyanat), Texas Rot, Cy5 und Cy5,5 (Applied Spectral Imaging (ASI), 2000). Jede chromosomenspezifische Probe ist entweder mit einem dieser Farbstoffe oder mit einer Kombination aus diesen Farbstoffen markiert. Das heißt, auf diese Weise ist jedes Chromosom durch ein spezifisches Fluoreszenzspektrum charakterisiert, was letztendlich die Identifizierung ermöglicht (Schröck et al. 1996). Mittels der bereits in der Einleitung erklärten Suppressions- Hybridisierung werden vorhandene repetitive Sequenzen vorher ausgeschaltet. Das so hergestellte, alle 24 menschlichen Chromosomen enthaltende Probengemisch kann

entsprechend etablierten Standardmethoden auf Metaphasechromosomen in- situ hybridisiert werden (Schröck et al. 1996, Schröck et al. 1998).

Nach der Hybridisierung erfolgt die Aufnahme der Spektralbilder durch das sogenannte Spectra- Cube- System. Mit Hilfe einer C- Mount- Verbindung kann man dieses System an ein modernes Fluoreszenzmikroskop anschließen (Köhler, Gräve, 1999). Es besteht aus einer Kombination von Interferometer und CCD- Kamera.

**Abbildung 3**

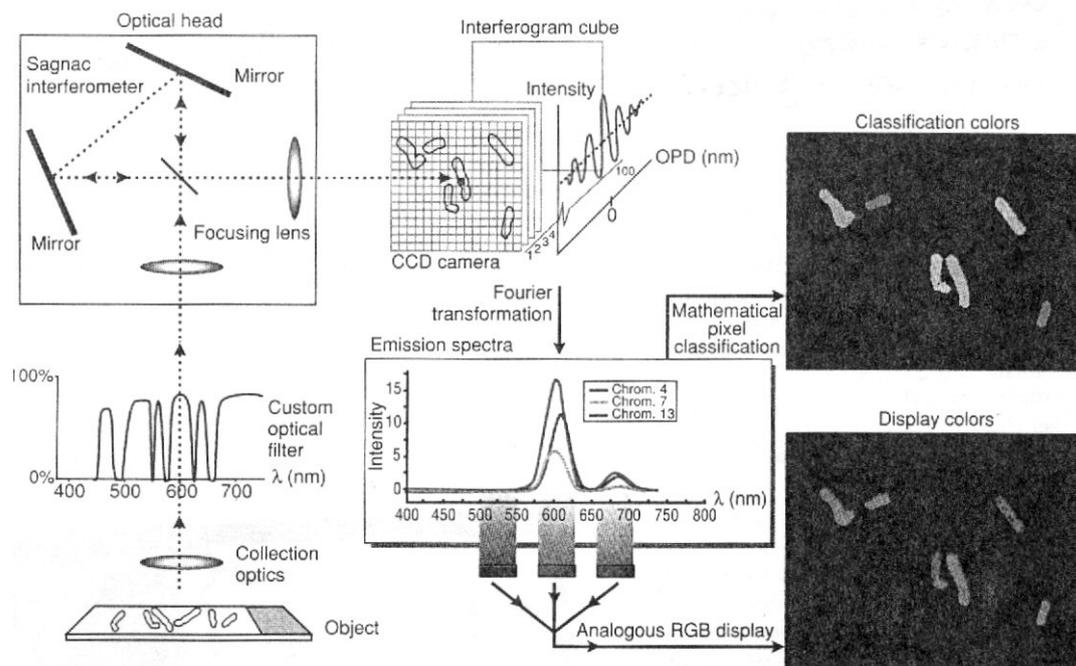


Abb. 3: Aufbau und Funktionsweise der Spektralen Karyotypenanalyse. Nach Hybridisierung erfolgt die Aufnahme der Bilder über ein Spectra- Cube- System, das an ein Fluoreszenzmikroskop angeschlossen ist. Die Emissions- Spektren der unterschiedlich markierten Chromosomen- Sonden werden in einer Aufnahme mittels eines "Triple- pass"- Filters gemessen. Mittels Fourier- Transformation wird schließlich das Spektrum exakt berechnet. Die Intensität jeder Display- Farben ist proportional zu der Intensität mit der die einzelnen Spektral- Bereiche vertreten sind. Unter Anwendung verschiedener, auf den Spektraldaten basierender Algorithmen, werden den Bildpunkten mit identischen Spektren dann eindeutig definierte Farben zugeordnet. Gleichen Spektraldaten werden entsprechende Falschfarben zugewiesen (Schröck et al. 1996).

Ein Interferometer ist ein Gerät, mit dem die Interferenz (Überlagerung) von Lichtwellen für extrem genaue Messungen von Wellenlängen oder von kleinen Abständen ausgenutzt wird. Seine Funktionsweise beruht auf folgendem Prinzip: Zwei oder mehrere Lichtstrahlen werden durch getrennte optische Wege geführt. Erreicht wird dies mit Spiegeln oder halbdurchlässigen Platten. Am Wegende werden die Teilstrahlen durch weitere Spiegel reflektiert und wieder vereinigt. Dabei liefern die vereinigten Lichtstrahlen ein Interferenzmuster (Interferenzstreifen oder -ringe). Bei einem Interferometertyp zum

Vermessen von monochromatischem Licht kann ein Trennspiegel in einem der Strahlengänge in der Richtung des Lichtstrahles geringfügig verstellt werden. Diese Verschiebung und damit die Verlängerung oder Verkürzung des Lichtweges kann man genau messen. Verstellt man den Spiegel um eine halbe Wellenlänge, so werden im Interferenzmuster helle und dunkle Abschnitte vertauscht. Die Wellenlänge ermittelt man meist aus der Anzahl der Interferenzmusteränderungen bei einer größeren Verschiebung des Spiegels ("Interferometer", Microsoft® Encarta® Enzyklopädie 2000. © 1993-1999 Microsoft Corporation).

Die Emissions- Spektren der unterschiedlich markierten Chromosomen- Sonden werden in einer Aufnahme mittels eines "Triple- pass"- Filters gemessen. Der "Triple- pass"- Filter erlaubt es alle Fluorochrome simultan anzuregen und gleichzeitig ihre Emissions- Spektren zu messen (Köhler, Gräve, 1999). Ein Filterwechsel wird so überflüssig. Das verwendete Sagnac Interferometer erzeugt entsprechend dem emittierten Licht der verschiedenen chromosomenspezifischen Sonden jeweils Unterschiede im optischen Weg. Auf diese Weise entstehen die sogenannten Interferogramme (Köhler, Gräve, 1999). Für jeden Pixel des CCD- Bildes wird ein Interferogramm erstellt. Hieraus wird mittels Fourier- Transformation schließlich das Spektrum exakt berechnet (Garini et al. 1996). Die feinen Unterschiede der Emissions- Spektren der Fluorochrome, durch das Interferometer erstellt, sind ausreichend, um eine Spektrum- spezifische Bildaufnahme mit der CCD- Kamera zu ermöglichen (Schröck et al. 1996).

Bei dem verwendeten Kamerasystem handelt es sich um die digitale CCD- Kamera Hamamatsu C 4880-85 (Köhler, Gräve, 1999). Sie ist ebenfalls über eine C- Mount- Verbindung am Ausgang der Spectra Cube angebracht (Köhler, Gräve, 1999). Spezielle Anforderungen bezüglich Lichtempfindlichkeit, Geschwindigkeit und Auflösung stellt die Spektrale Karyotypen- Analyse an dieses Kamerasystem (Köhler, Gräve, 1999). Für eine hohe Lichtempfindlichkeit sorgt dabei einmal die "Lens- on- Chip"- Technologie. Hierbei fokussieren Mikrolinsen über dem CCD- Detektor das Licht auf die lichtempfindliche Fläche jedes Pixels (Köhler, Gräve, 1999). Eine weitere Verbesserung auf diesem Sektor wird durch thermoelektrische Kühlung des CCD- Detektors, womit sein thermisches Rauschen reduziert wird, erreicht (Köhler, Gräve, 1999). Auch durch langsames Auslesen der im CCD gespeicherten Elektronen im "Slow- scan- Mode" wird eine entsprechend hohe Lichtempfindlichkeit durch erniedrigtes Ausleserauschen (Köhler, Gräve, 1999) gewährleistet. Der 659 x 494 Pixel (je 9,9 x 9,9  $\mu\text{m}$ ) große CCD- Detektor ist im ganzen sichtbaren Lichtbereich bis nahe dem Infrarotbereich empfindlich und zeichnet sich durch ein gutes Auflösungsvermögen, auch kleiner Fluoreszenzintensitätsänderungen, aus (Köhler,

Gräve, 1999). Die Aufnahmezeit verkürzt sich vor allem durch die Möglichkeit im “Slow-scan- Mode” bis zu 4 Bilder pro Sekunde aufnehmen zu können und diese mit 12 bit Datentiefe digitalisieren zu können (Köhler, Gräve, 1999).

Die Auswertung der digitalisierten Bilder erfolgt nach deren Übertragung über ein PCI- Bus Board auf einen leistungsstarken Computer (Köhler, Gräve, 1999). Die Auswertungs-Software benötigt das Betriebssystem MS Windows NT (Köhler, Gräve, 1999). Das entsprechende Programm zur Analyse stellt die Spektraldaten zunächst als Rot- Grün- Blau-Bild dar (Köhler, Gräve, 1999). Bei dieser ersten Visualisierung der Spektralaufnahme handelt es sich um kein Bild mit 24 unterscheidbaren Farben (Köhler, Gräve, 1999). Die Umwandlung der Emissionsspektren in diese sogenannten Display- Farben wird folgendermaßen erreicht: Das von jedem Bildpunkt gemessene Spektrum wird in drei Spektral- Bereiche unterteilt (475 bis 550nm; 550 bis 650nm; 650 bis 750nm). Jeder dieser drei Spektral- Bereiche wird in einer anderen Farbe, entweder blau, grün oder rot, visualisiert. Die Intensität jeder Display- Farben ist proportional zu der Intensität mit der die einzelnen Spektral- Bereiche vertreten sind (Schröck et al. 1996).

Unter Anwendung verschiedener, auf den Spektraldaten basierender Algorithmen, werden den Bildpunkten mit identischen Spektren dann eindeutig definierte Farben zugeordnet. Gleichen Spektraldaten werden entsprechende Falschfarben zugewiesen (Köhler, Gräve, 1999). Dieses Klassifizierungsschema stellt eine wesentliche Grundlage der Spektralen- Karyotypenanalyse dar und ermöglicht erst die eigentliche Chromosomenerkennung (Köhler, Gräve, 1999). Die dabei verwendeten Algorithmen setzten gewisse Referenz- Spektren, die für jedes Chromosom vorher bestimmt und in einer entsprechenden Datenbank im Computer gespeichert werden müssen, voraus (Schröck et al. 1996). Die Falschfarbe, deren Spektraldaten mit denen einer Falschfarbe in der Referenzdatenbank am ehesten übereinstimmen, wird dem Bildpunkt in der Aufnahme zugewiesen (Schröck et al. 1996). Allerdings muss für jeden Pixel eine minimale Abweichung angenommen werden. Dieser Fehler wird mit folgendem Algorithmus veranschlagt:

$$S_{x,y,n} = \sum [I_{x,y}(\lambda) - I_n(\lambda)]^2$$

$I_{x,y}(\lambda)$  steht für ein normiertes Spektrum bei den Bildpunkten mit den Koordinaten  $x, y$ .  $I_n(\lambda)$  stellt das normierte Referenz- Spektrum für jedes Chromosom  $n= 1, 2, \dots 23 (X), 24 (Y)$  dar. Nachdem der Wert  $S_{x,y,n}$  für alle Referenz- Spektren berechnet wurde, wählt man den kleinsten Wert und ordnet einem Bildpunkt eine Falschfarbe zu gemäß der im Referenzspektrum zugewiesenen Falschfarbe (Schröck et al. 1996).

Parallel zur Spektralbild- Aufnahme wird ein Bild in der DAPI- Gegenfärbung (4'-6'-diamidino-2-phenylindol) aufgenommen (Köhler, Gräve, 1999). Dazu wird der Filter entsprechend dem DAPI- Modus gewechselt. Die DAPI- Gegenfärbung bewirkt eine feine Q-Bänderung der Chromosomen. Durch einen in der Analysesoftware integrierten Bandenverstärkungsalgorithmus wird die Qualität dieser Darstellung beinahe auf G-Bänderungsniveau gebracht (Köhler, Gräve, 1999). Die dadurch mögliche parallele Darstellung und Bearbeitung von Spektraldaten und Bänderungsinformationen vereinfacht die Zuordnung von Chromosomenbänderung während der SKY- Analyse (Köhler, Gräve, 1999). Die für eine SKY- Aufnahme benötigte Zeit variiert je nach Helligkeit und Größe der einzelnen Bilder, der gewünschte Auflösung und dem Verhältnis von Signal zu Störzeichen. Im Schnitt benötigt man für eine Messung mit einer 15nm (bei 600nm) Spektral- Auflösung ca. 50 Sekunden. Die räumliche Auflösung der Messung beträgt ungefähr 24µm, lediglich durch die Größe der Bildpunkte (15µm) des CCD- Systems und die Objektiv- Vergrößerung (63x) beschränkt. Um dann letztendlich das Spektralbild mit Hilfe des in der Software integrierten Fourier Transformations- Algorithmus zu erstellen, sind weitere 2 Minuten notwendig (Brigham 1988).

Eine Aufnahme zur SKY- Analyse liefert somit drei verschiedene Versionen der untersuchten Metaphase- Probe: Einmal das Bild im RGB- (Rot- Grün- Blau) Modus, die darauf basierende Darstellung mit den zugeordneten Falschfarben und schließlich die Metaphase in der DAPI- Gegenfärbung abgebildet. Zur besseren Übersicht werden die Chromosomen gleichzeitig noch in ein Klassifizierungsschema gebracht, das die Chromosomen gemäß ihrer Nomenklatur ordnet.

Die weitere Bearbeitung der jeweiligen Bilder erfolgt anschließend mit Microsoft Power Point, Photo Shop und Corel Draw.

### **2.3.1. SKY- Anwendung speziell bei der Maus**

Diese Technik einschließlich der spezifischen Marker steht für Untersuchungen der 40, X, Y Maus- Chromosomen zur Verfügung. Die bei den Maus- Sonden verwendeten Fluoreszenz- Farbstoffe sind Rodamin (A), Texas- Rot (B), Cy 5 (C), FITC (D) und Cy 5.5 (E) mit folgenden Absorptions- bzw. Emissionsspektren:

**Tabelle 1**

Label	A-Rhodamine	B-Texas-Red	C-Cy5	D-FITC	E-Cy5.5
Absorption (nm)	550	596	650	495	675
Emission (nm)	570	620	670	525	694

Absorptions- und Emissionsspektren der Fluoreszenz- Farbstoffe bei den Maus- Sonden (Applied Spectral Imaging (ASI), 2000).

Die einzelnen Chromosomen der Maus sind wie folgt gelabelt:

**Tabelle 2**

Chromosom	Label	Chromosom	Label	Chromosom	Label
1	ACD	9	E	17	BCD
2	CE	10	C	18	B
3	AE	11	BC	19	DE
4	ABD	12	CD	X	ABC
5	AC	13	D	Y	ADE
6	BE	14	ACE		
7	BD	15	AD		
8	AB	16	A		

Fluoreszenz- Farbstoff Code mit dem die Chromosomen jeweils markiert wurden: A- Rhodamine (A), B- Texas-Red (B), C- Cy5 (C), D- FITC (D), E- Cy5.5 (E) (Applied Spectral Imaging (ASI), 2000).

## **2.4. Puffer, Lösungen und Ansätze**

- 1xPBS (Phosphate buffered saline):

0.15 M NaCl

0.05 M NaHPO<sub>4</sub>

- 1xPBS- Lösung (Phosphate buffered saline), pH 7,0 (mit 0,2N HCL auf pH 7,0 eingestellt):

100ml 10x PBS

900ml doppelt destilliertes Wasser

- 1x PBS / 50 mM MgCl<sub>2</sub>:

50 ml 10x PBS

25 ml 1M MgCl<sub>2</sub>

- ad 500ml dH<sub>2</sub>O
- 20 x SSC- Puffer, pH 7,0 (mit 0,2N HCL auf pH 7,0 eingestellt):
  - 350,6 g NaCl (3 M NaCl)
  - 176,4 g Trinatriumcitrat- 2- hydrat (0,3 M Na-Citrat)
  - ad 2 Liter doppelt destilliertes Wasser
- Wasch- Lösung I (50% Formamid / 2xSSC), pH 7,0 (mit 0,2N HCL auf pH 7,0 eingestellt):
  - 30 ml 20x SSC
  - 120 ml dH<sub>2</sub>O
  - 150 ml Formamid
  - Die Lösung wird im Wasserbad auf 45° C erhitzt.
- Wasch- Lösung II (1x SSC), pH 7,0 (mit 0,2N HCL auf pH 7,0 eingestellt):
  - 25ml 20x SSC
  - ad 500 ml dH<sub>2</sub>O
  - Die Lösung wird im Wasserbad auf 45° C erhitzt.
- Wasch- Lösung III (4x SSC / 0.1% Tween 20), pH 7,0(mit 0,2N HCL auf pH 7,0 eingestellt):
  - 100 ml 20x SSC
  - 400 ml dH<sub>2</sub>O
  - 0.5 ml 0.1% Tween 20
  - Die Lösung wird im Wasserbad auf 45° C erhitzt.
- Denaturierungs- Lösung, pH 7,0 (mit 0,2N HCL auf pH 7,0 eingestellt):
  - 70 ml Formamid
  - 10 ml 20x SSC
  - 20 ml dH<sub>2</sub>O
  - Die Lösung wird im Wasserbad auf 72° C erhitzt.
- DAPI- Stammlösung (20%) pH 7,0 (mit 0,2N HCL auf pH 7,0 eingestellt):
  - 2 mg DAPI (4` - 6` - diamidino- 2- phenylindol)
  - 10 ml dH<sub>2</sub>O
  - 10 ml 2x SSC
  - Da Lösung lichtempfindlich, mit Alufolie umwickelt in Kühlschrank stellen (hier bei 4° C mehrere Monate haltbar).
- 1% Formaldehyd
  - 2.7 ml 37% Formaldehyd
  - 100 ml 1x PBS/ MgCl<sub>2</sub>

- RPMI- Kulturmedium:

970 ml dreifach destilliertes, steriles Wasser

27 ml NaHCO<sub>3</sub>

RPMI- Trockenpulver

→Die Lösung wurde steril filtriert und in 200 ml- Flaschen abgefüllt. Danach wurden die unverschlossenen Flaschen zur Einstellung des pH- Wertes zwei Tage im 37°C- Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub>- Gehalt inkubiert. Die Komplementierung des Mediums erfolgte durch Zugabe von 37 ml FKS (fötales Kälberserum), sowie 1 ml Penicillin G (Benzylpenicillin, Natriumsalz: 1670 IE/mg). Das bei -37°C gelagerte FKS wurde im 37°C- Wasserbad aufgetaut und dann für 30 Minuten zur Inaktivierung des Komplementsystems in ein 56°C- Wasserbad gestellt.

## **2.5. Chemikalien:**

Alle handelsüblichen Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt. Darüber hinaus wurden spezielle Chemikalien von Folgenden Firmen bezogen:

- Fresenius AG, Bad Homburg: Ampuwa (doppelt destilliertes Wasser)

- Gibco Karlsruhe: RPMI 1640, PHA, PBS, FKS, Colcemid

- Applied Spectral Imaging GmbH, Mannheim: SkyPaint™ Kit:

#1 SkyPaint™ probe mixture

#2 Blocking Reagent

#3 Buffer I

#4 Buffer II

#5 DAPI/ antifade

-Riedel- de Haen, Hannover: Pepsin

- Carl Roth GmbH: Ethanol 99,8%

- Fluka, Buchs: Formamid

- Sigma Deisendorf: 0.1% Tween 20

-Serva, Heidelberg: DAPI (4` - 6` -diamidino- 2Phenylindol)

-Benzylpenicillin

-37% Formaldehyd

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Kreuzungsansätze**

Der Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit gliedert sich in drei verschiedene Kreuzungsansätze. Analysiert wurde jeweils der Karyotyp der Elterntiere mittels Mitose-Präparat und der Karyotyp der F1 Tochtergeneration anhand Mitose- und Meiose- Präparaten. Prinzipiell können alle Zellen zytogenetisch untersucht werden, die sich spontan oder nach Stimulation teilen (Murken, Cleve, 1996, S.31), wie zum Beispiel Fibroblasten, Knochenmarkgewebe oder Blutzellen. Zur Darstellung der Chromosomen wird das Metaphasestadium der Mitose bevorzugt. In dieser Phase hat das Chromatin seine stärkste Kondensation erreicht (Seyffert, 1998, S.378), und ist daher der mikroskopischen Analyse besonders gut zugänglich (Murken, Cleve, 1996, S.31). Ähnliches gilt für die Meiose-Präparate, die für die Analyse im Metaphasestadium I arretiert wurden.

#### **3.2. CD/CD mit NMRI- Labormaus**

Bei dem ersten Ansatz handelt es sich um eine Kreuzung der Wildpopulation CD/CD mit einer NMRI Labormaus.

##### **3.2.1. Labormaus**

Zuerst erfolgt die Beschreibung der NMRI- Labormaus mittels Spektraler Karyotypisierung. Für die Untersuchung wurde ein mitotisches Metaphase- Präparat aus Blutzellen verwendet. Die Darstellung vom Karyotyp der Labormaus mittels SKY erlaubt eine übersichtliche Einarbeitung in die einzelnen Bildarten.

Die erste Aufnahme der Metaphase ist ein Bild der DAPI- Gegenfärbung (Abb.: 4a). In dieser Darstellungsweise ist der vollständig akrozentrische Chromosomensatz der NMRI- Labormaus deutlich zu erkennen. Insgesamt setzt sich der Karyotyp aus 40 Chromosomen zusammen. Die Aufnahme, die nahezu G- Bänderungsniveau erreicht, ermöglicht bereits zum Teil die Identifizierung der Chromosomen allein anhand der Bänderungsstruktur.

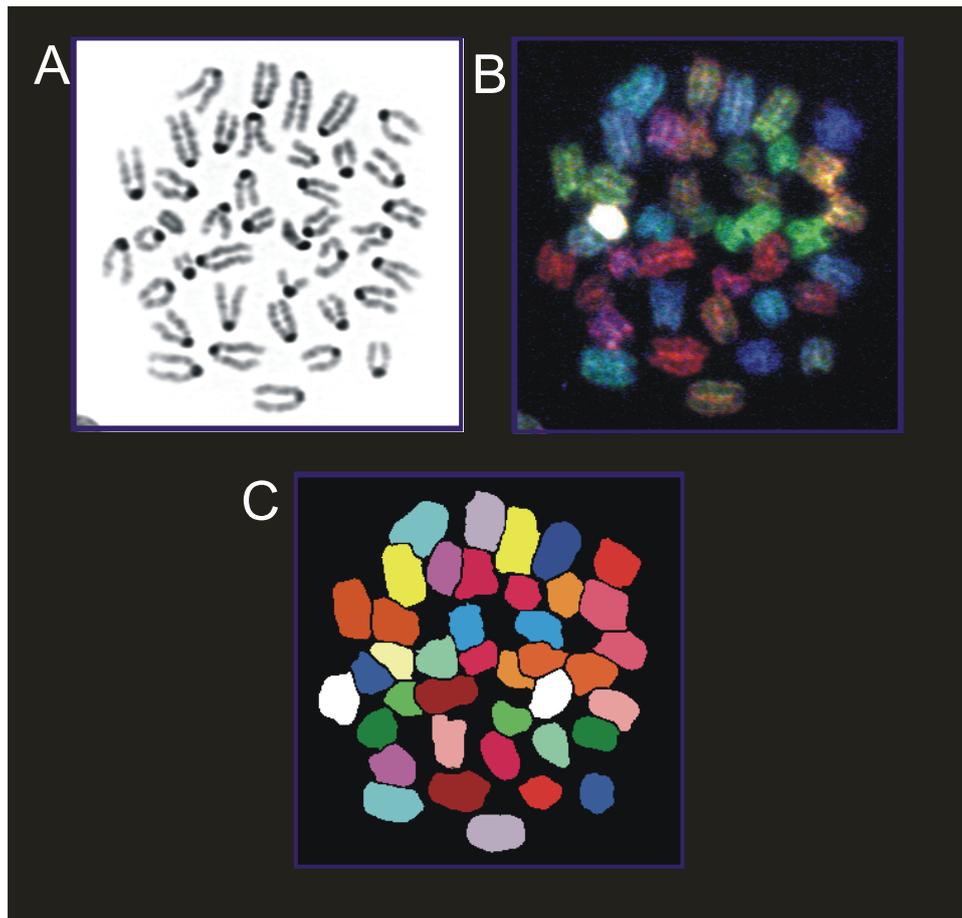
In Abb. 4b wird die Metaphase im sogenannten Rot- Grün- Blau- Modus gezeigt. Diese Aufnahme präsentiert die Chromosomen zwar schon in unterschiedlichen Farben, eine konkrete Chromosomen- Identifizierung ist visuell nicht möglich. Lediglich die charakteristische Abbildung des Y- Chromosoms gestattet dessen sichere Klassifizierung: Während die übrigen Chromosomen jeweils in unterschiedlichen Nuancen der Farben Rot, Grün und Blau abgebildet sind, sticht das Y- Chromosom durch ein hell- leuchtendes Weiß aus den übrigen Chromosomen hervor. Durch Vergleich mit der oben beschriebenen DAPI-

Abbildung kann dieses Ergebnis anhand des Bänderungsmusters bestätigt werden. Diese durch das Auswertungsprogramm erstellte Darstellung der Spektraldaten im Rot- Grün- Blau-Bild entspricht in etwa dem Bild das sich auch beim Blick durch das Fluoreszenzmikroskop mit dem entsprechenden Filter bietet.

Die dritte Darstellungsweise Abb. 4c zeigt die Chromosomen in den vom Computerprogramm zugewiesenen Falschfarben. Hier bei der NMRI- Labormaus sind die Chromosomen jeweils einfarbig. Identische Chromosomen bekommen dieselbe Falschfarbe zugewiesen. Insgesamt sind also die Chromosomen mit 21 verschiedenen Farben gekennzeichnet. Translokationen sind nicht zu erkennen.

Abschließend werden die Chromosomen entsprechend ihrer Klassifizierung automatisch in einer Karyotypentafel angeordnet (Abb. 4d). Die Chromosomen werden in der Karyotypentafel in den drei Darstellungsweisen, DAPI-, Rot- Grün- Blau- und Falschfarben-Bild, wie sie oben bereits beschrieben sind, angeordnet. Dies ermöglicht nun den direkten Vergleich der Chromosomen mittels der unterschiedlichen Abbildungs- Techniken. Besonders wichtig ist die Karyotypentafel der Labormaus im weiteren Verlauf als Vergleich zu den später analysierten Karyotypen mit Robertson`schen Chromosomen. Sie gibt einen Überblick über die den einzelnen Chromosomen zugeordneten Falschfarben. Das erleichtert später die Analyse und Auswertung der mit Robertson`schen Translokationen veränderten Karyotypen. In allen untersuchten Metaphasen bestätigte sich der in den Abbildungen 4a-d dargestellte und im Text erklärte Karyotyp der NMRI- Labormaus.

Abbildung 4



Darstellung des Karyotypen der NMRI- Labormaus. Abb. 4a ist ein Bild der der Metaphase in DAPI-Gegenfärbung. Man erkennt den vollständig akrozentrische Chromosomensatz der NMRI-Labormaus, der sich aus 40 Chromosomen zusammensetzt. In Abb. 4b wird die Metaphase im sogenannten Rot- Grün- Blau- Modus gezeigt, in Abb. 4c in der Falschfarben- Darstellungsweise.

Abbildung 4

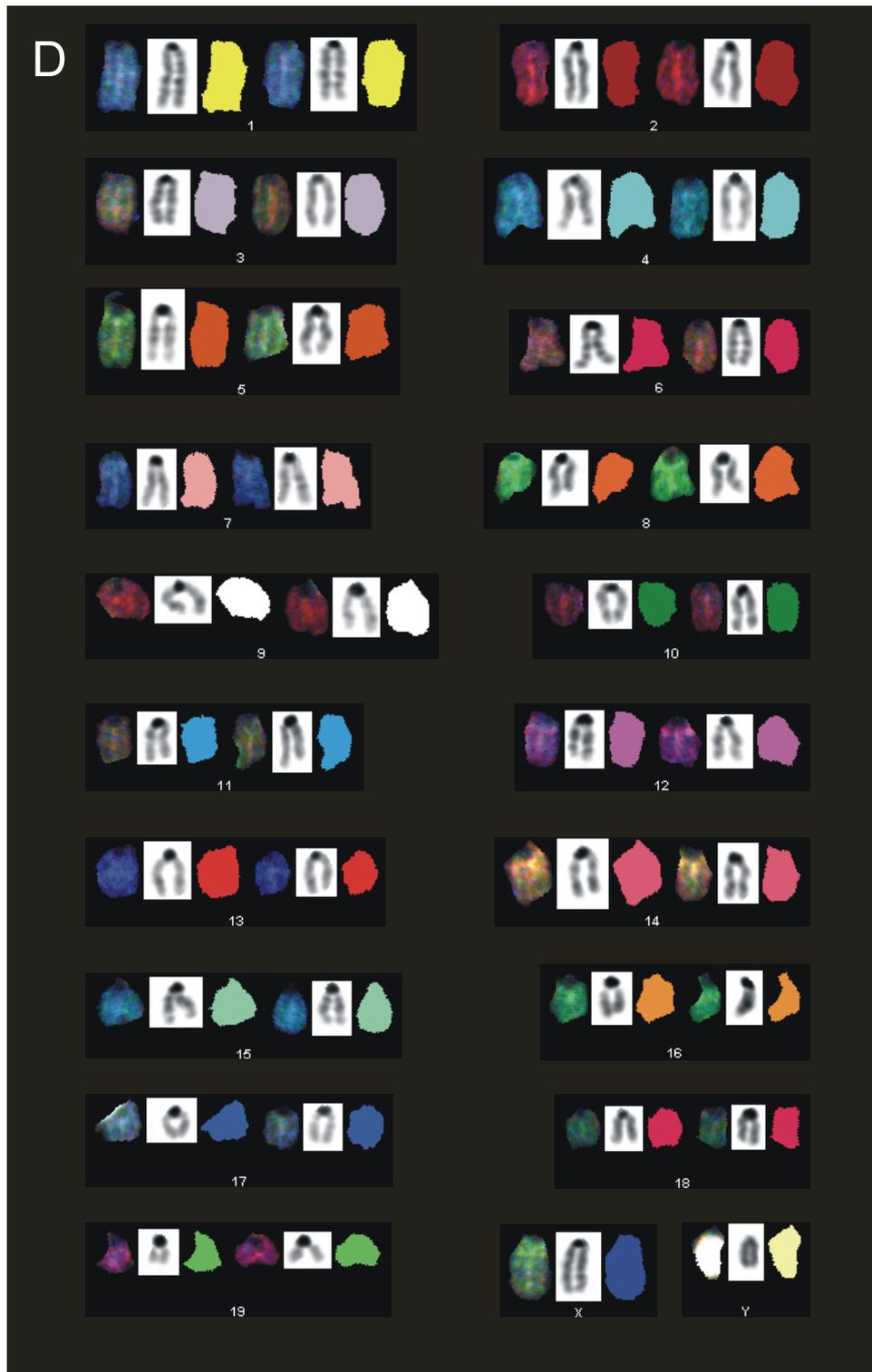


Abb. 4d: Karyotypen der NMRI- Labormaus in einer Karyotypentafel. Dabei sind DAPI-, Rot- Grün- Blau- Färbung und die Falschfarben Darstellungweise zur besseren Übersicht nebeneinander gegenübergestellt.

### 3.2.2. CD/CD

Für die Karyotypendarstellung der CD/CD- Population wurden ebenfalls mitotische Metaphase- Präparate aus Blutzellen verwendet. Im Gegensatz zu dem nur aus akrozentrischen Chromosomen bestehenden Karyotyp der NMRI- Labormaus, zeigen sich bei der DAPI- Darstellung der CD/CD- Population Abb. 5a bereits grundlegende Unterschiede. Bis auf nur vier akrozentrische Chromosomen setzt sich der übrige Karyotyp der CD/CD- Maus aus metazentrischen Chromosomen zusammen. Die Anzahl der Chromosomen ist dabei gegenüber dem Karyotypen der NMRI- Labormaus stark vermindert. Man zählt insgesamt lediglich 22 Chromosomen. Die Charakterisierung der einzelnen Chromosomen anhand dieser Abbildung gestaltet sich sehr schwierig. Im Rot- Grün- Blau- Bild Abb. 5b fällt auf, dass die metazentrischen Chromosomen aus zwei verschiedenen Farben zusammengesetzt sind. Getrennt durch den schwarz dargestellten Zentromer, erscheinen die beiden Chromosomenarme in unterschiedlichen Farben.

Dasselbe lässt sich auch im Falschfarben- Bild Abb. 5c beobachten: Bis auf die vier akrozentrischen Chromosomen sind alle anderen metazentrischen Chromosomen in jeweils zwei Farbhälften unterteilt. Anhand der zugeordneten Falschfarben kann man so die Robertson`schen Translokationen identifizieren.

Die Karyotypentafel Abb. 5d erlaubt schließlich eine exakte und übersichtliche Klassifizierung der Robertson`schen Translokationen. Man unterscheidet neun verschiedene homozygote Robertson`sche Translokationen. Die Spektrale Karyotypisierung bestätigt somit den mittels anderer Verfahren bereits ermittelten Karyotypen der CD/CD- Population. Wie bereits oben erwähnt und in den dazugehörigen Abbildungen Abb. 5a-d dargestellt lautet der CD/CD- Karyotyp dementsprechend wie folgt:

Rb (1.7) 1 Rma

Rb (3.8) 2 Rma

Rb (6.13) 3 Rma

Rb (4.15) 4 Rma

Rb (10.11) 5 Rma

Rb (2.18) 6 Rma

Rb (5.17) 7 Rma

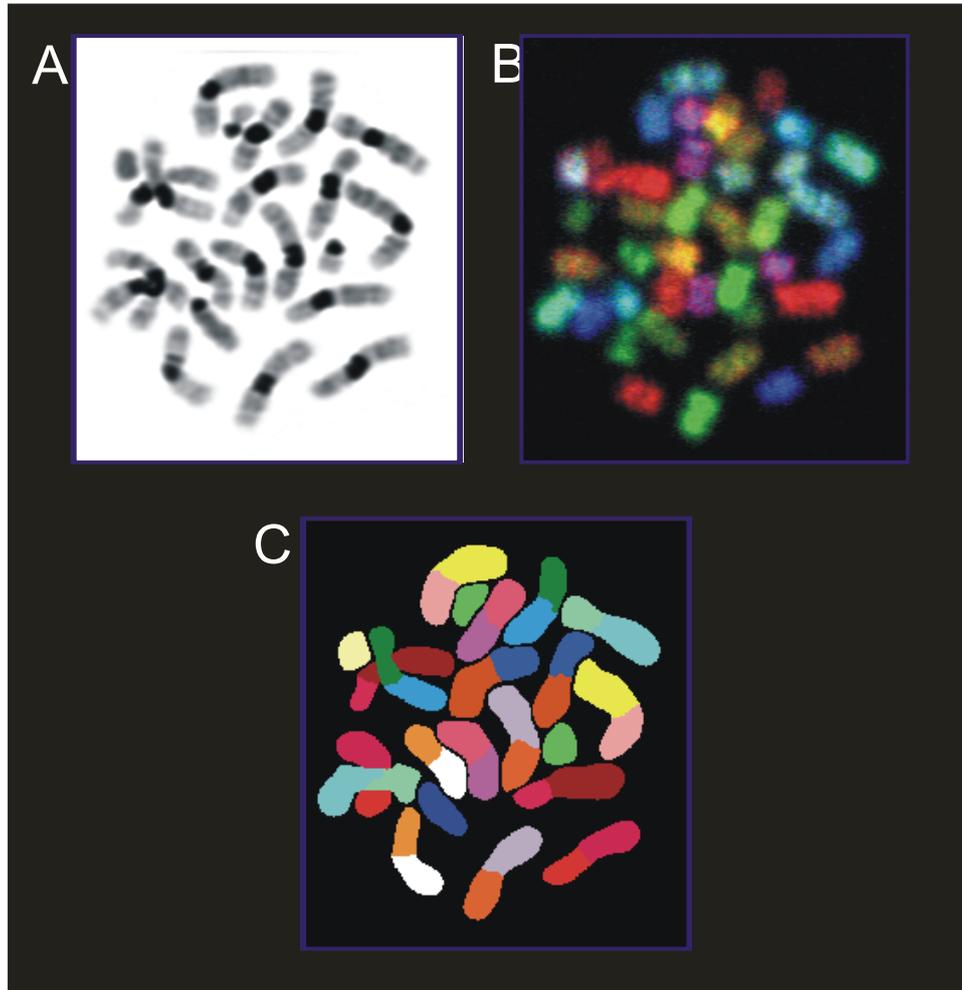
Rb (12.14) 8 Rma

Rb (9.16) 9 Rma

Die Geschlechtschromosomen X, Y und die Autosomen 19 liegen jeweils frei vor.

Die SKY- Analyse überzeugte mit demselben Ergebnis bei jeder der zehn untersuchten Metaphasen. Der für diese Population erwartete Karyotyp konnte mittels Spektraler Karyotypisierung exakt nachgewiesen und übersichtlich veranschaulicht werden.

Abbildung 5



Karyotypendarstellung der CD/CD- Population des Mitosepräparates. Abb. 5a stellt die DAPI-Darstellung der CD/CD- Population dar. Abb. 5b zeigt den Karyotypen in der Rot- Grün- Blau- Färbung und Abb. 5c in der Falschfarben Darstellungsweise. Man erkennt vier akrozentrischen Chromosomen und 18 metazentrischen Chromosomen.

Abbildung 5

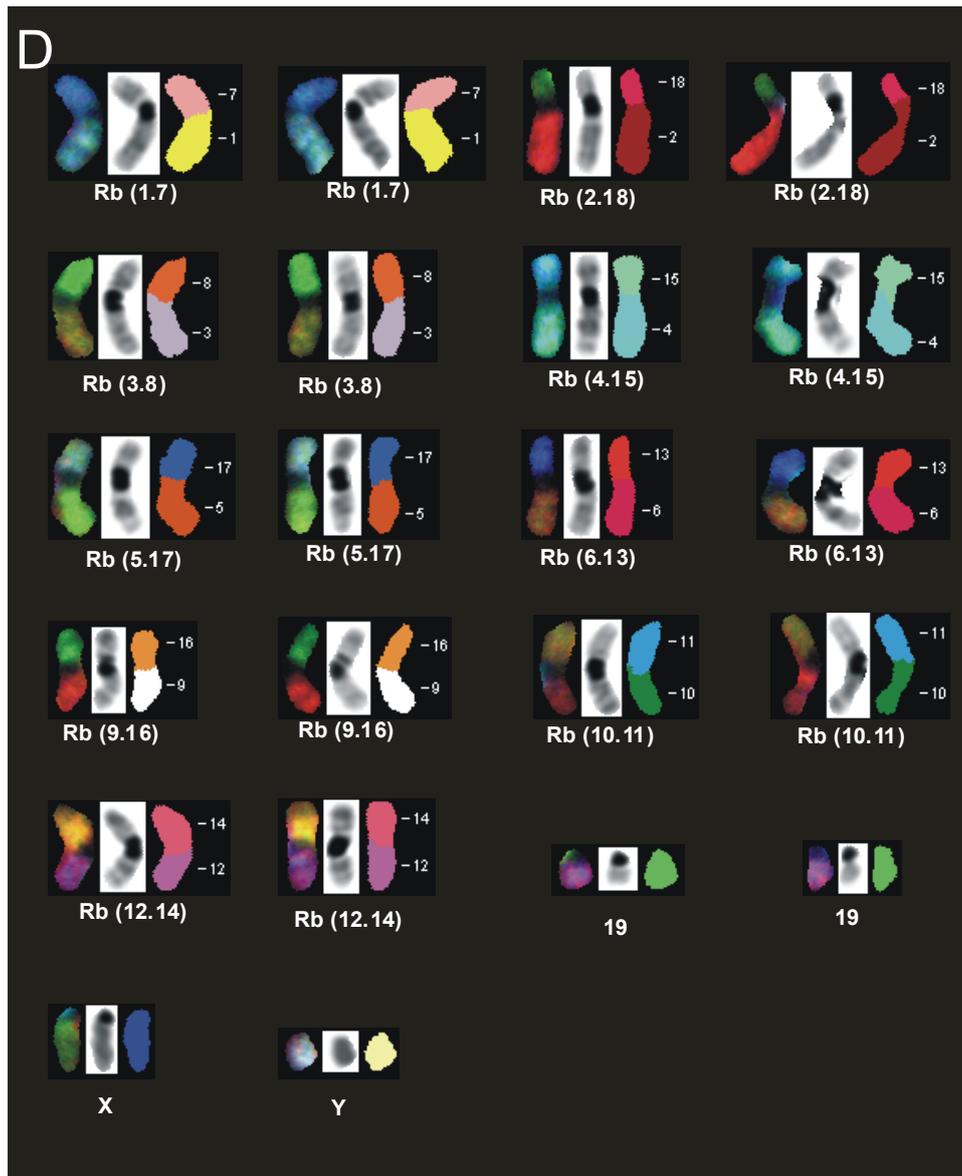


Abb.5d: Darstellung der Chromosomen der CD- Population in der Karyotypentafel. Man kann neun verschiedene homozygote Robertson'sche Translokationen unterscheiden.

### **3.2.3. F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit NMRI-Labormaus, Mitosepräparat**

Schon die DAPI- Färbung Abb. 6a dieser aus Blutzellen gewonnenen Metaphase zeigt einen gegenüber den Elterntieren völlig veränderten Karyotyp. Die Kreuzung scheint wie erwartet aus einer Kombination der akrozentrischen Chromosomen der NMRI- Labormaus und den metazentrischen Chromosomen der CD/CD- Population zu bestehen. Man kann insgesamt 22 akrozentrische von neun metazentrischen Chromosomen unterscheiden.

Ähnliche Informationen lassen sich auch aus Abbildung 6b ziehen. Desweiteren erkennt man hier, dass die akrozentrischen einfarbig dargestellt sind, während man bei den metazentrischen zwei durch das Zentromer getrennte Seiten verschiedener Farbe unterscheiden kann.

Die Abbildung der Metaphase in der „classification colour“- Variante (Abb. 6c) und die Anordnung der Chromosomen in der Karyotypentafel Abb. 6d, zeigen schließlich eindeutig den erwarteten Karyotyp der Kreuzung CD/CD mit NMRI- Labormaus. Von jedem Elterntier wird definitionsgemäß je ein homologes Chromosom an die F1- Tochtergeneration weitergegeben. Dementsprechend stammen die metazentrischen Chromosomen dieser Kreuzung von der CD/CD- Population ab, während die akrozentrischen von der Labormaus vererbt sind. Eine Ausnahme bilden in der Hinsicht die Chromosomen 19, X und Y, da sie in beiden Elternpopulationen in freier Form vorliegen. Bei den metazentrischen Chromosomen handelt es sich um Robertson`sche Translokationen. Diese kommen in der F1- Generation aber im Gegensatz zur CD/CD- Population nicht mehr homozygot vor, sondern sind nur je einmal vorhanden.

Zusammenfassend soll der Karyotyp, der bei allen analysierten Metaphasen dieser Kreuzungspopulation gefunden wurde, kurz aufgelistet werden:

Rb (1.7) 1 Rma

Rb (3.8) 2 Rma

Rb (6.13) 3 Rma

Rb (4.15) 4 Rma

Rb (10.11) 5 Rma

Rb (2.18) 6 Rma

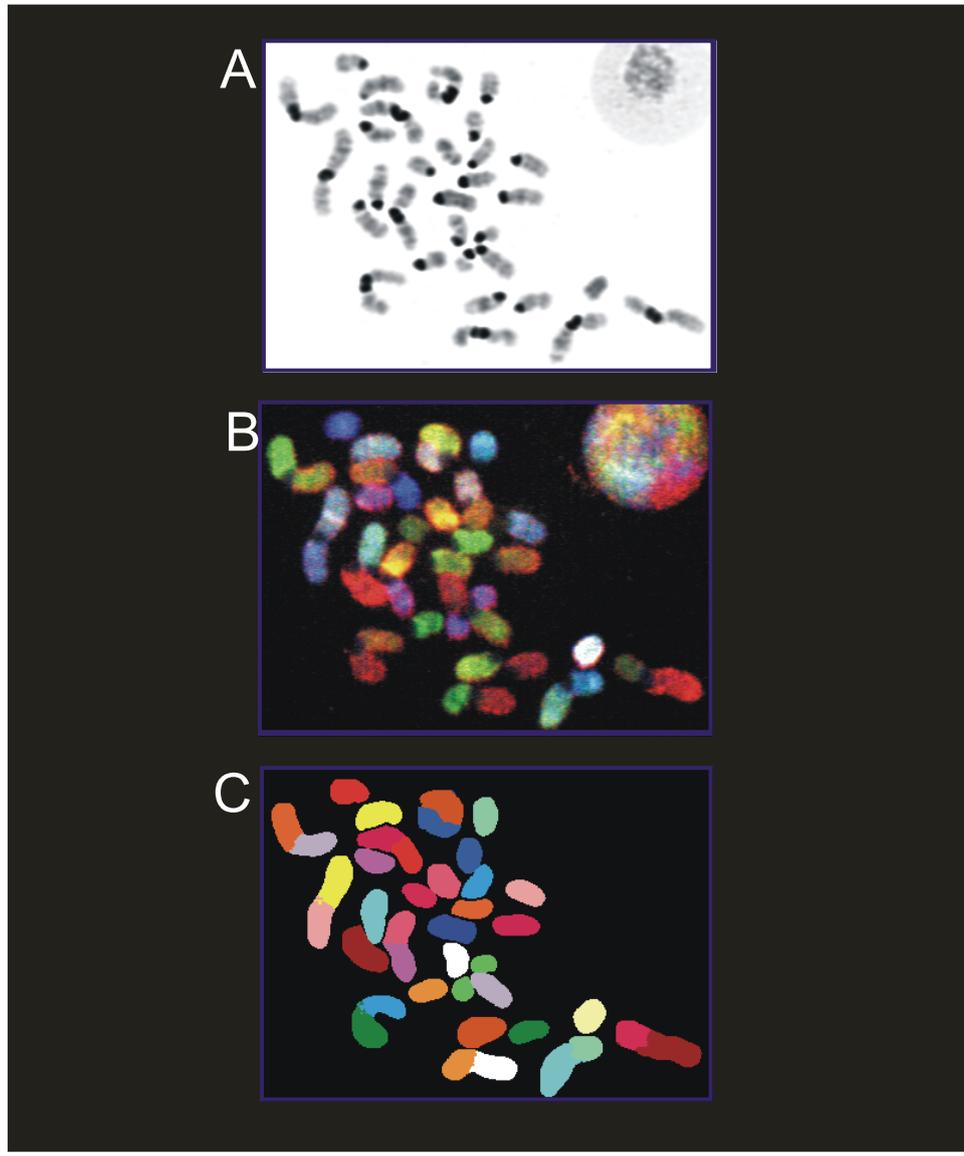
Rb (5.17) 7 Rma

Rb (12.14) 8 Rma

Rb (9.16) 9 Rma

Des Weiteren die einzelnen Chromosome 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 und 18. Schließlich als letztes aufgezählt, das paarig vorkommende Autosom 19 und X, Y.

Abbildung 6



F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit NMRI- Labormaus, Mitosepräparat. In der DAPI- Färbung Abb. 6a und der Rot- Grün- Blau- Färbung (b) kann man insgesamt 22 akrozentrische von neun metazentrischen Chromosomen unterscheiden. Die Abbildung Abb. 6c zeigt die Metaphase in der sogenannten classification colour“- Variante. Eine Zusammenfassung dieser drei Darstellungsvarianten bietet die Karyotypentafel Abb. 6d.

Abbildung 6



Abb. 6d: Darstellung der F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit NMRI- Labormaus in der Karyotypentafel.

### **3.2.4. F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit NMRI-Labormaus, Meiosepräparat**

Zur Analyse der Metaphasen wurden entsprechende Präparate aus Hodenmaterial der F1-Generation präpariert.

Betrachtet man alleine die DAPI- Färbung Abb. 7a fallen mehrere Dinge ins Auge: Zum einen sind die einzelnen Chromosomen nicht mehr klar voneinander abgrenzbar. Die Chromosomen scheinen gruppiert bzw. kettenartig angeordnet. Man kann drei Zentromere innerhalb jeder dieser Strukturen erkennen, zwei flankieren je die Seiten und der Dritte liegt in der Mitte. Lediglich zwei chromosomale Strukturen weichen von diesem Aufbau der übrigen neun ab. Einmal eine kleinere Struktur, deren Enden von zwei Zentromeren begrenzt wird. Zum anderen eine Struktur, die in der DAPI- Färbung schon als „Sex- Vesicle“ identifiziert werden kann, wobei hier nur ein Zentromer an einem Ende differenziert werden kann.

Weitere Information liefert die Rot- Grün- Blau- Abbildung 7b. Die neun kettenartigen chromosomalen Strukturen sind, getrennt durch den mittleren Zentromer, mit zwei verschiedenen Farben angefärbt. Während das „Sex- Vesicle“ auch zwei unterschiedliche Farben zeigt, erscheint die übrige Figur einfarbig.

Dasselbe Ergebnis liefert auch die Falschfarben- Darstellung Abb. 7c. Betrachtet man allein die Farbkombinationen, die die neun kettenartigen Strukturen charakterisieren, so spiegeln diese die Robertson`schen Translokationen der CD/CD- Population wider.

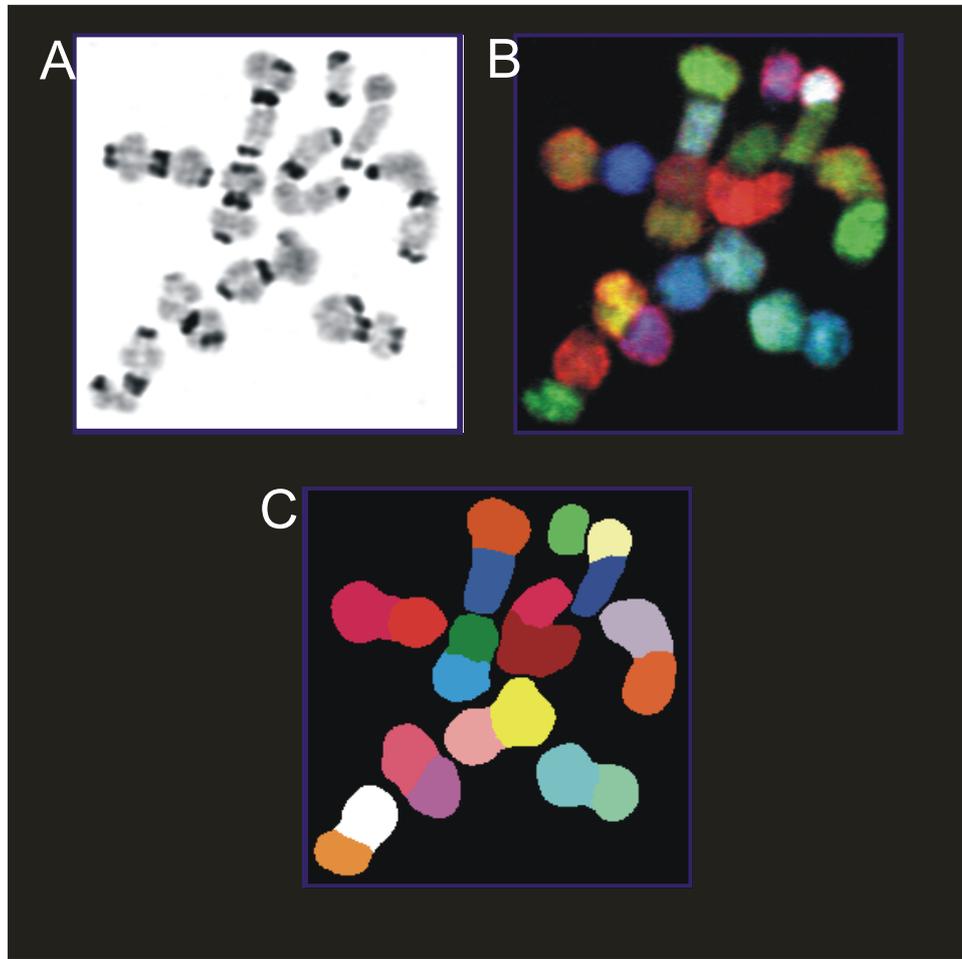
Die Karyotypentafel Abb. 7d klärt schließlich wie die Meiosefigur aufgebaut ist. Die jeweils zu den üblichen Darstellungen zugefügte Schemazeichnung soll verdeutlichen, wie sich in dieser Population die homologen Chromosomen in der Meiose aneinander lagern. Das Robertson`sche Chromosom liegt jeweils in der Mitte, während die dazu homologen, aber in freier Form vorliegenden Chromosomen sich an dessen zugehörigen Enden anlagern. Diese Strukturen werden auch als Trivalente bezeichnet. Entsprechend nennt man die Form in der die Autosomen 19 und X, Y vorliegen Bivalente. Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt die vorherigen Abbildungen, fällt ihre Interpretation im Nachhinein leichter. Vor allem die Lage der Zentromere wird so erklärt.

In allen 52 untersuchten Metaphasen konnte diese Meiosefigur für die analysierte Population nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde noch die Lagebeziehung von X und Y zueinander und die Lage zudem Chromosomenpaar 19 untersucht. In 78% der untersuchten Metaphasen lagen die Gonosomen

X, Y zusammen. In 29% der Fälle lag ebenso das Chromosomenpaar 19 benachbart zu X, Y. Lediglich bei einer geringen Anzahl (12%) waren X, Y und 19 völlig isoliert voneinander.

Abbildung 7



Darstellung der F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit NMRI-Labormaus, Meiosepräparat. DAPI-Färbung Abb. 7a, Rot-Grün-Blau-Abbildung 7b und Falschfarben-Darstellung Abb. 7c.

Abbildung 7

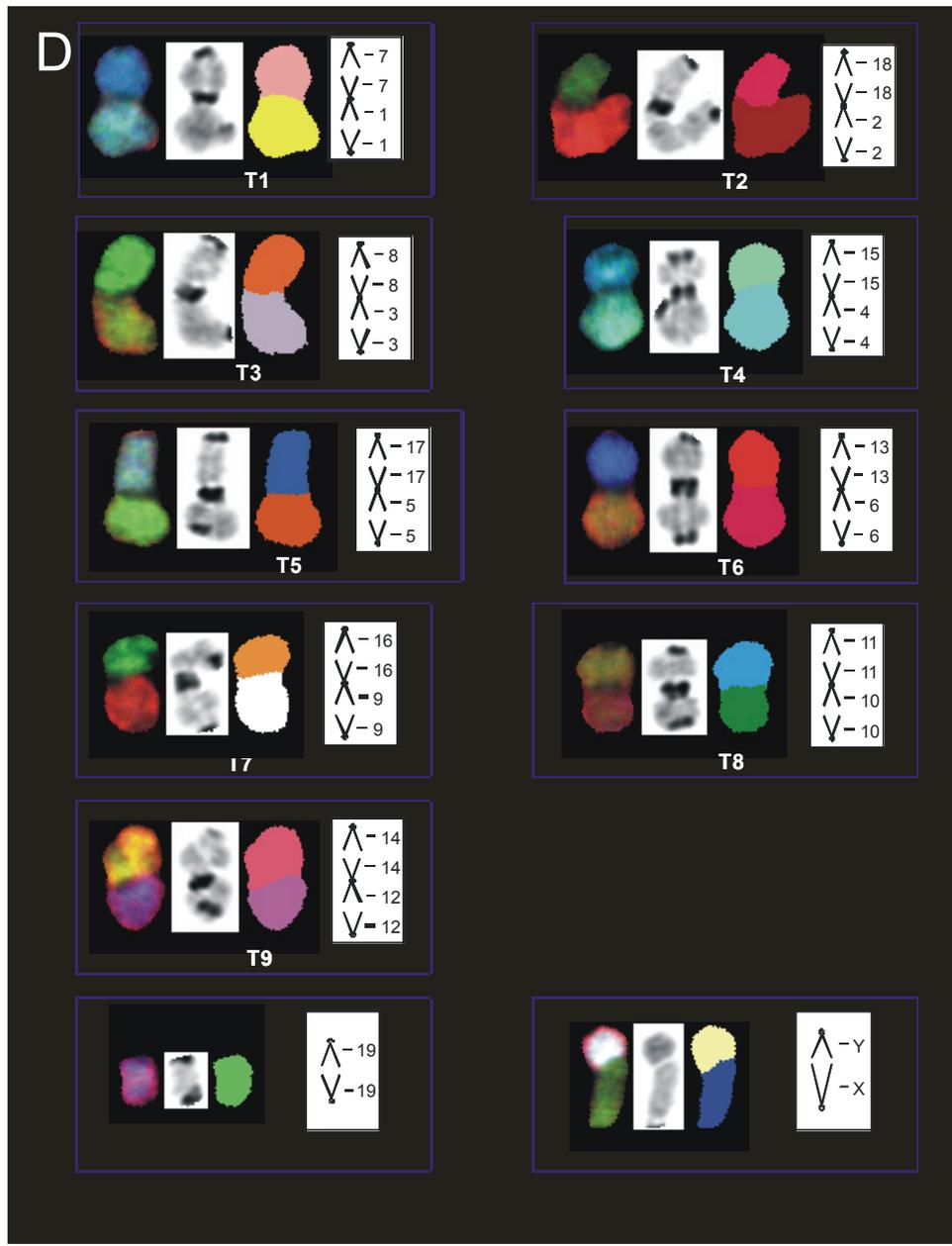


Abb. 7d: Darstellung der F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit NMRI-Labormaus in der Karyotypentafel. Die Schemazeichnung soll verdeutlichen, wie sich in dieser Population die homologen Chromosomen in der Meiose aneinander lagern. Nämlich das Robertson'sche Chromosom liegt jeweils in der Mitte, während die dazu homologen, aber in freier Form vorliegenden Chromosomen sich an dessen zugehörigen Enden anlagern. Diese Strukturen werden auch als Trivalente bezeichnet.

### **3.3. CD/CD mit Cremona**

Beim zweiten Kreuzungsansatz fungierten Tiere aus der CD/CD- Population und der Cremona- Population, abgekürzt CRE/CRE, als Elterntiere. Die Mitose- Präparate der untersuchten Metaphasen beider Elterntiere wurden jeweils aus Blutzellen hergestellt. Da der Karyotyp der CD/CD- Population unter 1.1 bereits ausführlich beschrieben und dargestellt wurde, wird auf eine Wiederholung dessen verzichtet.

#### **3.3.1. Cremona**

In der DAPI- Darstellung der CRE/CRE- Population Abb. 8a erkennt man ein ähnliches Bild wie bei der CD/CD- Population. Der bei der NMRI- Maus noch vollständig akrozentrische Chromosomensatz besteht bei Cremona aus nur noch vier akrozentrischen, aber 18 metazentrischen Chromosomen. Die exakte Identifizierung der einzelnen Chromosomenarme erlaubt diese DAPI- Darstellung nicht.

Auch das Rot- Grün- Blau- Bild Abb. 8b enthält keine weiteren Informationen über den Karyotyp von Cremona. Ebenfalls lässt der Vergleich dieser Darstellung mit der äquivalenten der CD/CD- Population keine eindeutige Aussage über die einzelnen Chromosomenarme zu. Die Farbnuancen sind oft zu fein und die Intensität der Farben in den Metaphasen zu verschieden, um eine genaue Zuordnung zu ermöglichen.

Erst durch die Darstellung der Metaphase in den vom Computer zugewiesenen Falschfarben Abb. 8c wird die Identifizierung der Robertson`schen Translokationen möglich. Man erkennt nun, dass es sich bei CD/CD und Cremona, obwohl beide die gleiche Anzahl von metazentrischen und akrozentrischen Chromosomen besitzen, um unterschiedliche Populationen handelt.

Die Übersicht in der Karyotypentafel Abb. 8d zeigt den für die Cremona- Population erwarteten Karyotyp. Auch hier handelt es sich um neun homozygote Robertson`sche Translokationen deren Charakterisierung bereits mit anderen zytogenetischen Methoden gelang. Der vollständige Karyotyp lautet:

Rb (1.6) 47 Lub

Rb (3.4) 48 Lub

Rb (2.8) 49 Lub

Rb (5.15) 50 Lub

Rb (10.12) 51 Lub

Rb (11.13) 52 Lub

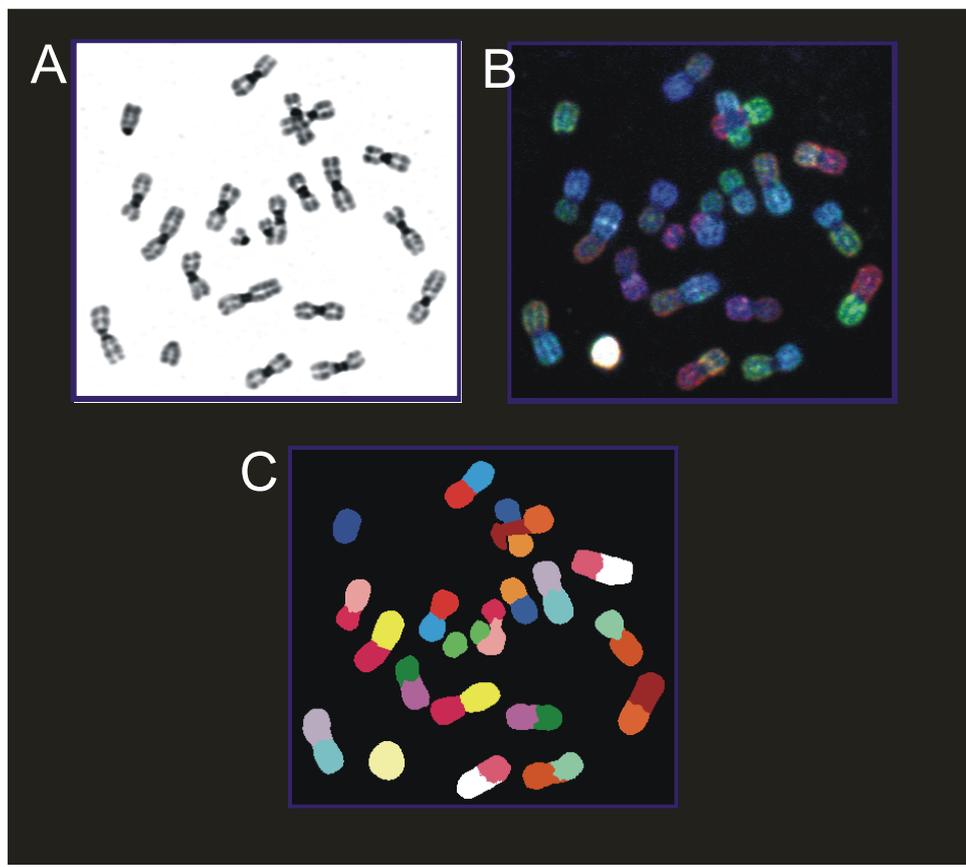
Rb (9.14) 53 Lub

Rb (16.17) 54 Lub

Rb (7.18) 55 Lub

Die Gonosomen X, Y und die beiden Autosomen 19 liegen frei vor. Die einzelnen Translokationen sind also völlig verschieden zu denen der CD/CD- Population. Dieser Karyotyp konnte in allen zehn untersuchten Metaphasen dieser Population mittels SKY-Analyse nachgewiesen werden.

Abbildung 8



Darstellung der Metaphasen von Cremona, Mitosepräparat. Abb. 8a zeigt die DAPI- Darstellung der CRE/CRE- Population, Abb. 8b das Rot- Grün- Blau- Bild. Man kann vier akrozentrischen und 18 metazentrischen Chromosomen erkennen. Abb. 8c präsentiert die Falschfarben- Darstellung.

Abbildung 8

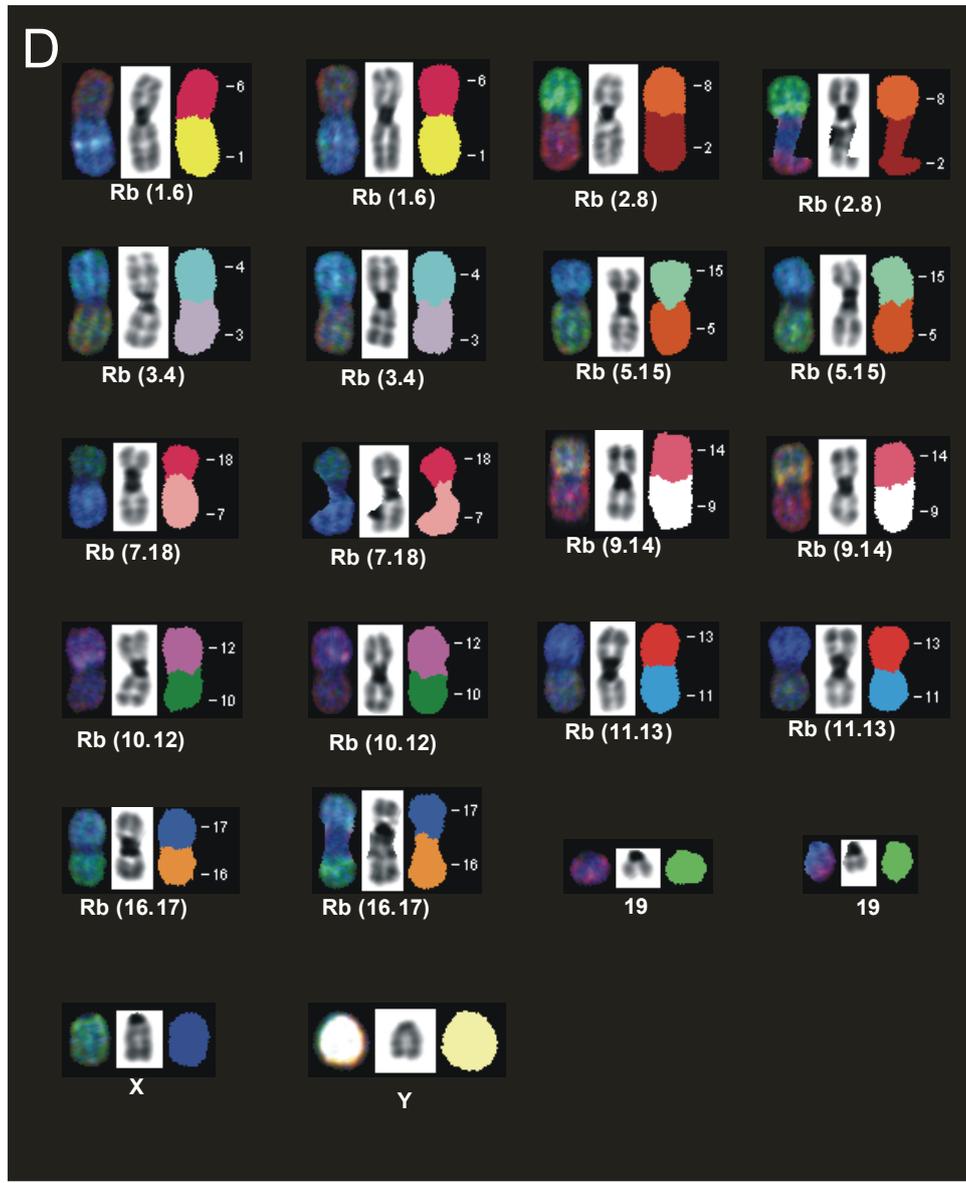


Abb. 8d: Übersicht über die verschiedenen Darstellungsweisen (DAPI-, Rot- Grün- Blau- Färbung, Falschfarben) des Cremona- Karyotypen in der Karyotypentafel.

### **3.3.2. F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit Cremona, Mitosepräparat**

Wie aus der oben angeführten Karyotypen- Beschreibung der Elterntiere ersichtlich wird, ist der Chromosomensatz der beiden Populationen aus jeweils unterschiedlichen Robertson'schen Translokationen aufgebaut. Besonders interessant bei der Analyse der F1 Tochtergeneration ist die Verteilung der Translokationen der beiden Populationen im F1 Karyotyp. Zur SKY- Analyse der F1- Mitose- Präparaten wurden aus Blutzellen isolierte Metaphasen verwendet.

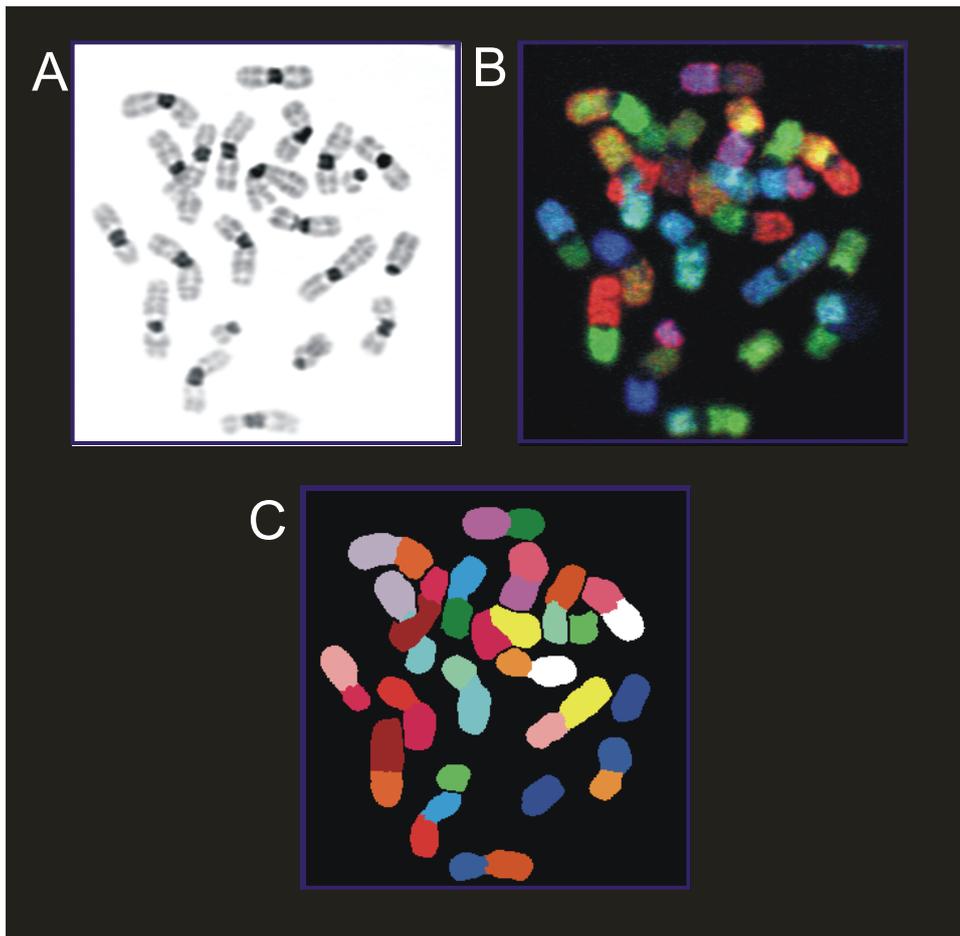
Sowohl die DAPI- Färbung Abb. 9a, als auch die sogenannte Rot- Grün- Blau- Abbildung 9b dieser Metaphase, können die konkrete Zusammensetzung der Robertson'schen Translokationen nicht klären. Man erkennt jedoch einen Karyotyp, der aus 18 metazentrischen und 4 akrozentrischen Chromosomen besteht. Zum Teil sind die akrozentrischen Chromosomen, zum Beispiel die Gonosomen, anhand der DAPI- Abbildung eindeutig zu identifizieren.

Was die Darstellung anhand der Falschfarben Abb. 9c bereits demonstriert, verdeutlicht schließlich die Chromosomen- Anordnung in der Karyotypentafel Abb. 9d: Die Robertson'schen Translokationen von beiden Elterntieren kommen im F1 Karyotyp vor. Diese Translokationen sind aber nun nicht mehr homozygot vorhanden. Es handelt sich nunmehr um 18 verschiedene Robertson'sche Translokationen. Unverändert liegen die beiden homologen Chromosomen 19 und die Gonosomen frei vor. Die herterozygoten Robertson'schen Translokationen lauten folgendermaßen:

Rb (1.7)	Rb (6.13)
Rb (1.6)	Rb (7.18)
Rb (2.8)	Rb (9.16)
Rb (2.18)	Rb (9.14)
Rb (3.4)	Rb (10.11)
Rb (3.8)	Rb (10.12)
Rb (4.15)	Rb (11.13)
Rb (5.15)	Rb (12.14)
Rb (5.17)	Rb (16.17)

Auch dieses Ergebnis konnte bei der Analyse 16 weiterer Metaphase dieser F1 Generation verifiziert werden.

Abbildung 9



F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit Cremona. Anhand der DAPI- Färbung Abb. 9a, als auch anhand der Rot- Grün- Blau- Färbung Abb. 9b dieser Metaphase kann man einen Karyotyp, der aus 18 metazentrischen und 4 akrozentrischen Chromosomen besteht, erkennen. Abb.9c Darstellung der Metaphase anhand der Falschfarben. Zur Identifizierung der einzelnen Chromosomen mittels Falschfarben vergleiche Abb. 9d.

Abbildung 9



Abb. 9d: F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit Cremona, Mitosepräparat: Chromosomen-Anordnung in der Karyotypentafel.

### 3.3.3. F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit Cremona, Meiosepräparat

Zur Untersuchung der Chromosomen- Anordnung in der Meiose der F1- Generation wurden entsprechende Präparate aus den Hoden verwendet. Da die Armzusammensetzung der Rb- Chromosomen der F1 Generation bekannt ist, kann man die Meiosefiguren dieser Hybriden voraussagen.

Bereits das DAPI- Bild Abb. 10a und auch die Rot- Grün- Blau- Darstellung Abb. 10b lassen den erwarteten Ring aus 18 Rb- (Robertson`schen translozierten) Chromosomen erkennen. Allerdings kann man aus diesen Bildern die einzelnen Chromosomen im Ring nicht identifizieren, obwohl man prinzipiell ihre Anordnung im Ring kennt.

Die Abb. 10c ermöglicht mit einem Blick die Identifizierung jedes beliebigen Chromosoms. Diese Falschfarben- Darstellung zeigt die vorher bereits angenommene Anordnung der Chromosomen im Ring. Die für die Metaphase der Meiose typische Paarung der homologen Chromosomen, ist bei einer derartigen Konstellation der Robertson`schen Translokationen allein durch eine solche Ringanordnung zu erreichen. Die vereinfachte Schemazeichnung Abb. 11 verdeutlicht die Aneinanderlagerung der homologen Chromosomen.

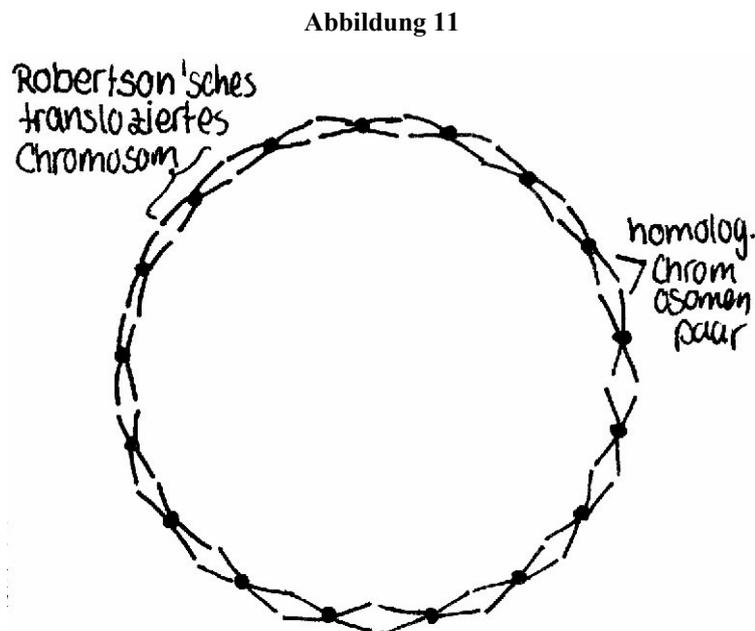
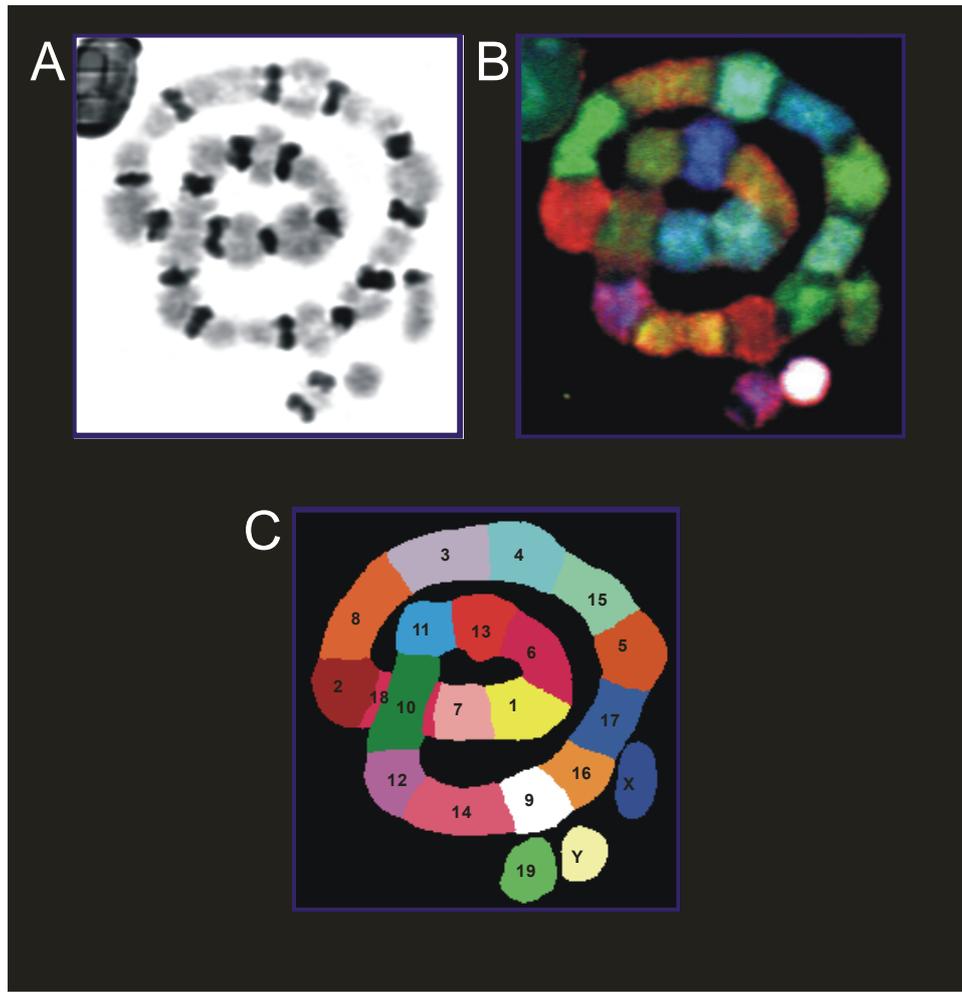


Abb. 11: Vereinfachte Darstellung der meiotischen Chromosomenanordnung der Population CD/ Cremona.

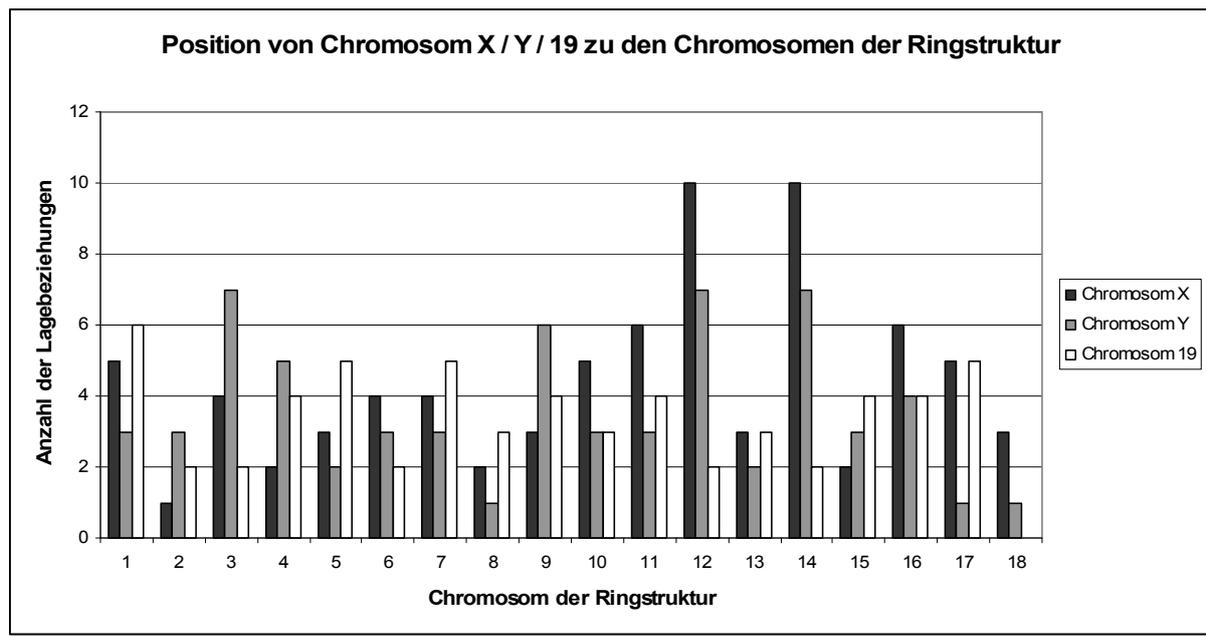
Abbildung 10



F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit Cremona, Meiosepräparat. Abb.10a zeigt die DAPI-Darstellung des Meiosepräparates, Abb.10b die Rot- Grün- Blau- Darstellung. Sie zeigen beide einen Ring aus 18 Rb- Chromosomen. Die Abb. 10c ist die Falschfarben- Darstellung des 18 Rb- Chromosomen Rings. Jede Falschfarbe symbolisiert ein Chromosom. Zur Verdeutlichung sind die Chromosomen in dieser Abbildung bereits entsprechend beschriftet.

In allen 42 untersuchten Meiosefiguren ergab sich dieselbe charakteristische Chromosomenanordnung. Auf diese Weise lässt sich auch die Lage der freien Chromosomen X, Y und 19 zu den Chromosomen im Ring analysieren. Dabei muss selbstverständlich berücksichtigt werden, dass es sich real um dreidimensionale Anordnungen handelt, die Auswertung aber nur anhand von zweidimensionalen Bildern erfolgt. Beschrieben wurde jeweils an welcher Chromosomenposition der Ringstruktur sich die Chromosomen X, Y und 19 befinden. Das Diagramm 1 zeigt die genauen Ergebnisse. Chromosom X war am häufigsten in der Nachbarschaft zu den Chromosomen 12 und 14 lokalisiert; dies traf ebenso auf Chromosom Y zu, wobei Chromosom Y noch genauso häufig in Nachbarschaft zu Chromosom 3 lag. Das Chromosomenpaar 19 befand sich am häufigsten in der Nähe von Chromosom 1 der Ringstruktur, wobei die Lagebeziehungen zu den einzelnen Chromosomen gleichmäßiger verteilt waren als bei den Chromosomen X und Y.

**Diagramm 1**

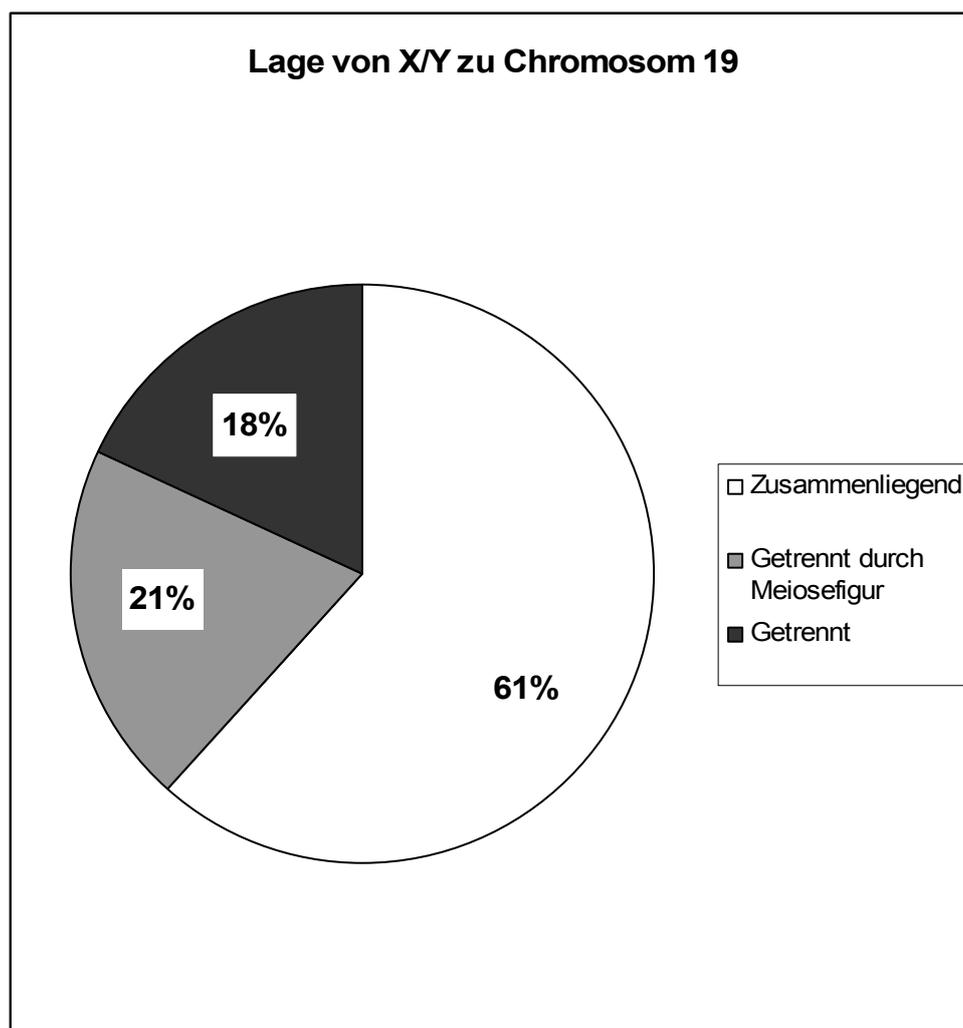


Auswertung der Lagebeziehungen von X, Y und Chromosom 19 zu den in der Meiosefigur enthaltenen Chromosomen.

In den 42 untersuchten Metaphasen wurde auch die Lage der Geschlechtschromosomen zu den homologen Chromosomen 19 betrachtet. Besonderes interessierte dabei, ob die Geschlechtschromosomen und die homologen Chromosomen während der Meiose in Beziehung zueinander stehen. Zur Auswertung wurde ihre nachbarschaftliche Lage während der Meiose herangezogen. Dabei wurden drei Zustände unterschieden: Zum einen, es besteht überhaupt kein Kontakt bzw. Nachbarschaft zwischen X/Y und dem homologen

Chromosomenpaar 19; dann die Geschlechtschromosomen und die Chromosomen 19 liegen zwar in unmittelbarer Nähe zueinander, sind aber lediglich durch einen Teil der Meiosefigur voneinander getrennt; und schließlich X/Y und 19 liegen in unmittelbarer Nachbarschaft. Diese Unterscheidung war nötig, da man beachten sollte, dass es sich bei den zweidimensionalen Bildern in der Realität um dreidimensionale Meioseanordnungen handelt. Das heißt, dass durch die Meiosefiguren getrennt erscheinende Chromosomen X/Y und 19, in der Wirklichkeit in unmittelbarer Nachbarschaft liegen können. Die statistische Bewertung ergab folgendes Ergebnis: In 61% der Fälle lagen X/Y und Chromosom 19 in unmittelbarer Nachbarschaft. In 21% waren die Geschlechtschromosomen durch die Meiosefigur vom Chromosom 19 getrennt. Eine voneinander völlig unabhängige Lage ergab sich in 18% der ausgewerteten Meioseanordnungen.

**Diagramm 2**



Auswertung der Lage von X und Y zu Chromosom 19 während der Meiose der CD/ CRE- Population. Drei Präparate stellen Sonderfälle dar, da Chromosom 19 hier zwar in Nachbarschaft zu einem Geschlechtschromosom liegt, aber X und Y getrennt sind.

Zur Vervollständigung der Analyse der Lagebeziehung von den Geschlechtschromosomen und dem Chromosom 19 wurde noch detailliert die Lage vom Chromosom 19 zu dem Geschlechtschromosom X bzw. Y untersucht. In 38% der Fälle lag Chromosom 19 näher an dem X- Chromosom; in 62% näher am Y- Chromosom.

**Tabelle 3**

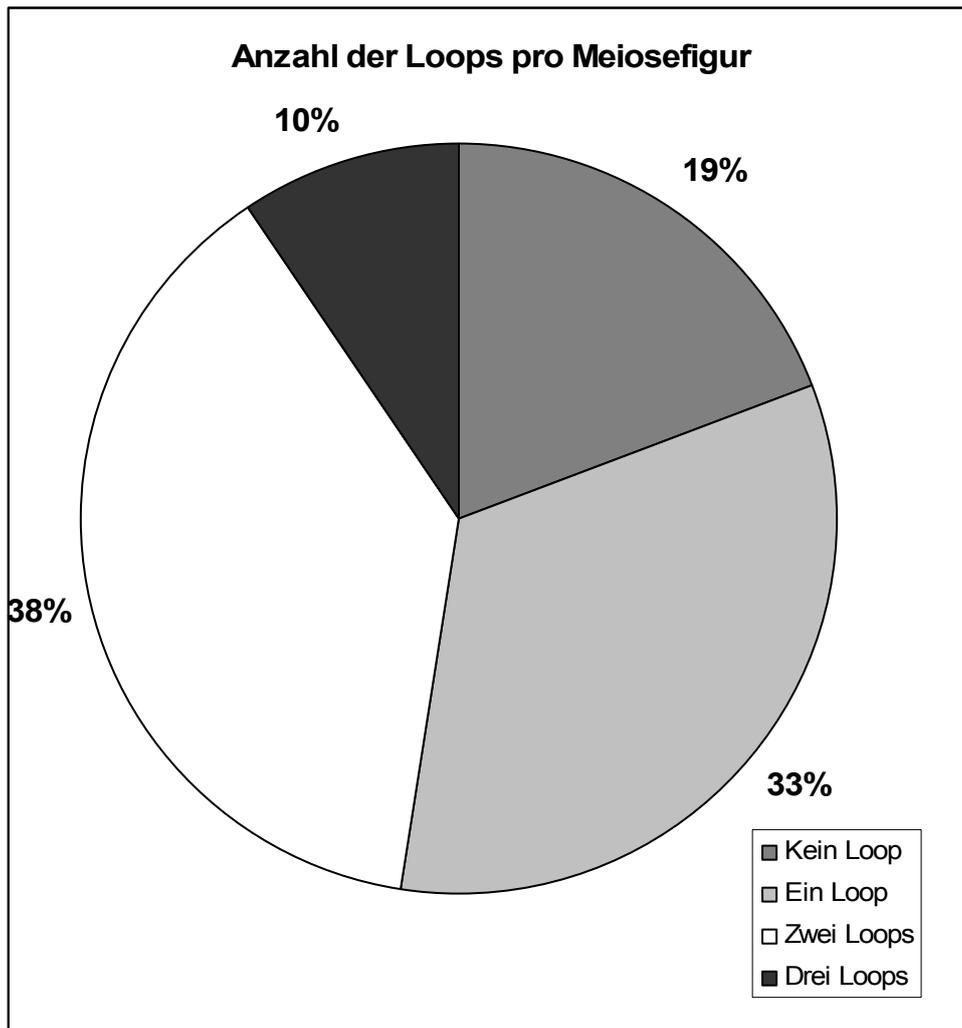
Chromosom 19 näher bei X	Chromosom 19 näher bei Y
38% (n=8)	62% (n=13)

Tabellarische Auswertung der Lage von X zu Chromosom 19 und der Lage von Y zu Chromosom 19 während der Meiose der CD/ CRE- Population. Bei drei Präparaten sind X und Y gleichweit von Chromosom 19 entfernt.

Zur genaueren Analyse erfolgte auch eine Auswertung der Lagebeziehung der Geschlechtschromosomen X und Y zueinander. Das Ergebnis zeigt, dass in der überwiegenden Anzahl der Fälle, nämlich in 91% der untersuchten Meiose- Proben, die Geschlechtschromosomen X und Y direkt zusammenliegen. In 7 % der Fälle sind X und Y nur durch die Meiosefigur voneinander getrennt, und nur in einem Fall (entspricht 2%) stehen X und Y in keinem direkten Kontakt.

Wie bereits oben beschrieben ist die einzig mögliche Meioseanordnung der F1-Tochtergeneration der Kreuzung aus CD/CD und Cremona die Ringstruktur. Interessanter Weise zeigte die zweidimensionale Darstellung der Meiosefiguren aber nur in 19% der Fälle eine einfache Ringstruktur. Viel häufiger dagegen bildeten die Meiosefiguren so genannte Loops, das heißt dass die Ringstruktur sich in sich verdreht darstellte. In 19% der Fälle lagerten sich die Chromosomen in der Meiose in einer einfachen Ringstruktur aneinander, wohingegen in 33% bzw. 38% der Fälle Einer- bzw. Zweier Loops entstanden und in 10% sogar Dreier- Loops.

Diagramm 3



Auswertung der Loopbildung bei den Meiosefiguren der CD/CRE Population.

Abbildung 12

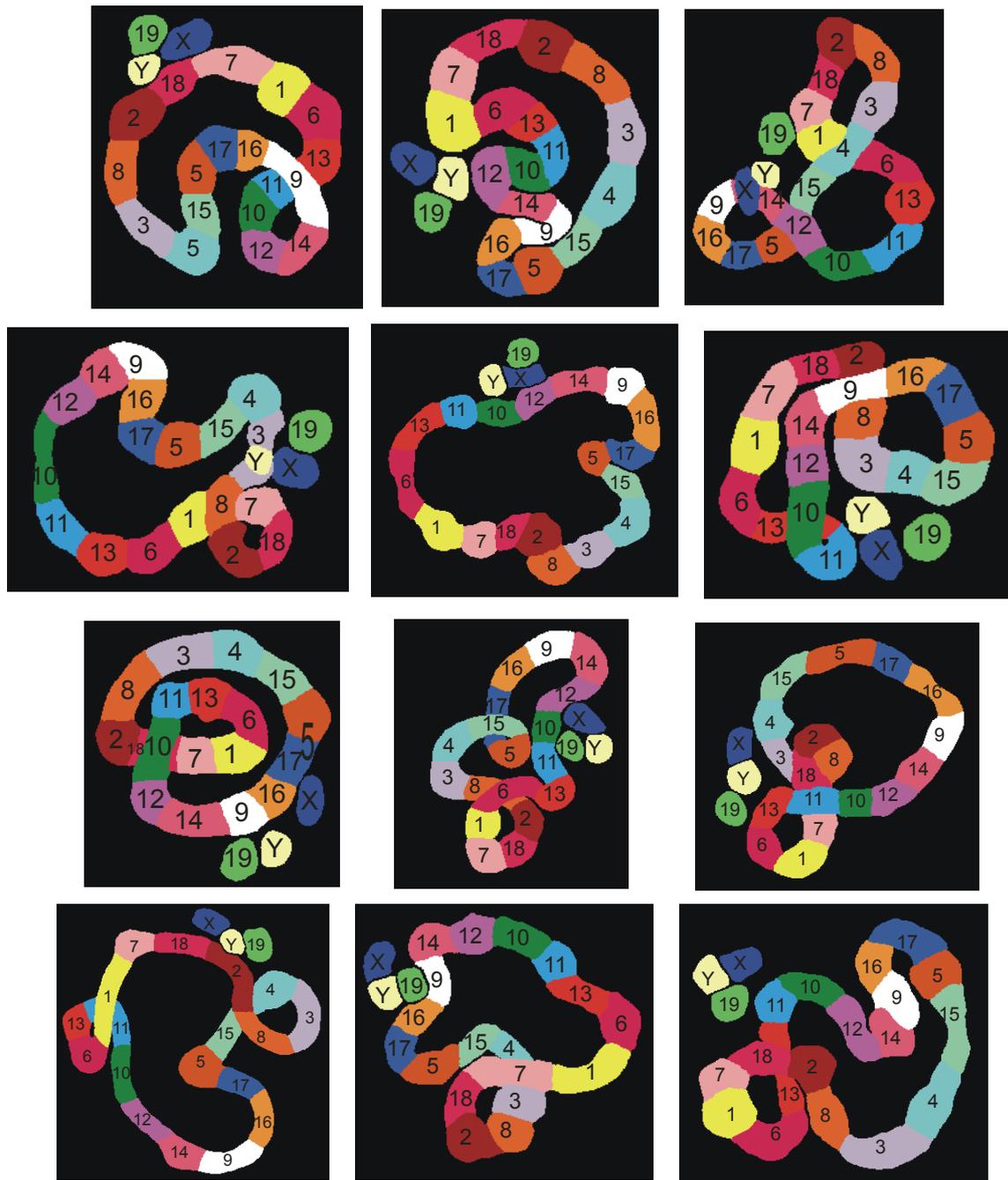


Abb.12: F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit Cremona, Meiosepräparat. Die Abbildung zeigt verschiedene Beispiele, die die Lagebeziehung von X, Y und 19 untereinander und zur Meiosefigur verdeutlichen soll. Bei allen abgebildeten Meiosefiguren liegen X, Y und Chromosom 19 in unmittelbarer Nähe zueinander.

### **3.4. CD/CD mit TA/TA**

Im letzten der drei Kreuzungsversuche wurde die bereits zu Beginn charakterisierte CD/CD Population mit der sogenannten TA/TA- Population gekreuzt.

#### **3.4.1. TA/TA- Population**

Die SKY- Analyse dieser Population wurde anhand von aus Blutzellen isolierten Metaphasen durchgeführt.

Wie die Abbildungen 13a und 13b bereits zeigen, besteht der Karyotyp der TA/TA- Population aus 14 metazentrischen und 12 akrozentrischen Chromosomen. Vergleicht man diese beiden Darstellungen der Metaphase miteinander, lässt sich vermuten, dass es sich um jeweils 7 bzw. 5 Paare (plus X, Y) homologer Chromosomen handelt.

Die Abbildung 13c liefert den Beweis für diese Vermutung. Gegenüber den Populationen Cremona und CD/CD, liegen hier fünf Paare homologer Chromosomen, nämlich die Autosomen 2, 7, 10, 18 und 19, und die Geschlechtschromosomen in freier Form vor. Die metazentrischen Robertson`schen Chromosomen sind ebenfalls homozygot vorhanden. Vergleicht man die Zusammensetzung ihrer Chromosomenarme mit den oben analysierten CD/CD- und CRE/CRE- Linien, fällt auf, dass es sich zum Teil um dieselben Translokationen handelt. Allerdings kommen ebenso andere Robertson`sche Translokationen in der TA/TA- Population vor (vgl. auch Abb. 13d). Bei letzteren handelt es sich konkret um die metazentrischen Chromosomen Rb(1.3), Rb(4.6) und Rb(8.12). Die übrigen vier Robertson`schen Translokationen kommen in der gleichen Form auch in der CRE/CRE- Population vor: Rb(5.15), Rb(9.14), Rb(11.13) und Rb(16.17).

Alle zehn durchgeführten SKY- Analysen dieser Population stellten den mittels anderer Methoden bereits beschriebenen TA/TA- Karyotyp eindeutig dar:

Rb (1.3) 1 Bnr

Rb (4.6) 2 Bnr

Rb (5.15) 3 Bnr

Rb (11.13) 4 Bnr

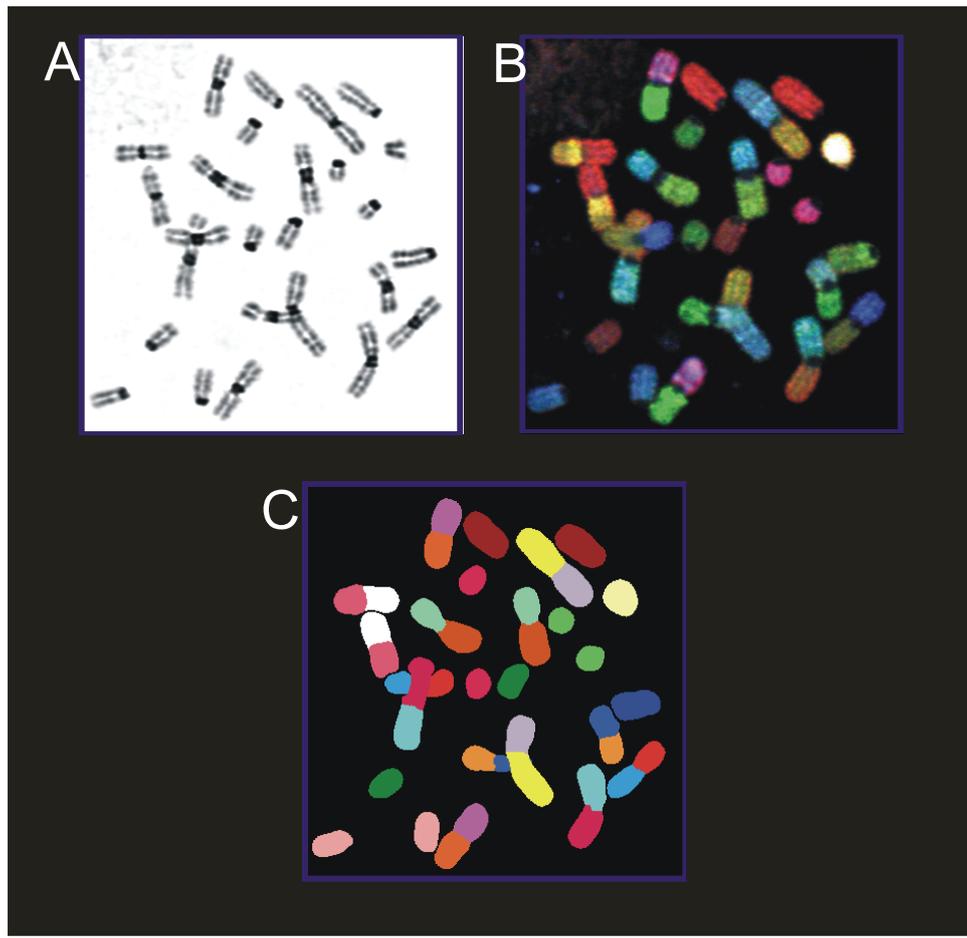
Rb (8.12) 5 Bnr

Rb (9.14) 6 Bnr

Rb (16.17) 7 Bnr

Wie bereits erwähnt liegen die Autosomen- Paare 2, 7, 10, 18 und 19, wie auch die Gonosomen frei vor.

Abbildung 13



Karyotypenanalyse der TA- Population. Wie die DAPI- bzw. Rot- Grün- Blau- Abbildungen 13a bzw. 13b zeigen, besteht der Karyotyp der TA/TA- Population aus 14 metazentrischen und 12 akrozentrischen Chromosomen. Wie die Falschfarben- Abbildung 13c zeigt, liegen hier fünf Paare homologer Chromosomen vor. Die 7 metazentrischen Robertson`schen Chromosomen sind ebenfalls homozygot vorhanden.

Abbildung 13



Abb. 13d: Darstellung der Chromosomen der TA- Population in der Karyotypentafel. Man kann sieben verschiedene homozygote Robertson'sche Translokationen unterscheiden.

### **3.4.2. F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit TA/TA, Mitosepräparat**

Die für die Spektrale Karyotypisierung benötigten Metaphasen wurden bei dieser Kreuzungspopulation aus Lymphozyten der Milz bzw. des Knochenmarks gewonnen. Aus den ersten beiden Abbildungen Abb. 14a, 14b lassen sich in erster Linie numerische Daten ableiten: Man zählt 16 metazentrische und 8 akrozentrische Chromosomen. D.h. die Anzahl der Chromosomen stimmt weder mit der Chromosomenzahl der TA/TA- Population noch mit CD/CD- Population überein.

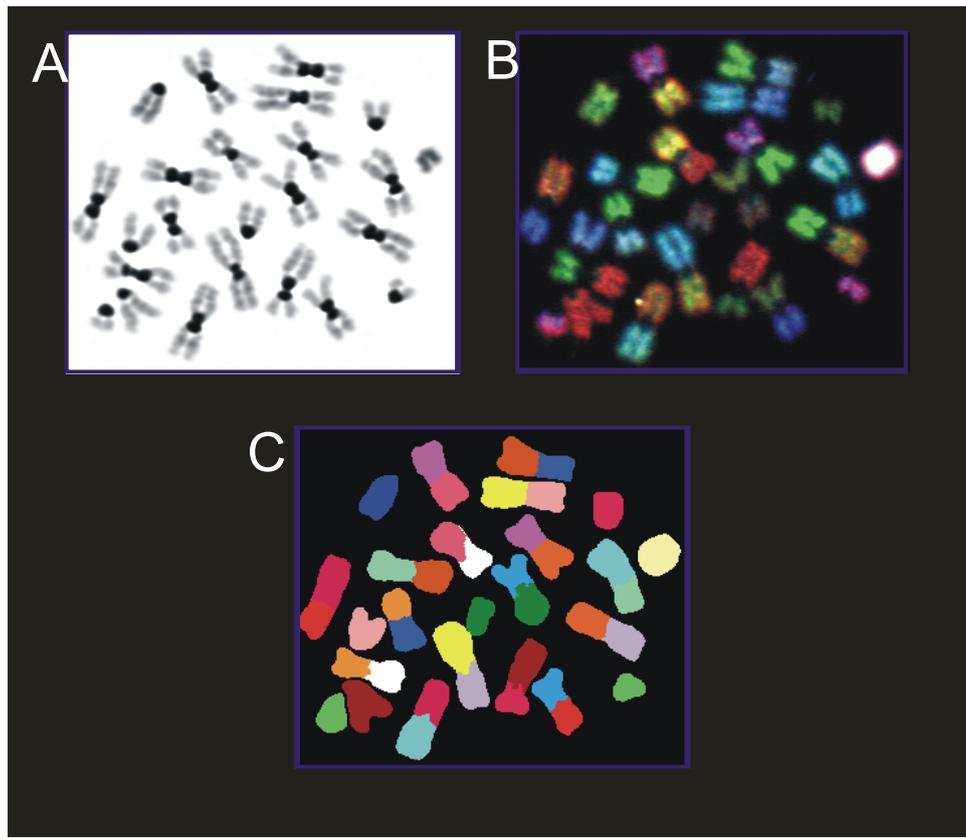
Die Zusammensetzung der Chromosomenarme, d.h. die Identifizierung der Robertson'schen Translokationen, zeigen schließlich die vom Computer zugeordneten „classification colours“ in den Abbildungen 14c und 14d. Wie erwartet setzt sich der Karyotyp der TA/CD- Kreuzung aus den Rb- Chromosomen beider Populationen zusammen. Der Unterschied zu den Karyotypen der Elterntiere besteht darin, dass die Translokationen nicht homozygot vorhanden sind. Jede Robertson'sche Translokation kommt exakt einmal im Karyotyp der F1- Generation vor. Auch die Chromosomen 2, 7, 10 und 18 liegen nicht paarweise sondern einzeln vor.

Entsprechend den untersuchten Metaphasen, ergibt sich für die CD/TA- Kreuzung folgender Karyotyp:

Rb (1.3)	Rb (1.7)	Rb (12.14)
Rb (4.6)	Rb (3.8)	Rb (9.16)
Rb (5.15)	Rb (6.13)	
Rb (11.13)	Rb (4.15)	
Rb (8.12)	Rb (10.11)	
Rb (9.14)	Rb (2.18)	
Rb (16.17)	Rb (5.17)	

Zusätzlich die in freier Form vorliegenden Einzel- Chromosomen 2, 7, 10, 18 und die paarweise angeordneten Chromosomen 19 und X, Y.

Abbildung 14



Darstellung der F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit TA/TA, Mitosepräparat. In den Abbildungen 14a (DAPI- Darstellung), 14b (Rot- Grün- Blau- Darstellung) und 14c (Falschfarben-Darstellung) erkennt man 16 metazentrische und 8 akrozentrische Chromosomen. Eine anschauliche Darstellung dieses Ergebnisses bietet die Karyotypentafel Abb. 14d.

Abbildung 14

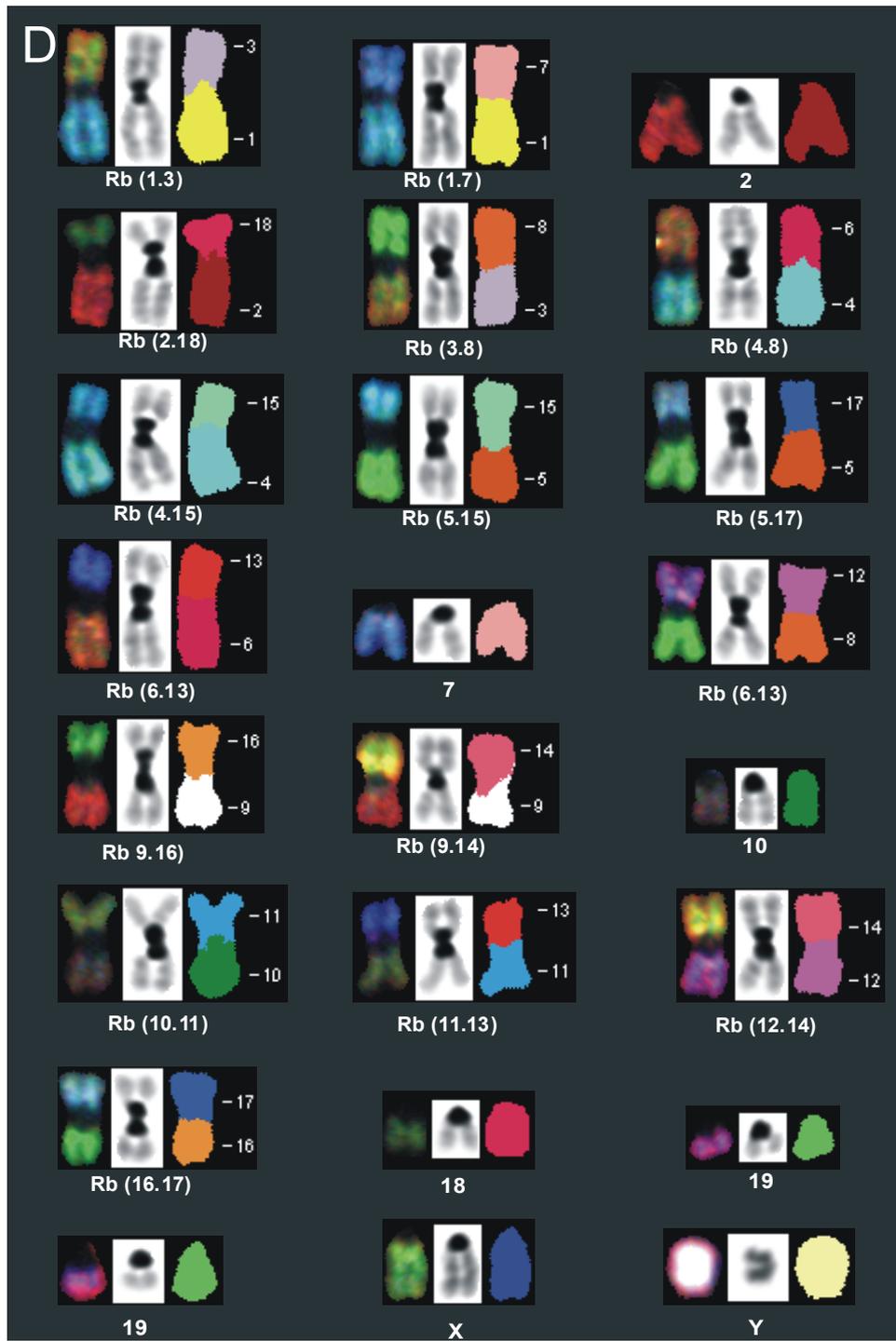


Abb. 14d: Chromosomendarstellung der F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit TA/TA in der Karyotypentafel.

### 3.4.3. F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit TA/TA, Meiosepräparat

Die entsprechenden Präparate für die SKY- Analyse stammen aus Hodengewebe. Da sich diese F1- Generation als extrem infertil herausstellte, war es mitunter schwierig eine entsprechende Anzahl von Metaphasen für die Karyotypisierung zu finden. Grund dafür ist der verhältnismäßige frühe Abbruch der Spermatogenese. Dennoch gelang es anhand von sieben Metaphasen die vermutete Meiosefigur der CD/TA- Kreuzung zu verifizieren.

Auf welche Weise sich die homologen Chromosomen in der Metaphase I der Meiose bei dieser Population anordnen, zeigt bereits die DAPI- Abbildung 15a. Zu unterscheiden sind zwei Bivalente, ein Trivalent und eine kettenartige Meiosefigur. 17 Zentromere untergliedern die Kette. In der Rot- Grün- Blau- Darstellung Abb. 15b erscheinen die Abschnitte zwischen diesen Zentromeren jeweils in unterschiedlichen Farben. Einzelne Chromosomen innerhalb der Kette sind in beiden Bildern schwer zu identifizieren.

Die den Chromosomen zugeordneten Falschfarben ermöglichen in Abbildung 15c die Identifizierung der Reihenfolge, in der die Chromosomen in der Kette angeordnet sind. An den beiden Enden der Kette liegen die beiden einzelnen Chromosome 7 und 10. Dazwischen ordnen sich die metazentrischen Chromosomen entsprechend der Zusammensetzung ihrer Chromosomenarme an. Das Trivalent besteht aus dem Robertson'schen Chromosom Rb(2.18) und den zugehörigen homologen Einzelchromosomen 2 und 18. Die homologen Chromosomen 19 und X, Y bilden jeweils ein Bivalent. Die Schemazeichnung 16 soll den Aufbau der Meiosefigur noch einmal bildlich darstellen und verdeutlichen.

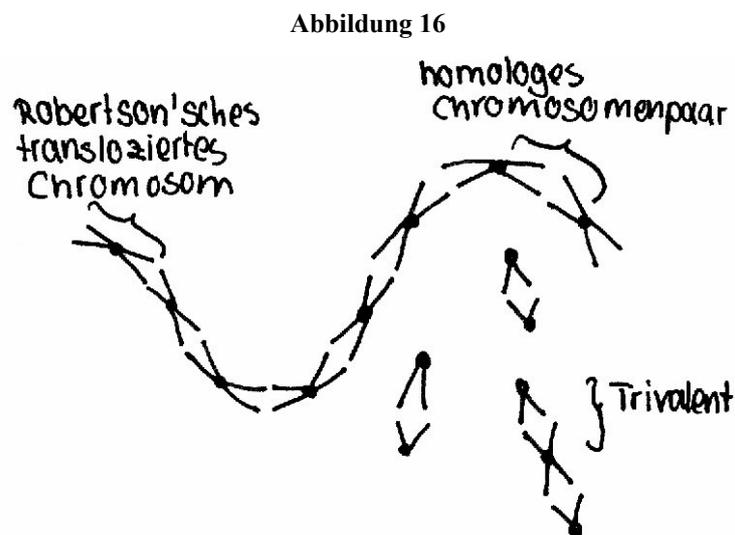


Abb. 16: Vereinfachte Darstellung der meiotischen Chromosomenanordnung der Population TA/CD.

Alle untersuchten Metaphasen dieser Kreuzung bilden in der Meiose zur Aneinanderlagerung der homologen Chromosomen dieselbe Figur. Betrachtet man den Karyotyp der CD/TA-Population, wird deutlich, dass eine Paarung der homologen Chromosomen nur auf diese Weise möglich ist.

Obwohl nur wenige Meiosefiguren aufgrund der erhöhten Infertilität untersucht werden konnten, zeigte sich in vier von sieben Metaphasen eine räumliche Beziehung während der Meiose zwischen X/Y, dem Chromosom 19 und dem Trivalent. In einem Fall lagen zwar X/Y und das Chromosomenpaar 19 nebeneinander, allerdings vom Trivalent getrennt, und einmal lagen das Trivalent und das Chromosomenpaar zusammen, getrennt von X/Y. Außerdem fand sich einmal die Situation, dass X, Y, Chromosomenpaar 19 und das Trivalent völlig unabhängig in ihrer Lage zueinander waren.

**Tabelle 4**

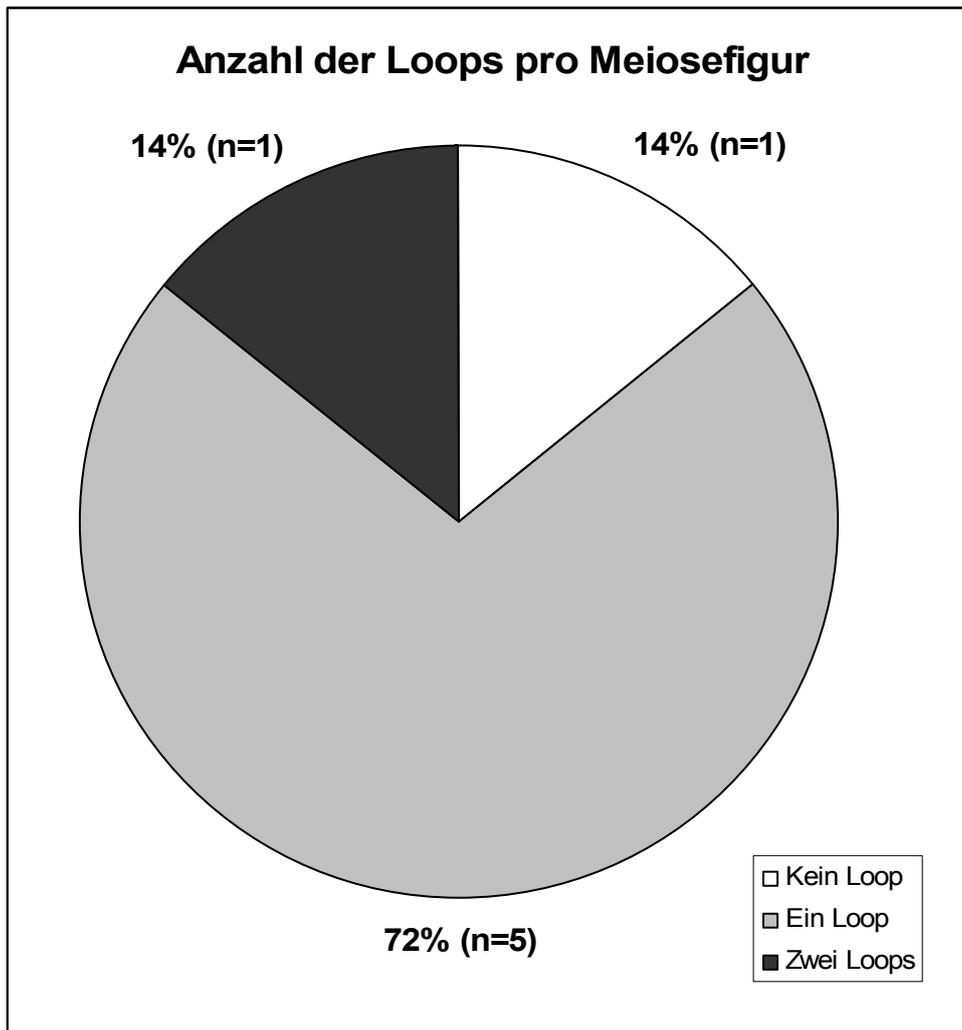
X/Y, Chromosom 19 und Trivalent liegen zusammen	57% (n=4)
X/Y, Chromosom 19 liegen zusammen, vom Trivalent getrennt	14,3% (n=1)
Chromosom 19 liegen liegt in der Nähe vom Trivalent, getrennt von X/Y	14,3% (n=1)
X, Y, Chromosom 19 und Trivalent liegen getrennt	14,3% (n=1)

Tabellarische Auswertung der Lage von X/Y zu Chromosom 19 und dem Trivalent.

Über die Lage der Chromosomenpaare (X/Y, 19, Trivalent) zur Meiose- Kettenstruktur, lässt sich aufgrund der limitierten Metaphasen keine sichere Aussage treffen. Tendenziell zeichnet sich aber bei den Metaphasen bei denen X/Y, 19 und das Trivalent zusammenliegen eine bevorzugte Lage an den Kettenenden ab (an beiden Enden gleich häufig).

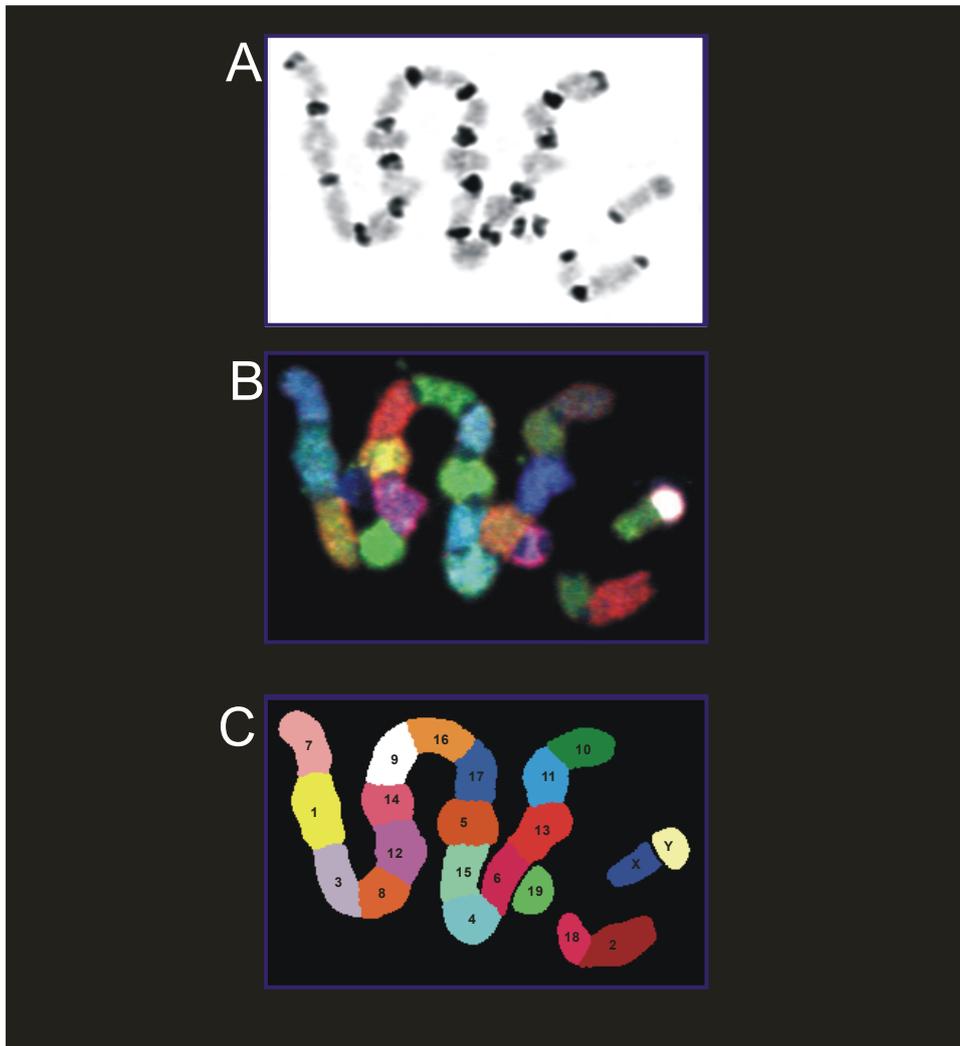
Auch bei dieser Meiosefigur formieren sich Loops. Man muß dabei allerdings beachten, dass es sich real um dreidimensionale Strukturen handelt, die Auswertung sich aber auf zweidimensionale Bilder stützt. In fünf von sieben untersuchten Metaphasen zeigte sich ein Loop, in einem Fall bildete sich ein Doppelloop und nur bei einer Metaphase lag keine Loopbildung vor.

Diagramm 4



Auswertung der Loopbildung bei den Meiosefiguren der TA/CD Population.

Abbildung 15



Darstellung der F1 Tochtergeneration der Kreuzung CD/CD mit TA/TA, Meiosepräparat. In der DAPI-Abbildung Abb. 15a und der Rot- Grün- Blau- Darstellung Abb. 15b sind zwei Bivalente, ein Trivalent und eine kettenartige Meiosefigur zu unterscheiden. Die den Chromosomen zugeordneten Falschfarben ermöglichen in Abb. 15c die Identifizierung der Reihenfolge, in der die Chromosomen in der Kette angeordnet sind. Das Trivalent besteht aus dem Robertson'schen Chromosom Rb(2.18) und den zugehörigen homologen Einzelchromosomen 2 und 18.

## **4. Diskussion**

### ***4.1. Spektrale Karyotypenanalyse am Mausmodell***

Seit dem Verfügbarwerden von DNA- Proben der Maus (Liyanage et al. 1997) für die Spektrale Karyotypenanalyse wird das Potential dieser Technik intensiv im Bereich der Mauszytogenetik genutzt (Köhler, Gräve, 1999). Schwerpunkte auf diesem Gebiet sind vor allem Untersuchungen menschlicher Krankheiten am Tiermodell (Coleman et al. 1997, Coleman et al. 1999). Bisher konzentrierten sich diese Untersuchungen im Wesentlichen auf die Erforschung der Karzinogenese, zum Beispiel bezüglich der Identifizierung tumorspezifischer Chromosomenaberrationen.

Aufgrund von zahlreichen Mutationen (Lyon et al. 1989) mit chromosomalen Anomalien wie die häufigen Robertson`schen- und Reziproken- Translokationen stellt die Maus in der Genetik ein äußerst effizientes Modellsystem dar. Diese Translokationen der Maus bieten ein hervorragendes experimentelles Modell zum Studium von Monosomien und Trisomien (Searle und Beechey 1978). In diesem Zusammenhang richtete sich der Fokus auf die zahlreichen geographischen Rassen mit jeweils unterschiedlichen Robertson`schen Translokationschromosomen. Seit dem ersten Bericht über die im Karyotyp der Maus entdeckten metazentrischen Chromosomen in Laborstämmen (Evans et al. 1967, Leonard et al. 1967) und Wildpopulationen (Gropp et al. 1970), waren derartige Mäuse Ausgangspunkt und Schwerpunkt zahlreicher Experimente. Dies umfasste sowohl die genaue Karyotypen-Charakterisierung der einzelnen geographischen Isolate (Winking et al. 1988, Gropp et al. 1982), als auch die genaue Analyse des Robertson`schen Translokations- Prozesses hinsichtlich verschiedenster zytologischer (Gropp et al. 1981), chromosomaler (Hauffe et al. 1998, Winking et al. 2000) und immunologischer (Haaf et al. 1989, Johannisson et al. 1994) Phänomene.

Besonderes Augenmerk richtete sich hierbei auf die Meiosefiguren, die von heterozygoten Trägern von Robertson`schen Translokationen gebildet werden. Für Robertson`sche Translokationen heterozygote Mäuse sind in der freien Wildbahn bisher nicht gefunden worden. Verschiedene Labors verändern deshalb für Forschungszwecke entsprechend den Karyotyp homozygoter Linien durch Kreuzung. Mit den unterschiedlichsten Methoden und Techniken wurden die Meiosefiguren dieser Kreuzungen schon analysiert und dennoch blieben entscheidende Fragen zum Beispiel bezüglich Fertilität oder einzelner Stukturphänomene ungeklärt.

Mit Hilfe der Spektralen Karyotypisierung sollen die Mäuse mit Robertson'schen Translokationen und insbesondere die Meiosefiguren der heterozygoten Träger eingehend analysiert werden. Die neuartige Technik soll einerseits zu einer kritischen Auseinandersetzung mit bereits bestehenden Erkenntnissen und Hypothesen führen. Zum anderen bietet diese Technologie neue Ansatzpunkte um nicht verstandene Mechanismen und offene Fragen im Zusammenhang mit Robertson'schen Translokationen im weitesten Sinn zu erklären.

#### **4.2. Etablierung der Spektralen Karyotypisierung für Meiosepräparate der Maus**

Obwohl die Spektrale Karyotypisierung seit ihrer Entwicklung sehr schnell auch in der Mauszytogenetik anwendbar war, waren bei Beginn dieser Arbeit keine entsprechenden Experimente mit Meiosepräparaten publiziert. Erst im April 2001, bereits nach Abschluß der experimentellen Arbeiten, erschien die erste Veröffentlichung über die Anwendung von SKY bei Meiosepräparaten (Heng et al. 2001). Um das geplante Projekt durchführen zu können, musste also die Technik zunächst für die Analyse von Meiose-Chromosomen der Maus neu etabliert werden.

Als Grundlage dienten die entsprechenden Standard-Protokolle der Spektralen Karyotypisierung für Mitose-Präparate (Applied Spectral Imaging (ASI), 2000). Im Rahmen der Vorbehandlung der Slides mit den Präparaten war weder bei der Pepsinisierung noch bei der Nachfixierung der Präparate eine Änderung des für Mitose-Chromosomen standardisierten Protokolls nötig. Entsprechende Kontrollen der Präparate im Phasenkontrastmikroskop ergaben keinerlei Qualitätsunterschiede hinsichtlich Zytoplasmaresten oder andere Verunreinigungen zwischen Meiose- und Mitose-Slides. Dagegen erfordert die Chromosomen-Denaturierung eine Adaptierung des etablierten Verfahrens. Besonderes Augenmerk richtet sich hierbei auf den Denaturierungszeitraum. Es besteht die Gefahr einer Überdenaturierung der Chromosomen, falls die Präparate zu lange in der Denaturierungslösung bleiben. Einerseits ist die Denaturierung ein sehr schneller Prozess, andererseits leiden verschiedene Komponenten wie Nucleotide unter der Hitze. Deshalb sollte die Denaturierungszeit so kurz wie möglich sein. Überdenaturierte Chromosomen-Präparate sind für die Spektrale-Karyotypisierung genauso ungeeignet wie Präparate die zu kurz in der Denaturierungslösung verbleiben. Um eine optimale Denaturierungszeit zu erreichen wurden deshalb mehrere Slides desselben Präparates jeweils unterschiedlich lang denaturiert. Das Denaturierungsergebnis wurde anschließend im Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Dabei

ergaben sich für die einzelnen Präparate folgende Optimal- Werte: Für die Spektrale Karyotypisierung von Mitose- Präparate wurden Slides mit Denaturierungszeiten von 2- 4 Minuten gewählt. Die geeignete Denaturierungsdauer der Meiose- Präparate betrug zwischen 6 und 10 Minuten. Im letztgenannten Fall wurden für die F1- Generationen der verschiedenen Kreuzungen jeweils unterschiedliche Optimalzeiten gefunden. Während meiotische Präparate von der F1 Generation aus der Kreuzung der CD/CD- Population mit der NMRI- Labormaus im Bereich von 6 und 6,5 Minuten denaturiert wurden, war bei der F1 Generation aus der Kreuzung der CD/CD- Population mit der TA/TA- Population ein optimales Ergebnis erst bei Denaturierungszeiten von 6,5- 7,5 Minuten erreicht. Die entsprechenden Präparate der F1 Generation der Kreuzung von der CD/CD- Population mit der Cremona- Population benötigten bereits 7 bis 10 Minuten um ähnliche Ergebnisse zu erzielen.

Für alle nachfolgenden Behandlungsschritte der Untersuchungsproben, die für die Spektrale Karyotypisierung von chromosomalen Präparaten erforderlich sind, ergaben sich keine vom standardisierten Protokoll abweichende Verfahren speziell für Meiose- Slides. Dies schließt insbesondere die Sonden- Denaturierung, die Hybridisierung und die Antikörperbehandlung mit ein.

### ***4.3. Bestätigung der erwarteten Karyotypen der in den Kreuzungsansätzen verwendeten Mauspopulationen***

Die Karyotypenanalyse im allgemeinen (Schröck et al. 1997) und natürlich auch speziell von Mauspopulationen mit Robertson`schen Translokationen (Winking et al. 1988, Capanna et al. 1976, Gropp et al. 1982) beschränkte sich bei der Spektralen Karyotypisierung auf die Bänderungsanalyse.

So wurden seit der ersten Entdeckung von metazentrischen Chromosomen im Karyotyp der Maus sämtliche Mauspopulationen und Laborstämme anhand der Bänderungstechnik analysiert (Winking et al. 1988, Capanna et al. 1976, Gropp et al. 1982). Auch von den in dieser Arbeit verwendeten Populationen wurden die Karyotypen mittels Bänderungsanalyse genau charakterisiert und die Robertson `schen Translokationen identifiziert (Capanna et al. 1976, Gropp et al. 1981, Gropp et al. 1970, Gropp et al. 1982). Letzteres erwies sich trotz konventionellen Bänderungsmethoden oft als sehr komplex. Es gestaltete sich teilweise schwierig die morphologisch ähnlichen Mäusechromosomen zu unterscheiden. Das galt natürlich vor allem für die Identifikation von den Chromosomenarmen der Robertson`schen Translokationen. Da sich die translozierten Karyotypen der Wildpopulationen oft nur in der Zusammensetzung einzelner Robertson`scher Chromosomen unterscheiden, war bei der Beschreibung neu entdeckter Populationen stets eine genaue, komplizierte und zeitintensive

Analyse und Auswertung der Bänderungsergebnisse nötig. Die Beschreibung noch nicht bekannter Robertson'scher Chromosomen erforderte zum Beispiel eine spezielle Vorgehensweise (Gropp et al. 1981). Da in einem perfekten Robertson'schen System eine komplette Chromosomenarm-Homologie besteht, wurde die Chromosomenarm-Zusammensetzung des unbekanntes metazentrischen Chromosoms einer Population durch Kreuzung mit Trägern bekannter Rb- Translokationen und gesicherter Chromosomenarm-Kombination ermittelt. In entsprechenden Meiose I Präparaten dieser Kreuzung konnte das unbekannte Robertson'sche Chromosom identifiziert werden. Die beschriebene Methode wurde in allen entsprechenden Untersuchungen des Lübecker Labors, die zahlreiche Populationen auf diese Weise charakterisiert haben, angewandt (Gropp et al. 1972; Capanna et al. 1976).

Ein noch größeres Problem stellte die Charakterisierung der Chromosomen dar, welche an den Meiosefiguren von Hybriden beteiligt sind. Als Hybriden werden F1 Generationen bezeichnet, die aus der Kreuzung zweier Populationen mit jeweils unterschiedlichen homozygot vorkommenden Robertson'schen Translokationen entstehen. Der Karyotyp der F1 Generation mit nunmehr heterozygot vorkommenden Robertson'schen Translokationen konnte Dank der bekannten Karyotypen der Elternpopulationen vorausgesagt und mittels Bänderungstechnik auch bestätigt werden (Capanna et al. 1976; Gropp et al. 1981; Gropp et al. 1970, Gropp et al. 1982). Theoretisch ist auch die Chromosomenzusammensetzung der entsprechenden Meiosefiguren der Hybriden zu erschließen. Einmal aufgrund der Zusammensetzung der Robertson'schen Translokationen, die wegen ihrer heterozygoten Existenz eine Paarung der homologen Chromosomen nur auf eine Art und Weise zulassen. Man spricht von einer alternierenden Arm-Homologie. Dementsprechend bilden sich eben in der Meiose Figuren wie Ketten, Ringe oder Trivalente. Zum anderen ist eine Identifizierung einzelner Chromosomen der Meiosefigur zum Beispiel mittels Chromosomenbänderung oder der neueren Technik FISH möglich. Aber wie bereits erwähnt sind diese Nachweismethoden zum Teil schwierig anzuwenden. Eine synchrone Darstellung aller Chromosomen einer Meiosefigur gelingt mit diesen Methoden nicht. Die ersten Beschreibungen der Meiosefiguren wurde anhand ähnlicher Kreuzungsversuche durchgeführt wie auch für die Detektion und Identifizierung unbekannter Rb- Chromosomen nötig waren (Capanna et al. 1976). Nicht nur, dass entsprechende Versuche sehr zeitaufwendig waren, es konnten auch nie zusätzliche, mit konventionellen Methoden der Zytogenetik nicht nachweisbare chromosomale Strukturumbauten ausgeschlossen werden (Cattanach et al. 1973). Genau diese Schwachstellen werden mit Hilfe der Spektralen Karyotypisierung behoben. SKY erlaubt die

gleichzeitige Abbildung und Identifizierung aller Chromosomen einer Metaphase und erkennt auch kleine interchromosomale Aberrationen. Die Zuverlässigkeit dieser neuen Technologie konnte in der vorliegenden Arbeit bewiesen werden. Die Karyotypen aller bei den Kreuzungen verwendeter Mäuse konnten eindeutig bestimmt werden. Das Ergebnis der Spektralen Karyotypisierung entsprach bei allen untersuchten Wildpopulationen dem bereits mittels anderer Methoden erzielten Resultate (Capanna et al. 1976; Gropp et al. 1981; Gropp et al. 1970, Gropp et al. 1982). Die Robertson'schen Translokationen aller Populationen konnten eindeutig klassifiziert werden. Auch die Chromosomen der NMRI- Labormaus wurden eindeutig identifiziert. Im Einzelnen entsprach der CD/CD- Karyotyp dem der Population, die erstmals 1976 von Capanna et al. beschrieben wurde (Capanna et al. 1976). Die mit „Cremona“ bezeichnete Population zeigt bei der Spektralen Karyotypisierung dieselben Robertson'schen Translokationen wie von Gropp und Winking 1981 (Gropp, Winking 1981) publiziert. Ebenfalls konnte für die TA/TA- Population das von Gropp et al. 1970 bzw. 1982 (Gropp et al. 1970, Gropp et al. 1982) dargestellte Ergebnis mittels SKY bestätigt werden. Auch die Karyotypen der F1 Generationen aus Kreuzungen dieser Populationen entsprachen früheren Ergebnissen. Die Karyotypen der Hybriden CD/NMRI (Haaf et al. 1989), CD/Cremona (Haaf et al. 1989, Johannisson et al. 1994) und CD/TA (Gropp et al. 1981, Capanna et al. 1976) wurden dementsprechend mittels SKY überprüft. Von den einzelnen Populationen und Hybriden wurden jeweils mehrere Metaphasen überprüft, um die Zuverlässigkeit der Technik zu gewährleisten. Dabei wurde eine völlige Übereinstimmung der einzelnen Untersuchungsergebnisse festgestellt. Neben den erwarteten Robertson'schen Translokationen konnten keine anderen interchromosomalen Strukturanomalien in den untersuchten Metaphasen nachgewiesen werden.

Am deutlichsten kristallisierten sich die Vorteile von SKY bei der Auswertung der Meiose-Präparate der Hybriden heraus. Diese Technik ermöglichte erstmals die gleichzeitige konkrete Identifizierung aller an den Meiosefiguren beteiligten Chromosomen. Die vermutete Anordnung der Robertson'schen Chromosomen konnte mit Hilfe der Spektralen Karyotypisierung in einer Art Screeningverfahren bestätigt werden. Eine derartige Darstellung dieser Meiosefiguren mit der eindeutigen Klassifizierung aller Chromosomen existierte vorher nicht. Damit konnte auch die für die Hybriden erwartete Paarung (Johannisson et al. 1994, Haaf et al. 1989) der homologen Chromosomen während der Meiose bewiesen werden.

Diese Arbeit zeigt somit sowohl die Vorteile der Spektrale Karyotypenanalyse gegenüber konventionellen Methoden, als auch dessen universelle Einsatzmöglichkeiten als

Screeningverfahren für Chromosomenanalysen. Zum einen konnten die Karyotypen der verschiedenen Wildpopulationen auf eine viel unkompliziertere und übersichtlichere Weise dargestellt werden als bei den konventionellen Methoden. Ebenso überzeugte die Korrektheit und Sicherheit der Ergebnisse. Nicht zuletzt ermöglichte SKY aufgrund der speziellen Darstellungsweise die Auswertung bisher nicht untersuchter Fragestellungen zum Beispiel bezüglich Lagebeziehungen von Chromosomen der Meiosefiguren zu frei liegenden Chromosomen.

#### **4.4. Interpretation der Multivalent- Formationen der untersuchten F1- Generationen**

##### **4.4.1. Stabilität der Meiosefiguren**

Die Multivalente der Maushybriden, die aus bis zu 36 Chromosomenarme bestehen, stellen in der Zytogenetik eine einzigartige künstlich erzeugte Meiose- Situation dar (Haaf et al. 1989). Im Diplotän, in dem die homologen Chromosomen beginnen auseinanderzuweichen (Murken, Cleve, 1996, S.38), führt die stattfindende autosomale Desynapsierung und die Auflösung der Chiasmata zu den beschriebenen Ring- und Kettenstrukturen des Diakinese- Stadiums (Haaf et al. 1989). Bereits frühere Untersuchungen dieser Meiosefiguren von Hybriden zeigen, dass die Ring- und Kettenformationen, wenn überhaupt, sehr selten auseinanderbrechen (Haaf et al. 1989). Bei der SKY- Analyse entsprechender Meiosepräparate konnte weder in den 42 untersuchten 18- Rb- Ringformationen noch in den 7 untersuchten 15- Rb- Kettenformationen ein Auseinanderbrechen beobachtet werden. Auch die gegenüber Mitose- Präparaten stark verlängerte Denaturierungszeit (vgl. oben 4.2) spricht für die Stabilität der Meioseformationen. Interessant hierbei erscheint, dass mit der Komplexität der Meiosefigur, die Dauer der Denaturierungszeit zunimmt (Ringformation länger als Kettenformation), ein Faktor der zusätzlich für zunehmende Stabilität spricht. Obwohl die Multivalente durch Kreuzung zweier verschiedener Rb- Populationen künstlich erzeugt wurden, und derartige Meioseformationen in wildlebenden Mäusen bisher nicht gefunden wurden, scheint der Prozess der Meiose I nicht gestört zu sein (Haaf et al. 1989) Selbst die in Publikationen beschriebenen im Pachytän- Stadium synaptisch nicht gepaarten Chromosomen- Segmente der Multivalente (Johannisson et al. 1994, Haaf et al. 1989), haben keinen Einfluss auf den geordneten Ablauf der Meiose (Johannisson et al. 1994) oder die Stabilität der Ringe.

#### **4.4.2. Konfiguration der Meiosefiguren**

Nur wenige der untersuchten Meiosefiguren der CD/Cremona- Hybriden bildeten einen kreisähnlichen Ring. Der überwiegende Teil formte innerhalb der Ringformation Schleifen oder Loops. 81% der untersuchten Metaphasen bildeten Einer-, Zweier oder Dreierloops. Weshalb diese auffallende Loop- und Schleifenbildung stattfindet ist nicht geklärt und in der Literatur auch noch nicht beschrieben.

Bei den Kettenformationen der CD/TA- Hybriden wurde bereits eine Tendenz dieser Multivalente zu Bogen- artigen bzw. Pseudoring- artigen Konfigurationen dokumentiert (Johannisson et al. 1994). Interpretiert wurden diese Pachytän- Konfigurationen als Ausdruck der räumlichen Anordnung der Kettenformation in den Zellkernen der Spermatozyten (Johannisson et al. 1994). Vor allem die Bildung der Pseudoringe wurde auf räumliche Nähe, Verbindung oder Paarung nicht homologer Chromosomen mit den ungepaarten Enden der akrozentrischen Chromosomen der Kette zurückgeführt (Johannisson et al. 1994). Diese Beobachtungen konnten mittels Spektraler Karyotypisierung nur zum Teil bestätigt werden. Die meisten mit SKY dargestellten Kettenformationen formten zwar einzelne Schleifen oder Loops, aber vollständige Pseudoringe oder Bogenartige Gebilde wurden nicht beschrieben. Allerdings ist diese Feststellung aufgrund der geringen Anzahl der mit SKY analysierten Meiose- Präparate der CD/TA- Hybriden wenig aussagekräftig. Zudem wurden in der genannten Publikation Hybriden aus anderen Kreuzungen (CD/Mil II; Sic/Alp) analysiert.

#### **4.4.3. Lagebeziehungen der Chromosomen X, Y und 19 während der Meiose**

Als besonders interessant zeigte sich die Spektrale Karyotypisierung zur Auswertung der Lage der Chromosomen X, Y und 19 an der Meiosefigur. Jedoch sollte man bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigen, dass es sich real um eine dreidimensionale Anordnung handelt, die Auswertung aber anhand von zweidimensionaler Bilder erfolgt. Da bisher in der Literatur keine bevorzugte Lage von X, Y oder 19 an der Ringstruktur dokumentiert wurde, muss man davon ausgehen, dass sie sich gleich häufig an die jeweiligen Chromosomen der Ringstruktur anlagern. Allerdings zeigte die Auswertung, dass dies nicht der Fall ist. An bestimmte Chromosomen lagern die nicht in die Ringstruktur integrierten Chromosomen bevorzugt an. Bezogen auf die absolute Anzahl entspricht dies bei dem X- Chromosom den Chromosomen 12 und 14, als nächstes gefolgt von Chromosom 11 und 16. Bei dem Y Chromosom sind das ebenfalls Chromosom 12 und 14, zusätzlich noch Chromosom 3, danach am häufigsten an Chromosom 9. Dagegen lagert sich das

Chromosomenpaar 19 bevorzugt an das Chromosom 1 beziehungsweise bezogen auf die absolute Anzahl am zweithäufigsten an die Chromosomen 5, 7 und 17 der Ringstruktur an. Die Tatsache, dass die Geschlechtschromosomen X und Y am häufigsten – zumindest bezogen auf die absolute Zahl- in Nachbarschaft zu denselben Ringchromosomen liegen überrascht nur zum Teil. Die Geschlechtschromosomen lagen während der Meiose in der Mehrzahl der untersuchten Metaphasen zusammen (91%). Erstaunlich ist jedoch dass es scheinbar eine Lagepräferenz der Geschlechtschromosomen zur Ringstruktur gibt. Interessant ist außerdem die Tatsache, dass die von den Geschlechtschromosomen bevorzugten Chromosomen 12 und 14 innerhalb der Ringformation benachbart liegen. Da die Spektrale Karyotypisierung keine Aussage darüber zulässt, inwieweit auf molekulargenetischer Basis Interaktionen zwischen den Ringchromosomen und den Geschlechtschromosomen bestehen, kann über die Bedeutung dieser Lagebeziehung nur spekuliert werden. In anderen Publikationen wurde bereits ein C-Banden Kontakt zwischen den Geschlechtschromosomen und Robertson'schen Translokationen während der Meiose beschrieben (Forjet 1979, 1977). Da diese Interaktionen allerdings nur in sterilen männlichen Mäusen gefunden wurden, wertete man dies als Interferenz mit dem X-Chromosom welche schließlich zu dessen Inaktivierung und zum Abbruch der Spermatogenese führen sollte (Forjet 1979, 1977). In einer anderen Veröffentlichung wurde eine Lagebeziehung zwischen dem X-Chromosom und einer Meiose-Kettenstruktur (ebenfalls in Mäusen heterozygot für verschiedene Robertson'sche Translokationen) während der Meiose beschrieben, eine ähnliche enge Beziehung zwischen X, Y und einer meiotischen Ringstruktur (ebenfalls in Mäusen heterozygot für verschiedene Robertson'sche Translokationen) konnte hier allerdings nicht gefunden werden (Johannisson, Winking, 1994). Die Beziehung zwischen Autosom der Meiosefigur und Gonosom wurde als Grund für einen Abbruch der Spermatogenese gesehen (Johannisson, Winking, 1994). Leider konnten aufgrund der Infertilität der TA-CD Population nur wenige Metaphasen untersucht werden, so dass ein reliabler Vergleich der meiotischen Gonosom-Autosom Beziehung in Metaphasen mit meiotischer Ring- und Kettenstruktur nicht möglich war. In einer anderen Studie, in der eine Beziehung zwischen dem „Sex Vesicle“ und Trivalenten (in Mäusen heterozygot für drei Robertson'schen Translokationen) in der Prophase I nachgewiesen wurde, bezog man dies einfach auf die im X/Y-Bivalent häufiger auftretenden ungepaarten Regionen (Grao et al. 1989).

Betrachtet man die Lagebeziehung von Chromosom 19 zur Ringstruktur während der Meiose, kann kein Zusammenhang mit der bevorzugten Lage der Gonosomen gefunden werden. Dies ist auffallend, denn in der Mehrzahl der Fälle (61,54%) lag das Chromosomenpaar 19 in

Nachbarschaft zu den Geschlechtschromosomen. Chromosom 19 nimmt in der Reihe der autosomalen Mäusechromosomen eine gewisse Sonderstellung ein. Erst vor kurzem konnten die ersten Robertson'schen Chromosomen, in denen Chromosom 19 involviert ist, in frei lebenden Mäusen gefunden werden (Britton- Davidian et al. 2000, Catalan et al. 2000). Jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen den Translokationen (Chromosom 2 und 4) und der nachbarschaftlichen Lage von Chromosom 19 zur Ringstruktur gefunden werden.

Wie bereits erwähnt besteht allerdings eine enge Nachbarschaftsbeziehung zwischen den Gonosomen und Chromosom 19 während der Meiose bei der CD/Cremona- Population. In 61% besteht ein direkter Kontakt, in 21% waren die Gonosomen und das Chromosom 19 nur durch die Meiosefigur getrennt, in 18% bestand keine nachbarschaftliche Beziehung. Es handelt sich hierbei wohl um eine bevorzugte Lagebeziehung zueinander, wenn man bedenkt, welche unterschiedlichen räumlichen Anordnungen sich dem Chromosom 19 eigentlich bieten. Insofern erstaunlicher, da anders als zum Beispiel die enge Lagebeziehung von X und Y, die in der Meiose zum „Sex Vesicle“ verschmelzen, durchaus nachzuvollziehen ist, zwischen den Gonosomen und den homologen Chromosom 19 eine Interaktion während der Meiose nicht bekannt ist. Inwieweit hier auf molekularer Ebene ein Kontakt besteht bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären. Wie bereits oben erwähnt, nimmt das Chromosom 19 in bezüglich der Beteiligung an Robertson'schen Translokationen eine besondere Position ein. Ob dies aufgrund möglicher Wechselwirkungen mit dem X/Y- Bivalent geschieht, bleibt Spekulation. Was wiederum die oben zitierte Studie von Grao et al. 1989 unterstützt, ist die in der Arbeit aufgefallene bevorzugte Lage von X/Y an bestimmten Chromosomen der Ringstruktur, die für das Chromosomenpaar 19 nicht nachzuvollziehen war.

Zusammenfassend ist sicher, dass weitere Analysen auf molekularer Ebene angeschlossen werden müssen, um die hier nachgewiesenen Lagebeziehungen weiter zu erforschen.

#### **4.5. Zusammenfassung**

Zusammenfassend gelang es in dieser Arbeit die Spektrale Karyotypenanalyse am Mausmodell für entsprechende Meiosepräparate zu etablieren. In den ersten experimentellen Versuchen wurden die Standardprotokolle den speziellen Anforderungen der Maus-Meiosepräparate angepasst. Bei diesem Etablierungsprozess fiel die überaus große Stabilität der Multivalent-Formationen der F1-Generation auf, was durch Ergebnisse aus der Literatur unterstützt wird.

Schließlich ermöglichte die Spektrale Karyotypisierung die Bestätigung von Ergebnissen, die bereits mittels anderer Techniken wie zum Beispiel der Bänderungsanalyse erhoben wurden. So konnten sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Karyotypen der einzelnen Populationen eindeutig identifiziert und dargestellt werden wie bereits mittels anderer Techniken vorbeschrieben, was die Qualität dieser Ergebnisse unterstreicht. Diese neue Technik erwies sich hierbei als ein äußerst effizientes Verfahren, das aufgrund seiner relativ unkomplizierten Handhabung, seiner sehr guten Reproduzierbarkeit und universellen Einsetzbarkeit als Screening Verfahren ideal erscheint. Dieses Faktum ermöglichte überhaupt erst die Untersuchung verhältnismäßig zahlreicher Meiosepräparate, was als Voraussetzung der weiterführenden Analysen unabdingbar ist.

Es konnten erstmals bevorzugte Lagebeziehungen von Chromosomen betrachtet werden, zum Beispiel bezüglich der Lagebeziehungen der meiotischen Ringstrukturen zu den frei liegenden Chromosomen. Es wurde eine bevorzugte Lage des X/Y-Bivalent zu bestimmten Chromosomen der Multivalent-Formation der F1-Generation nachgewiesen. Auch konnten Lagebeziehungen vom X/Y-Bivalent zum Chromosomenpaar 19 belegt werden, welches auffallend häufig in Nachbarschaft zu X/Y liegt. Um die aus der Arbeit gewonnenen Ergebnisse weiter einzuordnen und interpretieren zu können, müssen sich sicherlich künftig Untersuchungen auf molekularer Ebene anschließen. Viele Fragen bezüglich der Interaktionen während der Meiose zwischen Multivalent-Formationen und den frei liegenden Chromosomen könnten hieraus gezogen werden. Noch ungeklärte Fragen bezüglich Fertilität / Infertilität müssen weiter untersucht werden.

Es zeigte sich, dass die Spektrale Karyotypisierung vor allem auch in Kombination mit anderen Techniken eine ausgezeichnete Methode zur Analyse interchromosomaler Beziehungen beziehungsweise Prozesse ist. Die Weiterentwicklung dieser Technik wird wohl aufgrund des universellen Einsatzes ein Vordringen der Methode in die unterschiedlichsten Bereiche von Medizin und Biologie zur Folge haben.

## **5. Literaturverzeichnis**

Adolph S, Klein J (1981): Robertsonian variation in *Mus musculus* from Central Europe Spain, and Scotland. *J Hered.* 72, 219-21

Adolph S, Klein J (1983): Genetic variation of wild mouse populations in southern Germany. I. Cytogenetic study. *Genet Res.* 41, 117-34

Applied Spectral Imaging (ASI) Ltd., Industrial Zone, PO Box 101, 10551 Migdal Ha'Emek, Israel (2000): Sky- Paint™ Hybridization and Detection. Protocol – Mouse, Document 3 Rev. B 0-Dez-2000.

Bayreuther K (1952): Der Chromosomenbestand des Ehrlich- Aszites- Tumors der Maus. *Naturforsch.* 7, 554-7

Bigner SH, Schrock E (1997): Molecular cytogenetics of brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56, 1173-81

Blennow E, Nielsen KB, Telenius H, Carter NP, Kristoffersson U, Holmberg E, Gillberg C, Nordenskjold M (1995): Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet.* 55, 85-94

Blennow E, Telenius H, Larsson C, de Vos D, Bajalica S, Ponder BA, Nordenskjold M (1992): Complete characterization of a large marker chromosome by reverse and forward chromosome painting. *Hum Genet.* 90, 371-4

Brigham E.O. (1988): *The Fast Fourier Transform and its Application.* Prentice - Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Britton- Davidian J, Catalan J, Ramalhinho MG, Ganem G, Auffray JC, Capela R, Biscoito M, Searle JB, Mathias ML (2000): Rapid chromosomal evolution in island mice. *Nature,* 403, 158

Capanna E, Gropp A, Winking H, Noack G, Civitelli MV (1976): Robertsonian metacentrics in the mouse. *Chromosoma* 58, 341-53

Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT, Telenius H, Pelmeur AH, Leversha MA, Glancy MT, Wood SL, Cook K, Dyson HM, et al. (1992): Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet.* 29, 299-307

Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ (1970): Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma.* 30, 215-27

Catalan J, Auffray JC, Pellestor F, Britton-Davidian J (2000): Spontaneous occurrence of a Robertsonian fusion involving chromosome 19 by single whole-arm reciprocal translocation (WART) in wild-derived house mice. *Chromosome Res.* 8, 593-601

Cattanach BM, Moseley H (1973): Nodisjunction and reduced fertility caused by the tobacco mouse metacentric chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 12, 264-87

Chakrabarti S, Chakrabarti A (1977): Spontaneous Robertsonian fusion leading to karyotype variation in the house mouse - first report from Asia. *Experientia.* 33, 175-7

Coleman AE, Forest ST, McNeil N, Kovalchuk AL, Ried T, Janz S (1999): Cytogenetic analysis of the bipotential murine pre-B cell lymphoma, P388, and its derivative macrophage-like tumor, P388D1, using SKY and CGH. *Leukemia.* 13, 1592-600

- Coleman AE, Schrock E, Weaver Z, du Manoir S, Yang F, Ferguson-Smith MA, Ried T, Janz S (1997): Previously hidden chromosome aberrations in T(12;15)-positive BALB/c plasmacytomas uncovered by multicolor spectral karyotyping. *Cancer Res.* 57, 4585-92
- Collins C, Kuo WL, Segraves R, Fuscoe J, Pinkel D, Gray JW (1991): Construction and characterization of plasmid libraries enriched in sequences from single human chromosomes. *Genomics.* 11, 997-1006
- Dauwerse JG, Wiegant J, Raap AK, Breuning MH, van Ommen GJ (1992): Multiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum Mol Genet.* 1, 593-8
- Dulic` B, Soldatovic B, Dunderski Z (1980): Distribution of karyotypes in *Mus musculus* Linnaeus, 1758 (Rhodentia, Muridae) in some regions of Yugoslavia. *Biosistematika* 6, 203-10
- Dutrillaux B (1979): Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from *Microcebus murinus* (Prosimian) to man. *Hum Genet.* 48, 251-314
- Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Mary Crosse V, Wolff OH (1960): A new trisomic syndrome. *Lancet.* 1, 787-90
- Evans EP, Lyon MF, Daghli M (1967): A mouse translocation giving a metacentric marker chromosome. *Cytogenetics.* 6, 105-19
- Evans HJ, Atwood KC (1978): Report of the committee on in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 22, 146-9
- Ferguson-Smith MA (1997): Genetic analysis by chromosome sorting and painting: phylogenetic and diagnostic applications. *Eur J Hum Genet.* 5, 253-65
- Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH (1959): A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis. *Lancet* i (1959), 711-13
- Ford, Hamerton (1956): The chromosomes of man. *Nature* 178, 1020-23
- Forejt J (1979): Meiotic studies of translocation causing male sterility in the mouse. II. Double heterozygotes for Robertsonian translocations. *Cytogenet. Cell Genet.* 23, 163- 170
- Forejt J, Gregorova` S (1977): Meiotic studies of translocation causing male sterility in the mouse. I. Autosomal reciprocal translocations. *Cytogenet. Cell Genet.* 19, 159- 179
- Fredga K (1977): Chromosomal changes in vertebrate evolution. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 199, 377-97
- Garini Y, Macville M, du Manoir S, Buckwald RA, Lavi M, Katzir N, Wine D, Bar-Am I, Schröck E, Cabib D, Ried T (1996): Spectral karyotyping. *Bioimaging.* 4, 65-72
- Grao P, Coll MD, Ponsa M, Egozcue J (1989): Trivalent behavior during prophase I in male mice heterozygous for three Robertsonian translocations: an electron-microscopic study. *Cytogenet Cell Genet.* 52, 105-10.
- Gray JW, Carrano AV, Moore DH 2nd, Steinmetz LL, Minkler J, Mayall BH, Mendelsohn ML, Van Dilla MA (1975): High-speed quantitative karyotyping by flow microfluorometry. *Clin Chem.* 21, 1258-62
- Gropp A, Tettenborn U, von Lehmann E (1970): Chromosome variations on the Robertson type in the tobacco mouse, *M. Poschiavinus*, and its hybrids with the laboratory mouse *Cytogenetics.* 9, 9-23

- Gropp A, Winking H (1981): Robertsonian translocations: Cytology, meiosis, segregation patterns and biological consequences of heterozygosity. *Sym.Zool. Soc. Lond.* 47, 141-181. In: *Biology of the House Mouse*. Ed. By R. J. Berry. London, New York: Academic Press
- Gropp A, Winking H, Redi C, Capanna E, Britton-Davidian J, Noack G (1982): Robertsonian karyotype variation in wild house mice from Rhaeto-Lombardia. *Cytogenet Cell Genet.* 34, 67-77
- Gropp A, Winking H, Zech L, Muller H (1972): Robertsonian chromosomal variation and identification of metacentric chromosomes in feral mice. *Chromosoma.* 39, 265-88
- Guan XY, Trent JM, Meltzer PS (1993): Generation of band-specific painting probes from a single microdissected chromosome. *Hum Mol Genet.* 2, 1117-21
- Guan XY, Zhang H, Bittner M, Jiang Y, Meltzer P, Trent J (1996): Chromosome arm painting probes. *Nat Genet.* 12, 10-1
- Guttenbach M, Steinlein C, Engel W, Schmid M (2001): Cytogenetic characterization of the TM4 mouse Sertoli cell line. I. Conventional banding techniques, FISH and SKY. *Cytogenet. Cell Genet.* 94, 71-8
- Haaf T (1989): *Immunzytogenetik: Neue Wege zur strukturellen und funktionellen Analyse von Chromosom und Zellkern*, Habilitationsschrift
- Haaf T, Winking H, Schmid M (1989): Immunocytogenetics. III. Analysis of trivalent and multivalent configurations in mouse pachytene spermatocytes by human autoantibodies to synaptonemal complexes and kinetochores. *Cytogenet Cell Genet.* 50, 14-22
- Haddad BR, Schrock E, Meck J, Cowan J, Young H, Ferguson-Smith MA, du Manoir S, Ried T (1998): Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. *Hum Genet.* 103, 619-25
- Hansteen IL, Varslot K, Steen-Johnsen J, Langard S (1982): Cytogenetic screening of a newborn population. *Clin Genet.* 21, 309-14
- Hauffe HC, Searle JB (1998): Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from Northern Italy. *Genetics.* 150, 1143-54
- Heim S, Mitelman F (1995): *Cancer Cytogenetics*. Wiley-Liss, New York.
- Heng HH, Liu G, Lu W, Bremer S, Ye CJ, Hughes M, Moens P (2001): Spectral karyotyping (SKY) of mouse meiotic chromosomes. *Genome.* 44, 293-8
- Hsu TC (1952): Mammalian chromosomes in vitro. I. The karyotype of man. *J. Hered.* 43, 167-72
- [http://www.roche-applied-science.com/prod\\_inf/manuals/pcr\\_man/Chapter10/CHAP10-Seite249.htm](http://www.roche-applied-science.com/prod_inf/manuals/pcr_man/Chapter10/CHAP10-Seite249.htm)
- Interferometer, *Microsoft® Encarta® Enzyklopädie 2000*. © 1993-1999 Microsoft Corporation
- Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, Macgregor TN, Maclean N (1959(2)): Evidence of the existence of the human "super female". *Lancet.* 2, 423-25
- Jacobs PA, Strong JA (1959(1)): A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining. *Nature* 183, 302-3
- Jauch A, Daumer C, Lichter P, Murken J, Schroeder-Kurth T, Cremer T (1990): Chromosomal in situ suppression hybridization of human gonosomes and autosomes and its use in clinical cytogenetics. *Hum Genet.* 85, 145-50

- 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, 8611-5
- Johannisson R, Winking H (1994): Synaptonemal complexes of chains and rings in mice heterozygous for multiple Robertsonian translocations. *Chromosome Res.* 2, 137-45
- John B, Freeman M (1975): Causes and consequences of Robertsonian exchange. *Chromosoma* 52, 123-36
- Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, Lichter P (1993): Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet.* 90, 584-9
- Koehler U, Arnold N, Wienberg J, Tofanelli S, Stanyon R (1995(1)): Genomic reorganization and disrupted chromosomal synteny in the siamang (*Hylobates syndactylus*) revealed by fluorescence in situ hybridization. *Am J Phys Anthropol.* 97, 37-47
- Koehler U, Bigoni F, Wienberg J, Stanyon R (1995(2)): Genomic reorganization in the concolor gibbon (*Hylobates concolor*) revealed by chromosome painting. *Genomics.* 30, 287-92
- Köhler MR, Gräve W (1999): SKY (Spectral Karyotyping): Ein neues, molekularzytogenetisches Verfahren zur Chromosomenanalyse. *Biospektrum* 1, 5. Jahrgang.
- Köhler MR, Gräve W: Spectral Karyotyping (SKY): Ein neues molekularzytogenetisches Verfahren zur Chromosomenanalyse in Klinik und Forschung. Köhler, Applied Spectral Imaging (ASI) GmbH, Mannheim. Gräve, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching
- Le Beau MM (1993(2)): Important Advances in Oncology. DeVita VT, Hellmann S, Rosenberg S, Eds. Lippincott, Philadelphia, 29- 45
- Le Beau MM (1993): Detecting genetic changes in human tumor cells: have scientists "gone fishing"? *Blood.* 81, 1979-83
- Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E, Fletcher JA, Morton CC (2001): Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am. J. Hum. Gen.* 68, 1043-47
- Lee C, Lemyre E, Miron PM, Morton CC (2001): Multicolor fluorescence in situ hybridization in clinical cytogenetic diagnostics. *Curr. Opin. Pediatr.* 13, 550-5
- Lehmann E, Radbruch A (1977): Robertsonian translocations in *Mus musculus* from Sicily. *Experientia.* 33, 1025-6
- Lejeune J, Gautier M, Turpin R (1959) : Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Comp. Rend.* 248, 1721-22
- Lengauer C, Speicher MR, Popp S, Jauch A, Taniwaki M, Nagaraja R, Riethman HC, Donis-Keller H, D'Urso M, Schlessinger D, et al. (1993): Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum Mol Genet.* 2, 505-12
- Leonard A, Deknuddt G (1967): A new marker for chromosome studies in the mouse. *Nature.* 214, 504-5
- Levan A, Hauschka TS (1953): Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 14, 1-43

- Lichter P, Cremer T, Tang CJ, Watkins PC, Manuelidis L, Ward DC (1988): Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 9664-8
- Liechty MC, Hall BK, Scalzi JM, Davis LM, Caspary WJ, Hozier JC (1995): Mouse chromosome-specific painting probes generated from microdissected chromosomes. *Mamm Genome.* 6, 592-4
- Liyanage M, Coleman A, du Manoir S, Veldman T, McCormack S, Dickson RB, Barlow C, Wynshaw-Boris A, Janz S, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Schrock E, Ried T (1996): Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat Genet.* 14, 312-5
- Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B (1989): Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature.* 338, 348-50
- Lyon MF, Searle AG (eds.) (1989): Genetic variants and strains of the laboratory mouse. Oxford University Press, Oxford
- Macgregor H, Varley J (1988): Chromosome banding, in *Working with animal chromosomes.* Macgregor H & Varley J, Eds., John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore, 73-113
- Macville M, Veldman T, Padilla-Nash H, Wangsa D, O'Brien P, Schrock E, Ried T (1997): Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements. *Histochem Cell Biol.* 108, 299-305
- Malik Z, Cabib D, Buckwald RA, Talmi A, Garini Y, Lipson SG (1996(2)): Fourier transform multipixel spectroscopy for quantitative cytology. *J. Microsc.* 182, 133-140
- Malik Z, Dishi M, Garini Y (1996): Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells. *Photochem Photobiol.* 63, 608-14
- Marx J (1996): New methods for expanding the chromosomal paint kit. *Science.* 273, 430
- Matthey R (1966): Le polymorphisme chromosomique des *Mus* africains du sous-genre *Leggada*. Revision generale portant sur l'analyse de 213 individus. *Revue suisse Zool.* 73, 585-607
- Meltzer P (1995): Microdissection and PCR Amplification of banded human chromosomes. *Genetics Northwest Volume X, Number 1*
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM (1992): Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nat Genet.* 1, 24-8
- Miyashita K, Vooijs MA, Tucker JD, Lee DA, Gray JW, Pallavicini MG (1994): A mouse chromosome 11 library generated from sorted chromosomes using linker-adaptor polymerase chain reaction. *Cytogenet Cell Genet.* 66, 54-7
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA (1960): Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20, 613-16
- Moriwaki K, Yonekawa H, Gotoh O, Minezawa M, Winking H, Gropp A (1984): Implications of the genetic divergence between European wild mice with Robertsonian translocations from the viewpoint of mitochondrial DNA. *Genet Res.* 43, 277-87

- Müller S, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J (1997): Reciprocal chromosome painting between human and prosimians (*Eulemur macaco macaco* and *E. fulvus mayottensis*). *Cytogenet Cell Genet.* 78, 260-71
- Müller-Navia J, Nebel A, Oehler D, Theile U, Zabel B, Schleiermacher E (1996): Microdissection and DOP-PCR-based reverse chromosome painting as a fast and reliable strategy in the analysis of various structural chromosome abnormalities. *Prenat Diagn.* 16, 915-22
- Murken J, Cleve H (1996): *Humangenetik*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Nachman MW, Searle JB (1995): Why is the house mouse karyotype so variable? *Trends. Ecol. Evol.* 10, 397-402
- 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, 20-7
- Nederlof PM, van der Flier S, Raap AK, Tanke HJ, van der Ploeg M, Kornips F, Geraedts JP (1989): Detection of chromosome aberrations in interphase tumor nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 42, 87-98
- Nederlof PM, van der Flier S, Vrolijk J, Tanke HJ, Raap AK (1992): Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes for multiple in situ hybridization by digital imaging microscopy. *Cytometry.* 13, 839-45
- 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, 126-31
- Nielsen J, Wohlert M, Faaborg-Andersen J, Hansen KB, Hvidman L, Krag-Olsen B, Moulvad I, Videbech P (1982): Incidence of chromosome abnormalities in newborn children. Comparison between incidences in 1969-1974 and 1980-1982 in the same area. *Hum Genet.* 61, 98-101
- Ning Y, Liang JC, Nagarajan L, Schrock E, Ried T (1998): Characterization of 5q deletions by subtelomeric probes and spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet.* 103, 170-2
- Ning Y, Roschke A, Smith ACM, Macha M, Precht K, Riethman H, Ledbetter D (Group 1), Flint J, Horsley S, Regan R, Kearney L, Knight S, Kvaloy K, Brown WRA (group 2) (1996): A complete set of human telomeric probes and their clinical application. National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine collaboration. *Nat Genet.* 14, 86-9
- Nowell PC (1960): Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer Res.* 20, 462-66
- Nowell PC, Hungerford DA (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132, 1497
- Ohno S (1986): The total number of genes in the mammalian genome. *Trends in Genetics* 2, 8
- Orsini P, Bonhomme F, Britton-Davidian J, Croset H, Gerasimov S, Thaler L (1983): The complex of species of genus *Mus* in Central and Oriental Europe. II. Criteria for identification, distribution and ecological characteristics. *Z.Säugetierkunde* 48, 86-95
- Pardue ML, Gall JG (1970): Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science.* 168, 1356-8
- Paris Conference (1971): Standardization in human cytogenetics. *Birth Defects*, Vol. 8, No. 7. The National Foundation 1972, New York.

- Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP (1960): Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet* 1, 790-93
- Pfeiffer RA (1970): Kultivierung von Blut- und Knochenmarkszellen. In: Schwarzacher HG, Wolf Und (Ed.): *Methoden in der medizinischen Cytogenetik*: 1-35. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg- New- York.
- Popp S, Jauch A, Schindler D, Speicher MR, Lengauer C, Donis-Keller H, Riethman HC, Cremer T (1993): A strategy for the characterization of minute chromosome rearrangements using multiple color fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA libraries and YAC clones. *Hum Genet.* 92, 527-32
- Rabbitts P, Impey H, Heppell-Parton A, Langford C, Tease C, Lowe N, Bailey D, Ferguson-Smith M, Carter N (1995): Chromosome specific paints from a high resolution flow karyotype of the mouse. *Nat Genet.* 9, 369-75
- Ried T, Arnold N, Ward DC, Wienberg J (1993): Comparative high-resolution mapping of human and primate chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 18, 381-6
- Ried T, Baldini A, Rand TC, Ward DC (1992(1)): Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 1388-92
- Ried T, Landes G, Dackowski W, Klinger K, Ward DC (1992(2)): Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. *Hum Mol Genet.* 1, 307-13
- Ried T, Liyanage M, du Manoir S, Heselmeyer K, Auer G, Macville M, Schrock E (1997): Tumor cytogenetics revisited: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J Mol Med.* 75, 801-14
- Ried T, Schrock E, Ning Y, Wienberg J (1998): Chromosome painting: a useful art. *Hum Mol Genet.* 7, 1619-26
- Robinson TJ (1978): Preliminary report of a Robertsonian translocation in an isolated feral *Mus musculus* population. *Mamm. Chrom. Newsl.* 19, 84-85
- Rothfels KH, Siminovitch L (1958): An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Tech.* 33, 73-7
- Sachs ES, Van Hemel JO, Den Hollander JC, Jahoda MG (1987): Marker chromosomes in a series of 10,000 prenatal diagnoses. *Cytogenetic and follow-up studies. Prenat Diagn.* 7, 81-9
- Said K, Jacquart T, Montgelard C, Sonjaya H, Helal AN, Britton- Davidian J (1986): Robertsonian house mouse populations in Tunisia: A karyological and biochemical study. *Genetica* 68, 151-56
- 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, 494-7
- Schröck E, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Spurbeck J, Jalal S, Shaffer LG, Papenhausen P, Kozma C, Phelan MC, Kjeldsen E, Schonberg SA, O'Brien P, Biesecker L, du Manoir S, Ried T (1997): Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet.* 101, 255-62
- Searle AG, Beechey CV (1978): Complementation studies with mouse translocations. *Cytogenet Cell Genet.* 20, 282-303

- Searle AG, Peters J, Lyon MF, Hall JG, Evans EP, Edwards JH, Buckle VJ (1989): Chromosome maps of man and mouse. IV. *Ann Hum Genet.* 53, 89-140
- Seuanez HN (1979): *The phylogeny of human chromosomes.* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- Seyffert W, Gassen HG, Hess O, Jäckle H, Fischbach KF (1998): *Lehrbuch der Genetik.* Gustav Fischer Verlag, Ulm.
- Shepel LA, Morrissey LW, Hsu LC, Gould MN (1994): Bivariate flow karyotyping, sorting, and peak assignment of all rat chromosomes. *Genomics.* 19, 75-85
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC (1996): Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 12, 368-75
- Spikes AS, Hegmann K, Smith JL, Shaffer LG (1995): Use of fluorescence in situ hybridization to clarify a complex chromosomal rearrangement in a child with multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet.* 57, 31-4
- 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, 245-50
- Sullivan KF, Shelby RD, Vafa O, Kanda T, Wahl G (2001): Centromere Structure and Chromosome Dynamics. TSRI Scientific Report. <http://www.scripps.edu/research/sr98/cbgen25.htm>
- Tanemura M, Suzumori K, Nishikawa N, Ishihara Y (2001): Multicolor spectral karyotyping for complex chromosomal rearrangements in repeated abortion or congenital anomalies. *Prenat. Diagn.* 21, 1123-8
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992(2)): Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics.* 13, 718-25
- Telenius H, Pelmeur AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjold M, Pfragner R, Ponder BA (1992(1)): Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer.* 4, 257-63
- Thaler L, Bonhomme F, Britton-Davidian J (1981): process of speciation and semi-speciation in the house mouse. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 47, 27-41. In: *Biology of the House Mouse.* Ed. By R. J. Berry. London, New York: Academic Press
- Tjio JH, Levan A (1956): The chromosome number of man. *Hereditas* 42, 1-6
- Tolmie JL (1995): Chromosome disorders. In Whittle MJ and Connor JM (eds), *Prenatal Diagnosis in Obstetric Practice.* Blackwell Scientific, Oxford.
- Van Tuinen P, Ledbetter DH (1983): Cytogenetic comparison and phylogeny of three species of Hylobatidae. *Am J Phys Anthropol.* 61, 453-66
- Veldman T, Vignon C, Schrock E, Rowley JD, Ried T (1997): Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet.* 15, 406-10
- Warburton D (1991): De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 49, 995-1013

- Weier HU, Polikoff D, Fawcett JJ, Greulich KM, Lee KH, Cram S, Chapman VM, Gray JW (1994): Generation of five high-complexity painting probe libraries from flow-sorted mouse chromosomes. *Genomics*. 21, 641-4
- Wiegant J, Wiesmeijer CC, Hoovers JM, Schuurin E, d'Azzo A, Vrolijk J, Tanke HJ, Raap AK (1993): Multiple and sensitive fluorescence in situ hybridization with rhodamine-, fluorescein-, and coumarin-labeled DNAs. *Cytogenet Cell Genet*. 63, 73-6
- Wienberg J, Jauch A, Stanyon R, Cremer T (1990): Molecular cytogenetics of primates by chromosomal in situ suppression hybridization. *Genomics*. 8, 347-50
- Wienberg J, Stanyon R, Jauch A, Cremer T (1992): Homologies in human and *Macaca fuscata* chromosomes revealed by in situ suppression hybridization with human chromosome specific DNA libraries. *Chromosoma*. 101, 265-70
- Winking H, Dulic`B, Bulfield G (1988): Robertsonian karyotype variation in the European house mouse, *Mus musculus*. *Z. Säugetierkunde* 53, 148-161
- Winking H, Reuter C, Bostelmann H (2000): Unequal nondisjunction frequencies of trivalent chromosomes in male mice heterozygous for two Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet*. 91, 303-6
- Xiao Y, Darroudi F, Kuipers AG, de Jong JH, de Boer P, Natarajan AT (1996): Generation of mouse chromosome painting probes by DOP-PCR amplification of microdissected meiotic chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*. 75, 63-6
- Yang F, Carter NP, Shi L, Ferguson-Smith MA (1995): A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma*. 103, 642-52
- Yang F, O'Brien PC, Wienberg J, Ferguson-Smith MA (1997(1)): A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in Indian muntjac using chromosome painting. *Chromosome Res*. 5, 109-17
- Yang F, O'Brien PC, Wienberg J, Neitzel H, Lin CC, Ferguson-Smith MA (1997(2)): Chromosomal evolution of the Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). *Chromosoma*. 106, 37-43

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Schmid sehr herzlich für die Überlassung des Themas danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Claus Steinlein für die außerordentlich intensive und engagierte Betreuung dieser Arbeit. Seine immer motivierende Unterstützung hat entscheidend zum Erfolg dieser Promotion beigetragen.

Danken möchte ich des weitern allen Labormitarbeitern am Institut für Humangenetik für die praktische Hilfe bei der Durchführung der Experimente.



# Lebenslauf

**Name:** Kern  
**Vorname:** Christine  
**Geburtsdatum:** 09.03.1977  
**Geburtsort:** Würzburg  
**Eltern:** Emil Kern  
Elisabeth Kern, geb. Zürrlein

## Ausbildung:

Sep. 1983 – Juli 1987 Grundschole Rimpar  
Sep. 1987 – Juli 1996 Deutschhaus Gymnasium, Würzburg  
Sep. 1996 Beginn des Medizinstudiums an der Julius - Maximilians -  
Universität in Würzburg  
Sep. 1998 Ärztliche Vorprüfung  
März 2000 1. Staatsexamen  
März 2002 2. Staatsexamen  
Juni 2003 3. Staatsexamen  
Juli 2003 – Oktober  
2004 AIP in der kardiologischen Abteilung des Leopoldina  
Krankenhauses in Schweinfurt  
Seit Oktober 2004 Assistenzärztin in der kardiologischen Abteilung des Leopoldina  
Krankenhauses in Schweinfurt

Rimpar, den 11.12.2006 .....

*Christine Kern*