

1.2 Zytogenetische Grundlagen der molekularen Medizin

KARL SPERLING und HEIDEMARIE NEITZEL

Inhaltsverzeichnis	
1.2.1	Einleitung 54
1.2.2	Chromosomentheorie der Vererbung 56
1.2.3	Grundlagen der Chromosomenphysiologie 60
1.2.3.1	Struktur der Chromosomen und des Chromatins 60
1.2.3.2	Funktionelle Gliederung der Chromosomen 61
1.2.3.3	Kartierung von Genen und repetitiver DNA 63
1.2.4	Zellzyklus und Chromosomenzyklus 65
1.2.4.1	Regulation des Zellzyklus 66
1.2.4.2	Checkpoint-Kontrolle 71
1.2.4.3	Regulation der Zellproliferation 74
1.2.5	Chromosomopathien 75
1.2.5.1	Aneuploidien 76
1.2.5.2	Imprinting 76
1.2.5.3	Strukturelle Chromosomenmutationen 78
1.2.6	Somatische Chromosomenmutationen 79
1.2.6.1	Somatische Rekombination 79
1.2.6.2	Chromosomeninstabilität 81
1.2.6.3	Chromosomenmutationen in der Tumorgenese 82
1.2.7	Ausblick 84
1.2.8	Literatur 85

1.2.1 Einleitung

Die molekulare Medizin ist eine analytische Wissenschaft mit dem Ziel, einen medizinischen Sachverhalt bis hin zu seinen molekularen Ursachen aufzuklären. Die Zytogenetik dagegen stellt die Verbindung zytologischer, speziell chromosomaler Beobachtungen mit genetischen Sachverhalten dar und wird daher als eine deskriptive Disziplin angesehen.

Diese Sichtweise ist aus mehrfachen Gründen zu einfach:

1. Die Zytogenetik ist nicht rein deskriptiv, da sie auf einem höheren Niveau biologischer Organisation als der DNA entscheidende biologisch-medizinische Sachverhalte in einem logischen Zusammenhang darzustellen vermag. Sie relativiert damit zugleich eine weit verbreitete Ansicht, dass ein zellbiologisches Phänomen dann aufgeklärt und verstanden ist, wenn die beteiligten Moleküle identifiziert und benannt wurden.
2. Die Zytogenetik hat durch ihren neuen Zweig, die molekulare Zytogenetik, unmittelbar Anschluss an die molekulare Genetik und damit auch die molekulare Medizin gefunden.

Einige der größten Erfolge der molekularen Medizin basieren auf zytogenetischen Beobachtungen, wie die folgenden 3 Beispiele aus der Entwicklungsgenetik, der medizinischen Genetik und der Tumorgenetik belegen sollen.

1. Der erste Fall betrifft einen Befund von 1959, wonach Individuen mit der Chromosomenkonstitution 47,XXY männlich und solche mit der Konstitution 45,XO weiblich sind. Dies sprach dafür, dass beim Vorliegen eines Y-Chromosoms die ontogenetische Entwicklung in männliche Richtung verläuft. Später konnte gezeigt werden, dass hierfür nur ein kleiner Bereich im kurzen Arm des Y-Chromosoms verantwortlich ist. Dies führte zur Identifizierung des SRY-Gens (sex determining region on Y), dem Schaltergen, das beim Menschen und beim Säuger allgemein die Entwicklung des undifferenzierten Embryos in männliche Richtung bestimmt. Die Mutation nur eines einzigen Basenpaars in diesem Gen, die dessen Funktionsverlust bedingt, führt zur Entstehung weiblicher Individuen mit einem ansonsten normal männlichen Chromosomensatz. Diese sind als Kinder phänotypisch normal weiblich, entwickeln aber in der Pubertät keine sekundären Geschlechtsmerkmale und sind aufgrund fehlender Gonaden steril. Die molekulare

Analyse hat dabei nicht nur diese besondere Form von Sterilität aufklären können, sondern zugleich dasjenige Gen beim Säuger identifiziert, das für die Geschlechtsbestimmung verantwortlich ist [Übersicht bei Wolf (1995)].

2. Eine zytogenetische Auffälligkeit war es auch, die mit einer der häufigsten genetisch bedingten Ursachen geistiger Behinderung einhergeht, dem so genannten fragilen X-Syndrom. Zytogenetisch auffällig war eine brüchige (fragile) Stelle im terminalen Bereich des langen Arms des X-Chromosoms. Gestützt auf die Lokalisation konnten das Gen identifiziert und zugleich ein vollkommen neuer Mutationsmechanismus beschrieben werden. Es handelt sich um eine Vermehrung von Basentriplets der Folge (CCG)_n im nichtkodierenden Bereich des FMR1-Gens (fragile X mental retardation-1).

Es kommt aber nur dann zu klinischen Konsequenzen, wenn bereits eine so genannte Prämutation, also eine geringfügigere Vermehrung des Basentriplets vorliegt. Durchlaufen diese so veränderten Sequenzen die Oogenese, nicht die Spermatogenese, kann es zur erneuten Vermehrung des Basentriplets und damit zur Ausprägung klinischer Symptome kommen. Mit der Aufdeckung dieses Mechanismus wurde zugleich die Erklärung für ein bislang vollkommen rätselhaftes Phänomen geliefert, die Antizipation. Gemeint ist damit, dass bei bestimmten genetisch bedingten Erkrankungen das Erkrankungsrisiko und die Schwere der Erkrankung von Generation zu Generation zunehmen. Das gleiche Phänomen konnte inzwischen für mehr als ein Dutzend weiterer neurologischer Erkrankungen belegt werden [Übersicht Kaufmann u. Reiss (1999)], bei denen die Schwere der Erkrankung und das Manifestationsalter mit der zunehmenden Länge der Basentriplets korreliert.

3. Ein letztes Beispiel soll den Stellenwert zytogenetischer Beobachtungen für das Verständnis der Tumorgenese illustrieren. Kennzeichnend für das Burkitt-Lymphom, eine in Deutschland seltene Krebserkrankung, sind charakteristische Translokationen der Krebszellen zwischen einem Chromosom 8 und einem Chromosom 2, 14 oder 22, die jeweils die gleichen Bruchstellen betreffen. Es bedeutete einen wissenschaftlichen Durchbruch auf dem Gebiet der Tumorgenetik, als im Oktober 1982 2 Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zeigen konnten, dass als Folge dieser Translokationen das *c-myc*-Gen auf Chromosom 8 in Nachbarschaft zu den Genen

der schweren (Chromosom 14) oder der leichten Ketten der Immunglobulingene (Chromosom 2 und 22) gelangt, die gerade in diesen Zellen besonders aktiv sind. Als Folge der Translokation kommt es zu einer gesteigerten Expression des *c-myc*-Gens als entscheidendem frühen Schritt in der Genese dieser Tumoren. Zum 1. Mal konnte damit für die Kanzerogenese ein Zusammenhang zwischen einer strukturellen Chromosomenveränderung und der Expression der davon betroffenen Genen hergestellt werden. Im Gegensatz zu den beiden vorausgegangenen Beispielen handelt es sich hier nicht um Veränderungen in der Keimbahn, sondern um Mutationen in somatischen Zellen [Übersicht bei Look (1998)].

Diese 3 speziellen Beispiele illustrieren einen allgemeinen Sachverhalt: Die Zytogenetik ist schon deshalb eine wesentliche Grundlage der molekularen Medizin, weil die Gene auf den Chromosomen angeordnet sind. Die Genkarte stellt das entscheidende Ordnungsprinzip in der Genetik dar, durchaus vergleichbar mit der Orientierungshilfe mittels Landkarten im täglichen Leben. So können strukturelle Veränderungen der Chromosomen, die die Keimbahn betreffen und mit klinischen Auffälligkeiten einhergehen oder die maligne Zellen auszeichnen, den Weg zu den jeweils betroffenen Genen weisen. Der Lageort des Gens lässt zudem Hinweise auf die Genexpression zu, da die Chromosomen selbst funktionell untergliedert sind.

Darüber hinaus stellen bestimmte Chromosomenmutationen das lichtmikroskopische Äquivalent einer DNA-Schädigung dar. Eine erhöhte Rate an Chromosomenbrüchen kann so auf eine mutagene Exposition hinweisen. Liegt eine derartige „Chromosomeninstabilität“ aber als Symptom einer genetisch bedingten Erkrankung vor, deutet dies darauf hin, dass der zugrunde liegende Defekt direkt oder indirekt mit einem zentralen zellulären Geschehen, der DNA-Reparatur und der Zellzykluskontrolle zusammenhängt.

Ein wichtiger Aspekt blieb bislang unerwähnt: Chromosomale Veränderungen selbst sind Gegenstand der molekularen Medizin, einmal im Hinblick auf ihre Ätiologie und zum anderen bezüglich ihrer klinischen Konsequenzen. So weisen nahezu 30% aller befruchteten Eizellen eine Chromosomenanomalie auf, unter Neugeborenen sind es noch etwa 0,6%, wobei die Mehrzahl auch klinisch auffällig ist. Chromosomenmutationen tragen daher entscheidend zur Mortalität und Morbidität im Kindesalter bei. Zudem gibt es kaum eine Krebs-

form, die nicht mit chromosomalen Veränderungen einhergeht.

Angesichts dieser Sachlage ist es nicht verwunderlich, dass zytogenetische Befunde in vielen Kapiteln dieses Werkes angesprochen werden. Es kann daher nicht Aufgabe dieses Beitrags sein, die einzelnen Bereiche ausführlich abzuhandeln; dies ist den speziellen Abschnitten vorbehalten. Ebenso können hier nicht die elementaren Grundlagen von Mitose und Meiose besprochen werden, die jedem einschlägigen Lehrbuch zu entnehmen sind. Zudem bleibt das Gebiet der menschlichen Chromosomopathien weitgehend ausgespart, da dies Gegenstand eines eigenen Kapitels in Band „Monogen bedingte Erbkrankheiten 2“, Kapitel „Chromosomopathien“ (Ganten u. Ruckpaul 2000) ist.

Hier soll vielmehr der Versuch unternommen werden, gestützt auf die allgemeinen Grundlagen der Chromosomentheorie, der Vererbung und der Chromosomenphysiologie, die molekularen Grundlagen zytogenetischer Phänomene darzustellen und ihre Bedeutung für das Verständnis medizinischer Sachverhalte aufzuzeigen, ganz im Sinn der einleitend angeführten Beispiele.

1.2.2 Chromosomentheorie der Vererbung

Die etwa 30 000–40 000 Gene des Menschen verteilen sich auf 23 Chromosomenpaare. Von der Mutter und vom Vater wird jeweils ein einfacher, haploider Chromosomensatz an die Nachkommen vererbt. Die befruchtete Eizelle, die Zygote, weist danach in der Regel einen normalen diploiden Satz aus 46 Chromosomen auf. Sämtliche Körperzellen gehen durch Zellteilung, Mitose, aus der befruchteten Eizelle hervor. Sie enthalten daher ebenfalls 46 Chromosomen und im Prinzip auch sämtliche Erbanlagen. Dass sich die verschiedenen Gewebe in morphologischer und physiologischer Hinsicht unterscheiden, beruht letztlich darauf, dass jeweils nur bestimmte Gene aktiv sind. Die entwicklungs- und gewebespezifische Regulation der Genaktivität ist Grundlage jeden Entwicklungs- und Differenzierungsgeschehens. Die Bedeutung der Chromosomen als Träger der Erbanlagen liegt deshalb einmal darin, die korrekte Verteilung der Gene auf die Tochterzellen zu gewährleisten, und zum anderen darin, die korrekte Weitergabe der Gene bei der Keimzellbildung, der Meiose, zu sichern. Zugleich sind die Chromosomen der Interphase (das Chromatin) aber auch das Substrat der Genregulation.

Diese Erkenntnisse haben Anfang dieses Jahrhunderts ihren Niederschlag in der „Chromosomentheorie der Vererbung“ gefunden, die zugleich die Geburtsstunde der Zytogenetik markiert. Dabei ergab sich eine vollständige Korrelation zwischen den im Kreuzungsexperiment ermittelten Befunden und den zytogenetischen Beobachtungen (Abb. 1.2.1). Das paarweise Vorhandensein der Erbanlagen in den Körperzellen entsprach dem paarweisen Vorliegen der Chromosomen, das einfache Vorhandensein in den Keimzellen der Reduktion der diploiden auf die haploide Chromosomenzahl während der Meiose. Die lichtmikroskopisch sichtbaren Chiasmata der Prophase der Meiose stellen das Korrelat für den im Kreuzungsexperiment ermittelten Austausch von Genen zwischen homologen Chromosomen (Cross-over) dar. Diese genetischen Austauschereignisse ermöglichten T. H. Morgan und seinen Schüler in den 20er Jahren die Erstellung der ersten Genkarten bei der Taufliege *Drosophila*. Die auf diese Weise ermittelte Entfernung der Gene wird in cM (Zentimorgan) angegeben. Hierbei entspricht die genetische Distanz von 1 cM einer Rekombinationsrate zwischen 2 Genen von 1%.

Es war ein fast einmaliger Zufall in der Wissenschaft, als Heitz und Bauer 1933 in Berlin (und unabhängig von ihnen Painter in den USA) zeigen konnten, dass das damals genetisch am besten analysierte Objekt, die *Drosophila*, sich zugleich auch zytogenetisch in besonderer Weise auszeichnet. In den Speicheldrüsen der Larven finden sich so genannte Riesenchromosomen. Es handelt sich dabei um Interphasechromosomen, die aus mehr als 1000 gepaarten Chromatiden bestehen, was ihre große Länge und Dicke erklärt. Sie weisen eine spezifische Bandenstruktur auf, wobei ein bestimmtes Gen einer distinkten Bande zugeordnet und damit die lineare Anordnung der Gene auf den Chromosomen sichtbar gemacht werden konnten. Durch die Arbeiten von Beermann und seinen Schülern in den 50er Jahren konnte hieran sogar gezeigt werden, dass sich genetisch aktive und inaktive Gene im Lichtmikroskop in ihrer Konformation unterscheiden.

Damals schien es ausgeschlossen, jemals die Reihenfolge der Gene auch auf den menschlichen Mitosechromosomen oder die Expression der Gene lichtmikroskopisch nachweisen zu können. Heute ist dies dank des Fortschrittes auf dem Gebiet der molekularen Zytogenetik möglich. Mittels der Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) können die Gene beim Menschen rasch kartiert und ihr Verlust bei bestimmten Erkran-

Chromosomentheorie der Vererbung

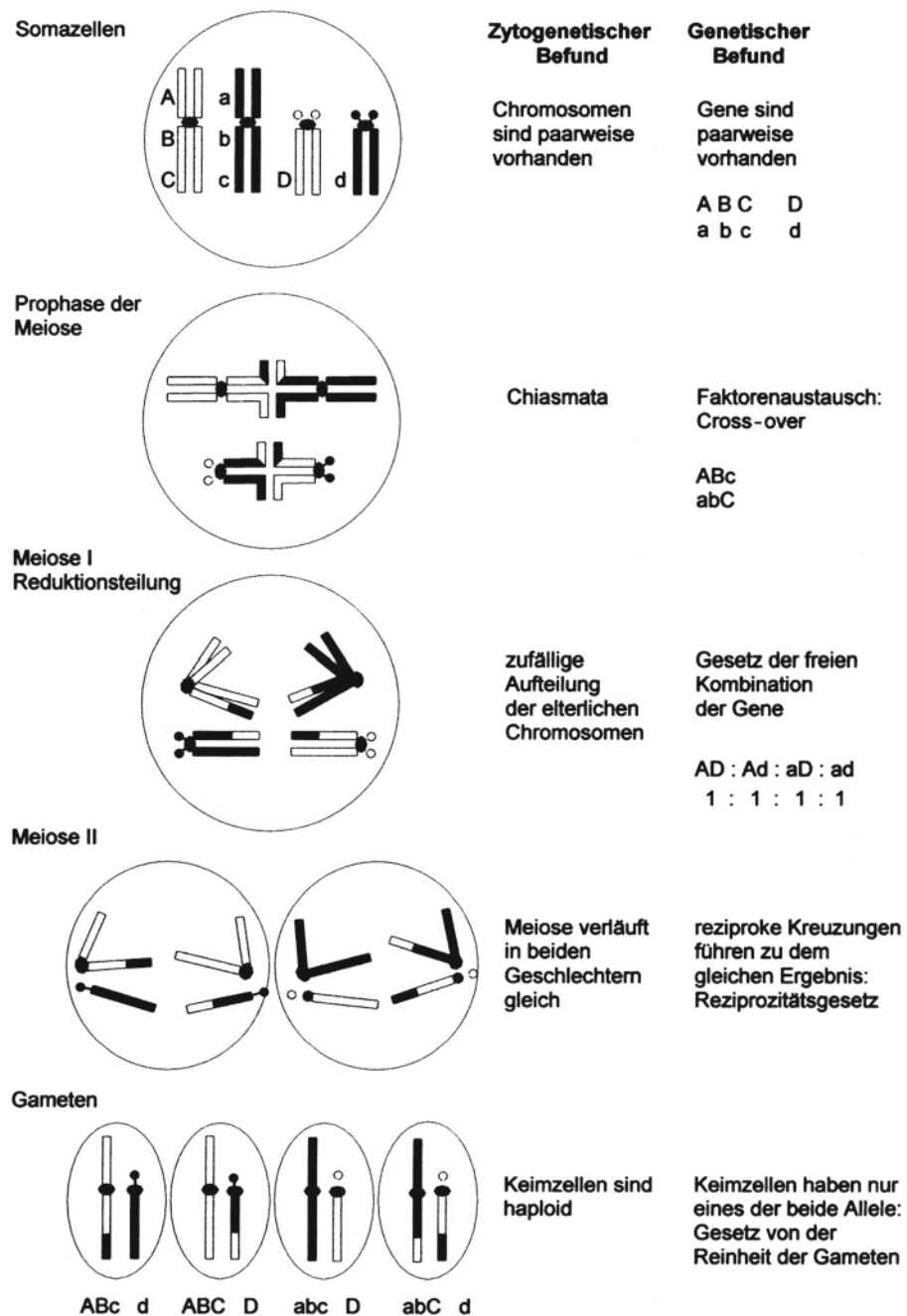


Abb. 1.2.1. Gegenüberstellung von zytogenetischen Beobachtungen mit den entsprechenden genetischen Befunden, die durch das Kreuzungsexperiment erschlossen wurden, die zusammen dann die „Chromosomentheorie der Vererbung“ begründet haben

kungen lichtmikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 1.2.2). Noch wesentlich größer ist die Auflösung, wenn die Hybridisierung nicht an Mitosechromosomen, sondern an DNA-Fibrillen erfolgt. Hierbei können Längenunterschiede von wenigen Tausend Basenpaaren erfasst werden. Mit Hilfe des so genannten Padlock-Verfahrens können sogar einzelne Basenaustausche lichtmikroskopisch er-

kannt werden (Baner et al. 2001). Einzelheiten zu diesen Verfahren finden sich in Band „Monogen bedingte Erbkrankheiten 2“, Kapitel „Chromosomopathien“ (Ganten u. Ruckpaul 2000).

Die FISH-Analyse kann mit Einzelsonden erfolgen, aber auch mit einem Gemisch von Proben, die repräsentativ für ein einzelnes Chromosom (chromosome painting) oder einzelne Chromoso-

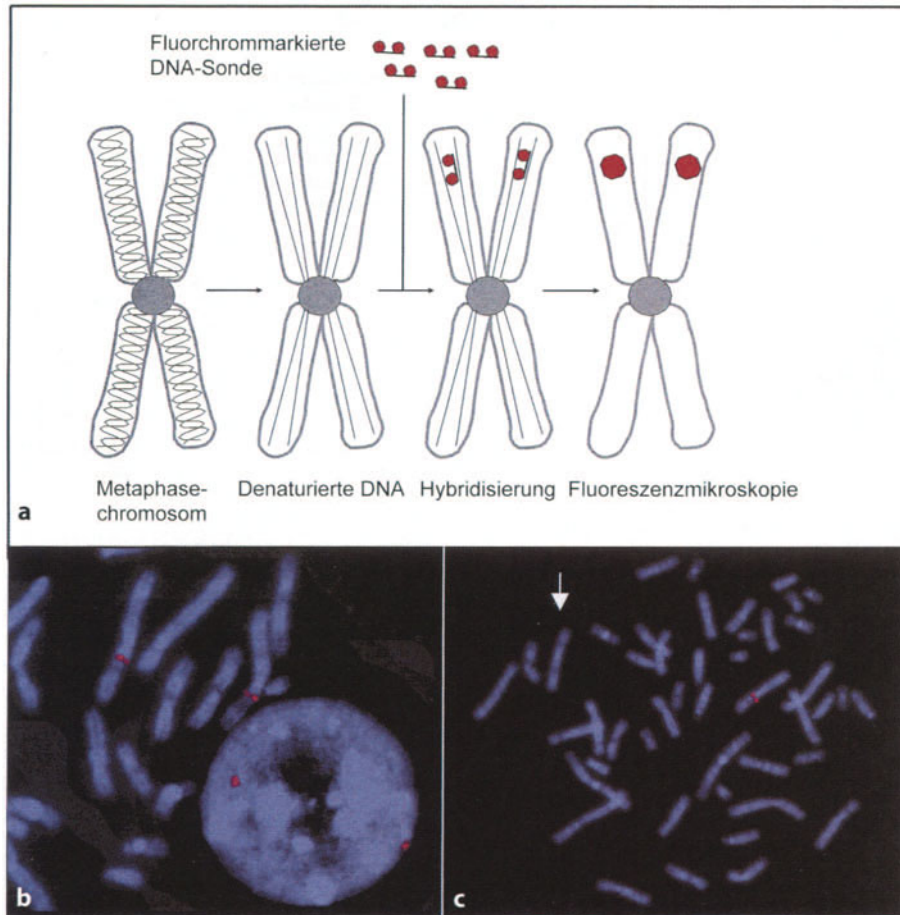


Abb. 1.2.2. a Schematische Darstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Hierzu wird eine DNA-Probe, die mit einem Fluorochrom markiert ist, auf menschliche Metaphasechromosomen hybridisiert. Deren DNA wurde zuvor in den einzelsträngigen Zustand überführt, b Ausschnitt aus einer Metaphase nach FISH mit einer Sonde von Chromosom 3: das Fluoreszenzsignal ist auf beiden Chromo-

somen 3 im kurzen Arm nachweisbar, außerdem sind deutlich 2 Signale in dem unten rechts liegenden Interphasekern sichtbar, c Metaphase einer Patientin, die eine Deletion für den oben genannten Bereich im kurzen Arm von Chromosom 3 aufweist: Das FISH-Signal ist nur auf einem der beiden Chromosomen 3 nachweisbar; Pfeil 2, deletiertes Chromosom 3

menabschnitte sind. Werden unterschiedliche Fluorochrome verwendet, ergibt sich ein chromosomales Bandenmuster, das der Kodierung durch ein Strichmuster entspricht und als „chromosomal barcode“ bezeichnet wird. Wie aus Abb. 1.2.2 hervorgeht, kann dieser Nachweis auch an Zellkernen vorgenommen werden, sodass man dank der FISH-Technik für eine zytogenetische Untersuchung nicht mehr auf Metaphasechromosomen und damit auf proliferierende Zellen angewiesen ist (Interphasezytogenetik).

Ebenso kann heute für jedes Gen die entwicklungs- und gewebespezifische Expression auf RNA-Ebene durch In-situ-Hybridisierung ermittelt werden. Hierzu wird z.B. an Gewebeschnitten der Maus die betreffende mRNA durch Hybridisierung

Abb. 1.2.4. a,b Chromosomale Verteilung zweier repetitiver Elemente im Genom der Erdmaus *Microtus agrestis* nach In-situ-Hybridisierung. Beide Elemente kommen bei den nächsten Verwandten nur in wenigen Kopien vor und wurden im Lauf der Evolution der Art *Microtus agrestis* in großem Maß amplifiziert. a Die Lage des einen repetitiven Elements von 3 kbp Länge ist auf das Heterochromatin der beiden großen Gonosomen begrenzt. b Das andere Retroposon tritt bevorzugt im Heterochromatin auf, ist jedoch auch weit über das Euchromatin verteilt. Der Nachweis wurde mit FITC-markierten Sonden durchgeführt, c,d Nachweis der Transkriptionsaktivität des in (b) gezeigten Elements in der Oogenese der Erdmaus *Microtus agrestis*, c Pachytänchromosomen nach DAPI-Färbung. Das Heterochromatin des X-Bivalents tritt deutlich hervor. d Dieselbe Zelle nach DNA-RNA-in-situ-Hybridisierung, wobei das Retroposon von b als Sonde eingesetzt wurde. Deutlich ist die Markierung über dem Heterochromatin und Teilen des Euchromatins zu erkennen, was mit der chromosomalen Lage des Retroposons (b) korreliert, aus Sperling (1999)

Abb. 1.2.3 a,b. Nachweis des Expressionsmusters eines Mausegens durch DNA-RNA-Hybridisierung an einem 14,5 Tage alten Mausembryo. Es handelt sich um das so genannte NBS-Gen (Nijmegen-breakage-Syndrom), das in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die meiotische Rekombination sowie die Umbauten der Immunglobulingene einbezogen ist. Als Sonde wurde eine ^{35}S -markierte Antisense-RNA-Probe eingesetzt und autoradiographisch nachgewiesen. Die Silberkörnchen des Autoradiogramms erscheinen nach Dunkelfeldbeleuchtung als leuchtende Pünktchen (b). Die Markierung findet sich bevorzugt über allen teilungsaktiven Geweben, *me* Mesenzephalon, *te* Telenzephalon, *to* Zunge, *thy* Thymus, *Lu* Lunge, *Li* Leber, *pa* Pankreas, aus Wilda et al. (2000)

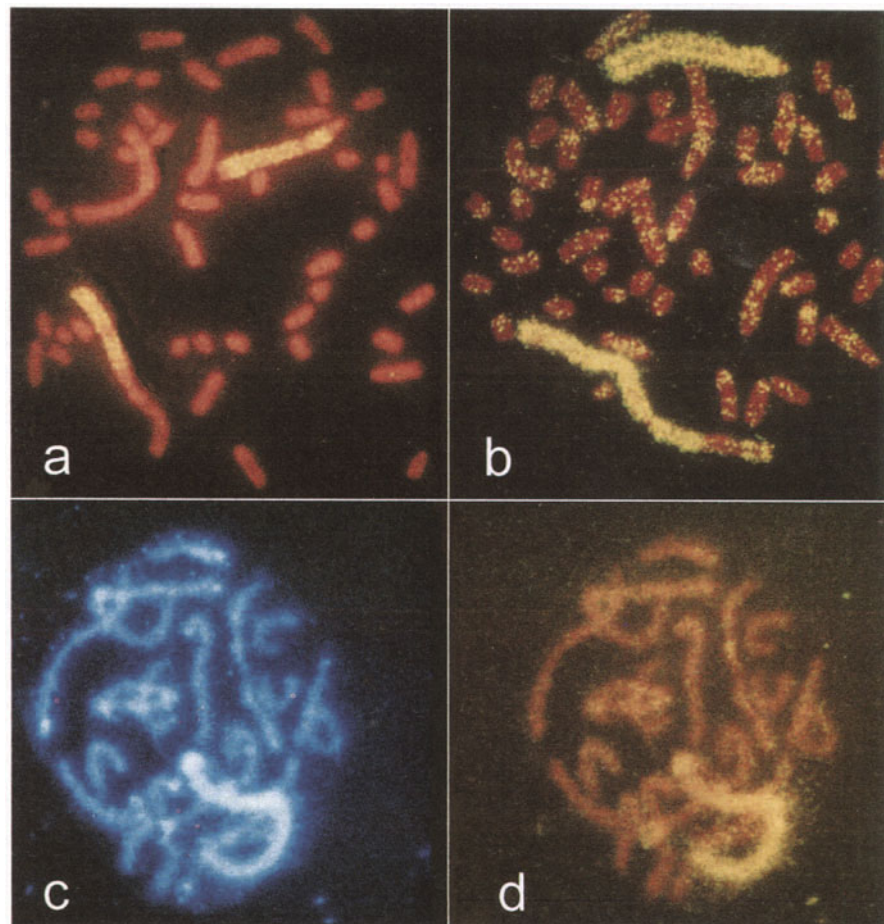
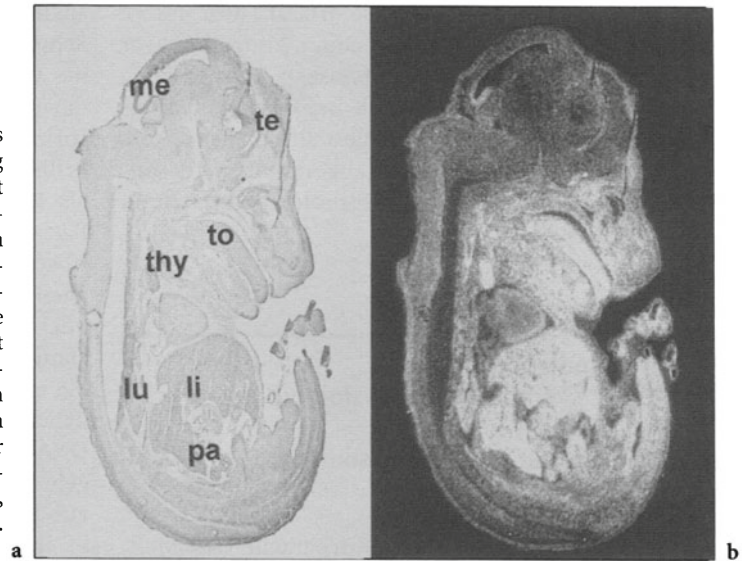


Abb. 1.2.4 a-d

Die chromosomalen Proteine von Mitose- und Interphasechromosomen stimmen weitgehend überein. Es findet daher keine vollständige Reorganisation statt, wie im Fall der Spermien-DNA nach der Befruchtung, sondern eine Modifikation der Proteine, insbesondere durch Phosphorylierung und Azetylierung. Mit dem Übergang von der Interphase zur Metaphase ist eine Verkürzung um das 5- bis 10fache verbunden. Dies lässt sich durch In-situ-Hybridisierung zeigen, indem die Distanzen zweier Loci im Interphasekern und auf den Metaphasechromosomen verglichen werden. Zugleich zeigt sich dabei, dass die Gene auf den Schwesterchromatiden charakteristische, spiegelbildliche Positionen einnehmen. Dies wird unter der Annahme verständlich, dass die helikalen Windungen der Schwesterchromatiden gegensätzlich verlaufen [Übersicht Bridger u. Bickmore (1998), Hart u. Laemmli (1998)].

In dem kompakten Zustand der Metaphasechromosomen, der Transportform, ist das genetische Material inaktiv. In der Interphase liegt das Chromatin in dekondensierter Form vor, die einzelnen Chromosomen sind nicht mehr sichtbar. Sie können jedoch nach In-situ-Hybridisierung als distinkte Bereiche im Interphasekern nachgewiesen werden (Abb. 1.2.2). Hierfür wurde bereits 1909 von Boveri der Begriff „Chromosomenterritorium“ geprägt. Er unterstreicht, dass die Chromosomen nicht miteinander verknäult vorliegen. Sie weisen, zumindest in teilungsaktivem Gewebe, eine Polarität auf, die durch die Orientierung in der Anaphase vorgegeben ist und von Rabl bereits 1885 beschrieben wurde. Hierbei sind die Zentromere und Telomere zu unterschiedlichen Polen gerichtet und die Chromosomenarme V-förmig abgelenkt. Innerhalb der Chromosomenterritorien scheinen die aktiven Gene bevorzugt auf deren Oberfläche zu liegen. Der Zellkern selbst besteht aus einer Reihe weiterer Kompartimente, die für den geordneten Stoffaustausch und die RNA-Prozessierung unerlässlich sind [Übersicht Cremer et al. (1982), Marshall et al. (1997), Bridger u. Bickmore (1998), Belmont et al. (1999)]. Die Chromosomen können ihre Position im Interphasekern verändern; wenn die Zelle jedoch ausdifferenziert ist, scheint ihre Anordnung stabil zu sein [Übersicht Zink u. Cremer (1998)].

In Zellen mit stark reduzierter genetischer Aktivität liegt auch das Chromatin in kompakter Form vor, wie z. B. in den Spermien oder in den Zellkernen der Lymphozyten des peripheren Bluts. Die Regel aber ist, dass das Chromatin der Zellkerne aus stärker und schwächer anfärbbaren Anteilen,

d.h. unterschiedlich kondensierten Bereichen, besteht. Hierfür hat Guthertz (1907) den Begriff Heteropyknosis vorgeschlagen. Durchgesetzt hat sich dagegen jedoch die von Heitz (1928, 1929) eingeführte Bezeichnung Heterochromatin für die gegenüber dem Euchromatin stärker angefärbten Bereiche.

Die Zellkerne der verschiedenen Gewebe können eine sehr charakteristische Morphologie aufweisen. So lassen sich die Zellkerne z. B. der Granulozyten sehr einfach von denen der Leberzellen oder denen des Neuroektoderms unterscheiden, und zwar bei nahezu allen Wirbeltieren (Manuelidis 1990). Unter anderen Bedingungen, z. B. wenn diese Zellen in die Gewebekultur überführt werden, ändert sich die Morphologie wieder. Es handelt sich also um einen grundsätzlich reversiblen Zustand. Diese charakteristische Morphologie der Interphasekerne hängt mit der Lage der Chromosomen und der unterschiedlichen Kondensation einzelner Chromosomenabschnitte zusammen. Letztlich dürfte es sich um den lichtmikroskopisch sichtbaren Ausdruck unterschiedlicher Genexpressivität der einzelnen Gewebe handeln. Allerdings stellen sich keinesfalls alle inaktiven Bereiche auf diese Weise dar. Die verschiedenen biochemischen Modifikationen des Chromatins und die daran beteiligten Signalstrukturen sind nicht Gegenstand dieses Beitrags. Übersichten hierzu finden sich bei Dreyfuss u. Stuhl (1999), Ng u. Bird (1999), Eissenberg u. Elgin (2000) und Festenstein u. Kioussis (2000).

1.2.3.2 Funktionelle Gliederung der Chromosomen

Weitere Einsichten in die funktionelle Gliederung des Genoms haben verschiedene Verfahren der differenziellen Anfärbung der Chromosomen in Verbindung mit der Genkartierung erbracht. Das verbreitetste Verfahren hierfür ist die so genannte G-Banden-Technik, die auf einer speziellen Vorbehandlung der Chromosomen und anschließender Giemsa-Färbung beruht. An Chromosomen der Prophase können so mehr als 850 dunkle und helle G-Banden unterschieden werden (Abb. 1.2.6). Die hellen G-Banden werden auch als R-Banden (reversed bands) bezeichnet. Eine Untergruppe davon bilden die T-Banden, die sich bevorzugt an den Chromosomenenden befinden.

Mittels der C-Banden-Technik werden die zentromernahen Bereiche spezifisch angefärbt (Abb. 1.2.6), wobei die besonders großen C-Banden der

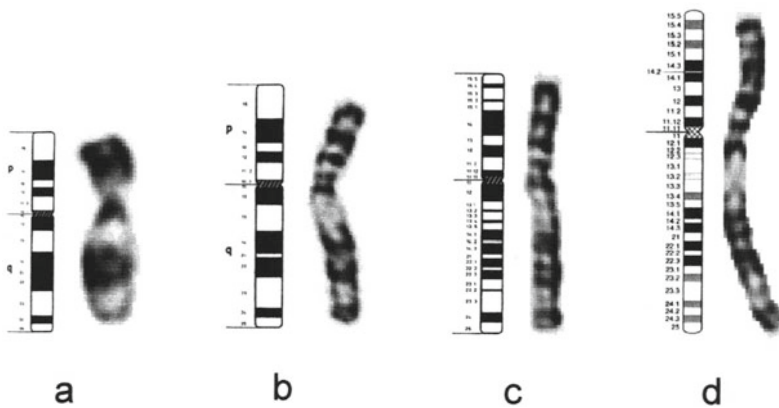


Abb. 1.2.6a-d. Darstellung des Bandenmusters des Chromosoms 11 mit unterschiedlicher Auflösung. (a) Etwa 200 Banden/haploidem Genom. Im mittleren Abschnitt des langen Arms von Chromosom 11 ist eine dunkle Bande erkennbar. Diese ist auf dem 400-Banden-Stadium (b) eindeutig in 2 Banden aufgeteilt. Eine gute Bänderungsqualität mit etwa

550 Banden ist in (c) gezeigt, wobei der kurze Arm 3 distinkte dunkle Banden aufweist. Auf dem 850-Banden-Stadium (d) kann die Bande 11p14.1 deutlich von 11p14.3 unterschieden werden. Die Schemazeichnungen b,c,d stammen aus ISCN, 1995, aus Sperling et al. (1997)

Chromosomen 1, 9, 16 und Y auffallen. Diese können zwischen verschiedenen Individuen erheblich variieren (chromosomale Heteromorphismen).

Mittels In-situ-Hybridisierung kann heute sogar das Bandenmuster der Chromosomen im Interphasekern nachgewiesen und gezeigt werden, dass deren Größe etwa einem 600-Banden-Stadium entspricht. Das heißt, die Gesamtlänge von Interphase- und Mitosechromosomen ist kaum verschieden, die Unterschiede betreffen die Ausbildung und die Anordnung der Chromatinfibrille (Lemke, pers. Mitteilung).

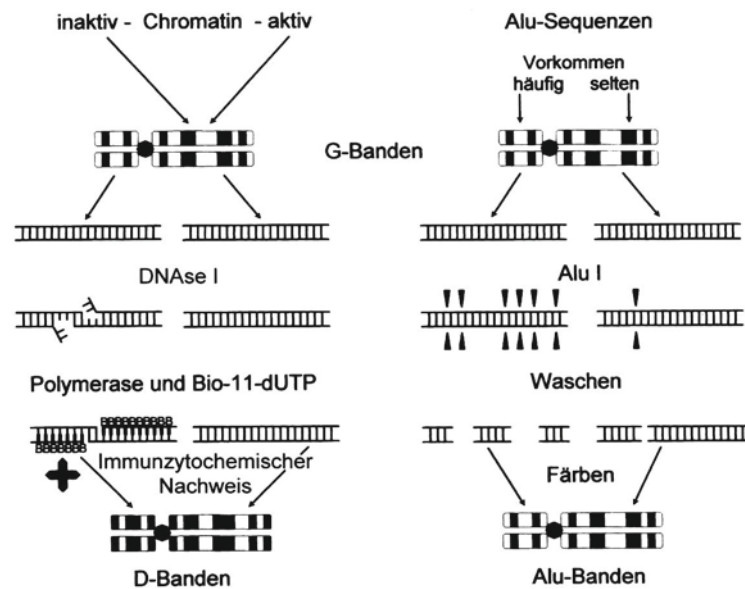
Nach Zugabe des Basenanalogons Bromdesoxyuridin (BrdU) während der DNA-Replikation können die neu synthetisierten Bereiche aufgrund ihrer geringen Anfärbung nachgewiesen werden. Hierbei zeigt sich, dass die R-Banden in der ersten Hälfte der S-Phase repliziert werden, die G-Banden in der 2. Hälfte und ganz zum Schluss die C-Banden sowie das genetisch inaktive X-Chromosom im weiblichen Geschlecht.

Bemerkenswert ist, dass die Zahl der Replikationsbanden praktisch der maximalen Anzahl von Banden entspricht, die nach differenzieller Färbung darstellbar sind. Wird von 1000 Banden/haploidem Genom, d.h. pro 3×10^9 bp ausgegangen, entspricht eine Bande bzw. eine Replikationseinheit im Durchschnitt etwa 3×10^6 bp oder 3 Mbp. Da die Initiationsstellen für die Replikation (replication origins) etwa 50 bis mehr als 100 kbp auseinander liegen, sollten in einer Replikationseinheit etwa 10–50 derartiger Replikons zusammengefasst sein [Übersicht Holmquist (1992), Craig u. Bickmore (1993)].

Erste Einsicht in die Natur der verschiedenen Banden haben enzymhistochemische Untersuchungen ergeben. Werden die Mitosechromosomen mit DNase I behandelt und die Schnittstellen in der DNA mittels der Nicktranslationstechnik immunzytochemisch nachgewiesen (Abb. 1.2.7), ergibt sich ein charakteristisches Bandenmuster, wobei die D-Banden (DNase-Banden) eine gute Übereinstimmung mit den R-Banden aufweisen. Da mittels DNase I bevorzugt genetisch aktive und potenziell aktive Bereiche geschnitten werden, ist dies ein indirekter Hinweis darauf, dass die R-Banden genreicher als die G-Banden sind [Übersicht bei Sperling (1990)].

Wird die DNA der Mitosechromosomen mit Restriktionsenzymen geschnitten und danach angefärbt, wird in Abhängigkeit von der Erkennungssequenz des Enzyms ein G- oder C-Bandenähnliches Muster erhalten (Abb. 1.2.7). Der Färbefekt wird darauf zurückgeführt, dass sich die DNA zwischen eng benachbarten Schnittstellen ablöst und die Chromosomen dort entsprechend schwächer angefärbt sind. Nach Restriktion mit der Endonuklease HaeIII (Erkennungssequenz GGCC) ergibt sich ein typisches G-Banden-Muster, wobei die großen C-Banden der Chromosomen 1, 9, 16 und Y ausgenommen sind, die sich daher von den kleineren C-Banden der Zentromerregion der anderen Chromosomen unterscheiden. Wie weiter unten gezeigt wird, dürften sie auch in ihrer molekularen Organisation verschieden sein. Ein G-Banden-Muster resultiert aber auch nach schonender Restriktion mit dem Restriktionsenzym

Abb. 1.2.7. Zytogenetischer Nachweis *DNAse-I*- und *Alu-I*-empfindlicher Chromosomenabschnitte. Im 1. Fall beruht die Empfindlichkeit auf einer offenen Chromatin-konformation. Nach Behandlung der Metaphasechromosomen mit *DNAse I* werden diese Bereiche (R-, T-Banden) bevorzugt geschnitten, was durch Einbau von biotinyliertem *dUTP* und nachfolgender immunzytochemischer Färbung nachgewiesen werden kann (*D-Banden*). Im 2. Fall beruht die Empfindlichkeit auf der Häufung von Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *Alu I* in den R-Banden. Nach Behandlung von Metaphasechromosomen mit *Alu I* kommt es in diesen Bereichen zu kleinen Fragmenten, die durch das nachfolgende Waschen entfernt werden, wodurch sich die Chromosomen an diesen Stellen heller färben (*Alu-Banden*)



Alu I. Dies bedeutet, dass die R-Banden besonders viele Alu-I-Schnittstellen aufweisen sollten, was in guter Übereinstimmung mit den dort befindlichen repetitiven Alu-Elementen steht (s. unten).

1.2.3.3 Kartierung von Genen und repetitiver DNA

Direkte Hinweise auf die genetische Ausstattung der einzelnen chromosomalen Banden lieferte die Kartierung von Genen und repetitiven DNA mittels In-situ-Hybridisierung. Die Befunde werden ausführlich „Monogen bedingte Erbkrankheiten 2“, Kapitel „Chromosomopathien“ (Ganten u. Ruckpaul 2000), abgehandelt und lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die Chromosomen 13, 18 und 21 sind die Autosomen mit der niedrigsten Anzahl von Genen. Es sind auch die einzigen Autosomen, für die eine Trisomie mit dem Leben vereinbar ist, alle anderen Trisomien enden als Spontanaborte bzw. bereits vor der Implantation.
2. Die T-Banden sind die genreichsten Regionen, gefolgt von den R-Banden. Speziell finden sich hier die so genannten „house-keeping genes“, die für den Grundmetabolismus der Zellen verantwortlich und in nahezu sämtlichen Zellen aktiv sind. Die G-Banden dagegen enthalten wesentlich weniger, entwicklungs- und gewebespezifisch exprimierte Gene. Die C-Banden sind praktisch genleer [Übersicht Holmquist (1992), Craig u. Bickmore (1993)].

3. Die chromosomalen Banden unterscheiden sich auch hinsichtlich der vorherrschenden repetitiven Elemente. So weisen die T- und R-Banden überwiegend kurze repetitive Elemente von etwa 300 bp Länge auf (SINES: short interspersed nucleotide elements), deren wichtigste Vertreter die Alu-Elemente sind (genannt nach einer charakteristischen Schnittstelle für das Restriktionsenzym Alu I). In den G-Banden finden sich überwiegend längere repetitive Elemente (LINES: long interspersed nucleotide elements), die weit über 1000 bp lang sein können [Übersicht bei Smit (1996)].
4. Das C-Banden-Material im Bereich der Zentromere besteht überwiegend aus sehr kurzen, millionenfach vorhandenen, repetitiven Elementen (so genannte Satelliten-DNA). Die großen C-Banden der Chromosomen 1, 9, 16 und Y sind jedoch deutlich komplexer aufgebaut. In Analogie zu Befunden an *Drosophila* und Erdmaus dürften sie dem β -Heterochromatin entsprechen, jene dem α -Heterochromatin (Neitzel et al. 1998).

Werden diese Befunde zur genetischen Zusammensetzung der verschiedenen chromosomalen Strukturen in Bezug gesetzt zu den Vorstellungen ihrer molekularen Organisation, ergibt sich folgendes Chromosomenmodell: Die Schleifen des Interphaschromatins, die durch SAR voneinander getrennt werden, stimmen hinsichtlich ihrer Länge gut mit einzelnen Replikons und DNase-I-sensitiven Bereichen überein. Vermutlich handelt es sich dabei um die gleichen funktionellen Grundeinheiten (funktionelle Domänen). Ein Cluster aus 10–50 dieser

NCBI
National Library of Medicine National Institutes of Health

PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

Search GenBank for

Go

What does NCBI do?

About NCBI Established in 1988 as a national resource for molecular biology information, NCBI creates public databases, conducts research in computational biology, develops software tools for analyzing genome data, and disseminates biomedical information - all for the better understanding of molecular processes affecting human health and disease.

GenBank

Molecular databases

Literature databases

Genomic biology

Tools

Research at NCBI

Hot Spots

- ▶ Cancer genome anatomy project
- ▶ Clusters of orthologous groups
- ▶ Coffee Break
- ▶ Electronic PCR
- ▶ Gene expression omnibus
- ▶ Genes and disease
- ▶ Human genome resources
- ▶ Human/mouse homology maps
- ▶ LocusLink
- ▶ Malaria genetics & genomics
- ▶ ORF finder
- ▶ Reference sequence project
- ▶ Retrovirus resources
- ▶ Serial analysis of gene expression
- ▶ Trace archive
- ▶ UniGene
- ▶ VecScreen

Draft Human Genome

BLAST remodeled [Archives](#)

BLAST The BLAST pages have been restructured, with many new features added. Select a service from the BLAST main page based on the type of query sequence, then limit the BLAST search to a subset of sequences, based on Entrez-style queries. More ...

NCBI in the News

The draft sequences of the human genome were compared in an article by Aach et al. (*Nature*, Feb. 15), noting overall similarities but differences in details. Use of RefSeq, NCBI's manually curated database of mRNA sequences, is credited with providing additional gene annotation for the public sequence.

[Disclaimer](#) [Privacy statement](#)

Revised March 14, 2001

Abb. 1.2.8. Website des NCBI (National Center for Biotechnology), die einen raschen Zugang zu den wichtigsten Datenbanken der Humangenomforschung eröffnet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Elemente dürfte einer chromosomalen Bande von 3 Mbp entsprechen.

Diese Bereiche weisen zudem eine recht übereinstimmende Basenzusammensetzung auf. Es handelt sich um so genannte Isochore, die sich im Dichtegradienten abtrennen lassen. Das Isochor mit dem höchsten GC-Gehalt ist bevorzugt in den T-Banden anzutreffen. Bei diesen Isochoren handelt es sich um ein Kennzeichen der Warmblüter und vermutlich eine evolutionäre Anpassung an die hohe Körpertemperatur, die eine entsprechende Stabilität der DNA erfordert (Bernardi 1989).

Die R- und T-Banden sind besonders reich, sie replizieren in der frühen S-Phase, haben eine offene Konformation, wie aus der DNase-I-Empfindlichkeit hervorgeht und dürften größere Schleifen ausbilden als die G-Banden. Diese weisen deutlich weniger Gene und dabei speziell die gewebespezifisch exprimierten Gene auf. Ihre Schleifen sind kleiner, der Kondensationsgrad in der Mitose größer. Aus klinischer Sicht ist bedeutsam, dass sich Veränderungen von R-Banden-Material gravierender auf die Entwicklung auswirken als von G-Banden-Material [s. Band „Monogen bedingte

Erbkrankheiten 2“, Kapitel „Chromosomopathien“ (Ganten u. Ruckpaul 2000)]. Die C-Banden bestehen nahezu ausschließlich aus repetitiver DNA. Dies erklärt, weshalb Unterschiede in ihrer Menge ohne offenkundige klinische Auswirkungen sind.

Neben diesen globalen Vergleichen erlaubt die vergleichende Genkartierung aber auch Einsichten, die die Regulation der Genaktivität betreffen. Aus der menschlichen Genkarte wird ersichtlich, dass Gene, die an der Ausbildung eines bestimmten Organs beteiligt sind oder aufeinander folgende Schritte bestimmter Stoffwechselprozesse steuern, generell auf unterschiedlichen Chromosomen bzw. chromosomalen Abschnitten gelegen sind, anders als bei Bakterien, bei denen sie in ein Operon eingeschlossen sind. Dies trifft auch auf solche Gene zu, die verschiedene Untereinheiten eines Proteins kodieren und daher in stöchiometrischen Verhältnissen vorliegen müssen. Ihre Regulation muss daher individuell erfolgen (Sperling 1999a).

Das tatsächliche Bild ist aber noch wesentlich komplexer. Aus der Genkarte wird ersichtlich, dass nah verwandte Gene oftmals als Cluster angeordnet sind, wie z.B. die Gene für die ϵ -, γ -, β - und δ -Globin-Ketten auf dem Chromosom 11 sowie die ζ - und α -Globin-Gene auf Chromosom 16. Dies weist auf ihre jeweilige Entstehung durch ungleiches Cross-over hin. Sie werden als Globingenfamilie zusammengefasst. Ein besonders instruktives Beispiel bilden die 38 Gene der Homöobox(HOX)-Genfamilie, die beim Menschen in 4 Gruppen auf den Chromosomen 2, 7, 12 und 17 angeordnet sind. Sie spielen in der Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle und werden entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert. Dabei spiegelt die Reihenfolge im Genom zugleich die Abfolge ihrer Aktivierung wieder (Wright 1991). Die Mitglieder der einzelnen Genfamilie lassen sich auf ein Gencluster zurückführen, das sich bereits bei der Taufliege *Drosophila* findet. Inzwischen gibt es eine Reihe weiterer Beispiele von Genen und Genfamilien, die bei Invertebraten nur einmal vorkommen, bei höheren Wirbeltieren dagegen in bis zu 4 Kopien vorliegen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es im Lauf der Vertebratevolution 2 Genomverdopplungen gegeben hat. In vielen Fällen sind die duplizierten Gene durch Mutation inaktiviert und in Pseudogene überführt worden, in anderen Fällen sind durch ungleiches Cross-over neue Gene hinzu gekommen (Sperling 1999a).

Die Genkarte stellt das entscheidende Ordnungsprinzip in der Genetik dar. Die Angabe, wo welche Gene, klonierte DNA-Fragmente oder be-

reits sequenzierte Abschnitte gelegen sind, war die Voraussetzung für die Erstellung der vollständigen Basensequenz des menschlichen Genoms. Der Genkartierung kommt daher im Rahmen des humanen Genomprojekts eine zentrale Rolle zu. Ebenso wichtig ist der rasche Zugriff auf diese Daten. Eine Übersicht der wichtigsten Datenbanken findet sich bei Borsani et al. (1998). Hier soll nur auf die Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hingewiesen werden, die viele Banken zusammenfasst und Verbindungen von der Chromosomenkarte bis hinunter zu der Sequenz des Gens und seiner Beschreibung herstellt (Abb. 1.2.8).

1.2.4 Zellzyklus und Chromosomenzyklus

Charakteristische Kennzeichen proliferierender Zellen sind

- das Zellwachstum und
- die Zellteilung.

Der gesamte Zellzyklus setzt sich danach aus der Interphase sowie der Kern- und der Zellteilung (Zytokinese) zusammen, bei der die Chromosomen sichtbar werden. Beide werden häufig als „Mitose“ zusammengefasst, obwohl der Begriff streng genommen nur für die Kernteilung gilt. Die Dauer der Mitose beträgt ca. 1 h. Die Interphase dagegen ist sehr viel länger und variiert in dieser Hinsicht auch erheblich zwischen verschiedenen Geweben. Sie wird in 3 Phasen unterteilt:

- die G₁-Phase (G vom engl. „gap“, Lücke), dem Zeitabschnitt vom Ende der Mitose bis zu Beginn der S-Phase,
- die S-Phase (S von Synthese), in der die Verdopplung des genetischen Materials stattfindet,
- die G₂-Phase, dem Abschnitt zwischen dem Ende der S-Phase und dem Beginn der Mitose.

Zur Kennzeichnung solcher Zellen, die sich nicht mehr teilen (z.B. die Nerven- oder Muskelzellen des Erwachsenen) oder nur nach einem bestimmten Stimulus (z.B. die Lymphozyten des peripheren Bluts) wurde der Begriff G₀-Phase eingeführt (Abb. 1.2.9).

Eine genaue Erforschung dieser Vorgänge wurde erst möglich, nachdem die Zellen in der Gewebekultur, in vitro, vermehrt werden konnten. Hierbei zeigte sich einmal, dass diploide Zellen nur eine begrenzte Zahl von Zellteilungen durchführen können, bis sie in das Stadium der Seneszenz ein-

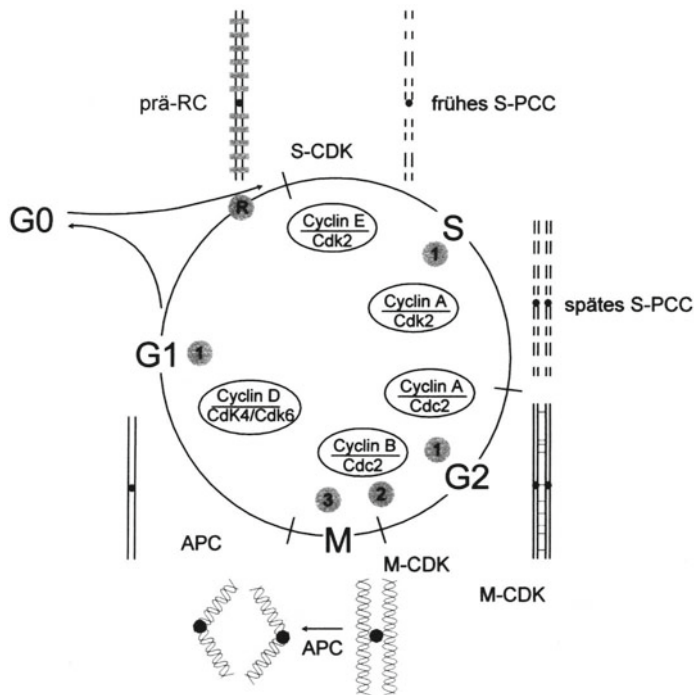


Abb. 1.2.9. Schematische Darstellung von Zellzyklus und Chromosomenzyklus. Der Ablauf des Zellzyklus wird entscheidend durch spezifische cyclinabhängige Proteinkinasen [innerer Bildteil, nach Shackelford et al. (1999)], die hier als S-CDK und M-CDK zusammengefasst wurden, und den APC (anaphase promoting complex) gesteuert. Zugleich erfahren die Chromosomen charakteristische Veränderungen. In der G₁-Phase bestehen sie aus einer Chromatide, an die sich der Prä-RC (pre replication complex) anlagert. Die R-Banden replizieren in der frühen S-Phase, was sich an vorzeitig kondensierten S-Phase-Chromosomen (S-PCC) als Färbelücke darstellt, in der späten S-Phase sind diese Bereiche doppelsträngig und die replizierenden G-Banden ungefärbt. Beim Übergang in die Mitose kommt es durch helikale Faltung zu einer weiteren Verkürzung der Chromosomen. Weitere Einzelheiten s. Text, 1 Checkpoints nach Schädigung der DNA, 2 Topoisomerase-II-abhängiger Checkpoint, 3 Spindel(Kinetochor)-Checkpoint, R Restriktionspunkt

treten (Hayflick u. Moorhead 1961). Eine Ausnahme bilden die Zellen von Tumoren. Zum anderen wurde deutlich, dass eine Vermehrung diploider Zellen nur dann möglich ist, wenn in der frühen G₁-Phase bestimmte Faktoren, Mitogene, zugegen sind. Hier greifen auch die Faktoren ein, die in vivo die Gewebedifferenzierung steuern, sowie anti-proliferative Zytokine, die den Eintritt der Zellen in die G₀-Phase veranlassen.

Der Ablauf des Zellzyklus kann in jeder Phase verlangsamt oder ganz blockiert werden, wenn eine Schädigung der DNA vorliegt bzw. die Chromosomen nicht exakt in der Äquatorialplatte der Metaphase angeordnet sind. Hierfür sind genetisch gesteuerte Kontrollprozesse verantwortlich, die die Integrität des Erbguts „checken“. 1988 wurde hierfür der etwas missverständliche Begriff der „Checkpoint-Kontrolle“ eingeführt. Tatsächlich handelt es sich um komplexe „pathways“, die die Arretierung des Zellzyklus bewirken, bis der Schaden behoben ist [Übersicht Nurse (1997), Shackelford et al. (1999)] und eng mit den molekularen Prozessen gekoppelt sind, die für die Regulation des Zellzyklus und der DNA-Reparatur verantwortlich sind.

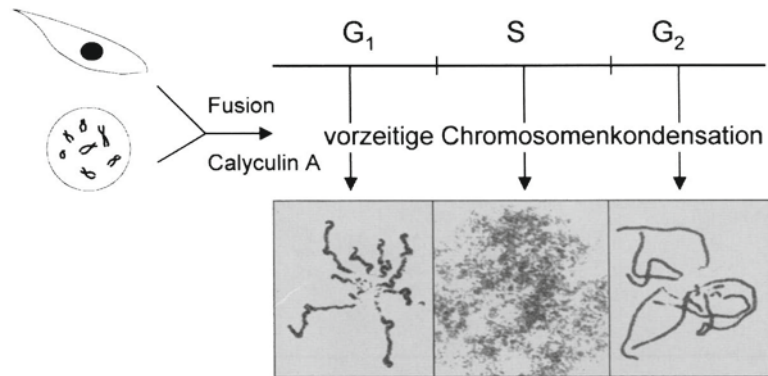
Inzwischen sind die zugrunde liegenden Mechanismen teilweise aufgeklärt und etliche der beteiligten Gene identifiziert worden. Hierbei zeigte sich, dass diese evolutionär hoch konserviert sind und dass sich nicht selten Homologien von der Hefe bis hin zum Menschen nachweisen lassen.

Einige der grundlegenden Prozesse konnten daher an Modellorganismen (Hefe, *Drosophila*, *Xenopus*) analysiert, andere aus zytogenetischen Beobachtungen erschlossen werden. Gestützt auf diese Befunde sollen im Folgenden die entscheidenden Mechanismen dargestellt und in Bezug zur molekularen Medizin gesetzt werden.

1.2.4.1 Regulation des Zellzyklus

Werden Mitosezellen mit solchen der G₁-, S- oder G₂-Phase fusioniert, kommt es in Letzteren sofort zum Eintritt eines mitoseähnlichen Prozesses unter Ausbildung vorzeitig kondensierter Chromosomen (PCC: premature chromosome condensation). Erwartungsgemäß bestehen die Chromosomen der G₁-Phase nur aus einer Chromatide, die der G₂-Phase aus 2 noch eng gepaarten Chromatiden. Die Chromosomen der S-Phase dagegen zeigen ein „pulverisiertes“ Aussehen (Abb. 1.2.10). Hierbei ist die Chromosomenkontinuität jedoch nicht aufgehoben, die ungefärbten Bereiche zwischen den einzelnen Fragmenten stellen vielmehr die Orte der DNA-Verdoppelung dar. So werden in der frühen S-Phase nur einzelsträngige, in der späten S-Phase dagegen nahezu ausschließlich doppelsträngige Fragmente gefunden (Abb. 1.2.10). Dies zeigt, dass bestimmte Bereiche der Chromosomen zu diskreten Zeiten der S-Phase repliziert werden.

Abb. 1.2.10. Darstellung vorzeitig kondensierter Chromosomen der G₁-, S- und G₂-Phase nach Fusion von Mitose- mit Interphasezellen bzw. Zugabe des Phosphataseinhibitors Calyculin A. Es handelt sich um die Chromosomen des indischen Muntjaks, der mit 2n = 6E/7W die niedrigste Chromosomenzahl bei Säugern aufweist. Deutlich erkennbar ist die polare Ausrichtung der Zentromere (Rabl-Orientierung). Weitere Einzelheiten s. Text



Die Zahl der so sichtbaren Replikationseinheiten entspricht der Anzahl Banden an differenziell gefärbten Chromosomen und spiegelt eine funktionelle Untergliederung des Genoms wider (s. S. 61).

Bei Messung der Länge der vorzeitig kondensierten Chromosomen sind eine Zunahme derselben von der frühen bis zur späten G₁-Phase und eine Abnahme im Lauf der G₂-Phase zu sehen, sodass in Analogie zum Zellzyklus hier auch von einem Chromosomenzyklus gesprochen werden kann [Übersicht Sperling u. Rao (1974), Sperling (1982)]. Zugleich zeigen diese Versuche, dass sich im Zytoplasma der Mitosezellen ein Faktor befindet, MPF (maturation promoting factor), dessen Vorhandensein bestimmt, wann eine Zelle in die Mitose eintritt, und durch den alle nachfolgenden Prozesse wie

- die Chromosomenkondensation,
- die Auflösung der Kernmembran und
- die Ausbildung des Spindelapparats

gesteuert werden [Übersicht bei Lewin (1990)].

Dieser Faktor ist nicht artspezifisch. Er ist auch für die Ausbildung der Chromosomen in der Meiose verantwortlich, und zwar im gesamten Tier- und Pflanzenreich. Werden z.B. schonend isolierte Pflanzenzellkerne in Froschoozyten injiziert, bei denen es gerade zur Auflösung der Kernmembran und Herausbildung der Chromosomen kommt (germinal vesicle breakdown), tritt bei den Pflanzenzellkernen ebenfalls eine vorzeitige Chromosomenkondensation ein (von der Haar et al. 1981).

In gleicher Weise konnte durch Zellfusion gezeigt werden, dass es nach Verschmelzung von S- mit G₁-Phase-Zellen in Letzteren zu einer vorzeitigen Initiation der DNA-Synthese kommt, nicht dagegen in G₂-Phase-Zellen [Übersicht bei Stillman (1996)]. Das bedeutet, dass auch die S-Phase durch

bestimmte Faktoren induziert wird, allerdings nur dann, wenn die Mitose abgelaufen und Trennung der Schwesterchromatiden erfolgt ist. Auf diese Weise wird verhindert, dass ein DNA-Abschnitt gleich mehrfach nacheinander verdoppelt wird. Zytogenetischer Ausdruck eines Fehlers in diesem Kontrollsystem ist das Auftreten von Endoreduplikationen (Abb. 1.2.11b). Bei der temperatursensitiven Hamsterzelllinie ts-41 kommt es als Folge einer rezessiven Mutation dazu, dass die Zellen nach der S-Phase sofort erneut die DNA replizieren (Handeli u. Weintraub 1992). Ein solches Phänomen tritt nicht selten in Tumorzellen auf und trägt zur großen Variabilität in der DNA-Menge bei. Zweifellos sind verschiedene Gene in dieses Kontrollsystem einbezogen (Stewart et al. 1999).

Heute sind die Faktoren identifiziert, die den Eintritt in die Mitose und die S-Phase steuern. Es handelt sich um spezifische, cyclinabhängige Proteinkinasen, CDK (cyclin-dependent protein kinase). Die katalytischen Untereinheiten dieser Kinasen sind nur dann aktiv, wenn sie mit einer regulatorischen Untereinheit, bestimmten Cyclinen, zusammentreten. Die Mitose wird durch die M-CDK (synonym MPF) gesteuert, die sich aus der Proteinkinase Cdc2 (cdc: cell division control entspricht CDK1) und Cyclin A oder B zusammensetzt, die S-Phase durch die S-CDK (Abb. 1.2.9). Die Aktivität der Proteinkinasen variiert mit dem Zellzyklus, was entscheidend von der Verfügbarkeit der jeweiligen Cycline abhängt, die, wie der Name bereits verrät, zyklisch synthetisiert und nach Ubiquitinierung durch das Proteasom degradiert werden [Übersicht Solomon et al. (1990), Ohi u. Gould (1999), Tyers u. Jorgensen (2000), Pines u. Rieder (2001)].

Bei der Hefe erfolgen die Chromosomenkondensation und der Eintritt in die Mitose durch Aktivierung des Komplexes Cycin-B-CDK1. Im Gegen-

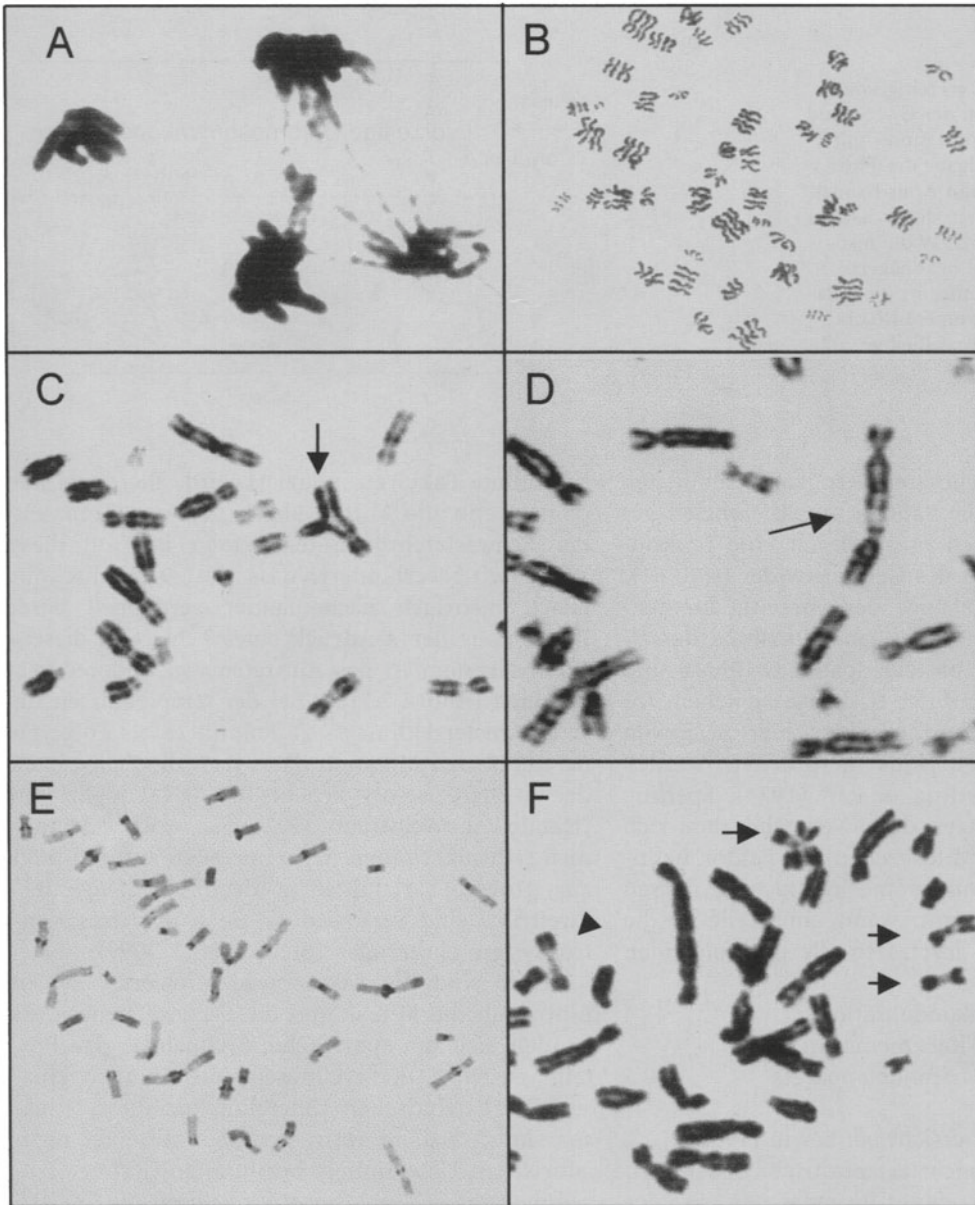


Abb. 1.2.11A-F. Aberrante Metaphasen und Anaphasen, A Multipolare Mitose, B Endoreduplikation, C Chromatidtranslokation zwischen heterologen Chromosomen (*Pfeil*), D Telomerfusion von Chromosomen (*Pfeil*), E „Abstoßung“

heterochromatischer Chromosomensegmente beim Roberts-Syndrom nach C-Banden-Färbung, F ICF-Syndrom. *Pfeile* Chromosomen mit decondensiertem Heterochromatin

satz dazu sind die Vorgänge bei Vertebraten deutlich komplexer. Die G₂-Phase des Zellzyklus ist durch die zunehmende Aktivierung des Komplexes Cyclin-A-CDK2 charakterisiert, der seine größte Aktivität in der späten Prophase erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist noch keine signifikante Aktivierung des MPF-Cyclin-B1-CDK1-Komplexes nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, dass die Chromosomenkondensation in HeLa-Zellen durch Mi-

kroinjektion von Cyclin-A-CDK2 induziert werden kann und dass Inhibitoren von Cyclin-A-CDK2 die Chromosomenkondensation in der frühen Prophase verhindern (Furuno et al. 1999). In Säugerzellen scheinen somit die Vorgänge, die die Zellen in der G₂-Phase für die Mitose vorbereiten und die die Chromosomenkondensation initiieren, nicht durch die Aktivierung von Cyclin-B1-CDK1 bedingt, sondern durch Cyclin-A-CDK2. Während der G₂-Pha-

se ist Cyclin-B1-CDK1 im Zytoplasma lokalisiert und wird durch Phosphorylierung an den Aminosäuren Thr14 und Tyr15 in der inaktiven Form gehalten (Takizawa u. O Morgan, 2000). Die Aktivierung von Cyclin-B1-CDK1 erfolgt durch die Dephosphorylierung an Thr14 und Tyr15 durch die Phosphatase Cdc25 und die Phosphorylierung von Thr161 durch die CDK aktivierende Kinase CAK. In der späten Prophase wird der aktivierte Cyclin-B1-CDK1-Komplex in den Kern transloziert und die Zelle überschreitet den so genannten „point of no return“, der dem Zeitpunkt entspricht, nach dem eine Inaktivierung von Cyclin-B1-CDK1 und damit eine Rückkehr in die G₂-Phase des Zellzyklus, z.B. nach einer Schädigung durch ionisierende Strahlen, nicht mehr möglich ist. Da CDK1 auch in der Lage ist, Cdc25 durch Phosphorylierung zu aktivieren, kommt es zu einem positiven Rückkopplungsprozess der Aktivierung (Rieder u. Cole 1998, Hagting et al. 1999). Die tatsächlichen Gegebenheiten sind allerdings noch wesentlich komplexer, da 2 weitere Phosphatasen, PP-1 und PP-2A, ebenfalls an der Aktivierung von Cdc25 bzw. der Inaktivierung von Cdc2 beteiligt sind (Pallen et al. 1992). Diese Phosphatasen werden spezifisch durch Calyculin A inhibiert, ein Toxin des Meeresschwamms *Discoderma calyx*. Wird diese Substanz zu menschlichen Zellen gegeben, kommt es bei diesen zu einer vorzeitigen Chromosomenkondensation, bevorzugt der G₂-Phase-Chromosomen. Von besonderer praktischer Bedeutung ist dies für die Analyse chromosomaler Schäden nach Mutagenbehandlung, bei der es infolge der Aktivierung des „DNA damage checkpoints“ zu einer Arretierung im Zellzyklus gekommen ist (Abb. 1.2.10). Innerhalb 1 h nach Zugabe von Calyculin A können die geschädigten G₁- oder G₂-Phase-Chromosomen analysiert werden (Gotoh et al. 1995).

Durch Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Cdc2 kann es bei der Hefe zu einem vorzeitigen Eintritt in die Mitose kommen. Ganz entsprechend lässt sich bei Säugerzellen in vitro durch Austausch von Tyr15 gegen eine nicht phosphorylierbare Aminosäure in Cdc2 ebenfalls eine vorzeitige Chromosomenkondensation auslösen (Krek u. Nig 1991). Ebenso kann es als Folge einer Genmutation zu einer vorzeitigen Chromosomenkondensation kommen, wie 1978 an einer temperatursensitiven Hamsterzellmutante, tsBN2, gezeigt wurde. Hierbei ist das RCC1-Gen (regulation of chromosome condensation) defekt (Kai et al. 1986). Es kodiert den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für das Ran-Protein (Renault et al.

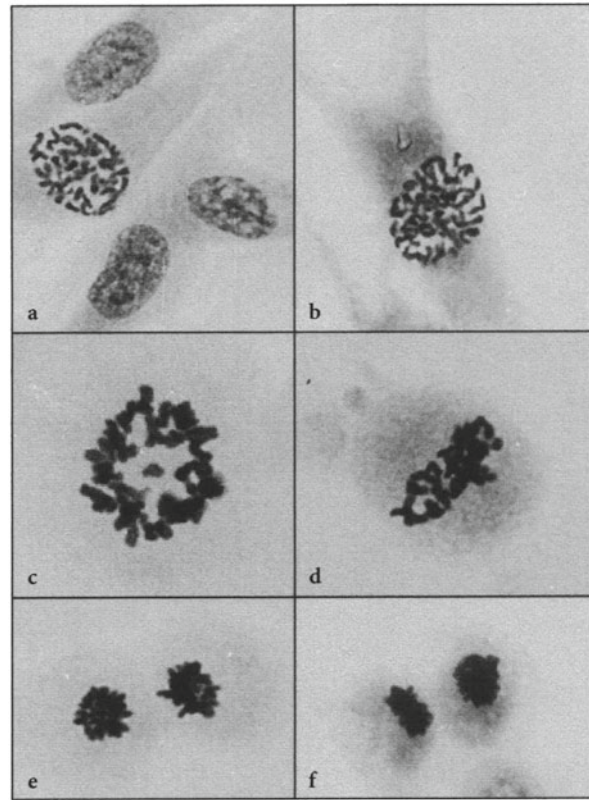


Abb. 1.2.12 a-f. Fibroblastenkultur von einem Patienten, bei dem die G₂-Phase des Zellzyklus stark verkürzt ist, und die G₂-Phase-Chromosomen in die Mitose eintreten. Bemerkenswert ist der hohe Anteil spontaner Mitosen, der normalerweise bei 1% liegt (a,b). Der Ablauf der Mitose erfolgt jedoch ungestört, wie die Bilder von Meta-, Ana- und Telo-phase belegen (c-f)

1998) und greift in bislang unbekannter Weise in die Regulation der M-CDK ein, die dadurch vorzeitig aktiviert wird.

Inzwischen wurde erstmalig auch eine genetisch bedingte Erkrankung beim Menschen gefunden, bei der die Patienten in allen daraufhin untersuchten Geweben eine stark verkürzte G₂-Phase in Verbindung mit einem vorzeitigen Eintritt in die Mitose aufweisen (Abb. 1.2.12). Die Mutation betrifft jedoch nicht das RCC1-Gen, sondern vermutlich ein anderes Protein, das in die Regulation der M-CDK einbezogen ist. Die betroffenen Kinder weisen einen ausgeprägten Minderwuchs in Verbindung mit geistiger Retardierung und Mikrozephalie auf. Durch Kopplungsanalysen konnten das RCC1-Gen, die verschiedenen Cycline und Kinasen ausgeschlossen werden, sodass es sich um ein bislang unbekanntes Gen der Mitoseinitiation handeln dürfte (Neitzel et al. 2002).

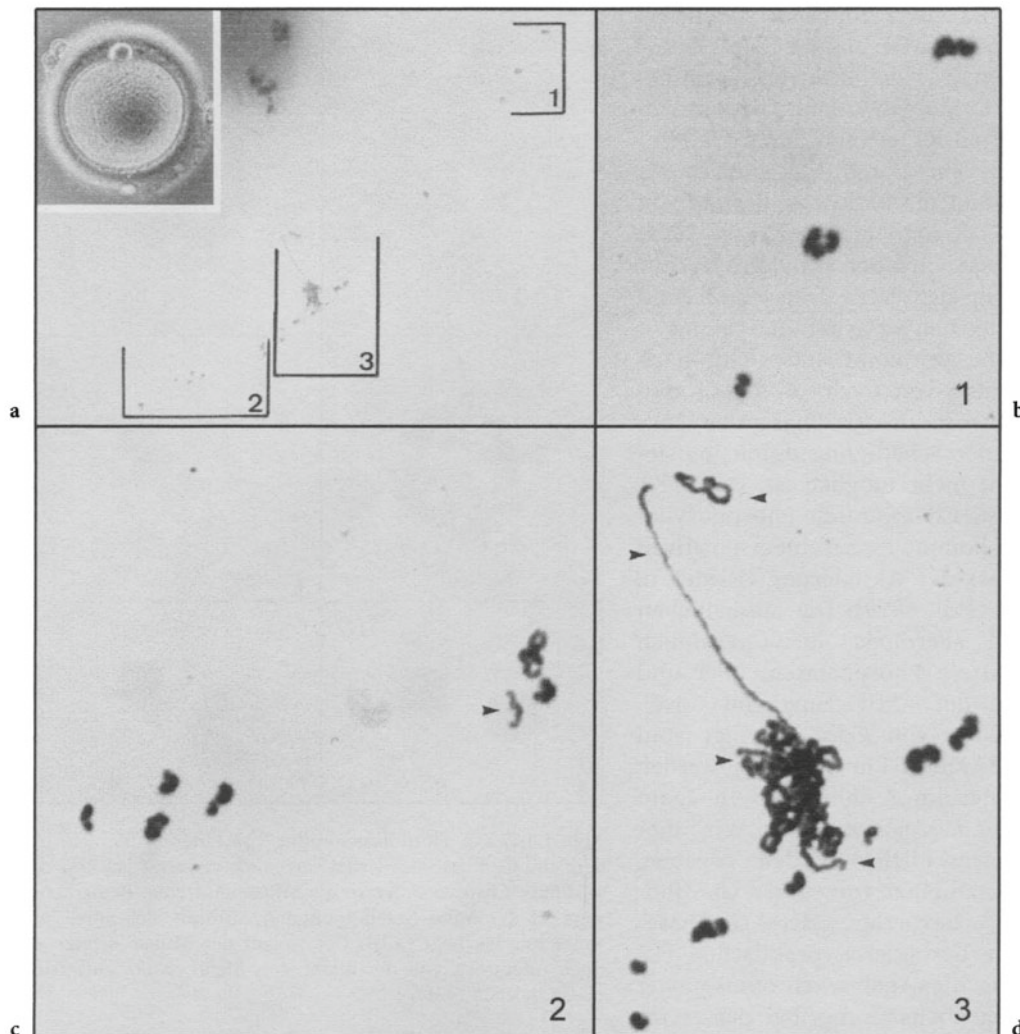


Abb. 1.2.13 a–d. Vorzeitig kondensierte Spermienchromosomen nach In-vitro-Fertilisation einer Eizelle mit Arretierung in der Metaphase II. a Übersicht, c,d Pfeile vorzeitig kon-

densierte Spermienchromosomen. Bei den anderen Chromosomen handelt es sich um die Metaphase-II-Chromosomen der Oozyte, aus Schmiady et al. (1986)

Nach Eintritt in die Mitose ordnen sich die Chromosomen in der Äquatorialplatte der Metaphase an. Erst nachdem alle Chromosomen so ausgerichtet sind, setzt wie auf ein Signal die Trennung in der Zentromerregion ein. Hierfür ist der „anaphase-promoting complex“ (APC oder Cyclosom) verantwortlich, der u. a. diejenigen Proteine abbaut, die die Schwesterzentromere verbinden (Abb. 1.2.9). Seine Aktivierung ist daher Voraussetzung für den Eintritt in die Anaphase. Darüber hinaus trägt der APC-Komplex zum Abbau des Spindelapparats und der M-CDK bei. Zugleich wird dadurch der Block beseitigt, der die Anlagerung des Präreplikationskomplexes an die Chromatiden als Voraussetzung für die nachfolgende DNA-Synthese verhindert. Dank dieser dualen

Funktion sorgt der APC dafür, dass eine erneute DNA-Synthese erst nach der Anaphase erfolgt und die Mitose nur in einer Richtung ablaufen kann [Übersicht bei Allshire (1997), Wolf u. Jackson (1998)].

Wie bereits angeführt wurde, ist die M-CDK auch für die Chromosomenkondensation in der Meiose verantwortlich. Der wesentliche Unterschied zur Mitose liegt in der unterschiedlichen Regulation ihrer Aktivität. In den Oozyten gibt es hierfür eine spezifische Proteinkinase, *c-mos*, die auch dafür verantwortlich zu sein scheint, dass es zwischen der ersten und zweiten Reifeteilung, MI und MII, zu keiner DNA-Verdopplung kommt (Heikinheimo u. Gibbons 1998). Ferner bildet das Protein MOS zusammen mit einer Kinase, MAPK

(mitogen-activated protein kinase), den so genannten zytostatischen Faktor, CSF, der die Arretierung der Chromosomen in der MII bedingt (Sagata 1998). In diesem Stadium werden die Oozyten ovuliert, und erst nach dem Eindringen des Spermiums wird dieser Block aufgehoben. Geschieht dies jedoch nicht, kommt es zu einer vorzeitigen Chromosomenkondensation des Spermiumkerns, der hierbei G_1 -Phase-Chromosomen ausbildet (Abb. 1.2.13). Es handelt sich um ein Phänomen, das nicht selten im Rahmen der In-vitro-Fertilisation an entwicklungsunfähigen Oozyten beobachtet wird (Schmiady et al. 1986).

An dieser Stelle soll auf einen wichtigen Unterschied zwischen Mitose und Meiose hingewiesen werden. In der Anaphase der ersten Reifeteilung bleiben die Schwesterchromatiden miteinander verbunden, da ja die homologen Chromosomen voneinander getrennt werden. Der Zusammenhalt der Zentromere in diesem Stadium muss daher verschieden von dem der Mitose und der MII sein. Bei der Taufliege *Drosophila* wurde ein Protein gefunden, Mei S322 (Biggins u. Murray 1998), das hierbei eine Rolle spielen dürfte, da es bis zur Anaphase I an das Zentromer bindet und danach dissoziiert. Ganz entsprechend verhält sich das Rec8-Protein der Hefe. Eine Deletion dieses Gens führt dazu, dass sich bereits in der MI die Schwesterchromatiden voneinander trennen (Watanabe u. Nurse 1999). Homologe beider Gene finden sich auch beim Menschen.

Theoretisch wäre zu erwarten, dass ein genetischer Defekt beim Menschen, der diesen spezifischen Vorgang betrifft, nur zu einer Arretierung der Chromosomen in der MI führt und keine weiteren klinischen Auswirkungen zeigt. Tatsächlich wurde ein derartiger Fall im Rahmen der In-vitro-Fertilisation bei 2 Schwestern aus einer Verwandtenehe gefunden. Sämtliche Oozyten wiesen kein Polkörperchen auf, wohl aber 23 Bivalente in der MI. Nach der In-vitro-Fertilisation kam es zu einer Ausbildung vorzeitig kondensierter Spermienchromosomen und einem Entwicklungsstopp.

Interessanterweise gibt es einen Mäusestamm, LT/Sv, bei dem es in einem hohen Prozentsatz der Oozyten ebenfalls zu einer Arretierung in der Metaphase I kommt. Damit geht ein Anstieg der Cdc2-Kinase-Aktivität einher. Durch Zugabe von 6-DMAP, einem Inhibitor der Proteinphosphorylierung, konnten die Cdc2-Kinase-Aktivität gesenkt und die Arretierung aufgehoben werden (Hampl u. Eppig 1995). Der gleiche Effekt stellte sich auch nach der Injektion von Mos-antisense-Oligonukleotiden ein (Hirao u. Eppig 1997). Es spricht

daher einiges dafür, dass in diesem Fall MOS auch bei der MI-Arretierung eine Rolle spielt.¹

Das „Gegenstück“ zum Kinetochor bildet das Zentrosom (synonym Zentriol), ein Organell, das an der Ausbildung des Spindelapparats beteiligt ist. Es teilt sich kurz vor dem Eintritt in die Mitose und wandert zu gegenüber liegenden Zellpolen. Hierdurch wird die Achse bei der Zellteilung festgelegt. In Tumorzellen finden sich nicht selten multipolare Mitosen statt (Abb. 1.2.11a), die auf dem Vorhandensein mehrerer Zentrosome in den Zellen basieren. Auch wenn die Biologie der Zentrosome noch wenig verstanden ist, gibt es inzwischen erste Hinweise, dass die Überexpression einer Kinase, STK15, die mit dem Zentrosom assoziiert ist, auch mit der Vermehrung der Zentrosome in den Krebszellen korreliert ist und auf diese Weise entscheidend zur großen Variabilität der Chromosomenzahl und -zusammensetzung von Tumorzellen beitragen dürfte [Übersicht Doxsey 1998].

1.2.4.2 Checkpoint-Kontrolle

Für den geregelten Ablauf des Zellzyklus ist entscheidend, dass die Mitose erst beginnt, wenn die DNA vollständig repliziert ist, und dass die Anaphase nicht eintritt, bevor sämtliche Chromosomen korrekt in der Äquatorialplatte angeordnet sind. Hierfür sind die bereits erwähnten Kontrollmechanismen verantwortlich, die eng mit den Regulatoren des Zellzyklus kooperieren.

Von besonderer Bedeutung ist der „DNA damage checkpoint“ (Abb. 1.2.9), da die DNA das einzige Molekül der Zelle ist, das im Fall einer Schädigung nicht ersetzt, sondern repariert wird. Nach einer Schädigung der DNA kommt es zu einer Verlangsamung oder Arretierung des Zellzyklus in der G_1 -, S- oder G_2 -Phase, bis der Schaden behoben ist. Allerdings gibt es in der späten G_2 -Phase einen bestimmten Zeitpunkt (point of no return), von dem an auch hohe Strahlendosen oder andere exogene Noxen den Eintritt in die Mitose nicht mehr aufhalten können. Bei einer Reihe höherer

¹ In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass eine MII-Arretierung bei nahezu sämtlichen Vertebraten zu finden ist, jedoch bei Insekten, verschiedenen Mollusken und der Seescheide normalerweise eine Arretierung in MI vorliegt (Sagata 1998). In letzterem Fall konnte gezeigt werden, dass der MAPK für die Arretierung in MI verantwortlich ist und Veränderungen im intrazellulären Kalziumspiegel mit dem Eintritt in die MII einhergehen (Russo et al. 1998).

Tiere liegt dieser Punkt erst in der mittleren Prophase (Pines u. Rider 2001).

Im Fall einer besonders schweren Schädigung kann es statt zur reversiblen Arretierung der Zellen und DNA-Reparatur zur Einleitung der Apoptose und damit zur Elimination der betroffenen Zellen kommen [Übersicht bei Weinert (1998 a, b)]. Eine zentrale Rolle bei diesen Prozessen kommt dem TP53-Gen zu. Es kodiert den Transkriptionsfaktor p53, der als Folge einer DNA-Schädigung aktiviert wird und seinerseits die Expression des p21-Gens induziert, das diejenigen CDK inhibiert, die den Eintritt in die S-Phase kontrollieren. Zellen der G₁-Phase bleiben daher in diesem Stadium arretiert, bis der Schaden behoben ist. Alternativ kann p53 auch den Eintritt in die Apoptose einleiten, also den genetisch gesteuerten Zelltod [Übersicht Rudin u. Thompson (1998)]. Es nimmt in praktisch sämtlichen Zellen diese wichtige Kontrollfunktion wahr. Fällt das Gen infolge somatischer Mutationen aus, bedeutet dies in vielen Fällen einen entscheidenden Schritt in der Tumorentstehung, liegt dagegen bereits eine Keimbahnmutation vor, führt dies zum Li-Fraumeni-Syndrom. Die Betroffenen haben ein sehr hohes Risiko, bereits in jungen Jahren Tumoren ganz unterschiedlicher Art und nicht selten sogar mehrere Primärtumoren gleichzeitig zu entwickeln.

Verschiedene Gene sind in die Erkennung von DNA-Schäden einbezogen und damit in die Aktivierung von p53. Im Fall von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) zählen das ATM- und das NBS-Gen dazu. Eine Mutation in diesen Genen führt zu den autosomal-rezessiven Krankheiten Ataxia teleangiectatica bzw. dem Nijmegen-breakage-Syndrom. Die betreffenden Patienten sind durch ein hohes Tumorrisiko gekennzeichnet. Ihre Zellen weisen eine erhöhte Chromosomeninstabilität und eine extreme Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen auf, durch die bevorzugt DSB ausgelöst werden. Zugleich kommt es zu einer verzögerten und verringerten Aktivierung von p53. Auch diese Erkrankungen sind ein Beispiel dafür, wie eine zytogenetische Auffälligkeit, die erhöhte spontane und strahleninduzierte Chromosomenbrüchigkeit, den Weg zur Isolation des zugrunde liegenden Gens eröffnet hat (Digweed et al. 1999, Sperling et al. 1998).

Am „DNA damage checkpoint“ sind eine Vielzahl von Genen beteiligt:

- Gene, die der Schadenserkenkung (Sensoren) dienen,
- Gene, die die Weiterleitung des jeweiligen Signals (signal transducer) veranlassen, sowie

- Gene für die Strukturen (target), die die Signale erhalten und die Arretierung des Zellzyklus bewirken [Übersicht Weinert (1998 a, b)].

Hierbei besteht eine enge Kopplung mit den Prozessen, die für die Regulation des Zellzyklus und die DNA-Reparatur verantwortlich sind.

Daneben existiert ein weiteres Kontrollsystem, das in der G₂-Phase das Ausmaß der Verkettung zwischen den DNA-Helices der Schwesterchromatiden misst (Abb. 1.2.9). Es ist abhängig von der Topoisomerase II. Wird diese blockiert, kommt es zu einer Arretierung der Zellen in der G₂-Phase. Wird der Block künstlich durch Koffeinzugabe aufgehoben, treten die Chromosomen mit noch zusammenhängenden Schwesterchromatiden in die Anaphase ein und bilden bizarre Teilungsstrukturen aus (Downes et al. 1994).

Die Checkpoint-Kontrolle betrifft aber nicht nur DNA-Veränderungen, sondern auch die vollständige Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialplatte der Metaphase als Voraussetzung für ihre korrekte Aufteilung (Abb. 1.2.9). Vereinfacht ausgedrückt wirken hierbei 2 Kräfte gegeneinander:

- die Trennkräfte durch die Mikrotubuli des Spindelapparats und
- die dagegen gerichteten Kohäsionskräfte der Schwesterchromatiden und -zentromere.

Für den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden sind 2 Mechanismen verantwortlich:

1. Bei der DNA-Verdopplung kommt es regelmäßig zur Verkettung der neu synthetisierten DNA-Helices der Schwesterchromatiden, deren Trennung durch die Topoisomerase II erfolgt (s. S. 60).
2. Es gibt bestimmte Proteine, die gleichsam wie Klebstoff die Schwesterchromatiden zusammenhalten. Sie werden von bestimmten SMC-Genen (stable maintenance of chromosomes) gebildet [Übersicht bei Gottschling u. Berg (1998), Jessberger et al. (1998), Murray (1999)].

Dieser Zusammenhalt erklärt auch, warum z. B. nach der Induktion von Chromatidbrüchen die Bruchstücke noch in der Metaphase mit der Schwesterchromatide assoziiert sind bzw. sich im Fall von Translokationen charakteristische Quadri- radiale ausbilden, die auf dem Zusammenhalt der Schwesterchromatiden basieren (Abb. 1.2.11 c).

Der Zusammenhalt der Schwesterchromatiden und -zentromere in der Metaphase ist Voraussetzung für die bipolare Ausrichtung der Zentromere, genauer der Kinetochoren, zu gegenüber liegenden Spindelpolen und damit für die korrekte Auftei-

lung in der Anaphase. Bei den Kinetochoren handelt es sich um Proteinstrukturen, die sich an die DNA der Zentromere anlagern und u.a. der Verankerung der Spindelfasern dienen. Erst wenn sämtliche 46 Chromosomen in der Äquatorialplatte angeordnet sind, kommt es zur Aktivierung des APC, und die Anaphase setzt ein. Ein einzelnes, fehlorientiertes Chromosom führt zur Blockierung in der Metaphase [Übersicht Rieder u. Salmon (1998), Dobie et al. (1999), Zachariae (1999)]. Dies gilt auch für die Metaphase I der Spermatogenese beim Menschen, jedoch nicht für die Oogenese (Hunt et al. 1995) und dürfte zur hohen Rate an Non-disjunction im weiblichen Geschlecht beitragen (s. S. 71):

Bei der Hefe, *Saccharomyces cerevisiae*, sind bereits 7 Gene bekannt, die in diesen „Spindel-Checkpoint“ oder besser „kinetochor attachement checkpoint“ einbezogen sind [MAD1-3 und BUB1-3, MPS1, Übersicht bei Hardwick (1998), Amon (1999), Burk (2000)]. Im Fall einer Mutation in diesen Genen treten die Zellen auch dann in die Anaphase ein, wenn der Spindelapparat nicht ausgebildet ist. Entsprechend hoch ist die Chromosomenfehlverteilung. Ein derartiges Phänomen zeigen auch bestimmte menschliche Tumorzellen in Kultur, die sich zugleich durch die Variabilität ihrer Chromosomenzahl auszeichnen. Eine verringerte Aktivität des menschlichen MAD2-Gens (Li u. Benezra 1996, Takahashi et al. 1999) bzw. eine Mutation im BUB1-Gen (Cahill et al. 1998) wurden in diesen Fällen als Erklärung für den Checkpoint-Defekt angegeben.

Bemerkenswerterweise gibt es auch eine Reihe familiärer Fälle, bei denen der Verdacht auf einen Mitosedefekt besteht. Anlass für die zytogenetische Untersuchung der Patienten sind in der Regel das Auftreten wiederholter Aborte oder der Verdacht auf Infertilität. Dabei zeigte sich, dass ein erheblicher Prozentsatz der Mitosen vorzeitig getrennte Schwesterchromatiden aufweist und dass dieses Merkmal dominant erblich ist (Rudd et al. 1983). In 2 Fällen zeigten beide Eltern dieses Merkmal, und jeweils 1 ihrer Kinder war offensichtlich homozygot hierfür. Diese homozygoten Kinder wiesen u.a. eine schwere Wachstumsretardierung auf und verstarben mit 2 Jahren. In den meisten Metaphasen fand sich eine vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden, zusätzlich aber noch ein hohes Ausmaß an Aneuploidien, die ganz verschiedene Chromosomen betrafen und als Mosaik vorlagen (Kajii et al. 1998). Nach Colcemidzugabe kommt es nicht zur Arretierung in der Mitose, das heißt, der Defekt betrifft den Spindel-Checkpoint

(Matsuura et al. 2000). Daneben gibt es Fälle, in denen nur einzelne, aber bestimmte Chromosomen eine vorzeitige oder auch verzögerte Trennung der Zentromere zeigen (Mehes 1978). Im Fall des X-Chromosoms nimmt diese Eigenschaft mit dem Alter deutlich zu und könnte für das häufigere Auftreten von 45,XO-Zellen bei älteren Frauen verantwortlich sein (Fitzgerald et al. 1986).

Ein erhöhtes Risiko für meiotische und mitotische Non-disjunction wurde kürzlich für eine arabische Familie beschrieben. 3 von 10 Kindern wiesen eine Trisomie 21 auf, wobei das zusätzliche Chromosom von der Mutter stammte. Überraschenderweise zeigte sich, dass auch in ihren Lymphozyten das Chromosom 21 – nicht jedoch das Chromosom 22 – eine stark erhöhte Rate von Fehlverteilungen aufwies. Die molekulare Grundlage hierfür ist noch unverstanden (Ramel, pers. Mitteilung).

Von diesen Formen zu trennen ist eine rezessive Erkrankung, das Roberts-Syndrom [Übersicht Van Den Berg u. Francke (1993)], bei dem es zu einer frühzeitigen Trennung der Zentromere kommt, die aber auf einem fehlenden Zusammenhalt des zentromerischen Heterochromatins beruht (Abb. 1.2.11e). Die Kinder weisen u.a. schwere Skelettfehlbildungen auf. Manches spricht dafür, dass das Roberts-Syndrom, wie auch die oben genannten Erkrankungen, genetisch heterogen ist. Erst nach Identifizierung der jeweiligen Gene wird herausgefunden werden können, in welche „pathways“ sie eingreifen.

1999 gelang es, das Gen zu identifizieren, das dem autosomal-rezessiven ICF-Syndrom (immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies) zugrunde liegt (Okano et al. 1999, Xu et al. 1999). Zytogenetisch sind die Patienten durch eine „Instabilität“ des Heterochromatins der Chromosomen 1, 9 und 16 gekennzeichnet (Abb. 1.2.11f). Diese beruht auf einer Hypomethylierung dieser Chromatinfraction infolge eines Defekts der DNA-Methyltransferase, DNMT3B. Damit einher geht auch eine Hypomethylierung des inaktiven X-Chromosoms im weiblichen Geschlecht, das zugleich DNase I empfindlich ist, früher repliziert (s. S. 62) und vermutlich nicht mehr der vollständigen Inaktivierung unterliegt (Hansen et al. 2000). Auch hier hat der zytogenetische Befund entscheidend zur Aufklärung dieses komplexen Krankheitsbilds beigetragen.

1.2.4.3 Regulation der Zellproliferation

Eine der grundlegenden Methoden der Zytogenetik und auch der molekularen Medizin stellt die Kultivierung von Zellen *in vitro* dar, z.B. von Fibroblasten, die aus einer Hautbiopsie stammen. Hierbei zeigte sich, dass eine Voraussetzung für deren Proliferation extrazelluläre Faktoren sind, die Mitogene oder Wachstumsfaktoren, die in der frühen G₁-Phase zugegen sein müssen, um bestimmte CDK zu aktivieren, damit der Zellzyklus durchlaufen werden kann. Der Restriktionspunkt (R) gibt an, ab wann der Zellzyklus auch ohne diesen Stimulus weiterläuft (Abb. 1.2.9).

Eine zentrale Rolle kommt hierbei dem Retinoblastomprotein, pRb, zu. In G₀-Zellen ist es hypophosphoryliert und bindet bestimmte Transkriptionsfaktoren, z.B. E2F, die dadurch inaktiviert werden. Der R-Punkt ist dann überwunden, wenn die CDK das pRb phosphorylieren, wodurch der Transkriptionsfaktor freigesetzt wird. Dieser aktiviert verschiedene Gene, die die Zellproliferation regulieren, u.a. auch ein bestimmtes Cyclin [Übersicht Assoian u. Zhu (1997)]. Auch hier liegt ein komplexes Netzwerk der Genwirkung vor (Zhang 1999), auf das hier nicht näher eingegangen werden kann.

Die Zellvermehrung *in vitro* hört dann auf, wenn die Fibroblasten den Boden des Kulturgefäßes als einschichtige Lage bedecken (Kontaktinhibition). Durch Vereinzeln der Zellen und Aufteilen auf 2 neue Kulturgefäße (Passagieren) kann diese Inhibition aufgehoben werden. Die Zahl der Passagen ist jedoch begrenzt, sodass die Zellen nach einer logarithmischen Vermehrungsphase relativ abrupt in das Stadium der Seneszenz eintreten (Hayflick u. Moorhead 1961). Die Zahl der möglichen Passagen hängt vom Alter des Individuums ab, von dem die Fibroblasten stammen und ist bei bestimmten genetisch bedingten Erkrankungen, die mit einer vorzeitigen Alterung verbunden sind, stark reduziert. Es muss daher einen Kontrollmechanismus geben (mitotic clock), durch den das Alter der Zellen bestimmt wird.

Wie heute bekannt ist, verkürzen sich die Enden der Chromosomen, die Telomere, bei jeder Passage. Die telomerische DNA besteht aus Repeats der Sequenz TTAGG/CCCTAA, die in Zellen der Keimbahn etwa 15 kbp lang ist. Wird ein bestimmter Schwellenwert unterschritten, stellen die Zellen die Teilung ein. In den Keimzellen findet sich das Enzym Telomerase, das in der Lage ist, diese Repeats wieder zu verlängern. Letztendlich ist dies die entscheidende Voraussetzung für die „Kontinuität der

Keimbahn“ (s. S. 57). In den meisten diploiden Zellen dagegen ist die Telomerase nur gering exprimiert, was eine der Gründe für deren begrenzte Teilungsfähigkeit und gleichsam ein Schutzmechanismus gegen maligne Entartung ist (Bodnar et al. 1998).

Der Abbau und Verlust des Telomers geht zugleich mit einer zytogenetischen Auffälligkeit einher: der Fusion von Chromosomenenden mit der Ausbildung dizentrischer und Ringchromosomen oder langer Ketten aneinander hängender Chromosomen. Hierzu kommt es auch, wenn das Protein TRF2, das spezifisch an das Chromosomenende bindet, mutiert ist. Zugleich führt dies zum Proliferationsstopp und zum vorzeitigen Eintritt in die Seneszenz (van Steensel et al. 1998). Ebenso greifen hier das ATM- und das NBS-Gen an, die im Fall der Ataxia teleangiectatica und dem Nijmegen-breakage-Syndrom mutiert sind und dann ebenfalls mit gehäuften Telomerfusionen einhergehen (Abb. 1.2.11 d, Digweed et al. 1999). Besonders ausgeprägt fand es sich bei einem Patienten mit Thiberge-Weissenbach-Syndrom (Dutrillaux et al. 1977). In seneszenten und Tumorzellen tritt dieses Phänomen dann auf, wenn die Telomere stark verkürzt sind [Übersicht de Lange (1995)]. Eine einfache Erklärung hierfür wäre, dass kurze Enden nicht mehr genügend TRF2 binden, durch das normalerweise die End-zu-End-Fusionen verhindert werden. Die damit verbundene Chromosomeninstabilität begünstigt zugleich die maligne Entartung der Zellen (Artandi u. DePinho 2000).

Bereits 1938 hatte Muller nach Bestrahlungsexperimenten bei *Drosophila* gezeigt, dass freie Chromosomenenden instabil sind und daher nicht vorkommen. So konnte er an den Riesenchromosomen keine Deletionen, sondern stets Translokationen finden. Die besondere Struktur der Telomere, also der natürlichen Chromosomenenden, verhindert daher, dass sie von der DNA-damage-checkpoint-Kontrolle als Bruch angesehen und repariert (fusioniert) werden. Zum anderen stellen sie die Voraussetzung für die DNA-Replikation der Chromosomenenden dar [Übersicht bei Henderson (1995)]. Die Sequenzübereinstimmung sämtlicher Chromosomenenden könnte auch dafür mitverantwortlich sein, dass in einem kurzen Stadium der meiotischen Prophase, dem Bukett-Stadium, sämtliche Telomere miteinander assoziiert sind (Price 1999, Scherthan et al. 1996).

Ein Kennzeichen von Tumorzellen ist, dass sie das Stadium der Seneszenz überwunden haben und unbegrenzt teilungsfähig sind. Beim Menschen kommt es praktisch nicht vor, dass diploide

Zellen in der Gewebekultur spontan immortalisieren. Eine Ausnahme bilden Zellen von Patienten, bei denen mittel- oder unmittelbar die DNA-Reparatur defekt und die Mutationsrate entsprechend erhöht sind. Dies ist aber nur die Grundlage für weitere genetisch bedingte Veränderungen, wie den Verlust der Kontaktinhibition, das Vermögen in Suspension zu wachsen und in einem Medium, dem keine Wachstumsfaktoren zugesetzt sind.

Es ist bereits lange bekannt, dass bestimmte Viren in der Lage sind, diploide menschliche Zellen zu immortalisieren. Im Fall von B-Lymphozyten ist dies das Epstein-Barr-Virus, bei Fibroblasten z.B. das menschliche Papilloma- oder das SV40-Virus. Der Nachweis, welche Gene bzw. Genabschnitte dieser Viren für die Umwandlung normal diploider in Tumorzellen verantwortlich sind, hat entscheidend zum Verständnis der Tumorgenese beigetragen. Dies soll an nur einem Beispiel illustriert werden. Menschliche Fibroblasten lassen sich allein dadurch immortalisieren, dass die Telomeraseaktivität erhöht wird (Bodnar et al. 1998). Sie werden dadurch aber nicht zu Tumorzellen. Werden in diese Zellen zusätzlich das Gen für das große T-Antigen des SV40-Virus eingebracht, ein virales Onkoprotein, sowie ein aktiviertes zelluläres Onkogen, H-rasV12, dann zeigen sie alle Eigenschaften von Tumorzellen. Sie können in Suspension wachsen und bilden in immundefizienten, so genannten Nacktmäusen Tumoren aus. Diese Transformation gelingt auch bei Epithelzellen.

Mindestens 4 Prozesse sind von dieser Manipulation betroffen:

1. Durch die Telomerase wird die Verkürzung der Telomere unterbunden.
2. Das SV40 T-Antigen inaktiviert das p53.
3. Das SV40 T-Antigen inaktiviert das pRb, also damit 2 zentrale Proteine der Proliferationskontrolle.
4. Das mutierte ras-Gen macht die Zellen unabhängig von Wachstumsfaktoren und überwindet damit den R-Punkt (Kiyono et al. 1998).

Generell handelt es sich bei der Tumorgenese um einen Mehrschrittprozess, wobei die jeweiligen molekularen Veränderungen für jeden Zelltyp mehr oder weniger spezifisch sind. Die meisten der über 100 bekannten Protoonkogene und Tumorsuppressorgene sind in die hier aufgeführten Vorgänge der Zellzyklusregulation, der Checkpoint-Kontrolle und DNA-Reparatur einbezogen, was die überragende Bedeutung dieser Kontrollmechanismen, aber auch deren Komplexität unterstreicht.

Die Kontrolle der Zellproliferation ist selbstverständlich auch für das normale Entwicklungs- und Differenzierungsgeschehen von entscheidender Bedeutung. Auch hier sind die „signaling pathways“ evolutionär hoch konserviert. So kommt es z.B. bei der Entwicklung der Extremitäten von Vertebraten durch Zusammenspiel des Proteins „sonic hedgehog“ mit den Wachstumsfaktoren FGF4 und FGF8 zur Festlegung der a.-p.- und der Proximal-distal-Achsen, während das Wnt-7-Gen die dorsal-ventrale Ausrichtung bestimmt. Auch wenn die genaue Wirkungsweise dieser Gene im Hinblick auf die Regulation des Zellwachstums noch nicht geklärt ist, zeigen doch Mutationen in diesen Genen beim Menschen, dass hierdurch ein sehr komplexes, pleiotropes Muster von Fehlbildungen ausgelöst wird, worauf im vorliegenden Buch eingegangen wird.

1.2.5 Chromosomopathien

Die Chromosomopathien werden in einem eigenen Kapitel im Band „Monogen bedingte Erbkrankheiten 2“, Kapitel „Chromosomopathien“ (Ganten u. Ruckpaul 2000) abgehandelt. Hier werden nur die Ergebnisse kurz zusammengefasst, die unmittelbar die molekulare Medizin berühren.

Bei den verschiedenen Chromosomopathien können strukturelle von numerischen Mutationen unterschieden werden. Hinzukommen Mosaiken und Chimären, worunter das Vorliegen mehrerer chromosomal unterschiedlicher Zelllinien in einem Individuum verstanden wird. Der unterschiedlichen Klassifikation liegt auch ein verschiedener Entstehungsmechanismus zugrunde (Sperling u. Neitzel 2000). Hinsichtlich der Häufigkeit von Chromosomenanomalien zum Zeitpunkt der Befruchtung nimmt der Mensch eine Sonderstellung ein, da vermutlich >30% aller Zygoten einen aberranten Chromosomensatz aufweisen, insbesondere eine Aneuploidie. Als eine Erklärung hierfür wird der fehlende Checkpoint gegenüber Chromosomenfehlverteilungen im weiblichen Geschlecht angenommen (s. S. 66).

Die Zellteilungen nach der Befruchtung laufen rasch nacheinander ab und scheinen ebenfalls besonders fehleranfällig zu sein, da ein Großteil von 6–10 Zellembryonen nach FISH-Analyse eine Mosaikkonstitution aufweist und etwa 10% vollkommen aberrante (chaotic) Karyotypen (Delhanty et al. 1997). Diese Befunde sprechen dafür, dass die

Checkpoint-Kontrolle bei den ersten Zellteilungen noch nicht wirkungsvoll funktioniert [Übersicht bei Handyside u. Delhanty (1997)]. Sie erklären zugleich, dass diskrepante chromosomale Befunde zwischen dem extraembryonalen Gewebe und dem eigentlichen Fetus nicht selten sind (Sperling et al. 1997).

Ein erheblicher Anteil chromosomal aberranter Embryonen geht bereits vor der Implantation zugrunde, darunter praktisch sämtliche Monosomien, ein weiterer Teil führt zu einem Spontanabort. Der Anteil Neugeborener mit einem auffälligen Karyotyp liegt bei 0,6%.

1.2.5.1 Aneuploidien

Die ungleiche Überlebensrate der verschiedenen Chromosomenanomalien ist Ausdruck der jeweiligen genetischen Imbalance. Beispielhaft hat Gropp (1982) dies für die Maus gezeigt, da hier Spezialstämme zur Verfügung stehen, mit denen für jedes Autosom gezielt trisome bzw. monosome Feten erzeugt werden können. Entsprechend wie beim Menschen sind bald nach der Implantation nur noch trisome Feten zu finden, deren charakteristische Überlebensrate von dem jeweils betroffenen Chromosom abhängt (Abb. 1.2.14). Dabei können – ebenso wie beim Menschen – verschiedene Trisomien gleiche Fehlbildungen aufweisen, während andere Fehlbildungsmuster charakteristisch für be-

stimmte Trisomien sind. Diese „Semispezifität“ kann damit erklärt werden, dass komplexe morphogenetische Prozesse durch zahlreiche Gene gesteuert werden, die auf unterschiedlichen Chromosomen gelegen sind.

Die Veränderungen in der Dosis jedes einzelnen Gens mündet dabei in einen recht übereinstimmenden pathogenetischen Prozess ein. Wird hierdurch z.B. die Proliferation bestimmter Zellen während der Embryogenese verlangsamt, führt dies zu einer Hypoplasie. Wenn dadurch in einer kritischen Phase der Differenzierung eines Blastems weniger Zellen als normal zur Verfügung stehen, kann nach dem Alles-oder-nichts-Gesetz die Morphogenese gerade noch normal ablaufen oder so gestört sein, dass es zu einer Fehlbildung kommt. Dabei dürften auch stochastische Effekte eine Rolle spielen, ob ein kritischer Schwellenwert über- oder unterschritten wird. Zum Verständnis der Ätiologie derartiger Chromosomopathien ist also nicht nur die genetische Ausstattung des jeweiligen Chromosoms zu berücksichtigen, sondern auch der Zufall.

1.2.5.2 Imprinting

Der hohe Prozentsatz trisomer Zygoten und die Fehlerrate der ersten Zellteilungen kann auch dazu führen, dass es durch Anaphaseverlust oder Non-disjunction des überzähligen Chromosoms zur

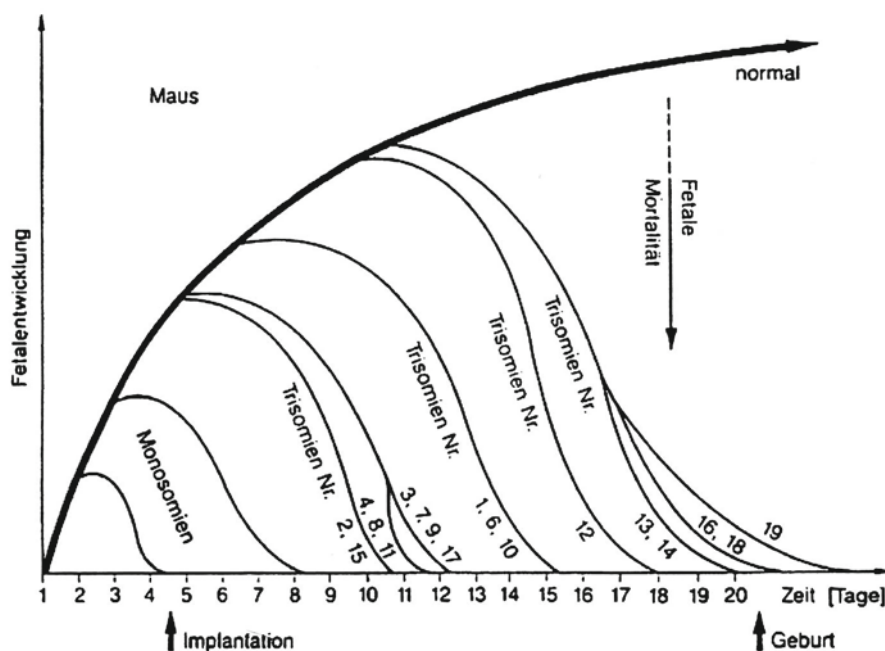


Abb. 1.2.14. Entwicklungsprofile unterschiedlicher Aneuploidien der Maus, aus Gropp (1982)

Entstehung einer diploiden Zelllinie kommt. In 1/3 der Fälle stammen dann beide Chromosomen nur von einem Elternteil, es liegt eine uniparentale Disomie vor (UPD). Als Folge davon können Chromosomenabschnitte auftreten, die vollkommen identisch sind, d.h. die gleichen Allele aufweisen (uniparentale Isodisomie). Dies kann zur Homozygotie für seltene rezessive Erkrankungen führen, obwohl nur ein Elternteil heterozygoter Genträger ist (Engel 1998).

Darüber hinaus kann es als Folge einer UPD zu Entwicklungsstörungen kommen, die auf einen Imprintingeffekt zurückgehen. Gemeint ist damit, dass die Expression bestimmter Gene von der elterlichen Herkunft abhängig ist. So ist in bestimmten Arealen des Gehirns (Hippocampus, Zerebellum) nur das mütterliche UBE3A-Gen auf dem Chromosom 15 aktiv. Im Fall einer paternalen UPD 15 wird daher das betreffende Protein dort nicht gebildet, und es kommt zum Angelman-Syndrom (AS). Der gleiche Effekt stellt sich ein, wenn das mütterliche Gen infolge einer Deletion verloren ging. Betrifft die Deletion das väterliche bzw. die UPD das mütterliche Chromosom 15, führt dies zum Prader-Willi-Syndrom. Hier ist das klinische Bild durch den Ausfall bestimmter väterlicher Gene bestimmt. Die Aktivität dieser Gene wird durch ein „imprinting center“ über eine größere Entfernung hinweg gesteuert und führt zu charakteristischen gametenspezifischen Methylierungsmustern. Es handelt sich hierbei also auch um ein chromosomales Phänomen (Brannan u. Bartolomei 1999, Bern-Porath u. Cedar 2000, Sleutels et al. 2000).

Ein gesicherter Imprintingeffekt fand sich neben dem Chromosom 15 für

- paternale UPD 6 (transienter neonataler Diabetes mellitus),
- materne UPD 7 (Silver-Russell-Syndrom),
- paternale UPD 11 (Beckwith-Wiedemann-Syndrom),
- materne UPD 14 (Minderwuchs und vorzeitige Pubertät) und
- paternale UPD 14 (starker Minderwuchs mit Skelettdysplasie).

Auch dies ist ein Beispiel, wie erst durch die Zytogenetik ein molekulargenetischer Befund verständlich gemacht wurde.

Derartige epigenetische Prozesse, bei denen die elterlichen Erbanlagen unterschiedlich programmiert sind, spielen in der frühen Entwicklung eine wesentliche Rolle. Erste Belege hierfür lieferte der zytogenetische Hinweis auf parthenogenetische

Entwicklungen beim Menschen (Surani 1995). Einmal betreffen diese Prozesse gutartige Geschwülste, die so genannten ovariellen Teratome. Diese können differenzierte Strukturen aller 3 Keimblätter ausbilden und weisen stets einen weiblichen Chromosomensatz auf. Sie gehen auf eine unbefruchtete Eizelle zurück, die die 1. Reifeteilung durchlaufen hat und infolge Verdopplung des haploiden Satzes wieder diploid wurde. Im anderen Fall handelt es sich um eine – abortive – Entwicklung mit ausschließlich väterlichem Erbgut. Durch Befruchtung einer kernlosen Eizelle mit einem X-haltigen Spermium und anschließender Verdopplung des haploiden Satzes kommt es zu vollständigen Blasenmolen, die keinen Embryo, sondern ausschließlich extraembryonales Gewebe aufweisen. Das heißt, die väterlichen Gene steuern bevorzugt die Entwicklung des extraembryonalen Gewebes, die mütterlichen die des eigentlichen Embryos.

Ein weiteres epigenetisches Phänomen betrifft die X-Inaktivierung im weiblichen Geschlecht. Der so genannte Dosiskompensationsmechanismus führt dazu, dass im weiblichen Geschlecht eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert wird und dadurch die Zahl aktiver X-chromosomaler Gene in beiden Geschlechtern annähernd gleich ist. Die X-Inaktivierung findet in der frühen Embryogenese zufällig zwischen dem väterlichen und mütterlichen X statt, bleibt dann aber über die Zellteilungen hinweg erhalten. Das heißt, dass jede Zelle monosom für die X-gebundenen Gene ist und weibliche Individuen Mosaik aus Zellen darstellen, in denen entweder das väterliche oder das mütterliche X aktiv ist [Übersicht bei Migeon (1994)]. Dieser Mosaikstatus manifestiert sich besonders eindrucksvoll im Fall von X-chromosomalen Hautkrankheiten [Übersicht bei Happle (1998)].

Die Inaktivierung des X-Chromosoms ist ein reversibler Prozess, da in den Oozyten beide X aktiv sind, in der Spermatogenese dagegen X- und Y-Chromosom inaktiviert werden. Sichtbarer Ausdruck davon ist das kompakte „Sexvesikel“ im Pachytän. Auch in weiblichen somatischen Zellen hat der inaktive Zustand des einen X-Chromosoms sein morphologisches Korrelat in Form des Geschlechtschromatins (synonym Barr-Körperchen). Damit lassen sich weibliche von männlichen Zellen einfach unterscheiden. Ganz entsprechend sind 47,XXY-Individuen geschlechtschromatinpositiv, 45,X0-Individuen geschlechtschromatinnegativ. 47,XXX-Individuen weisen in einem hohen Prozentsatz ihrer Zellen 2 Geschlechtschromatinkör-

perchen auf. Im Prinzip erklären die Inaktivierung überzähliger X-Chromosomen bzw. die fehlende Inaktivierung im Fall der XO Konstitution die geringen klinischen Auswirkungen gonosomaler gegenüber autosomalen Aneuploidien.

Ein weiteres Kennzeichen der X-Inaktivierung sind die DNA-Replikation in der späten S-Phase (s. S. 64), die DNase-I-Unempfindlichkeit, der hohe Grad an Methylierung der DNA und die Azetylierung der Histone [Übersicht bei Migeon (1994)].

1.2.5.3 Strukturelle Chromosomenmutationen

Es waren strukturelle Mutationen des X-Chromosoms, die die Voraussetzung zur Aufklärung des Mechanismus der Inaktivierung legten. Generell gilt hierbei, dass beim Vorhandensein eines normalen und eines aberranten X-Chromosoms letzteres praktisch stets inaktiv ist, was die geringen klinischen Auswirkungen vom Grundsatz her verständlich macht. Überraschend war jedoch, dass Isochromosomen für den langen Arm nicht selten sind, solche für den kurzen Arm aber unter Neugeborenen bislang nicht gefunden wurden. Diese Isochromosomen sind jedoch genetisch aktiv, die genetische Imbalance ist daher so groß, dass die Embryonen frühzeitig zugrunde gehen. Das heißt aber auch, dass das für die Inaktivierung verantwortliche Segment auf dem langen Arm gelegen sein muss. Durch weitere strukturelle Chromosomenmutationen konnte das Inaktivierungszentrum auf Xq13.2 lokalisiert und das entscheidende Gen Xist (X inactive specific transcript) identifiziert werden [Übersicht bei Lee u. Jaenisch (1997), Brockdorff (1998), Kelley u. Kuroda (2000)]. Diese Inaktivierung kann im Fall von X-Autosomen-Translokationen auch auf das angrenzende autosomale Material übergreifen und die betreffenden Gene – teilweise – inaktivieren [Übersicht bei Lyon (1998)].

Im Fall balancierter X-Autosomen-Translokationen ist das Translokationschromosom bei den Trägerinnen regelmäßig aktiv und das normale X-Chromosom inaktiv. Es kommt daher zu keiner genetischen Imbalance, sodass in der Regel damit keine klinischen Konsequenzen verbunden sind. Betrifft die Bruchstelle jedoch ein Gen, z.B. das für die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne, sind die heterozygoten Genträgerinnen erkrankt, da das normale Gen ja auf dem inaktiven X-Chromosom gelegen ist, nicht exprimiert wird und das andere Allel infolge der Chromosomenmutation defekt ist.

Strukturelle Chromosomenanomalien der Autosomen können direkt den Weg zu Genen mit Krankheitswert weisen. Offensichtlich ist dies im Fall „balancierter“ Translokationen, bei denen eine Bruchstelle innerhalb des Gens gelegen ist und dabei eine dominante Mutation bedingt. Etwa 6% derartiger Träger sind klinisch auffällig. Im Rahmen einer großen internationalen Kooperation werden diese Fälle systematisch gesammelt und analysiert (Ropers 1998).

Nicht immer ist der Karyotyp-Phänotyp-Bezug jedoch so einfach. Die Bruchstellen können auch mehrere Hundert kb vom eigentlichen Gen entfernt sein und dessen Expression beeinflussen. Es handelt sich dabei um einen „Positionseffekt“, der nicht auf DNA-, sondern auf Chromosomen(Chromatin)ebene erklärt werden muss. Im Gegensatz zum Menschen ist dieses Phänomen bei Hefe, *Drosophila* und mit Einschränkungen auch der Maus bereits gut analysiert [Übersicht bei Wallrath (1998), Cockell u. Gasser (1999), Dobie et al. (1997)].

Ebenso wie Translokationen können auch Mikrodeletionen wegweisend für die Identifizierung betroffener Einzelgene oder ganzer Genkomplexe sein. Größere Deletionen und/oder Duplikationen bestimmter Chromosomenabschnitte, wie sie insbesondere unter den Nachkommen von Personen mit balancierten Translokationen gefunden werden, stellen die Zwischenglieder zu kompletten Trisomien oder Monosomien dar. Dennoch ist es angesichts der großen klinischen Variabilität nur sehr eingeschränkt möglich, einzelne Komponenten des klinischen Bildes der reinen Trisomien bestimmten Chromosomenabschnitten zuzuordnen. Allgemein zeigte sich jedoch, dass Veränderungen von T- und R-Banden größere klinische Auswirkungen zeigen als die von G-Banden. Dies entspricht ihrem Gehalt von Genen (s. S. 63) und ist für die Beurteilung des genetischen Risikos der Nachkommen von Trägern balancierter Chromosomentranslokationen von praktischer Bedeutung. Exakte Vorhersagen sind jedoch nicht möglich, sodass man in der genetischen Beratung auf empirische Daten angewiesen ist (Stengel-Rutkowski et al. 1988).

Ein besonderer Aspekt aus molekularer Sicht betrifft die Entstehung struktureller Chromosomenmutationen. So ist die Mutationsrate für Robertson-Translokationen, bei denen es zur „Fusion“ zweier akrozentrischer Chromosomen kommt, mit 4×10^{-4} höher als für jede Genmutation, betrifft aber ganz bevorzugt die Fusion zwischen den Chromosomen 13 und 14 sowie 14 und 21. Ebenso

ist die Mutationsrate für Mikrodeletionen bzw. -duplikationen auf Chromosom 17p12, die das Myeligen, PMP22, betreffen und mit 2 neurologischen Erkrankungen einhergeht (HNPPP und CMT1) mit 1×10^{-4} ungewöhnlich hoch.

In beiden Fällen ergab die Analyse, dass an der Entstehung der Umbauten bestimmte repetitive Elemente beteiligt sind. So weisen die Chromosomen 13, 14 und 21 Repeats auf, die eine starke Homologie miteinander zeigen. Wird zusätzlich angenommen, dass diese Sequenzen auf Chromosom 14 invertiert sind, würde ein Cross-over in diesem Bereich während der Oogenese die bevorzugte Entstehung derartiger Translokationschromosomen erklären (Sullivan et al. 1996). Im Fall des Chromosoms 17 geht die hohe Mutationsrate auf ungleiches Cross-over zwischen 2 Repeats von 24 kb zurück, die das PMP22-Gen flankieren. Diese Repeats enthalten zudem Signalstrukturen, die bei der Rekombination eine wichtige Rolle spielen (MEPS: meiosis processing sequences), was eine Erklärung für die besonders hohe Cross-over-Rate in diesem Bereich sein dürfte.

Vermutlich wird dieser Entstehungsmechanismus noch bei einer Reihe weiterer Mikrodeletions-syn-drome vorliegen, da Repeats der erforderlichen Länge und Sequenzübereinstimmung für ein (ungleiches) Cross-over auch am Genlocus für das Williams-Beuren-, das Angelman- und Prader-Willi-, aber auch das DiGeorge-Syndrom gefunden wurden [Übersicht bei Lupski (1998)].

Einen Spezialfall stellen Repeats mit gegenläufiger Orientierung auf dem gleichen Chromosom dar, so genannte inverted Repeats. Im Fall des Gens für den Blutgerinnungsfaktor VIII, das auf Xq gelegen ist, befindet sich ein Repeat innerhalb des Gens, 2 andere etwa 500 kb entfernt. Kommt es zur Rekombination zwischen diesen Repeats, entsteht eine Inversion, durch die das Gen inaktiviert wird. Diese Situation liegt bei nahezu der Hälfte aller Patienten mit schwerer Hämophilie vor. Die Neumutationen treten nahezu ausschließlich im männlichen Geschlecht auf. Eine Erklärung hierfür liegt auf der Hand: In der Spermatogenese liegt der lange Arm des X-Chromosoms ungepaart vor, sodass es infolge der intrachromosomalen Paarung zu derartigen Rekombinationsereignissen kommt, im weiblichen Geschlecht dagegen paaren sich die homologen X-Chromosomen normal (Pratt et al. 1994). Diese Beispiele zeigen aber auch, dass eine zytogenetische Analyse erforderlich ist, um die Ätiologie dieser monogen bedingten Krankheiten zu verstehen.

1.2.6 Somatische Chromosomenmutationen

Die Zahl der Zellen des menschlichen Körpers mit etwa 10^{14} liegt weit über der Rate somatischer (Gen-) und Chromosomenmutationen. Das heißt, jede beliebige Mutation dürfte in den Zellen jedes Individuums wiederholt aufgetreten sein. Hier geht es 1. um regelmäßig auftretende Chromosomenveränderungen, die eine konstitutive Eigenschaft des Genoms sind (mitotisches Cross-over und Schwesterchromatidaustausche), 2. um eine stark erhöhte somatische Mutationsrate als Folge von Genmutationen der Keimbahn (Chromosomeninstabilitätssyn-drome) und 3. um solche somatischen Chromosomenmutationen, die den Zellen einen Vorteil verschafften und sich daher ausbreiten konnten (Tumorgene-se).

1.2.6.1 Somatische Rekombination

Das Auftreten von somatischem (synonym mitotischem) Cross-over ist aus der Drosophilagenetik schon seit mehr als 60 Jahren bekannt. Eine der Voraussetzungen hierfür ist die regelmäßige Assoziation der homologen Chromosomen auch in den Somazellen, die in den Zellen des Menschen und der Säuger offensichtlich nicht stattfindet. Dennoch gibt es alte zytogenetische Beobachtungen, die einen Hinweis auf mitotisches Cross-over liefern. Wie bereits erwähnt wurde, bleiben die Schwesterchromatiden bis in die Metaphase hinein gepaart. Hat sich in der vorausgegangenen Interphase ein somatisches Cross-over ereignet, sollte dies zu Translokationsfiguren zwischen 2 homologen Chromosomen führen, die identische Bruchstellen betreffen.

Bei der Auswertung normaler Lymphozytenmetaphasen zeigt sich, dass die spontane Häufigkeit dieser Austauschereignisse (etwa 1 auf 1000 Metaphasen) praktisch ebenso hoch ist wie die zwischen allen heterologen Chromosomen zusammen (Therman u. Kuhn 1976) und bevorzugt genreiche Chromosomenabschnitte betrifft (Therman u. Kuhn 1981). Dieses Phänomen ist im Fall einer autosomal-rezessiven Krankheit, dem Bloom-Syndrom, extrem erhöht (Abb. 1.2.16). Hier konnte auch der direkte molekulargenetische Beweis erbracht werden, dass es an homologen Stellen zur Rekombination kommt (German u. Ellis 1998).

Bei Patienten mit dem Bloom-Syndrom, die heterozygot für 2 unterschiedliche Mutationen waren

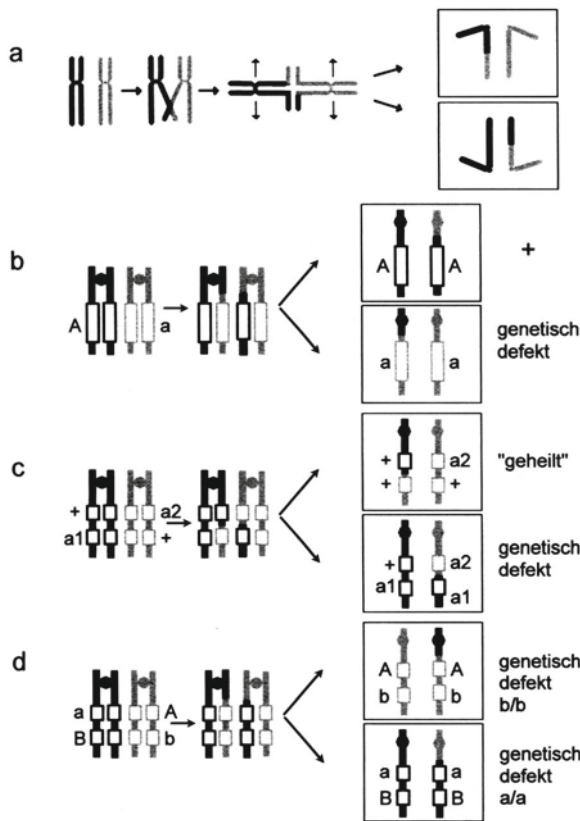


Abb. 1.2.15 a–d. Genetische Konsequenzen von somatischem Cross-over. **a** Paarung der homologen Chromosomen mit somatischem Cross-over in der Interphase, Anordnung der Chromosomen in der Metaphase (Pfeile Zellpole) und Ergebnis nach Auftrennung in der Anaphase. Die homologen Chromosomen sind durch unterschiedliche Grautöne gekennzeichnet. **b–d** Genetische Konsequenzen von somatischem Cross-over. **b** Entstehung von Homozygotie bei Heterozygotie für ein rezessives Gen, **c** Entstehung normaler Zellen bei Compound-Heterozygoten, **d** Entstehung von „Zwillingsflecken“ bei doppelt Heterozygoten. Nähere Erläuterungen s. Text

(Compound-Heterozygote), kam es als Folge eines somatischen Cross-overs innerhalb des Gens zur Bildung von Schwesterchromatiden mit der normalen Sequenz bzw. den beiden Mutationen. Nach der Mitose führt dies zu Zellen, die unverändert den Defekt aufweisen und solchen, die „geheilt“ sind (Abb. 1.2.15). Das gleiche Phänomen wurde inzwischen auch bei Patienten mit der Fanconi-Anämie gefunden und durch Sequenzanalyse bestätigt (Lo Ten Foe et al. 1997). Es ist zu erwarten, dass eine derartige „somatische Gentherapie“ auch das Krankheitsgeschehen beeinflusst.

Dieses Phänomen sollte sich stets dann zeigen, wenn Individuen heterozygot für ein rezessives Gen sind, da als Folge des somatischen Cross-

overs Zellen gebildet werden, die homozygot für den Defekt sind (Abb. 1.2.15). Die pigmentlosen Flecken, die häufig bei Patienten mit dem Bloom-Syndrom zu finden sind, werden in diesem Sinn gedeutet. Da vermutlich jeder Mensch heterozygot für mehrere rezessive Gene ist, dürfe dieses Phänomen gar nicht so selten sein, allerdings ist die Beweisführung nicht einfach [Übersicht bei Happle (1998)].

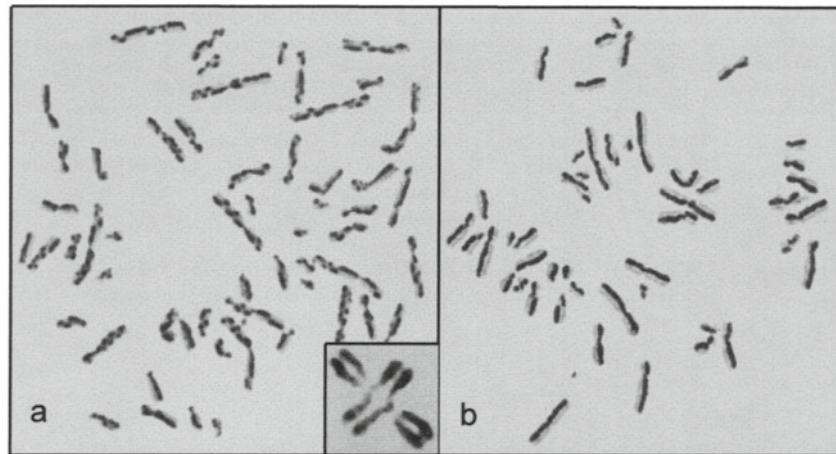
Ein besonders instruktives Beispiel für somatisches Cross-over stellen so genannten Zwillingsflecken dar, wie sie bei *Drosophila* und vielen anderen Organismen beschrieben wurden. Die benachbarten Areale weisen 2 verschiedene mutante Phänotypen auf. Die Tiere selbst sind phänotypisch normal, aber doppelt heterozygot für 2 gekoppelte rezessive Gene (Abb. 1.2.15). Durch somatische Rekombination entstehen die jeweiligen homozygoten Zellareale. Für den Menschen hat Happle (1998) entsprechende Beobachtungen zusammengestellt.

Regelmäßige Rekombinationsereignisse finden auch zwischen Schwesterchromatiden statt. Dies lässt sich zytogenetisch nachweisen, indem Zellen in Gegenwart des Basenanalogons BrdU kultiviert werden, wonach sich die Schwesterchromatiden differenziell anfärben lassen (Abb. 1.2.16). Etwas 5–8 Schwesterchromatidaustausche, SCE (sister chromatid exchanges), können so pro Metaphase nachgewiesen werden. Es wurde lange diskutiert, ob es sich hierbei um ein natürliches oder infolge der DNA-Markierung induziertes Phänomen handelt. Die Antwort darauf haben 2 zytogenetische Beobachtungen geliefert:

- Im Fall von Ringchromosomen führt ein einfacher Schwesterchromatidaustausch zu großen dizentrischen Ringen, ein doppelter zu ineinander verhakten Ringen, was ohne Markierung der DNA nachweisbar ist und damit die „spontane“ Natur der SCE belegt.
- Zudem hat sich gezeigt, dass bei Patienten mit dem Bloom-Syndrom die SCE-Rate drastisch erhöht ist (Abb. 1.2.16), d.h. das defekte Protein ist in diesen Prozess involviert.

Die biologische Bedeutung dieser Rekombinationsvorgänge ist nicht offensichtlich, da sie keine genetischen Konsequenzen haben sollten. Im Fall ungleicher SCE allerdings kann es zur Vermehrung bzw. Verminderung bestimmter Sequenzen kommen. Dies wird als eine Erklärung für die variable Größe des Y-Heterochromatins herangezogen, da meiotische Rekombination dafür nicht in Frage kommt. Die SCE-Rate wird durch bestimmte mu-

Abb. 1.2.16 a, b. Zytologische Auffälligkeiten bei Patienten mit Bloom-Syndrom, a Metaphase eines Patienten mit stark erhöhter Rate an Schwesterchromatidaustauschen (SCE). Zur differenziellen Darstellung der Schwesterchromatiden werden die Zellen für 2 Zellzyklen in BrdU-haltigem Medium kultiviert. *Insert* Reunionsfigur zwischen homologen Chromosomen, die charakteristisch für diese Erkrankung ist. b Metaphase mit normaler SCE-Rate



tagene Noxen stark erhöht, sodass angenommen werden kann, dass es sich um einen Prozess handelt, der bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielt [Übersicht bei Tucker et al. (1993)]. Auch dies ist ein Beispiel dafür, dass ein grundlegendes zellbiologisches Phänomen erst durch die Zytogenetik entdeckt wurde und jetzt im Hinblick auf seine pathogenetische Relevanz gewertet werden muss.

1.2.6.2 Chromosomeninstabilität

Einzelne Chromosomenbrüche treten in einem kleinen Prozentsatz der Metaphasen auf. Nach Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen steigen sie dosisabhängig an und können auch noch Jahre nach einer Exposition zur biologischen Dosisabschätzung herangezogen werden. Der Grund liegt in der langen Lebensdauer der Lymphozyten des peripheren Bluts. Eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit kann auch als Folge der Exposition gegenüber chemischen Mutagenen oder bestimmten Virusinfektionen auftreten [Übersicht bei Obe u. Müller (1999)].

Hier ist eine kleine Ergänzung angebracht. Aus dem Aberrationsmuster der Chromosomen in der ersten Mitose nach Bestrahlung wird ersichtlich, ob das Chromosom uninem oder bereits verdoppelt war. So führt eine Exposition in der G_1 -Phase zu Aberrationen vom Chromosomentyp, in der späteren S- und G_2 -Phase vom Chromatidtyp (Abb. 1.2.17). Eine hohe Strahlendosis zum Zeitpunkt der Mitose führt zu Verklebungen der Chromatiden als Folge einer unvollständigen Trennung der bestehenden Verbindungen (s. S. 72).

Eine Gruppe von Chemomutagenen, die als Radionimetika zusammengefasst werden, erzeugt ein

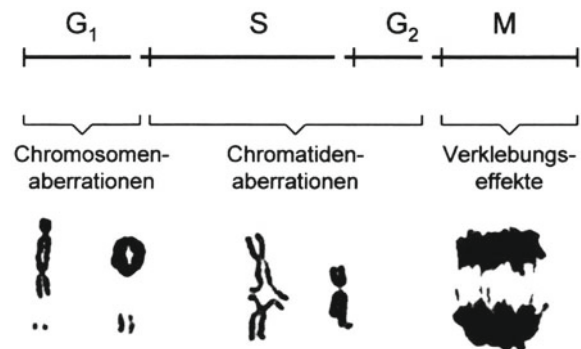


Abb. 1.2.17. Zusammenhang zwischen dem Stadium des Zellzyklus, zu dem eine Exposition mit ionisierenden Strahlen erfolgt und dem chromosomalen Aberrationsmuster in der darauf folgenden Mitose, aus Sperling u. Obe (1977)

vergleichbares Aberrationsmuster. Viele andere Substanzen jedoch führen ausschließlich zu Chromatidtypaberrationen, auch nach Zugabe in der G_1 -Phase, da sie zu ihrer Manifestation auf die S-Phase angewiesen sind. Das weitere Schicksal der Zellen hängt davon ab, wie groß die genetische Imbalance nach der Zellteilung ist. Besonders langlebig sind balancierte reziproke Translokationen, die mittels „chromosome painting“ sehr empfindlich nachgewiesen werden können [Übersicht bei Obe u. Müller (1999)].

Einzelne Chromosomenbrüche stellen gesundheitlich kein besonderes Risiko dar. Findet sich dagegen eine erhöhte Chromosomeninstabilität bei Patienten mit einer genetisch bedingten Erkrankung, kommt dieser plötzlich ein großes Gewicht zu: Der Befund weist darauf hin, dass das betreffende Gen direkt oder indirekt in die Aufrechterhaltung der DNA-Integrität involviert ist, d.h. in ein zentrales zellbiologisches Geschehen (s. S. 72).

Tabelle 1.2.1. Charakteristika von Syndromen mit Chromosomeninstabilität

Syndrom (OMIM)	BS (210900)	WS (277700)	RTS (268400)	DKC (305000)	AT (208900)	ATLD (604391)	NBS (251260)	FA
	Bloom-Syndrom	Werner-Syndrom	Rothmund-Thomson-Syndrom	Dyskeratosis congenita	Ataxiatelangiectatica	AT-like disorder	Nijmegen-breakage-Syndrom	Fanconi-Anämie
Locus	15q25.1	8p12-p11	8q24.3	Xq28	11q22.3	11q21	8q21	mind. 7 Loci
Protein	RECQ2-Helikase	RECQ3-Helikase	RECQ4-Helikase	Dyskerin (Telomerase-dysfunktion?)	Proteinkinase	MRE11 als Teil eines DSB-Reparaturkomplexes	Nibrin als Teil eines DSB-Reparaturkomplexes	Proteinkomplex, der mit dem BRCA1-Reparaturkomplex kollokalisiert
Krebsrisiko	Insgesamt erhöht	Weichteilsarkome	Osteosarkome	Epitheliale und hämatologische Krebse	T-Zell-Lymphome und Leukämien	?	Insbesondere B-Zell-Lymphome	Insbesondere Leukämien
Spontane Chromosomeninstabilität	+	+	+	-	+	+	+	+
	Homologe Translokation	Mosaik aus variierenden Translokationen	Aneuploidien und Isochromosomen	Lymphozyten + Fibroblasten und Knochenmarkzellen	In Lymphozyten gehäuft Aberrationen der Chromosomen 7 und 14	In Lymphozyten gehäuft Aberrationen der Chromosomen 7 und 14	In Lymphozyten gehäuft Aberrationen der Chromosomen 7 und 14	Gehäuft Rekombinationen nicht-homologer Chromosomen
Homologe Rekombination (Schwesterchromatid-austausch)	++	-	(+)	-	-	-	-	-
Überempfindlichkeit	UV	4-NQO, Camptothecin	4-NQO	-	γ -Strahlen, Camptothecin	γ -Strahlen	γ -Strahlen, Cross-linker	DEB, Cross-linker

Jeder Bruch repräsentiert einen DNA-Schaden, der so besonders empfindlich lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Die betroffenen Patienten zeichnen sich durch ihr hohes Krebsrisiko und oftmals ihre spezifische Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Mutagenen aus. So weisen die Zellen von Patienten mit der Ataxia teleangiectatica oder dem Nijmegen-breakage-Syndrom eine Überempfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen auf, die von Patienten mit der Fanconi-Anämie gegenüber Agenzien, die die einzelnen DNA-Stränge vernetzen (Tabelle 1.2.1). Diese zytogenetische Auffälligkeit dient als differenzialdiagnostisches Kriterium.

1.2.6.3 Chromosomenmutationen in der Tumorgenese

Auf die zentrale Rolle von Chromosomenveränderungen im Krebsgeschehen wurde wiederholt hingewiesen und wird detailliert in den Bänden „Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen“ (Ganten u. Ruckpaul 2001) sowie „Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen“ (Ganten u. Ruckpaul 2002) eingegangen. Hier sollen nur die unterschiedlichen Typen kurz dargestellt werden.

Numerische Chromosomenanomalien wie Polyploidien und Aneuploidien sind in Tumorzellen kei-

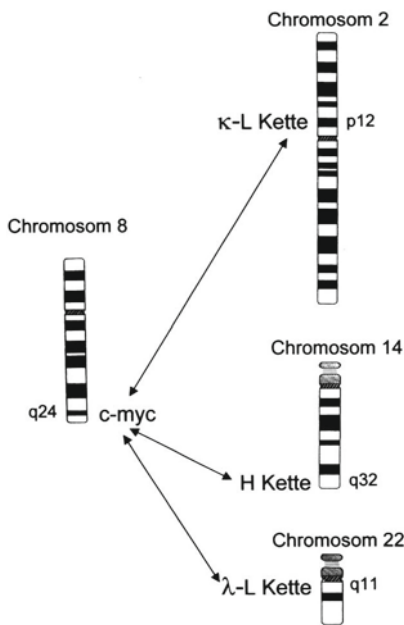


Abb. 1.2.18. Chromosomale Umbauten beim Burkitt-Lymphom. Als Folge einer Translokation kommt das c-myc-Gen auf Chromosom 8q24 in die Nachbarschaft der Gene für die leichten (κ , λ) Ketten oder das Gen für die schwere (H) Kette der Immunglobuline

ne Seltenheit, lassen aber angesichts ihrer großen Variabilität wenig Rückschlüsse auf die eigentliche Tumorphathogenese zu. Zu ihrer Entstehung tragen u. a. Endoreduplikationen und Endomitosen, Zellfusionen sowie das Auftreten multipolarer Mitosen bei [Übersicht bei Therman u. Kuhn (1989)]. Diese Veränderungen sind jedoch Folge der malignen Entartung und nicht ursächlich dafür.

Entscheidende Einblicke in die Tumorgenese haben spezifische Chromosomenumbauten ermöglicht, durch die bestimmte Protoonkogene aktiviert (z. B. Burkitt-Lymphom, Abb. 1.2.18) oder neue Fusionsgene generiert werden (z. B. 9/22-Translokation bei der chronisch-myeloischen Leukämie). Hierauf wurde bereits einleitend hingewiesen (s. S. 55). Mikrodeletionen der Bande 15q14 finden sich bei etwa 5% aller Patienten mit dem Retinoblastom und trugen entscheidend dazu bei, das Rb-Gen zu identifizieren und seine Natur als Tumorsuppressorgen aufzuklären. Im diesem Fall handelt es sich um eine Keimbahnmutation. Als Folge somatischer Mikrodeletionen können derartige Genverluste ebenfalls eintreten und durch FISH-Analyse nachgewiesen werden (LOH: loss of heterozygosity). Dabei zeigte sich, dass in vielen Tumoren ein bestimmtes elterliches Chromosom bevorzugt betroffen ist, in der Mehrzahl das mütterliche Chromosom [Übersicht bei Feinberg (1998)].

Am Beispiel embryonaler Tumoren (z. B. Wilms-Tumor) bei Kindern mit dem Wiedemann-Beckwith-Syndrom ließ sich nachweisen, dass hier genomisches Imprinting eine Rolle spielt, da das andere Allel in diesen Zellen nicht aktiv ist. Überraschenderweise zeigte sich für das IGF2-Gen im Wilms-Tumor, dass beide Allele aktiv sind, obwohl normalerweise nur das väterliche Gen exprimiert wird. Hier und in vielen anderen Tumoren kommt es daher zu einem „loss of imprinting“ (LOI), einer der häufigsten Veränderungen in Tumoren überhaupt [Übersicht bei Feinberg (1998)].

Auf weitere spezielle zytogenetische Veränderungen in Tumoren wie Fusion von Chromoso-

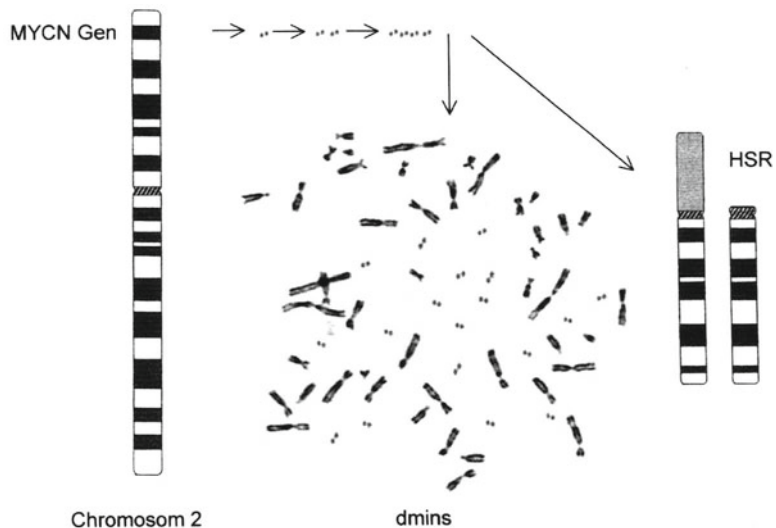


Abb. 1.2.19. Zytogenetische Auffälligkeiten beim Neuroblastom. Als Folge einer Amplifikation des MYCN-Gens auf Chromosom 2 kommt es zur Entstehung kleiner, extrachromosomaler Fragmente (double minutes: *dmin*). Gelegentlich kommt es zur Integration in ein Chromosom und weiterer Amplifikation, was zu einer homogen angefärbten Region führt (homogeneously staining region: *HSR*). Nach Gutmann u. Collins (1998)

men oder vorzeitige Trennung von Schwesterchromatiden wurde bereits hingewiesen.

Hier soll nur noch auf 2 Auffälligkeiten eingegangen werden, die speziell beim Neuroblastom eine pathogenetisch wichtige Rolle spielen [Übersicht bei Gutmann u. Collins (1998)]. Es handelt sich um die Bildung kleiner Chromatinfragmente (dmin: double minute chromatin bodies) und längere, einheitlich gefärbte Chromosomenabschnitte (HSR: homogeneously staining regions). Diese sind Ausdruck der Amplifikation des MYCN-Onkogens auf Chromosom 2. Hierdurch werden extrachromosomale Elemente gebildet, die vermutlich ringförmig sind, kein Zentromer (Kinetochor) besitzen und daher bei der Mitose zufällig verteilt werden. Sie verleihen den Zellen offensichtlich einen Proliferationsvorteil. Sehr selten kommt es zur Integration in das Genom und zur Ausbildung der HSR (Abb. 1.2.19).

Diese wenigen Beispiele sollen die zentrale Rolle der molekularen Zytogenetik in der Tumorforschung unterstreichen. In dem Katalog von Mittelman et al. (1994) sind mehr als 84000 derartiger Fälle zusammen gestellt.

1.2.7 Ausblick

In diesem Kapitel wurde die Zytogenetik als medizinische Grundlagenwissenschaft herausgestellt, die zu ganz neue Einsichten in die molekulare Ursache von Krankheiten geführt hat. Tatsächlich hat die Zytogenetik zugleich auch eine wesentliche angewandte Seite. Jährlich werden in Deutschland mehr als 100000 zytogenetischer Analysen durchgeführt, etwa 70000 davon im Rahmen der vorgeburtlichen Diagnostik. Der diagnostische Umfang liegt daher deutlich über dem derzeitigen molekulargenetischen Nachweis schwerer monogener Erkrankungen. Vermutlich wird er in den kommenden Jahren noch deutlich zunehmen. Es spricht vieles dafür, dass bestimmte genomische Imbalancen, die sich bislang einem allgemeinen Nachweis weitgehend entzogen haben, als ursächlich für einen beträchtlichen Teil ungeklärter Krankheitsfälle in Frage kommen. Es handelt sich um submikroskopische Deletionen und -duplikationen als Folge von Neumutationen oder familiärer, kryptischer Translokationen. So liegt eine Mikrodeletion am Locus 22q11.2 etwa 6% aller angeborenen Herzfehler und mehr als 10% aller pränatal diagnostizierten Herzfehlbildungen zugrunde,

bei denen die anderen bekannten Ursachen ausgeschlossen wurden. Submikroskopische Imbalancen im Bereich der Telomerregionen finden sich bei etwa 10% aller geistig schwer behinderter Kinder, wobei die Werte zwischen einzelnen Untersuchern zwischen 7% und 23% variieren (Knight u. Flint 2000). Als wichtigsten Entstehungsmechanismus derartiger Imbalancen werden die auf S. 79 angesprochenen inter- und intrachromosomalen Rekombinationsereignisse angenommen, die auf repetitive Elemente im Genom zurückzuführen sind. Solche Elemente, die im Bereich der Telomerregionen liegen und sich nur geringfügig zwischen unterschiedlichen Chromosomen unterscheiden, begünstigen die Entstehung chromosomaler Translokationen, die nach der Meiose zu genetisch unbalancierte Nachkommen führen können (Ballif et al. 2000, Flint et al. 1995, Varley et al. 2000). Jene Repeats, die bestimmte chromosomale Bereiche flankieren, erhöhen das Risiko für ungleiches Cross-over (Lopez et al. 2000, Trost et al. 2000). Als Folge davon kommt es zu Mikrodeletionen und -duplikationen. Bei einer systematischen, genomweiten Suche nach derartigen Imbalancen wird sicherlich bei wesentlich mehr Patienten mit angeborenen Fehlbildungen und geistiger Behinderung als bisher die eigentliche Ursache gefunden werden.

Den entscheidenden diagnostischen Durchbruch zum genomweiten Nachweis von Mikrodeletionen dürften DNA-Chips geordneter DNA-Fragmente darstellen, deren Prototyp mit einer Auflösung von 1 Mio. bp bereits vorliegt (Snijders et al. 2000). Die jeweilige Anzahl der Genkopien wird dabei durch Comparative genomic hybridization bestimmt (Array-CGH). Es ist zu erwarten, dass die Auflösung zukünftig noch deutlich gesteigert werden kann.

Der Zeitaufwand ist vergleichsweise gering, da die DNA des Testgewebes ohne vorherige Kultivierung eingesetzt werden kann und der Ablauf zudem automatisierbar ist. Da hiermit selbstverständlich auch vollständige Aneuploidien nachgewiesen werden und die Auflösung deutlich größer ist als bei der klassischen Zytogenetik, dürfte die Array-CGH in den nächsten Jahren – vorausgesetzt sie kann die in sie gesetzten Erwartungen tatsächlich erfüllen – die bisherige personal- und zeitaufwändige zytogenetische Diagnostik in der medizinischen Genetik zunehmend ersetzen.

Den betroffenen Familien kann bei bekannter Ursache eine umfassende, individuelle Beratung angeboten werden. Beim Vorliegen einer Neumutation wird das Wiederholungsrisiko generell vernachlässigbar sein, bei familiären kryptischen

Translokationen dagegen kann es präzisiert und auf die Möglichkeit einer pränatalen Diagnostik hingewiesen werden.

Aus wissenschaftlicher Sicht eröffnen derartige Mikrodeletionen und -duplikationen zudem einen besonders einfachen, direkten Weg, die zugrunde liegenden Gene zu identifizieren. Von der verantwortungsbewußten Einführung dieser Methode in die medizinische Praxis wird es abhängen, ob die neuen diagnostischen Möglichkeiten im Sinn der Patienten und Rat Suchenden eingesetzt werden und gleichzeitig die bemerkenswerten wissenschaftlichen Optionen genutzt werden können. Der Qualitätssicherung kommt hierbei nicht nur im Hinblick auf die Zuverlässigkeit der Befundung, sondern auch bezüglich des Kontextes insgesamt, in dem diese Untersuchung angeboten und in Anspruch genommen werden, eine zentrale Bedeutung zu (Sperling et al. 1997). Hierbei sind 3 Bereiche zu unterscheiden:

1. Strukturqualität

Hierzu zählen die Qualifikation des Untersuchers sowie die Rahmenbedingungen für die Inanspruchnahme der jeweiligen Leistung insgesamt, z. B. die Sicherstellung eines angemessenen Beratungsangebots

2. Prozessqualität

Diese betrifft die praktische Durchführung der Untersuchung mit interner und externer Qualitätskontrolle. So haben z. B. erste Untersuchungen gezeigt, dass Mikrodeletionen auch bei den unauffälligen Eltern der Probanden vorliegen können und daher nicht in jedem Fall klinisch relevant sein müssen (Ballif et al. 2000).

3. Ergebnisqualität

Dazu rechnen die medizinischen und gesellschaftlichen Konsequenzen, die sich aus diesen neuen diagnostischen Möglichkeiten ergeben.

Die zukünftige Entwicklung wird zeigen, ob diese methodische Revolution molekularzytogenetischer Diagnostik zugleich einen Fortschritt der molekularen Medizin bedeutet.

1.2.8 Literatur

- Allshire RC (1997) Centromeres, checkpoints and chromatid cohesion. *Curr Opin Genet Dev* 7:264–273
- Amon A (1999) The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 9:69–75
- Artandi SE, DePinho RA (2000) A critical role for the telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 10:39–46
- Assoian RK, Zhu X (1997) Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 9:93–98
- Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG (2000) FISHing for mechanisms of cytogenetically defined terminal deletions using chromosome-specific subtelomeric probes. *Eur J Hum Genet* 8:764–770
- Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG (2000) The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Hum Genet* 67:1356–1359
- Baner J, Nielsson M, Isaksson A, Mendel-Hartvig M, Antson D, Landegren U (2001) More keys to padlock probes: mechanisms for high-throughput nucleic acid analysis. *Curr Opin Biotechnol* 1:11–15
- Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG (1996) Good genes in bad neighbourhoods. *Nat Genet* 12:229–232
- Belmont AS, Dietzel S, Nye AC, Strukov YG, Tumber T (1999) Large-scale chromatin structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 11:307–311
- Ben-Porath I, Cedar H (2000) Imprinting: focusing on the center. *Curr Opin Genet Dev* 10:550–554
- Bernardi G (1989) The isochore organization of the human genome. *Annu Rev Genet* 23:637–661
- Biggins S, Murray AW (1998) Sister chromatid cohesion in mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 10:769–775
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M et al. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349–352
- Borsani G, Ballabio A, Banfi S (1998) A practical guide to orient yourself in the labyrinth of genome databases. *Hum Mol Genet* 7:1641–1648
- Brannan CI, Bartolomei MS (1999) Mechanisms of genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 9:164–170
- Bridger JA, Bickmore WA (1998) Putting the genome on the map. *Trends Genet* 14:403–409
- Brockdorff N (1998) The role of Xist in X-inactivation. *Curr Opin Genet Dev* 8:328–333
- Burke DJ (2000) Complexity in the spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 10:26–31
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J et al. (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392:300–303
- Cockell M, Gasser SM (1999) Nuclear compartments and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 9:199–205
- Craig JM, Bickmore WA (1993) Chromosome bands – flavours to savour. *Bioessays* 15:349–354
- Cremer T, Cremer C, Baumann H et al. (1982) Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet* 60:46–56
- deLange T (1995) Telomere dynamics and genome instability in human cancer. In: Blackburn EH, Greider CW (eds) *Telomeres*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor New York, pp 265–293
- Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM (1997) Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 99:755–760
- Digweed M, Reis A, Sperling K (1999) Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *Bioessays* 21:649–656
- Dobie K, Mehtali M, McClenaghan M, Lathe R (1997) Variegated gene expression in mice. *Trends Genet* 13:128–129
- Dobie KW, Hari KL, Maggert KA, Karpen GH (1999) Centromere proteins and chromosome inheritance: a complex affair. *Curr Opin Genet Dev* 9:206–217
- Downes CS, Clarke DJ, Mullinger AM, Giménez-Abián JF, Creighton AM, Johnson RT (1994) A topoisomerase II-

- dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature* 372:467–470
- Doxsey S (1998) The centrosome – a tiny organelle with big potential. *Nat Genet* 20:104–106
- Dreyfuss G, Struhl K (1999) Nucleus and gene expression. Multiprotein complexes, mechanistic connections and nuclear organization. *Curr Opin Cell Biol* 11:303–306
- Dutrillaux B, Aurias A, Couturier J, Croquette MF, Viegas-Pequignot E (1977) Multiple telomeric fusions and chain configurations in human somatic chromosomes. *Chromosomes Today* 6:37–44
- Earnshaw WC (1988) Mitotic chromosome structure. *Bioessays* 9:147–150
- Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, Soewarto D (1995) Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod* 10:2343–2349
- Engel E (1998) Uniparental disomies in unselected populations. *Am J Hum Genet* 63:962–966
- Feinberg AP (1998) Genomic imprinting and cancer. In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds) *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hill, New York, pp 95–108
- Festenstein R, Kioussis D (2000) Locus control regions and epigenetic chromatin modifiers. *Curr Opin Genet Dev* 10:199–203
- Field C, Li R, Oegema K (1999) Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr Opin Cell Biol* 11:68–80
- Fitzgerald PH, Archer SA, Morris CM (1986) Evidence for the repeated primary non-disjunction of chromosome 21 as a result of premature centromere division (PCD). *Hum Genet* 72:58–62
- Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ et al. (1995) The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132–139
- Furuno N, Elzen N den, Pines J (1999) Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* 147:295–306
- Ganten D, Ruckpaul K (2000) *Monogen bedingte Erbkrankheiten 2*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Ganten D, Ruckpaul K (2001) *Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Ganten D, Ruckpaul K (2002) *Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- German J, Ellis NA (1998) Bloom syndrome. In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds) *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hill, New York, pp 301–316
- Giménez-Abián JF, Clarke DJ, Mullinger AM, Downes CS, Johnson RT (1995) A postprophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes. *J Cell Biol* 131:7–17
- Gotoh E, Asakawa Y, Kosaka H (1995) Inhibition of protein serine/threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells. *Biomed Res Tokyo* 16:63–68
- Gottschling D, Berg BL (1998) Chromosome dynamics: yeast pulls it apart. *Curr Biol* 8:R76–R79
- Gropp A (1982) Value of an animal model for trisomy. *Virchows Arch* 395:117–131
- Gutmann DH, Collins FS (1998) Neurofibromatosis type I. In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds) *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hill, New York, pp 423–442
- Hagting A, Jackman M, Simpson K, Pines J (1999) Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* 9:680–689
- Hampl A, Eppig JJ (1995) Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development* 121:925–933
- Handeli S, Weintraub H (1992) The ts41 mutation in Chinese hamster cells leads to successive S phases in the absence of intervening G2, M, and G1. *Cell* 71:599–611
- Handyside AH, Delhanty JDA (1997) Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. *Trends Genet* 13:270–275
- Hansen RS, Stoger R, Wijmenga C et al. (2000) Escape from gene silencing in ICF syndrome: evidence for advanced replication time as a major determinant. *Hum Mol Genet* 9:2575–2587
- Happle R (1998) Manifestation genetischer Mosaik in der menschlichen Haut. In: Parthier B (Hrsg) *Jahrbuch 1997 der Deutschen Akademie der Naturforscher, Reihe 3, Jahrgang 43*. Leopoldina, Halle/Saale, S 307–334
- Hardwick KG (1998) The spindle checkpoint. *Trends Genet* 14:1–4
- Hart CM, Laemmli UK (1998) Facilitation of chromatin dynamics by SARs. *Curr Opin Genet Dev* 8:519–525
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585–621
- Heikinheimo O, Gibbons WE (1998) The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Mol Hum Reprod* 4:745–756
- Henderson E (1995) Telomere structure. In: Blackburn EH, Greider CW (eds) *Telomeres*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor New York, pp 11–34
- Hirao Y, Eppig JJ (1997) Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in strain LT mouse oocytes: participation of MOS. *Development* 124:5107–5113
- Holmquist GP (1992) Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am J Hum Genet* 51: 17–37
- Hunt PA, LeMaire R, Embury P et al (1995) Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis. *Hum Mol Genet* 4:2007–2012
- Hurst LD, McVean GT (1997) Growth effects of uniparental disomies and the conflict theory of genomic imprinting. *Trends Genet* 13:436–443
- Jessberger R, Frei C, Gasser SM (1998) Chromosome dynamics: the SMC protein family. *Curr Opin Genet Dev* 8:254–259
- Jiang Y, Tsai TE, Bressler J et al. (1998) Imprinting in Angelman and Prader-Willi syndromes. *Curr Opin Genet Dev* 8:334–342
- Kai R, Ohtsubo M, Sekiguchi M, Nishimoto T (1986) Molecular cloning of a human gene that regulates chromosome condensation and is essential for cell proliferation. *Mol Cell Biol* 6:2027–2032
- Kajii T, Kawai T, Takumi T et al. (1998) Mosaic variegated aneuploidy with multiple congenital abnormalities: homozygosity for total premature chromatid separation trait. *Am J Med Genet* 78:245–249
- Kaufmann WE, Reiss AL (1999) Molecular and cellular genetics of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 88:11–24
- Kelley RL, Kuroda MI (2000) The role of chromosomal RNA in making the X for dosage compensation. *Curr Opin Genet Dev* 10:555–561
- Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ (1998) Both Rb/p16^{INK4a} inactivation

- and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396:84–88
- Kleinjan D-J, Heyningen V van (1998) Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet* 7:1611–1618
- Knight SJL, Flint J (2000) Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37:401–409
- Koshland D, Strunnikov A (1996) Mitotic chromosome condensation. *Ann Rev Cell Dev Biol* 12:305–333
- Krek W, Nig EA (1991) Mutations of p34^{cdc2} phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34^{cdc2} kinase activation. *EMBO J* 10:3331–3341
- Lee JT, Jaenisch R (1997) The (epi)genetic control of mammalian X-chromosome inactivation. *Curr Opin Genet Dev* 7:274–280
- Lewin B (1990) Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell* 61:743–752
- Li Y, Benzra R (1996) Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* 274:246–248
- Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA et al. (1997) Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet* 5:137–148
- Look AT (1998) Genes altered by chromosomal translocations in leukemias and lymphomas. In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds) *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hill, New York, pp 109–142
- López Correa C, Brems H, Lázaro C, Marynen P, Legius E (2000) Unequal meiotic crossover: a frequent cause of *NF1* microdeletions. *Am J Hum Genet* 66:1969–1974
- Lupski JR (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14:417–422
- Lyon MF (1998) X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet* 80:133–137
- Manuelidis L (1990) A view of interphase chromosomes. *Science* 250:1533–1540
- Marshall WF, Fung JC, Sedat JW (1997) Deconstructing the nucleus: global architecture from local interactions. *Curr Opin Genet Dev* 7:259–263
- Matsuura S, Ito E, Tauchi H, Komatsu K, Ikeuchi T, Kajii T (2000) Chromosomal instability syndrome of premature chromatid separation with mosaic variegated aneuploidy is defective in mitotic-spindle checkpoint. *Am J Hum Genet* 67:483–486
- Mehes K (1978) Non-random centromere division: a mechanism of non-disjunction causing aneuploidy? *Hum Hered* 28:255–260
- Migeon BR (1994) X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences. *Trends Genet* 10:230–235
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F (1994) *Catalog of chromosome aberrations in cancer*, 5th edn. Wiley-Liss, New York
- Murray A (1999) A snip separates sisters. *Nature* 400:19–21
- Neitzel H, Kalscheuer V, Henschel S, Digweed M, Sperling K (1998) Beta-heterochromatin in mammals: evidence from studies in *Microtus agrestis* based on the extensive accumulation of L1 and non-L1 retroposons in the heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet* 80:165–172
- Neitzel H, Neumann LM, Schindler D, Wirges A, Tonnies H, Trimborn M, Krebsova A, Richter R, Sperling K (2002) Premature chromosome condensation in humans associated with microcephaly and mental retardation: a novel autosomal recessive condition. *Am J Hum Genet* 70:1015–1022
- Ng H-H, Bird A (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 9:158–163
- Nowell P, Rowley J, Knudson A (1998) Cancer genetics, cytogenetics – defining the enemy within. *Nat Med* 4:1107–1111
- Nurse P (1997) Checkpoint pathways come of age. *Cell* 91:865–867
- Obe G, Müller W-U (1999) Zytogenetik in der genetischen Toxikologie und Strahlenbiologie. *Med Genet* 11:373–377
- Ohi R, Gould KL (1999) Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 11:267–273
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247–257
- Pallen CJ, Tan YH, Guy GR (1992) Protein phosphatases in cell signalling. *Curr Opin Cell Biol* 4:1000–1007
- Pines J, Rieder CL (2001) Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 3:E3–E6
- Pratt Rossiter J, Young M, Kimberland ML et al. (1994) Factor VII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet* 3:1035–1039
- Price CM (1999) Telomeres and telomerase: broad effects on cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 9:218–224
- Renault L, Nassar N, Vetter I et al. (1998) The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature* 392:97–101
- Rieder CL, Salmon ED (1998) The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* 8:310–318
- Ropers H-H (1998) Die Erforschung des menschlichen Genoms: Ein Zwischenbericht. *Dtsch Ärztl Z* 95:A-663–A670
- Rudd NL, Teshima IE, Martin RH, Siskin JE, Weksberg R (1983) A dominantly inherited cytogenetic anomaly: a possible cell division mutant. *Hum Genet* 65:117–121
- Rudin CM, Thompson CB (1998) Apoptosis and cancer. In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds) *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hill, New York, pp 193–204
- Russo GL, Wilding M, Marino M, Dale B (1998) Ins and outs of meiosis in ascidians. *Semin Cell Dev Biol* 9:559–567
- Sagata N (1998) Introduction: meiotic maturation and arrest in animal oocytes. *Semin Cell Dev Biol* 9:535–537
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Harle M, Cremer T (1996) Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* 134:1109–1125
- Schmiady H, Sperling K, Kentenich H, Stauber M (1986) Prematurely condensed human sperm chromosomes after in vitro fertilization (IVF). *Hum Genet* 74:441–443
- Shackelford RE, Kaufman WK, Paules RS (1999) Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect [Suppl 1]* 107:5–24
- Sleutels F, Barlow DP, Lyle R (2000) The uniqueness of the imprinting mechanism. *Curr Opin Genet Dev* 10:229–233
- Smit AF (1996) The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr Opin Genet Dev* 6:743–748
- Snijders AM, Hindle R, Seagraves S et al. (2000) Quantitative DNA copy number analysis across the human genome with ~ 1 megabase resolution using array CGH. *Am J Hum Genet [Suppl 2]* 67:31
- Solomon MJ, Glotzer M, Lee TH, Philippe M, Kirschner W (1990) Cyclin Activation of p34^{cdc2}. *Cell* 63:1013–1024
- Sperling K (1982) Cell cycle and chromosome cycle: morphological and functional aspects. In: Rao PN, Johnson

- RT, Sperling K (eds) Premature chromosome condensation. Application to basic, clinical, and mutation research. Academic Press, New York, pp 43–78
- Sperling K (1990) The DNase I-nick translation technique: a cytogenetic approach to map active chromatin. In: Sharma T (ed) Trends in chromosome research. Narosa Publishing House, New Delhi, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 251–264
- Sperling K (1999a) Die Genkarte des Menschen: Grundlage einer molekularen Anatomie. In: Parthier B (Hrsg) Jahrbuch 1998 der Deutsche Akademie der Naturforscher, Reihe 3, Jahrgang 45. Leopoldina, Halle/Saale, S 431–447
- Sperling K (1999b) Das humane Genomprojekt. In: Niemitz C, Niemitz S (Hrsg) Genforschung und Gentechnik – Ängste und Hoffnungen. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 109–133
- Sperling K, Obe G (1977) Chromosomen und Zellzyklus. In: Linner G (Hrsg) Cytogenetisches Praktikum. Fischer, Stuttgart, S 155–170
- Sperling K, Rao PN (1974) The phenomenon of premature chromosome condensation: its relevance to basic and applied research. Humangenetik 23:235–258
- Sperling K, Wegner R-D (1995) Ätiologie und Pathogenese chromosomal bedingter embryofetaler Fehlbildungen und Spontanaborte. In: Schneider J, Weitzel H (Hrsg) Pränatale Diagnostik und Therapie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S 47–86
- Sperling K, Neitzel H, Wegner R-D (1997) Der Einsatz der Zytogenetik in der Pränataldiagnostik unter qualitätssicherndem Aspekt. In: Arndt D, Obe G (Hrsg) Qualitätssicherung in der Zyto- und Molekulargenetik. Robert-Koch-Institut Schriften (RKI) 1/97. MMV Medizin Verlag, München
- Sperling K, Digweed M, Stumm M, Wegner RD, Reis A (1998) Chromosomeninstabilität, Strahlenempfindlichkeit und Krebs: Ataxia-telangiectasia und das Nijmegen Breakage Syndrom. Med Genet 10:274–277
- Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH (1996) Aneuploidy in human sperm: the use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction. Am J Hum Genet 58:356–362
- Stengel-Rutkowski S, Stene J, Gallano P (1988) Risk estimates in balanced parental reciprocal translocations. Monographie des Annales de Génétique. Exp Sci Franc Ed, Paris
- Stewart ZA, Leach SD, Pietenpol JA (1999) p21 (Waf1/Cip1) inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreplication after mitotic spindle disruption. Mol Cell Biol 19:205–215
- Stillman B (1996) Cell cycle control of DNA replication. Science 274:1659–1664
- Strain L, Warner JP, Johnston T, Bonthron DT (1995) A human parthenogenetic chimaera. Nat Genet 11:164–169
- Sullivan BA, Jenkins LS, Karson EM, Leana-Cox J, Schwartz S (1996) Evidence of structural heterogeneity from molecular cytogenetic analysis of dicentric Robertsonian translocations. Am J Hum Genet 59:167–175
- Surani MA (1995) Parthogenesis in man. Nat Genet 11:111–113
- Takahashi T, Haruki N, Nomoto S, Masuda A, Saji S, Osada H (1999) Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hSMAD2 and p55CDC, in human lung cancers. Oncogene 18:4295–4300
- Takizawa CG, Morgan DO (2000) Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. Curr Opin Cell Biol 12:658–665
- Therman E, Kuhn EM (1976) Cytological demonstration of mitotic crossing-over in man. Cytogenet Cell Genet 17:254–267
- Therman E, Kuhn EM (1981) Mitotic crossing-over and segregation in man. Hum Genet 59:93–100
- Therman E, Kuhn EM (1989) Mitotic modifications and aberrations in cancer. Crit Rev Oncog 1:293–305
- Trost D, Wiebe W, Uhlhaas S, Schwindt P, Schwanitz G (2000) Investigation of meiotic rearrangements in DGS/VCFS patients with a microdeletion 22q11.2. J Med Genet 37:452–454
- Tucker JD, Auletta A, Cimino MC et al. (1993) Sister-chromatid exchange: second report of the gene-tox program. Mutat Res 297:101–180
- Tyers M, Jorgensen P (2000) Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. Curr Opin Genet Dev 10:54–64
- Van Den Berg DJ, Francke U (1993) Roberts syndrome: a review of 100 cases and a new rating system for severity. Am J Med Genet 47:1104–1123
- Van Steensel B, Smogorzewska A, Lange T de (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. Cell 92:401–413
- Varley H, Di S, Scherer SW, Royle NJ (2000) Characterization of terminal deletions at 7q32 and 22q13.3 healed by de novo telomere addition. Am J Hum Genet 67:610–622
- Von der Haar B, Sperling K, Gregor D (1981) Maturing *Xenopus* oocytes induce chromosome condensation in somatic plant nuclei. Exp Cell Res 134:477–481
- Wallrath LL (1998) Unfolding the mysteries of heterochromatin. Curr Opin Gen Dev 8:147–153
- Watanabe Y, Nurse P (1999) Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. Nature 400:461–464
- Weinert T (1998a) DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. Cell 94:555–558
- Weinert T (1998b) DNA damage checkpoints update: getting molecular. Curr Opin Gen Dev 8:185–193
- Wilda M, Demuth I, Concannon P, Sperling K, Hameister H (2000) Expression pattern of the Nijmegen breakage syndrome, NBS, gene during murine development. Hum Mol Genet 9:1739–1744
- Wolf U (1995) The molecular genetics of human sex determination. J Mol Med 73:325–331
- Wolf DA, Jackson PK (1998) Cell cycle: oiling the gears of anaphase. Curr Biol 8:R636–R639
- Wright CVE (1991) Vertebrate homeobox genes. Curr Opin Cell Biol 3:976–982
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D et al. (1999) Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. Nature 402:187–191
- Zachariae W (1999) Progression into and out of mitosis. Curr Opin Cell Biol 11:708–716
- Zhang P (1999) The cell cycle and development: redundant roles of cell cycle regulators. Curr Opin Cell Biol 11:655–662
- Zink D, Cremer T (1998) Cell nucleus: chromosome dynamics in nuclei of living cells. Curr Biol 8:R321–R324