

Aus der Charité, Centrum 17  
Institut für Humangenetik  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Karl Sperling

## HABILITATIONSSCHRIFT

# **Molekularzytogenetische Charakterisierung konstitutiver und somatischer chromosomaler Imbalancen**

zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach Humangenetik

vorgelegt dem Fakultätsrat  
der Medizinischen Fakultät Charité  
Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. rer. nat. Holger Tönnies  
geboren am 01.08.1965 in Twistringen

eingereicht: April 2007

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 11.02.2008

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Fonatsch

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Siebert

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b>	1
1.1 Grundlagen der Chromosomenphysiologie	1
1.2 DNA-Reparatur	4
1.3 Chromosomenaberrationen	5
1.4 Chromosomenaberrationen in der Tumorgenetik	11
1.5 Genetische Instabilität	13
1.6 Chromosomeninstabilitätssyndrome	14
1.7 Methodische Aspekte zur molekularzytogenetischen Charakterisierung chromosomaler Imbalancen	18
1.8 Zielstellungen der Arbeit	23
<b>2. EIGENE ARBEITEN</b>	24
2.1 CGH-basierte Analyse chromosomaler Imbalancen	24
2.1.1 Analyse chromosomaler Imbalancen bei diploidem Chromosomensatz	25
2.1.2 Analyse euchromatischer Imbalancen bei überzähligem Markerchromosom	30
2.2 CGH-basierte Analyse chromosomaler Imbalancen in sporadischen Tumoren	34
2.2.1 Analyse charakteristischer chromosomaler Imbalancen verschiedener Tumorentitäten und deren Bedeutung für die Tumorklassifikation	35
2.2.2 Analyse der Assoziation genomischer Imbalancen mit Therapeutika- und Thermoresistenz	38
2.3 Charakterisierung und Bedeutung genomischer Imbalancen am Beispiel des Chromosomeninstabilitätssyndroms Fanconi Anämie	46
<b>3. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	47
<b>4. LITERATURVERZEICHNIS</b>	49
<b>5. DANKSAGUNG</b>	60
<b>6. ERKLÄRUNG</b>	61

## Abkürzungsverzeichnis

aDNA	Alte DNA
AML	Akute myeloische Leukämie
BAC	„bacterial artificial chromosome“
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
cenM-FISH	Zentromerische Multicolour-FISH
CENP	Zentromerisches Protein
CGH	„Comparative Genomic Hybridization“
CIN	„chromosomal instability“
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CNA	„copy number aberration“
CNV	„copy number variations“
CTCL	Kutaner T-Zell Lymphom
DM	„double minutes“
DOP	Degenerierte Oligonukleotid-Primer
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G-Banden	Giemsa-Banden
HR	Homologe Rekombination
HSR	„homogeneously staining region“
I-FISH	Interphase-FISH
KMD	Direkt präparierte Knochenmarkzellen
LCR	„low copy repeat“
LINES	„long interspersed nucleotide elements“
mar	Markerchromosom
MCB	„multicolour banding“
MDR	„multi drug resistance“
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
M-FISH	„multicolour-FISH“
MIN	„microsatellite instability“
MMR	Mismatch-Reparatur
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NAHR	Nicht-allelische homologe Rekombination
neo	Neozentromer
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NET	Neuroendokriner Tumor
NHEJ	„non-homologous end joining“
NIN	„nucleotide instability“
PBD	Direkt präparierte Zellen des peripheren Blutes
PEV	„position effect variegation“
R-Banden	Reverse-Banden
SCE	Schwesterchromatidaustausch
SINES	„short interspersed nucleotide elements“
SKY	„spectral karyotyping“
sSMC	„small supernumerary marker chromosome“
UPD	Uniparentale Disomie
WCP	„whole chromosome painting“
YAC	„yeast artificial chromosome“

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Grundlagen der Chromosomenphysiologie

Die Entwicklung der Mikroskopie, beginnend Ende des 16. / Anfang des 17. Jahrhunderts, unterstreicht, wie methodischer Fortschritt den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn bestimmt. Dank der Lichtmikroskopie konnten der Botaniker (und Rechtsanwalt) Schleiden und der Anatom Schwann 1838/39 die Zelltheorie begründen und damit den einheitlichen Aufbau von Tieren und Pflanzen, einschließlich des Menschen aus einzelnen Bausteinen, den Zellen, postulieren (Schleiden 1838; Schwann 1839). Hinsichtlich ihrer Erklärung, wie es zur Bildung neuer Zellen kommt, irrten sie sich jedoch grundlegend und haben auch die damals verbreitete Vorstellung einer Urzeugung nicht ausgeschlossen. In seinem berühmten Aphorismus von 1858 stellte Virchow indes klar: "Omnis cellula e cellula" und legt mit seinem Hauptwerk der "Cellularpathologie" die Grundlage für die moderne naturwissenschaftliche Medizin (Virchow 1858; Virchow 1858).

Durch Zellteilung entstehen aus einer Zelle zwei Tochterzellen. Es dauerte aber noch bis 1875, bis der Botaniker Strasburger und der Zoologe Bütschli den vollständigen Ablauf der Kernteilung (Mitose) beschrieben und weitere 10 Jahre bis zur Feststellung Rabls, dass die hierbei beobachteten Chromosomen offensichtlich für jede Art konstant sind (Strasburger 1875; Bütschli 1876; Rabl 1885). Die mitotische Teilung macht daher verständlich, weshalb praktisch alle Körperzellen die gleiche Anzahl von Chromosomen und damit auch von Erbanlagen aufweisen.

In diese Zeit hinein fällt auch die zutreffende Beschreibung des Befruchtungsvorganges durch O. Hertwig, wonach sich der Eikern und der aus dem Kopf des eingedrungenen Spermiums gebildete Kern zu einem neuen Kern vereinigen (Hertwig 1876). Am Beginn der Entwicklung eines jeden Individuums steht danach die kernhaltige Zygote, im Gegensatz zu Haeckels Annahme, dass es sich bei dem Ei um eine kernlose "Monerula" handle. Unklar blieb, weshalb es nicht mit jeder neuen Generation zu einer Verdoppelung des Kernmaterials, der Chromosomen, kommt. Die Antwort lieferten E. van Beneden und T. Boveri mit dem Nachweis der Reduktionsteilung (Meiose) (Beneden van and Neyt 1887; Boveri 1888). Als deren Folge weisen die Keimzellen nur einen einfachen, haploiden Chromosomensatz ( $n$ ) auf, die Körperzellen hingegen einen doppelten, diploiden Chromosomensatz ( $2n$ ). Nach Wiederentdeckung der Mendelschen Regel stellten Sutton (1902) und Boveri (1904) erleuchtend fest, dass die im Kreuzungsexperiment erschlossene Weitergabe der Erbanlagen ihr sichtbares cytologisches Korrelat im Verhalten der

Chromosomen bei Meiose und Befruchtung haben und begründeten damit die Chromosomentheorie der Vererbung (Übersicht siehe Cremer 1985). Damit ist, entgegen manchem Vorurteil, zugleich belegt, dass die Zytogenetik keine rein deskriptive Disziplin ist, da sie auf einem höheren Niveau biologischer Organisation als der DNA entscheidende biologisch-medizinische Sachverhalte in einem logischen Zusammenhang darzustellen vermag. Heute kommt hinzu, dass sie durch ihren neuen Zweig, die molekulare Zytogenetik, unmittelbar Anschluss an die molekulare Genetik und damit auch die molekulare Medizin gefunden hat. 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. Darüber hinaus hat die Zuordnung der verschiedenen Gene und nicht-kodierender Abschnitte zu den chromosomalen Bereichen, die sich mittels der Chromosomenbänderungstechniken unterscheiden lassen, zudem eine funktionelle Gliederung der Chromosomen belegt, die von grundsätzlicher medizinischer Relevanz ist (Übersicht: Sperling and Neitzel 2003).

Mittels der G-Bänderung lassen sich, z.B. an Prometaphasechromosomen, bis zu 850 dunkle (G-Banden) und helle (R-Banden) Chromosomenbanden pro haploidem Chromosomensatz unterscheiden. Dabei weisen die G-Banden eine geringe Dichte von Genen auf, die gewebs- und entwicklungspezifisch reguliert werden. Die R-Banden zeigen einen höheren Gengehalt, wobei auch die sog. „house keeping genes“ eingeschlossen sind, die den Grundmetabolismus der Zellen steuern und praktisch in jedem Gewebe exprimiert werden (Abb. 1).



Abb. 1: Molekulare und genetische Organisation der menschlichen Chromosomen. Die chromosomalen Banden unterscheiden sich neben dem GC-Gehalt auch in der relativen Anzahl der Gene sowie deren Hauptfunktionen. In G-Banden befinden sich längere, etwa 1000bp lange repetitive Elemente (LINES, „long interspersed nucleotide elements“), während in T- und R-Banden hauptsächlich die nur 300bp langen SINES („short interspersed nucleotide elements“) vorliegen.

Neben dem Gengehalt unterscheiden sich die G- und R-Banden zudem im GC-Gehalt sowie in den vorherrschenden repetitiven Elementen (Abb.1). In den chromosomenendständigen Bereichen, den T-Banden, ist die Gendichte am höchsten. Das C-Banden positive Material, welches mittels der C-Bänderung vorwiegend im Bereich der Zentromere nachweisbar ist, besteht aus repetitiven Satelliten-DNAs und wird als genleer angesehen (Holmquist 1992).

Die funktionelle Gliederung der Chromosomen ist auch aus klinischer Sicht von Bedeutung, da eine Imbalance von R-Bandenmaterial größere Auswirkungen hat, als die von G-Banden. Mengenveränderungen des C-Bandenmaterials, sog. chromosomale Heteromorphismen, haben nach heutigem Wissensstand keine klinische Relevanz.

Die Darstellung von Metaphasechromosomen setzt das Vorliegen proliferierender Zellen voraus. Im gesamten Zellzyklus dauert die Mitose etwa eine Stunde. Während der Interphase (G<sub>1</sub>-Phase, S-Phase und G<sub>2</sub> Phase) hingegen liegen die Chromosomen „dekondensiert“ vor. Sie nehmen distinkte Territorien im Interphasekern ein, deren Fläche (Volumen) allerdings kaum über der von Metaphasechromosomen liegt (z. B. Lemke et al. 2002).

Der ordnungsgemäße Zellzyklusablauf wird von verschiedenen Kontrollmechanismen („checkpoints“) überwacht, die direkt mit den Regulatoren des Zellzyklus kooperieren (Übersichten: Pihan and Doxsey 2003; Lengauer 2005). Mutationen in den zugrunde liegenden Genen, insbesondere denen, die Spindel, Zentrosom und Kinetochor betreffen, aber auch die Cohesine, können chromosomale Fehlverteilungen und damit Aneuploidien hervorrufen (Abb. 2).

Als ein Beispiel für einen Cohesionsdefekt sei hier die autosomal rezessive „mosaic variegated aneuploidy“ mit Tumorprädisposition angeführt. Dies ist eine Krankheit, die auf Mutationen im *BUB1B*-Gen basiert, welches spezifische Aufgaben im Spindel-Checkpoint sowie in der Schwesterchromatidcohesion wahrnimmt. Die betroffenen Patienten zeigen in ihren somatischen Zellen gehäuft Mosaike chromosomaler Aneuploidien und haben ein erhöhtes Risiko für Tumoren, wie Rhabdomyosarkome, Wilms Tumoren und Leukämien (Hanks et al. 2004).

Die Checkpoint-Kontrollen der Interphase sprechen auf das Vorliegen von DNA-Läsionen an. Die DNA wird, im Gegensatz zu anderen Molekülen der Zelle, nach einer Schädigung nicht eliminiert sondern repariert, was generell mit der Arretierung des Zellzyklus einhergeht.

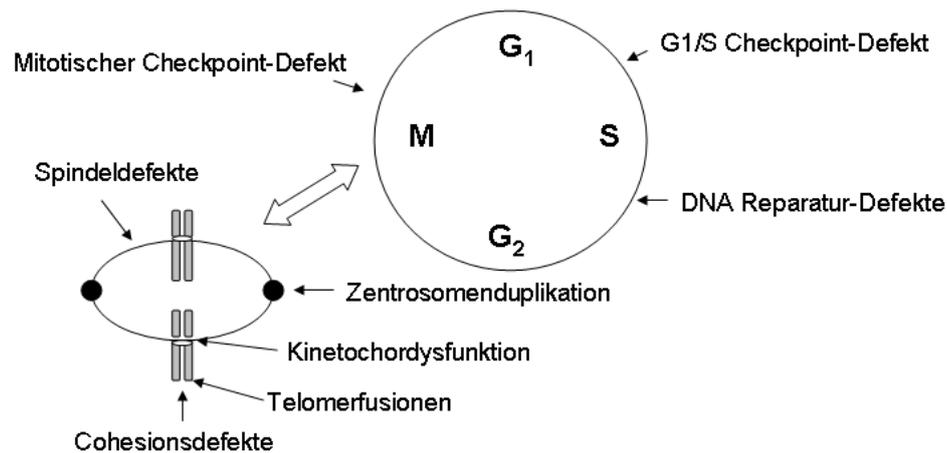


Abb. 2: Schematische Darstellung einiger für Aneuploidien verantwortlicher Defekte. Multipolare Mitosespindeln und Chromosomenfehlverteilungen können durch eine fehlerhafte Zentrosomenzahl bedingt sein. Cohesionsdefekte führen durch vorzeitige Schwesterchromatidtrennung ebenso zu Chromosomenfehlverteilungen, wie eine fehlerhafte Bindung von Spindelfasern beider Pole an das Kinetochor. Zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus können zusätzlich „checkpoint“- und DNA-Reparatur-Defekte das Aneuploidierisiko erhöhen.

## 1.2 DNA-Reparatur

Der DNA-Reparatur kommt aufgrund der vielfältigen endogen und exogen bedingten Schädigungen der DNA eine sehr große Bedeutung zu. Die DNA-Reparaturmechanismen sind demgemäß evolutionär hoch konserviert (Jefford and Irminger-Finger 2006). Sie lassen sich grob in drei verschiedene Kategorien einteilen (Hoeijmakers 2001). Mittels Exzisions-Reparatur werden defekte Basen (Basen-Exzisions-Reparatur; BER) bzw. Nukleotide (Nukleotid-Exzisions-Reparatur; NER) unter Verwendung des intakten komplementären Stranges als Matrize ersetzt. Die Mismatch-Reparatur (MMR) hingegen korrigiert unter Zuhilfenahme des intakten parentalen Stranges als Vorlage Fehler, die bei der DNA-Replikation auftreten. Mutationen in den Mismatch-Reparatur-Genen führen zu einer so genannten Mikrosatelliten-Instabilität (MSI), die beispielhaft bei Patienten mit hereditärem kolorektalem Karzinom ohne Polyposis (HNPCC) beschrieben wurde (Thibodeau et al. 1993; Aaltonen et al. 1994). Zur DNA-Doppelstrangbruchreparatur und zur Reparatur von DNA-Strangvernetzungen („cross-links“) besitzen eukaryotische Zellen zwei verschiedene Rekombinations-Reparaturmechanismen (Hoeijmakers 2001). Bei der homologen Rekombination (HR) wird der homologe Chromosomenabschnitt der Schwesterchromatide als Matrize zur Reparatur herangezogen, wodurch dieser auf die S- und G<sub>2</sub>-Phase beschränkte Mechanismus weitgehend fehlerfrei abläuft. Von größerer

Bedeutung beim Menschen ist die Reparatur auch mittels „non-homologous end joining“ (NHEJ), wobei es regelmäßig zum Verlust von Basen kommt. Als Folge eines fehleranfälligen NHEJ zwischen unterschiedlichen Chromosomen kann es zu tumorrelevanten somatischen Chromosomenveränderungen kommen (Aten et al. 2004), die in der nachfolgenden Mitose als Chromosomenaberration (z.B. unbalancierte Translokation) erkennbar werden.

DNA-Schädigungen müssen jedoch vor der Einleitung der Reparaturprozesse zunächst erkannt werden. Hierzu dienen sog. „Sensor-Proteine“ (Weinert 1998). Diese aktivieren „Transducer-Proteine“, die die eigentlichen „Effektor-Proteine“ steuern. Zu diesen „Effektor-Proteinen“ zählen neben den eigentlichen DNA-Reparaturproteinen auch die Proteine, die die Arretierung des Zellzyklus bewirken. Nach Kinzler und Vogelstein gehören diese Proteine der Gruppe der „caretaker“ an (Kinzler and Vogelstein 1997). Ihre biallelische Inaktivierung führt zu genomischer Instabilität infolge fehlerhafter bzw. ausbleibender DNA-Reparatur und somit zu einer Akkumulation möglicher tumorauslösender Mutationen.

Zu den „gatekeeper“-Genen zählt die Mehrzahl der Tumorsuppressorgene, die z.B. die Zellteilung regulieren und bei besonders schwerer Schädigung des Genoms den Zelltod durch Apoptose einleiten. Tumorsuppressorgene kodieren für negative Regulatoren der Zellproliferation und wirken rezessiv (Übersicht siehe Weinberg 1994). Die in Tumorzellen häufig beobachtbare Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch „loss of function“-Mutationen kann über einen Funktionsverlust beider Allele (Knudson 1971), z.B. durch Deletionen und Genmutationen, oder auch durch funktionelle Inaktivierung mittels Promotormethylierung bedingt sein. Protoonkogene, die ebenfalls den „gatekeepern“ zugeordnet werden können, regulieren oftmals die Zellproliferation positiv. Ihre Mutationen, in der Regel „gain of function“-Mutationen, wirken sich dominant aus.

### **1.3 Chromosomenaberrationen**

Chromosomenaberrationen können in numerische und strukturelle Aberrationen unterschieden werden (Abb. 3). Etwa 8% aller klinisch erkannten Schwangerschaften zeigen zytogenetisch erkennbare numerische (7%) bzw. strukturelle (1%) Veränderungen (Templado et al. 2005). Zahlenmäßig sind Aneuploidien ebenfalls die häufigste Ursache aller Chromosomenanomalien bei Neugeborenen (Tabelle 1).

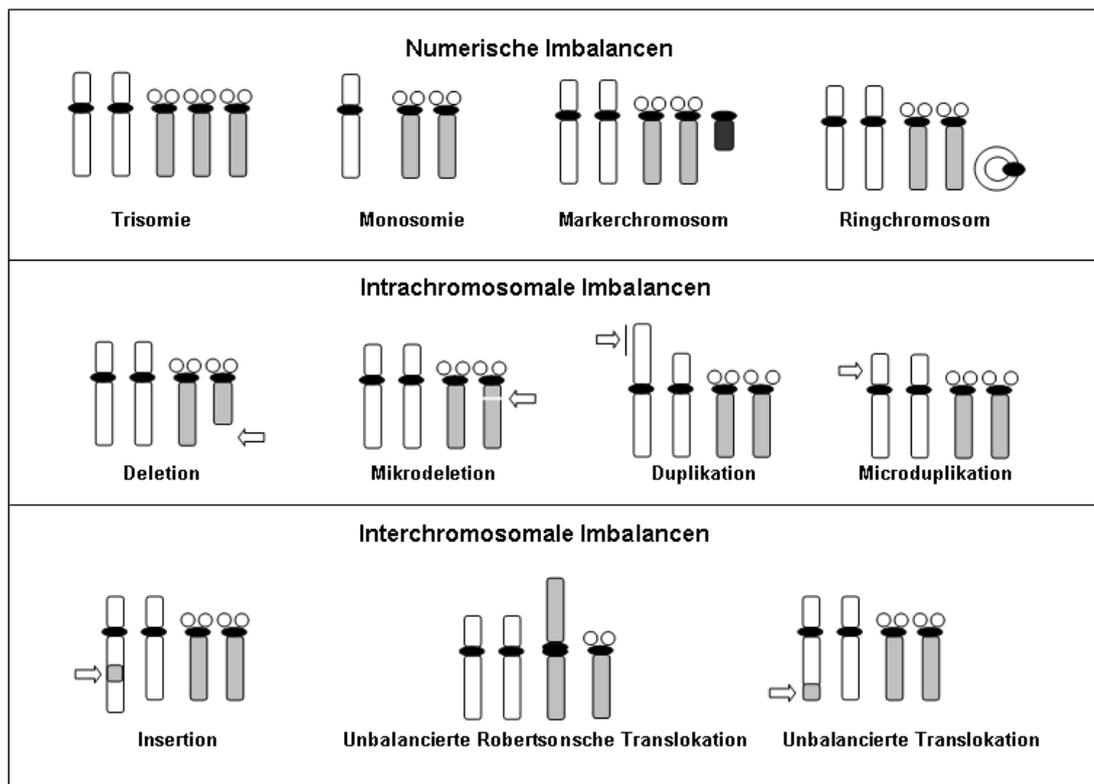


Abb. 3: Schematische Darstellung verschiedener Chromosomenaberrationen, die chromosomale Imbalancen hervorrufen (Erläuterungen siehe Text).

Hierbei dominieren in ihrer Gesamtheit die gonosomalen Anomalien. Nur eine Monosomie, die XO-Konstitution, ist mit dem Leben vereinbar. Unter den autosomalen Trisomien finden sich nur solche der Chromosomen 13, 18 und 21 unter Neugeborenen. Diese Elemente weisen auch zugleich die geringste Zahl an Genen auf. Wie vor allem molekularzytogenetische Studien zeigen (Delhanty 1997), liegt beim Menschen zum Zeitpunkt der Befruchtung eine wesentlich höhere Zahl aneuploider Chromosomensätze vor. Diese gehen überwiegend auf ein „non-disjunction“ in der Oogenese zurück. Nach Angell kommt ein weiterer Mechanismus hinzu, der auf der frühzeitigen Trennung der Schwesterchromatiden mit nachfolgender Chromatidfehlverteilung in der Meiose I beruht (Angell 1997). Das häufige Auftreten all dieser Fehlverteilungen spricht dafür, dass die Checkpoint-Kontrolle zur Erkennung dieser Schäden in den Reifeteilungen der Oozyten und den ersten Furchungsteilungen noch nicht wirkt (Handyside and Delhanty 1997). Ausdruck davon sind auch die große Anzahl von Mosaiken unter Blastomeren (Baart et al. 2006).

Tabelle 1: Häufigkeiten verschiedener Chromosomenanomalien bei Neugeborenen (aus Gardner und Sutherland, 2003)

Definition	o/oo	Gesamt o/oo
<b>Chromosomenveränderungen (unbalanciert)</b>		
Autosomale Trisomien		
13	0,08	} 1,4
18	0,15	
21	1,2	
Triploidien		0,02
Gonosomale Aneuploidien (m)		
XXY	1,2	} 2,5
XYY	1,2	
Andere	0,15	
Gonosomale Aneuploidien (w)		
X0 und X0/XX	0,3	} 1,4
XXX	1,1	
Unbalancierte strukturelle Veränderungen (2n=46)		0,3
Zusätzliche strukturell veränderte Chromosomen (2n=47)		0,4
Unbalancierte Imbalancen (sex matched)		4 (1 auf 250)
<b>Strukturelle Veränderungen (balanciert)</b>		
rcp	2,5	} 4,3
rob	1,0	
inv (perizentrisch)	0,8	
Insgesamt		8,3 (1 auf 120)

Liegt in der befruchteten Zygote eine Trisomie oder eine Monosomie vor, können in den nächsten Zellteilungen sog. „rescue“ Mechanismen einsetzen und zu einer uniparentalen Disomie (UPD) führen. Es kann durch sekundären Verlust eines überzähligen Chromosoms eine Disomie, bzw. durch „non-disjunction“ oder Reduplikation aus einer monosomen Zelle eine disome entstehen (Übersicht: Gardner and Sutherland 2003). Dabei können uniparentale (Hetero-) Disomien (z.B. bei „trisomy rescue“) oder auch parentale Isodisomien (z.B. bei „monosomy rescue“) entstehen (Engel 1998). Da die Expression einer Reihe von Genen von der elterlichen Herkunft abhängt, kann eine uniparentale Disomie auch krankheitsrelevant sein. So führt eine uniparentale maternale Disomie des Chromosom 15 zum Prader-Willi-Syndrom, eine paternale zum Angelman-Syndrom (Brannan and Bartolomei 1999) Abb. 4B).

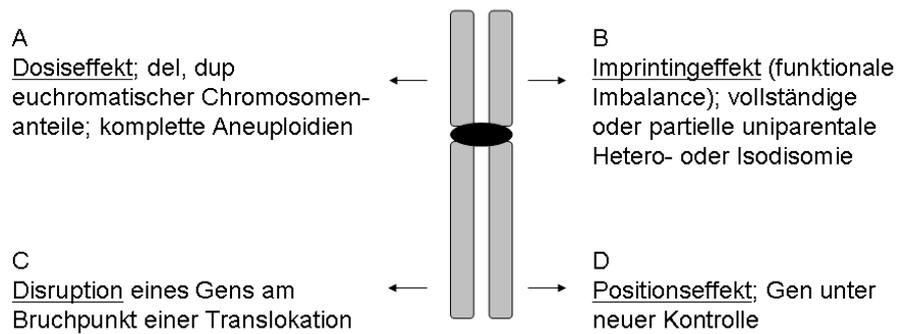


Abb. 4: Zusammenstellung verschiedener grundlegender, durch Chromosomenveränderungen hervorgerufener, Effekte.

Die strukturellen Chromosomenveränderungen beim Menschen lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Zum einen in die Gruppe der recht häufigen balancierten strukturellen Veränderungen, wie reziproke Translokationen, Robertsonsche Translokationen und Inversionen (Tabelle 1). Dem gegenüber stehen die unbalancierten Veränderungen, wie unbalancierte Translokationen, Duplikationen, Deletionen, Insertionen sowie überzählige Marker- und Ringchromosomen (Tabelle 1; Abb. 3).

Den strukturellen Chromosomenaberrationen liegen verschiedene Entstehungsmechanismen zugrunde. Reziproke Translokationen setzen eine Lagebeziehung der Chromosomen voraus und können zwischen allen menschlichen Chromosomen eintreten. Die Häufigkeit ihrer *de novo* Entstehung in der Keimbahn wurde von Jacobs mit  $1,6 \times 10^{-4}$  ermittelt (Jacobs 1981). Sie gehen auf eine illegitime meiotische Rekombination zweier nicht homologer Chromosomen zurück. Kommt es zu einer illegitimen Rekombination innerhalb eines Chromosoms, so kann die Folge eine Inversion sein. Die hierbei beteiligten Segmente können sog. „duplicons“ mit hoher Homologie sein, die derartige illegitime Rekombinationsereignisse begünstigen (Peoples et al. 2000). Zusätzlich scheinen auch palindromische AT-reiche Sequenzen die Häufigkeit von Translokationsereignissen zu erhöhen (Kurahashi et al. 2003). Die Entstehung der häufigeren Robertsonschen Translokationen, also der „Fusion“ zweier akrozentrischer Chromosomen, sind offenbar ebenfalls auf repetitive Sequenzen, die in diesem Fall invertiert vorliegen, zurückzuführen (Sullivan et al. 1996). Während es bei Robertsonschen Translokationen zu keinem nennenswerten Genverlust kommt, zeigen 6% aller Träger von reziproken *de novo* Translokationen kongenitale Auffälligkeiten. Diese können sowohl durch das Vorliegen submikroskopischer Deletionen, als auch durch direkte Disruption eines Gens bedingt sein

(Abb. 4A+C). Ebenso kann die Bruchstelle nicht das Gen selbst, sondern dessen regulatorische Sequenzen zerstören, oder aber ein Gen kann aufgrund der Translokation unter Kontrolle eines anderen Promotors geraten und somit einer aberranten Expression unterliegen (Abb. 4D). Derartige Translokationen als Folge illegitimer mitotischer Rekombination spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese.

Neuere Daten zeigen, dass strukturelle Chromosomenaberrationen offenbar häufiger in der männlichen Keimbahn *de novo* entstehen (Shaffer and Lupski 2000; Thomas et al. 2006b), während die meisten konstitutiven Aneuploidien auf maternale Meiose I-Fehlverteilungen zurückzuführen sind (Hassold and Hunt 2001; Pellestor et al. 2006).

Träger balancierter Translokationen haben aufgrund der verschiedenen möglichen meiotischen Segregationsarten bei der Gametenbildung (alternierende Segregation, Adjacent-Segregation, 3:1-Segregation) ein erhöhtes Risiko für die Entstehung unbalancierter Keimzellen. Abhängig von den betroffenen Chromosomen und der Lage der Bruchpunkte ergeben sich verschiedene Risiken für die Geburt von Nachkommen mit unbalanciertem Chromosomensatz (geringe Imbalance) bzw. einen frühen Abort (große Imbalance).

Konventionell-zytogenetisch sichtbare Duplikationen, Deletionen und Insertionen sind unter Neugeborenen selten (Tabelle 1). Sie entstehen durch ungleiches „cross-over“ zwischen Schwesterchromatiden bzw. homologen Chromosomen.

Eine besondere Gruppe stellen die sog. Mikrodeletionen und Mikroduplikationen dar. Diese sind aufgrund ihrer geringen Größe nur mittels molekularzytogenetischer bzw. molekulargenetischer Techniken darstellbar (Tonnie 2002). Kommt es bei der Entstehung der Imbalance zum Verlust mehrerer Gene, spricht man von einem „contiguous gene syndrome“ (Übersichten Emanuel and Shaikh 2001; Tonnie 2005). Sie entstehen ebenfalls aufgrund ungleicher „cross-over“ (nicht-allelische homologe Rekombination, NAHR). Diese findet zwischen repetitiven Elementen, den so genannten „low copy repeats“ (LCR), statt (Lupski 1998; Stankiewicz and Lupski 2002). In den LCR selbst liegen Signalstrukturen vor, die bei der Rekombination eine wichtige Rolle spielen (Lander et al. 2001; Bailey et al. 2002; Lupski and Stankiewicz 2005; Thomas et al. 2006a).

Subtelomerische Imbalancen finden sich bei bis zu 10% aller Kinder mit idiopathischer mentaler Retardierung (Knight and Flint 2000). Sie gehen auf Rekombinationen zwischen repetitiven Sequenzen im Bereich der Subtelomere nicht-homologer Chromosomen zurück (Flint et al. 1995).

Diese chromosomalen Imbalancen mit klinischem Phänotyp sind abzugrenzen von solchen, die offenbar auch bei unauffälligem Phänotyp vorliegen können und teilweise schon bei lichtmikroskopischer Auflösung nachweisbar sind. Diese euchromatischen Varianten können durchaus mehrere Gene umfassen (Barber 2005; Barber et al. 2005; Barber et al. 2007).

Durch neuere hochauflösende CHIP-basierende Analysemethoden werden heute zusätzlich so genannte „copy number variants“ (CNV) (Carter 2004; Iafrate et al. 2004; Lee 2005; Lupski and Stankiewicz 2005; Cho et al. 2006; Conrad et al. 2006; Hinds et al. 2006; McCarroll et al. 2006; Shaffer et al. 2006) nachgewiesen, die offenbar ebenfalls keine direkten pathogenetischen Auswirkungen haben. Diese zeigen eine Größe von 1kb und darüber und repräsentieren nach vorsichtigen Schätzungen bis zu 12% des gesamten menschlichen Genoms (Cho et al. 2006). Ihre genaue Bedeutung ist jedoch noch weitgehend ungeklärt (Lupski and Stankiewicz 2005; Shaffer et al. 2006).

Telomerische Deletionen liegen der Entstehung von Ringchromosomen zugrunde. Häufig liegen kleine Ringchromosomen auch überzählig vor. Diese können aufgrund von Schwesterchromatidaustauschen (SCE) dizentrisch und damit instabil werden (Henegariu et al. 1997). Folge davon ist ein sekundärer Verlust des überzähligen Chromosoms während postzygotischer Teilungen und Mosaizismus (Chen et al. 1995).

Ringchromosomen und kleine überzählige aberrante Chromosomen können auch als Markerchromosomen vorliegen. Definitionsgemäß handelt es sich hierbei um Elemente, deren Ursprung konventionell- zytogenetisch nicht abklärbar ist. Dies ist jedoch mittels molekularzytogenetischer Methoden möglich. Hierbei wird auch gleichzeitig die klinisch wichtige Frage abgeklärt, ob dem überzähligen Chromosom ein Krankheitswert zukommt (Eigene Fallberichte siehe: Stumm et al. 1999c; Tonnies 2002; Liehr et al. 2003; Tonnies et al. 2007b; Varon et al. 2007). Wie auch durch eigene Arbeiten belegt wird, lassen sich bestimmten kleineren Imbalancen auch definierte klinische Phänotypen zuordnen (Stumm et al. 1999c; Schinzel 2001; Tonnies et al. 2001b; Stumm et al. 2002; Horn et al. 2004; Gadzicki et al. 2006; Klopocki et al. 2006a; Klopocki et al. 2006b; Stumm et al. 2007).

Insgesamt sind aber noch eine große Anzahl empirischer Daten notwendig, um die klinische Variabilität segmentaler Imbalancen zu verstehen und damit exaktere Karyotyp-Phänotyp-Korrelationen sowie prognostische Aussagen hinsichtlich des Krankheitsverlaufes zu ermöglichen (de Ravel et al. 2006).

### 1.4 Chromosomenaberrationen in der Tumorgenetik

Krebs ist eine komplexe Krankheit. Dabei ist heute unbestritten, dass Veränderungen in Genen als Ursache der Tumorgenese angesehen werden müssen. Demnach handelt es sich bei Krebs um eine genetisch bedingte Krankheit. In der Regel treten die Tumorerkrankungen sporadisch auf, d.h. die ursächlichen genetischen Veränderungen liegen nur in den betroffenen somatischen Zellen vor.

Nach heutigen Erkenntnissen sind mehrere Mutationsereignisse auf Gen- oder Chromosomenniveau notwendig, damit die Transformation von einer normalen Gewebszelle in eine metastasierende Tumorzelle stattfindet (Übersicht siehe Jefford et al. 2006). Begünstigt wird dies, wenn die präkanzeröse Ausgangszelle eine genomische/chromosomale Instabilität aufweist. Als Folge davon kann es zu verschiedenen, genetisch heterogenen Zellklonen kommen. Dabei weisen die Klone mit rascherer Vermehrung einen Selektionsvorteil auf (Abb. 5).

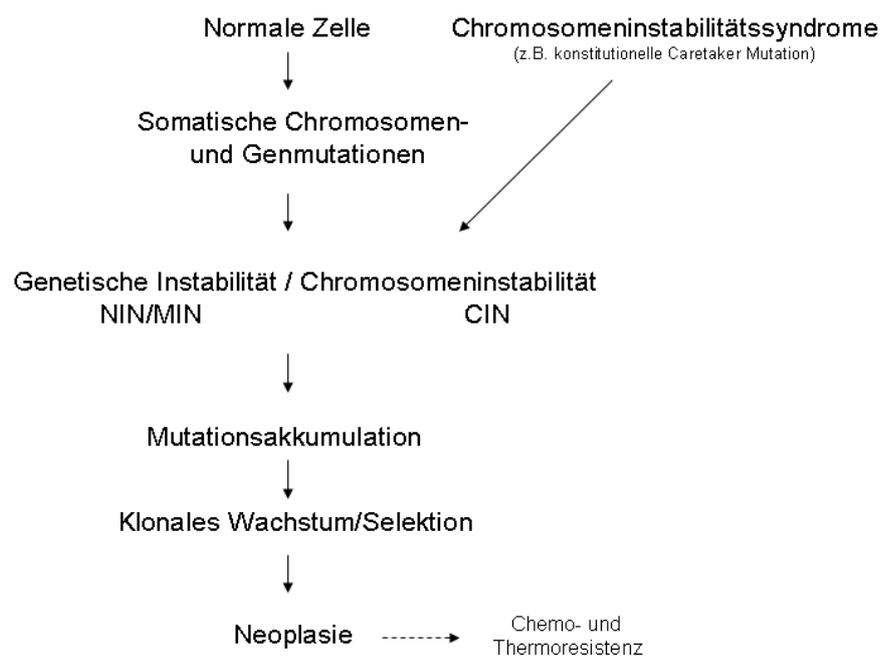


Abb. 5: Vereinfachtes Mehrschrittmodell der Tumorentstehung unter Einbeziehung der Chromosomeninstabilitätssyndrome (Erläuterung siehe Text).

Die Mutationen, welche zu einem unkontrollierten Wachstum von Zellen beitragen, können Gene betreffen, die an der Zellzykluskontrolle, der Zelladhäsion, der transmembranen Signalübertragung, der Telomerstabilität, der Chromosomensegregation oder der DNA-Reparatur beteiligt sind (Abb. 2). Auf molekularem Niveau stellen sie sich diese Mutationen z.B. als Basensubstitutionen, Deletionen oder Insertionen von

Nukleotiden dar. So liegen in nahezu allen Pankreaskarzinomen Missense-Mutationen im *K-RAS*-Gen vor, dessen Genprodukt eine wichtige Aufgabe in der Regulation der Zellteilung wahrnimmt (Bos 1989). Der Funktionsverlust der bereits erwähnten Tumorsuppressorgene erfolgt, z.B. in sporadischen Neoplasien, häufig in einem der beiden Allele durch Genmutationen, während z.B. der „second hit“, d.h. der Funktionsverlust des zweiten Allels, eine chromosomalen Mikrodeletion oder eine epigenetische Veränderung, z. B. eine Methylierung der Promotorregion, darstellen kann (Abb. 4).

Genmutationen liegen häufig der Aktivierung von Protoonkogenen zugrunde („gain of function“). Die Aktivierung von Protoonkogenen kann jedoch auch Folge einer lichtmikroskopisch balancierten Chromosomentranslokation sein, die häufig in hämatopoetischen Zellen und in Sarkomen zu beobachten ist. Aufgrund der Translokation kann es aber auch zur Bildung von Fusionsgenen und damit von Proteinen mit veränderten, neuen Eigenschaften (z. B. einer neomorphen Tyrosinkinase bei der t(9:22) der chronisch myeloischen Leukämie, CML) oder auch zur Überexpression eines Onkogens kommen (z.B. *c-MYC*, Bouchard et al. 1998). Als weiterer Mechanismus zählt die Amplifikation von Onkogenen, welche als intrachromosomale homogen anfärbare Bereiche (HSR, „homogeneously staining regions“) oder als extrachromosomale „double minutes“ in Tumorzellen nachweisbar sind (Cowell 1982). Der Vollständigkeit halber sei noch darauf hingewiesen, dass auch die Integration viraler Sequenzen in das Genom einer Zelle einen tumorigenen Prozess initiieren kann.

Viele zytogenetische und molekularzytogenetische Tumorstudien konnten belegen, dass ein Großteil der Zellen solider Tumoren aberrante Karyotypen mit komplexen chromosomalen Veränderungen, wie Translokationen oder Aneuploidien, aufweisen (Übersichten: Heim and Mitelman 1995; Lengauer et al. 1998).

## 1.5 Genetische Instabilität

Eines der Hauptmerkmale von Tumorzellen ist eine erworbene genomische/chromosomale Instabilität. Diese kann z.B. durch Mutationen in „caretaker“- und „gatekeeper“-Genen oder auf Chromosomenniveau durch partielle bzw. vollständige Aneuploidien bedingt sein (Übersichten: Hoeijmakers 2001; Schwab 2001; Emmert et al. 2006; Murnane 2006).

Die genomische Instabilität lässt sich auf zwei Mechanismen zurückführen: (I) die Mikrosatelliteninstabilität (MIN) basierend auf Mutationen in Mismatch-Reparatur-Genen, und (II) die chromosomale Instabilität (CIN) (Übersicht siehe Weaver and Cleveland 2006). Als Ursache der Chromosomeninstabilität kommen u. a. eine Telomerase-dysfunktion und mitotische Spindeldefekte infrage, aber auch eine fehlerhafte DNA-Doppelstrangbruchreparatur (siehe auch Abb. 2).

Es ist allgemein anerkannt, dass die maligne Transformation ein Mehrschrittprozess ist, der auf der Akkumulation verschiedener Mutationen beruht (Übersichten: Balmain 2001; Hahn and Weinberg 2002; Balmain et al. 2003; Pihan and Doxsey 2003; Jefford and Irminger-Finger 2006). Eine chromosomale Instabilität wird diesen Prozess beschleunigen (Übersicht siehe Lengauer et al. 1998). CIN führt zu kontinuierlichen Chromosomenveränderungen in Tumorzellen, die sich in Form vollständiger und segmentaler Aneuploidien widerspiegeln, und bereits von Boveri als „Prinziplosigkeit als Prinzip der Krebszellen“ beschrieben wurde (Boveri 1914; Balmain 2001).

Die chromosomale Instabilität führt auch zur Heterogenität der Karyotypen innerhalb eines Tumors. Dabei unterliegen die Tumorzellen einem selektiven Prozess, der jene Zellen begünstigt, die einen Proliferationsvorteil haben und somit einen aggressiveren Phänotyp aufweisen (Nowell 1976; Fearon and Vogelstein 1990; Tomlinson et al. 1996; Cahill et al. 1999). Dies zeigt sich auch daran, dass fortgeschrittene Tumoren zumeist einen höheren Anteil an Chromosomenaberrationen zeigen als Tumoren im Frühstadium.

Die Mindestanzahl an Mutationen, die für eine Tumorinitiation und -progression notwendig sind ist nicht bekannt und dürfte von dem jeweiligen Tumor abhängen. Aktuell wird diskutiert, dass die Akkumulation von 3 bis 12 Einzelmutationen für einzelne Tumorentitäten ausreichend zu sein scheint (Merlo et al. 2006).

Partielle und vollständige Aneuploidien beeinflussen direkt auch das Transkriptom der Zelle, d.h. die Expression einer großen Anzahl von Genen und können darüber die

Tumorgenese fördern („saltatorische Tumorevolution“)(Golub et al. 1999; Teixeira and Heim 2005).

Obwohl bis heute die Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika noch immer zum größten Teil unbekannt sind, zeigen vereinzelte Beschreibungen, dass die chromosomale Instabilität ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Resistenzbildung zu spielen scheint (Rajagopalan and Lengauer 2004).

Für alle Tumoren gilt, dass der Nachweis charakteristischer genetischer Veränderungen differentialdiagnostische und prognostische Informationen liefern kann, welche schon heute in vielen Therapieprotokollen Berücksichtigung finden. Das Ziel einer umfassenden Tumorgenomanalyse ist letztlich die Entwicklung einer genetischen Klassifikation. Diese sollte Hinweise auf das biologische Verhalten (Metastaserisiko/Resistenzentwicklung) eines Tumors liefern und die Zuordnung zu spezifischen Tumorstadien ermöglichen.

## **1.6 Chromosomeninstabilitätssyndrome**

Patienten mit Chromosomeninstabilitätssyndromen (Tabelle 2) zeigen neben multiplen Fehlbildungen als charakteristische Eigenschaft eine erhöhte spontane Chromosomeninstabilität. Zusätzlich weisen die Zellen der Patienten oftmals eine Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Mutagenen auf. So zeichnen sich Zellen von Ataxia telangiectasia (AT)- und Nijmegen Breakage Syndrom (NBS)- Patienten durch eine Überempfindlichkeit gegenüber ionisierende Strahlen aus, während Zellen von Fanconi Anämie (FA)- Patienten empfindlich gegenüber DNA-strangvernetzende Agenzien („cross-linker“) sind. Allen Chromosomeninstabilitätssyndromen gemeinsam ist die deutlich erhöhte Disposition für hämatologische und solide Tumoren (siehe Tabelle 2) (Übersichten: Duker 2002; Siebert 2003). Molekulargenetische Studien haben gezeigt, dass die jeweiligen Proteine (Tabelle 2) in einen gemeinsamen Signalweg zur Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) sowie der Checkpoint-Kontrolle eingebunden sind (Übersichten: Charames and Bapat 2003; Wang and D'Andrea 2004).

Tabelle 2: Verantwortliche Gene und häufigste Tumorprädispositionen bei Chromosomeninstabilitätssyndromen

<u>Syndrom</u>	<u>OMIM Nr.</u>	<u>Gen</u>	<u>Tumorprädispositionen</u>
Ataxia Telangiectasia	#208900	<i>ATM</i>	T- und B-Zell Lymphome
Nijmegen Breakage Syndrom	#251260	<i>NBS</i>	T- und B-Zell Lymphome Rhabdomyosarkome
Ataxia Telangiectasia ähnliche Erkrankung	#604391	<i>MRE11</i>	unbekannt
Bloom Syndrom	#210900	<i>BLM</i>	Generelle Tumorprädis- position Multiple Tumoren Non-Hodgkin Lymph. Leukämien Osteosarkome
Werner Syndrom	#277700	<i>WRN</i>	Weichteilsarkome Osteosarkome Melanome
Rothmund-Thompson Syndrom	#268400	<i>RTS</i>	Osteosarkome Hauttumoren
Fanconi Anämie	*607139 #300514 +227645 #605724 +227646 +600901 +603467 +602956 #609054 +608111 +609644 #610832	<i>FANCA</i> <i>FANCB</i> <i>FANCC</i> <i>FANCD1/BRCA2</i> <i>FANCD2</i> <i>FANCE</i> <i>FANCF</i> <i>FANCG</i> <i>FANCI/BRIP1</i> <i>FANCL</i> <i>FANCM/Hef</i> <i>FANCN/PALB2</i>	Akute myeloische Leukämie (AML) Plattenepithel- karzinome

Die Fanconi Anämie ist ein autosomal- und X-chromosomal-rezessives Chromosomeninstabilitätssyndrom, welches durch das Auftreten von Fehlbildungen, Knochenmarkversagen und einer hohen Inzidenz für ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) sowie einer akuten myeloischen Leukämie (AML) gekennzeichnet ist.

Ein Zusammenhang zwischen der Chromosomeninstabilität und dem Auftreten einer Leukämie bei der FA wurde bereits vor mehr als 30 Jahren von Schroeder postuliert (Schroeder and Kurth 1971; Schroeder 1974).

Bis zum Alter von 25 Jahren entwickeln 10% der FA-Patienten eine AML. Danach ist das Risiko für solide Tumoren, vor allem des Kopf- und Halsbereichs, des Ösophagus, der Vulva, des Anus und der Zervix, stark erhöht (Alter et al. 2003; Rosenberg et al. 2003).

Wie bereits von Schroeder postuliert, konnten Zakrzewski und Sperling 1980 anhand von Komplementationanalysen zeigen, dass für die FA genetisch heterogen ist (Zakrzewski and Sperling 1980). Neueste Daten zeigen, dass mindestens 13 unabhängige Komplementationsgruppen existieren, wobei 12 Gene bereits identifiziert wurden (Tabelle 2) (Übersichten: Niedernhofer et al. 2005; Taniguchi and D'Andrea 2006; Reid et al. 2007).

Klinisch lassen sich die Patienten der einzelnen Komplementationsgruppen nicht voneinander abgrenzen. Eine Ausnahme bilden Patienten mit Mutationen im *FANCD1* (=BRCA2) Gen, die einen extrem schweren klinischen Verlauf zeigen (Tischkowitz and Dokal 2004; Meyer et al. 2005). Die chromosomale Instabilität wird als ursächlich für die erhöhte Krebsdisposition angesehen. Durch die Identifikation und Analyse der zugrunde liegenden Gene wurde zunehmend deutlich, dass die FA-Proteine eine wichtige Rolle vor allem im „FA/BRCA-DNA-Reparatur-Pathway“ spielen (Abb. 6).

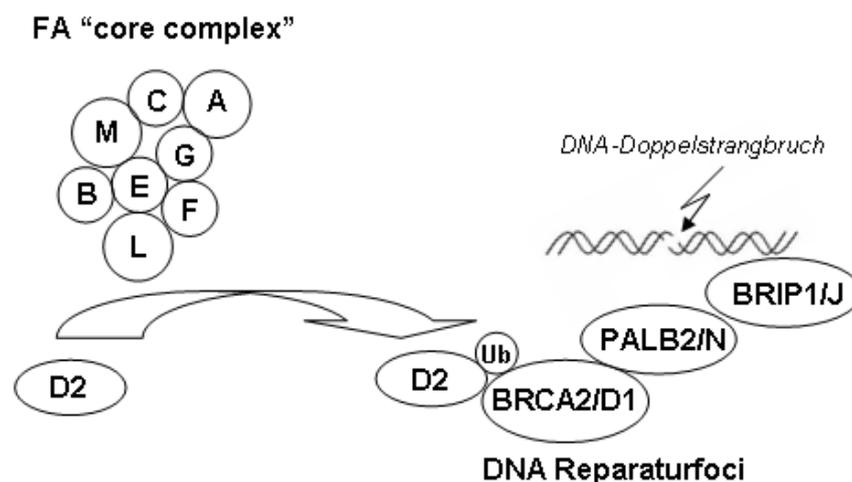


Abb. 6: Schematische Darstellung des „FA/BRCA-DNA-Reparatur-Pathways“. Bei Vorliegen einer DNA-Läsion (DNA-Doppelstrangbruch) wird der FA „core-complex“ unter Beteiligung von mindestens acht FA-Proteinen aktiviert und ermöglicht die Monoubiquitinierung des FANCD2-Proteins. Die aktive ubiquitinierte Form des FANCD2-Proteins bildet in Interaktion mit weiteren FA-Proteinen (BRCA2/D1, PALB2/N und BRIP1/J) an dem DNA-Läsionsort einen Komplex zur DNA-Reparatur aus, der als Reparaturfoci nachweisbar ist (Wang et al. 2004). Das FANCI-Protein ist bisher noch unbekannt und daher hier nicht dargestellt.

Zytogenetisch sichtbarer Ausdruck der Chromosomeninstabilität bei der Fanconi Anämie ist das Vorliegen von Chromatidbrüchen und chromosomalen Reunionsfiguren (Schroeder et al. 1964). Diese deuten auf einen Defekt in der Rekombinationsreparatur mittels homologer Rekombination bzw. NHEJ von Doppelstrangbrüchen während der S-Phase des Zellzyklus hin (Übersichten siehe Digweed et al. 2002; D'Andrea and Grompe 2003).

Unbalancierte Translokationen stellen auch die häufigste Chromosomenaberration in Knochenmarkszellen von Fanconi Anämie Patienten mit MDS bzw. einer AML dar. Diese Patienten unterscheiden sich daher hinsichtlich der Chromosomenaberrationen deutlich von denen anderer Patienten mit MDS und AML (Tischkowitz and Dokal 2004). Bei der AML von Non-FA-Patienten sind die häufigsten bekannten Aberrationen in Zellen des Knochenmarks balancierte Translokationen unter Bildung chimärer Genprodukte [z.B.  $t(15;17)$  *PML;RARA* (M3) oder  $inv(16)(p13q22)$  *MYH11;CBFB* (M4eo)] (Mrozek et al. 2004). Bei FA-Patienten mit MDS und AML hingegen wurden balancierte Translokationen bisher nicht nachgewiesen. FA-Patienten mit einer zytogenetischen Aberration im Knochenmark weisen ein 5-Jahres Überleben von nur 0,40 auf im Vergleich zu FA-Patienten ohne Klon mit 0,94 (Alter et al. 2000). Es handelt sich hierbei in der Regel um unbalancierte Aberrationen wie die partielle oder vollständige Monosomie 7, die auch bei Non-FA-Patienten mit MDS und AML ein negativer Prädiktor ist. Außerdem wurden bei der FA partielle Trisomien für den langen Arm von Chromosom 1, Deletionen von Chromosom 5q und Aberrationen in 11q beschrieben (Auerbach and Allen 1991; Butturini et al. 1994; Alter 1996).

Die Fanconi Anämie stellt ein wichtiges „Krankheitsmodell“ für das Verständnis des Zusammenhanges zwischen chromosomaler Instabilität und Tumorgenese dar. Eine zentrale Frage dabei ist, ob eine direkte Korrelation zwischen dem Vorliegen spezifischer nicht-homologer Chromosomenumbauten in den Knochenmarkszellen der Patienten und der Leukämieentstehung besteht (Callen et al. 2002). Die genaue Charakterisierung chromosomaler Aberrationen bei der FA ist für das Verständnis der neoplastischen Transformation von hoher praktischer Konsequenz, sowohl zur Definition prognostischer Marker, die die Wahl der Therapieform beeinflussen können, als auch hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen chromosomaler Instabilität und Tumorinitiation (Meijer 2005).

### **1.7 Methodische Aspekte zur molekularzytogenetischen Charakterisierung chromosomaler Imbalancen**

Die exakte Analyse von Chromosomenaberrationen ist in der klinischen Genetik für die Diagnosestellung, die syndromologische Zuordnung, sowie für umfassende Karyotyp-Phänotyp-Korrelation unerlässlich (Tonnies 2005). In der Tumorgenetik ermöglichen häufig erst der Nachweis und die Charakterisierung von chromosomalen Tumormarkern differentialdiagnostische und prognostische Aussagen. Darüber hinaus ergeben sich in der experimentellen Zytogenetik zahlreiche Fragestellungen, die die genaue Kenntnis der chromosomalen Konstitution, z.B. einer Zelllinie, voraussetzen, um weitergehende Fragestellungen im Bereich der Zell- oder Chromosomenphysiologie zu bearbeiten (Clarke et al. 1998).

Um einen Gesamtüberblick über das Vorliegen von Veränderungen auf chromosomaler Ebene zu erlangen, werden initial klassische zytogenetische Verfahren, wie die Karyotypisierung nach Chromosomenbänderung, in der Routinediagnostik und Grundlagenforschung angewandt. Mittels der Bänderungstechniken ist jedoch eine umfassende Charakterisierung chromosomaler Aberrationen aufgrund der geringen Auflösung nur bedingt möglich. Eine weitere Limitation konventionell-zytogenetischer Techniken liegt in der Tatsache, dass zytogenetische Analysen nur an Metaphasechromosomen durchgeführt werden können und somit von der Verfügbarkeit proliferierender Zellen abhängig sind. Teilungsinaktives oder fixiertes Material entzieht sich somit der konventionell-zytogenetischen Analyse.

Seit den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung als molekularzytogenetische Technik ein wichtiger methodischer Ansatz in der zytogenetischen Diagnostik und Forschung geworden und hat die zytogenetische Analyse in der Human- und Tumorgenetik revolutioniert (Übersichten siehe Stumm et al. 1999c; Tonnies 2002; Tonnies 2005).

Die molekulare Zytogenetik stellt methodisch eine Kombination aus molekulargenetischen und zytogenetischen Arbeitsmethoden dar und schließt somit die Lücke zwischen konventioneller Zytogenetik und molekularer Genetik. Sämtliche molekularzytogenetischen Techniken beruhen auf dem Prinzip der Hybridisierung komplementärer, einzelsträngiger Nukleinsäuren aufgrund ihrer wechselseitigen Bindungseigenschaften. Dabei dienen ausgewählte, mit Reportermolekülen markierte Nukleinsäuren als Sonden und denaturierte Chromosomen oder auch Interphasekerne als Zielsequenzen. Dies

ermöglicht den Nachweis der komplementären Sequenzen *in situ*, d.h. in ihrer natürlichen Lagebeziehung auf dem Metaphasechromosom bzw. im Interphasekern.

Eine Übersicht über die gängigsten molekularzytogenetischen Methoden sowie deren zugrunde liegenden Prinzipien und Validierungsmethoden ist in den folgenden eigenen Publikationen ausführlich dargestellt (Tonnies 2002; Tonnies 2005). Generell lassen sich in der molekularen Zytogenetik Techniken zur Charakterisierung einzelner Chromosomenveränderungen sowie gesamtgenomische Analysemethoden voneinander abgrenzen. Welche der vielfältigen Methoden ihre Anwendung findet, hängt zunächst von der Fragestellung ab. Zum gezielten Nachweis kleiner, zuvor definierter bzw. bekannter Aberrationen werden andere Methoden gewählt, als für die gesamtgenomische Analyse ohne genaue Kenntnis der vorliegenden Aberrationen. Zudem müssen zuvor alle methodischen Vor- und Nachteile genau abgewogen werden, um eine möglichst zielführende Analyse mit höchstmöglicher Sensitivität durchführen zu können.

Ist die chromosomale Region, bzw. ein Gen das analysiert werden soll, genau bekannt, kann der Nachweis unter Verwendung klonierter DNA-Sequenzen (YAC, BAC, Plasmide) direkt an Metaphasechromosomen des Patienten bzw. des Tumors als Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt werden (eigene beispielhafte Publikationen: Hillgenberg et al. 2001; Musebeck et al. 2001; Burger et al. 2002; Krude et al. 2002; Horn et al. 2003; Horn et al. 2004). Die FISH als Basismethode der molekularen Zytogenetik steht in dieser Form zusätzlich als Validierungsmethode nach gesamtgenomischen Analysen zur Verfügung. In vielen Fällen ist jedoch über die Zusammensetzung von Chromosomenaberrationen oder ganzer aberranter Genome wenig bzw. nichts bekannt. In diesem Fall ist die Anwendung gesamtgenomischer Analysemethoden angezeigt (Tabelle 3). Gesamtgenomische Analysemethoden ermöglichen den Nachweis genomischer Veränderungen entweder auf Einzelzellniveau oder in der Gesamtheit der DNA ausgewählter Gewebe.

Tabelle 3: Zusammenstellung gesamtgenomischer molekularzytogenetischer Analysemethoden

FISH Technik	Einzusetzende Sonde	Hybridisierungsziel	Nachweisbarer Aberrationstyp	Vorteile der Technik	Diagnostische Limitationen
CenM-FISH und CM-FISH	Zentromerspezifische Alpha-Satellitensonden	Zentromere (Metaphasespreitungen der Testperson)	Numerische Aberrationen; chromosomaler Ursprung eines Derivativ- oder Markerchromosoms	Schnelle Charakterisierung des Ursprungs von Markerchromosomen; keine besondere zytogenetischen Vorkenntnisse notwendig	Keine Informationen über euchromatische Chromosomenanteile
TM-FISH; M-Tel FISH; S-COBRA	Subtelomersonden	Subtelomere (Metaphasespreitungen der Testperson)	Kryptische terminale Deletionen; Duplikationen und Translokationen	Hohe Sensitivität; schnelle Analyse der Beteiligung aller subtelomeren Chromosomenenden in Aberrationen	Kleines Analysespektrum; häufig weitere Hybridisierungen locuspezifischer Sonden notwendig.
SKY/M-FISH und technische Ableitungen (CCK-FISH; COBRA-FISH; IPM-FISH)	Whole chromosome painting Sonden	Metaphasen (Metaphasespreitungen der Testperson)	Interchromosomale balancierte und unbalancierte Translokationen; Ursprung euchromatischer Markerchromosomen	Chromosomale Analyse auf Einzelzellniveau; hohe Sensitivität für numerische Aberrationen und Translokationen; schnelle Charakterisierung von Markerchromosomen in Bezug auf ihren euchromatischen Ursprung	Geringe Sensitivität in Bezug auf intrachromosomale Aberrationen wie Deletionen, Duplikationen und Inversionen; ungenaue Bruchpunktbestimmung. Überlagerungsfreie Chromosomenpräparationen notwendig.
Chromosomal bar codes und Rx-FISH	YAC Klone; Primaten-wcp-Sonden	Metaphasen (Metaphasespreitungen der Testperson)	Inter- und intrachromosomale Aberrationen wie Translokationen und größere Deletionen; Duplikationen sowie Inversionen	Chromosomale Analyse auf Einzelzellniveau; hohe Sensitivität für numerische Aberrationen; schnelle Charakterisierung von Markerchromosomen in Bezug auf ihren euchromatischen Ursprung	Suboptimale bandenspezifische Auflösung von Bruchpunkten; Überlagerungsfreie Chromosomenpräparationen notwendig.
Multicolor-banding; MCB	Partielle Chromosomenproben	Metaphasen (Metaphasespreitungen der Testperson)	Inter- und intrachromosomale Aberrationen wie Translokationen und Deletionen; Duplikationen sowie Inversionen	Sensitive Analyse auf Metaphaseniveau bezüglich chromosomaler Aberrationen mit bandenspezifischer Auflösung	Technisch sehr anspruchsvoll; kostenintensiv; nur auf wenige Labore beschränkt; überlagerungsfreie Chromosomenpräparationen notwendig.
Comparative genomic hybridization; CGH	Gesamtgenomische Test- und Kontroll-DNA	Metaphasen (Metaphasespreitungen einer Kontrollperson)	Chromosomale inter- und intrachromosomale Imbalancen; Genamplifikationen; Ursprung und genaue Zusammensetzung von Marker- und Derivatvchromosomen	DNA-basierende gesamtgenomische Analyse; bandenspezifische Auflösung von segmentalen Zugewinnen und Verlusten, Bruchpunktbestimmung möglich. Charakterisierung der Zusammensetzung von Markerchromosomen; Nachweis und Zuordnung von Genamplifikationen	Kein Nachweis balancierter Aberrationen möglich, Mosaikproblematik, zytogenetische Kenntnisse erforderlich
Matrix oder Array-CGH	Gesamtgenomische Test- und Kontroll-DNA	Definierte BAC-Klone	Chromosomale inter- und intrachromosomale Imbalancen; Genamplifikationen; Markerchromosomen	Chip-basierende gesamtgenomische Analyse; bandenspezifische Auflösung	Auflösung direkt abhängig von der Klondichte; kein Nachweis balancierter Aberrationen, Mosaikproblematik, Kosten pro Experiment

Eine Übersicht über die gesamtgenomischen molekularzytogenetischen Methoden, die heute in der Human- und Tumorgenetik ihre Anwendung finden, deren Einsatzmöglichkeiten, sowie deren spezifischen Vor- und Nachteile sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die vergleichende genomische Hybridisierung („Comparative Genomic Hybridization“; CGH) ist eine gesamtgenomische molekularzytogenetische Methode zum Nachweis genomischer Imbalancen (Kallioniemi et al. 1992; Tonnies et al. 2001b; Tonnies 2002; Tonnies 2005). Hierbei werden die zu untersuchende DNA-Probe sowie eine normale Kontroll-DNA mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, auf gespreitete normale Metaphasechromosomen unter Suppressionsbedingungen co-hybridisiert und jeweils über ihre spezifische Fluoreszenz detektiert (siehe Abb. 7). Das Intensitätsverhältnis von Test- zu Kontroll-DNA-Fluoreszenz (d.h. die Fluoreszenzintensität von Grün zu Rot) entlang eines jeden Chromosoms reflektiert die relative Kopienzahl eines Chromosomensegments im Testgenom. Nach Hybridisierung erfolgt durch computergestützte Bildanalyse die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten über die Länge eines jeden Chromosoms. Die ermittelten Werte werden als so genannte Ratioprofile dargestellt, die das Verhältnis von Test-DNA zu Kontroll-DNA widerspiegeln. Als Bezugsgröße zur Fluoreszenzintensität der Test-DNA (i.d.R. grün) dient die ebenfalls farbig markierte Kontroll-DNA (i.d.R. rot). Die so erstellten „copy number karyotypes“ zeigen direkt chromosomale Imbalancen an den entsprechenden Chromosomenabschnitten durch überschreiten der selbst ermittelten Schwellenwerte an. Im Bereich der Tumorgenetik, in dem diese Methode etabliert wurde, wird die CGH regelmäßig zur Klärung chromosomaler Imbalancen herangezogen (Knuutila et al. 1998; Knuutila et al. 1999; Ried et al. 1999; Stumm et al. 1999a). Mittels CGH ist es ebenfalls möglich, eine ganze Gruppe von Tumoren vergleichend zu analysieren und somit spezifische Chromosomenregionen näher zu charakterisieren, die mögliche Onko- bzw. Tumorsuppressorgene beinhalten. Zudem ermöglicht die sequentielle Analyse von z.B. Knochenmarkproben desselben Patienten über die Zeit die Verfolgung einer klonalen Evolution von Aberrationen. Aber auch Genamplifikationen (HSR, DM) können mittels CGH direkt an den korrespondierenden chromosomalen Bereichen dargestellt und damit erfolgreich detektiert werden (Schwab 1999). Diese Abschnitte können als Ausgangspunkte für die Isolierung pathogenetisch relevanter Gene, wie z.B. Onkogene, herangezogen werden.

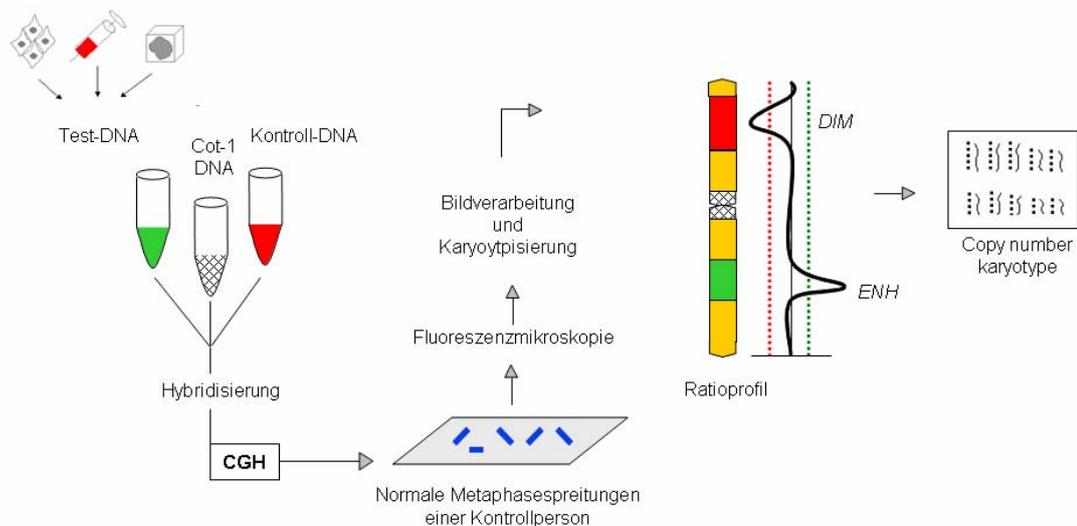


Abb. 7: Schematische Darstellung der Methode der Comparative Genomic Hybridization (Erläuterung siehe Text) (nach Tönnies 2002).

Intrachromosomale Chromosomenaberrationen (eigene Arbeiten: Stumm et al. 1999b; Stumm et al. 2002; Weise et al. 2002; Zumkeller et al. 2004; Jakubiczka et al. 2006; Trimborn et al. 2006; Tzschach et al. 2006a; Tzschach et al. 2006b; Stumm et al. 2007) und komplexe interchromosomale Aberrationen stellen in der Routinediagnostik eine häufige Fragestellung bezüglich vorliegender Imbalancen dar, die mittels CGH erfolgreich bearbeitet werden kann (eigene Arbeiten: Weimer et al. 2000; Borck et al. 2001; Seidel et al. 2003; Trimborn et al. 2005b).

Die CGH basiert allein auf der Verfügbarkeit von ausreichend DNA des zu untersuchenden Gewebes und ermöglicht somit auch die chromosomenspezifische Analyse nicht proliferierender Zellen. Eigene Analysen an archiviertem Material, wie in Paraffin eingebetteten Gewebsschnitten, konnten dies belegen (Guschmann et al. 2002; Guschmann et al. 2005). Dabei kann es bei geringer DNA-Menge notwendig sein, die DNA mittels DOP-PCR (Telenius et al. 1992) zu amplifizieren. In weiteren eigenen experimentellen Arbeiten konnte erstmals gezeigt werden, dass auch mehrere hundert Jahre alte DNA (aDNA) mittels CGH analysiert werden kann. Der Begriff aDNA wird für genetisches Material verwendet, das aus unterschiedlich konservierten, toten biologischen Organismen oder Geweben gewonnen werden kann. Unsere Analysen, auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird, haben gezeigt, dass der gezielte Einsatz alter DNA zum Nachweis chromosomaler Imbalancen mittels CGH möglich ist (eigene Arbeiten: Hummel et al. 1999; Klunker et al. 2002; Tönnies et al. 2002; Gobbel et al. 2005; Tönnies et al.

2005; Gobbel et al. 2007).

Insgesamt ist jedoch zu berücksichtigen, dass Aberrationen, die nur in Einzelzellen oder nur in einem sehr geringen Anteil des untersuchten Gewebes vorliegen, mittels der CGH-Methode nicht sensitiv erfasst werden. Um sehr geringe Mosaik nachzuweisen, ist wiederum die Anwendung der Interphase-FISH (I-FISH) auf Einzelzellniveau hilfreich. Hierbei lassen sich auch kleinste Zellpopulationen mit Chromosomenaberrationen nachweisen, vorausgesetzt, die zu analysierende Aberration ist bekannt und eine entsprechende Sonde kann eingesetzt werden. Weitere Validierungsmethoden und methodische Ansätze werden ausführlich in den dargestellten Arbeiten behandelt und bewertet.

### **1.8 Zielstellungen der Arbeit**

In der vorliegenden Habilitationsschrift werden eigene Arbeiten zu drei Themenkomplexen zusammengefasst, die auf der Verwendung eines breiten Spektrums molekularzytogenetischer Methoden basieren. Sie zielen darauf ab

1. chromosomale Imbalancen unter klinisch auffälligen Neugeborenen nachzuweisen und deren pathogenetische Relevanz zu ermitteln,
2. chromosomale Imbalancen sporadischer Tumoren im Hinblick auf ihren differentialdiagnostischen Wert zu überprüfen und ihre Rolle bei der Tumorprogression zu bestimmen und
3. am Beispiel der Fanconi Anämie, einer genetischen bedingten Krankheit mit Chromosomeninstabilität und einem extrem erhöhten Risiko für Leukämien, die Rolle chromosomaler Imbalancen in präkanzerösen Zellen im Hinblick auf ihre prognostische Aussagekraft zu ermitteln und in Bezug zu den betreffenden molekularen Veränderungen zu setzen.

## **2. EIGENE ARBEITEN**

### **2.1 CGH-basierte Analyse chromosomaler Imbalancen**

In der humangenetischen Routinediagnostik ist die konventionelle Zytogenetik auch heute noch der wichtigste methodische Ansatz zum Nachweis chromosomaler Aberrationen. Allerdings stößt diese Vorgehensweise an ihre Grenzen, wenn es um die Aufklärung von *de novo* Aberrationen und Markerchromosomen geht. In diesen Fällen bietet sich die vergleichende genomische Hybridisierung (engl. comparative genomic hybridization, CGH) an, da hiermit das gesamte Genom auf Imbalancen untersucht und zugleich die jeweilige Deletion oder Duplikation identifiziert werden kann.

### **2.1.1 Analyse chromosomaler Imbalancen bei diploidem Chromosomensatz**

**Tönnies H, Stumm M, Wegner RD, Chudoba I, Kalscheuer V, Neitzel H (2001) Comparative genomic hybridization based strategy for the analysis of different chromosome imbalances detected in conventional cytogenetic diagnostics. Cytogenet Cell Genet 93(3-4):188-94.**

Die Anwendungsbreite der CGH wird in dieser methodischen Arbeit an acht repräsentativen Fällen illustriert, die intrachromosomale und interchromosomale *de novo* Aberrationen betreffen (Tonnie et al. 2001c). Mittels CGH-Analyse konnten wir exemplarisch darstellen, dass es neben der, im Vergleich zur konventionellen Auswertung genaueren Charakterisierung der Aberrationen bezüglich der chromosomalen Beteiligung ebenso möglich war, eine von Patientenchromosomen unabhängige Aberrationsgrößenbestimmung durchzuführen. Es wird auf die Spezifität und die Sensitivität dieser Methode eingegangen und die Bedeutung spezifischer FISH-Sonden zur Validierung der Befunde herausgestellt.

**Tönnies H, Schulze I, Hennies HC, Neumann LM, Keitzer R, Neitzel H (2001) De novo terminal deletion of chromosome 15q26.1 characterised by comparative genomic hybridisation and FISH with locus specific probes. J Med Genet 38: 617-620.**

Am Beispiel eines sehr seltenen Falles mit einer terminalen *de novo* Deletion von Chromosom 15 konnte durch Kombination von CGH, FISH- und Microsatelliten-Analyse eine genaue Größenbestimmung durchgeführt und gezeigt werden, dass hierbei das „insulin-like growth factor 1 receptor gene“ (*IGF1R*) verloren gegangen ist (Tönnies et al. 2001a). Die Hybridisierung einer „All Telomere Probe“, die den Nachweis der telomerspezifischen TTAGGGn-Sequenz ermöglicht, ergab für beide Chromosomen 15 ein positives Signal, d. h. das deletierte Chromosom weist ein intaktes Telomerrepeat auf. Bei der Patientin liegt somit eine Haploinsuffizienz des *IGF1R* Gens vor. Dieser Rezeptor gehört zur Gruppe der Transmembranproteine. Das verminderte Vorliegen von IGF1-Rezeptoren erklärt einerseits den Phänotyp der Wachstumsverzögerung der Patientin, da IGF1 als essentieller Regulator der Wachstumskontrolle gilt. Da IGF1R auch in die kardiovaskuläre Entwicklung einbezogen ist, könnte dies auch den komplexen Herzfehler der Patientin erklären.

**Tönnies H (2004) "Congenital Diaphragmatic Hernia: Is 15q26.1-26.2 a Candidate Locus?" Am J Med Genet 131A(2):224.**

Biggio und Kollegen warfen die Frage auf, ob eine Deletion 15q26.1q26.2 ursächlich für den klinischen Befund einer Zwerchfellhernie sein kann (Biggio et al. 2004). In dem hier vorliegenden Kommentar (Tönnies 2004) werden drei zytogenetisch vergleichbare Fälle zitiert, die keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Zwerchfellhernie ergaben (Roback et al. 1991; Siebler et al. 1995; Tönnies et al. 2001a) und daher eine interstitielle Deletion in der angegebenen Chromosomenregion als alleinige Ursache unwahrscheinlich erscheint.

Dies wird noch durch neuere Daten erhärtet, die mittels Array-CGH und Kandidatengenanalyse gewonnen wurden (Slavotinek et al. 2006). Insgesamt scheint daher eine chromosomale Ursache aufgrund einer 15q26.1q26.2-Deletion für das Auftreten einer Zwerchfellhernie eher unwahrscheinlich.

**Tönnies H, Stumm M, Neumann L, Volleth M, Grumpelt U, Musebeck J, Annuss G, Neitzel H (2001) Two further cases of WHS with unbalanced *de novo* translocation t(4;8) characterised by CGH and FISH. J Med Genet 38(6):E21.**

Im Jahr 2000 wiesen Wieczorek et al. erstmalig nach, dass einige Patienten mit Wolf-Hirschhorn Syndrom nicht auf singulären terminalen Deletionen von Chromosom 4p beruhen, sondern vielmehr auf komplexe interchromosomale Aberrationen unter Beteiligung von Chromosom 8p zurückzuführen sind (Wieczorek et al. 2000). In dieser Arbeit konnten wir zwei weitere Fälle mit identischer unbalancierter Translokation t(4;8) vorstellen, die mittels konventioneller Zytogenetik nicht hinreichend abgeklärt werden konnten (Tonnie et al. 2001b). Mittels CGH ließen sich eine Deletion von Chromosom 4p, sowie eine partielle Duplikation von Chromosom 8p nachweisen und durch FISH verifizieren. Beide Publikationen zeigten, dass die klinischen Aspekte der Patienten mit unbalancierter Translokation t(4;8) unspezifisch sind und somit eine phänotypische Unterscheidung zu den klassischen Deletion 4p Fällen nicht möglich ist. Der Frage des Entstehungsmechanismus wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes nachgegangen (s. folgende Arbeit von Giglio et al. 2002).

**Giglio S, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R, Ragusa A, Gueneri S, Selicorni A, Stumm M, Tönnies H, Ventura M, Zollino M, Neri G, Barber J, Wieczorek D, Rocchi M, Zuffardi O (2002) Heterozygous Submicroscopic Inversions Involving Olfactory Receptor-Gene Clusters Mediate the Recurrent t(4;8)(p16;p23) Translocation. Am J Hum Genet 71(2):276-85.**

Die Translokation t(4;8) scheint die zweithäufigste reziproke Translokation beim Menschen zu sein. Daher stellt sich die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus der häufigen *de novo*-Entstehung. Im Rahmen dieses Kooperationsprojektes konnte gezeigt werden, dass die Bruchstellen der Translokation innerhalb der olfaktorischen Rezeptor (OR)-Gencluster auf Chromosom 8p23 und Chromosom 4p liegen (Giglio et al. 2001). Mittels molekularzytogenetischer Analyse unter Verwendung von BAC-Klonen an Metaphasen der Mütter von fünf dieser Patienten, konnte erstmalig gezeigt werden, dass diese heterozygote, submikroskopische Inversionen der beiden chromosomalen OR-Gencluster aufweisen. Unter den Kontrollen sind diese heterozygoten Inversionen in 12,5% (4p16) bzw. 26% (8p23) nachweisbar. Dies spricht dafür, dass ein doppelt-heterozygoter Inversionspolymorphismus in nicht-homologen Chromosomen eine interchromosomale Aberration bedingen kann. Somit liegt bei Inversions-Heterozygoten eine Prädisposition für chromosomale Rearrangements vor, welche das Risiko für Nachkommen mit einer *de novo* Chromosomenaberration erhöht.

### **2.1.2 Analyse euchromatischer Imbalancen bei überzähligen Markerchromosomen**

In den folgenden Arbeiten stand die Analyse kleiner überzähliger Markerchromosomen (sSMC), die auch in seltenen Fällen als Ringchromosomen vorliegen können, im Vordergrund. Diese findet man als *de novo* Aberrationen in etwa 0,05% aller Neugeborenen. Markerchromosomen ist grundsätzlich eines gemeinsam: ihre Herkunft ist konventionell-zytogenetisch nicht abklärbar (Tonnie 2005). Erschwerend kommt hinzu, dass häufig nur ein kleiner Teil der Zellen betroffen ist, so dass eine Analyse auf Einzelzellniveau erfolgen muss. Die Kenntnis der Natur des Markerchromosoms ist Voraussetzung für das Verständnis des Entstehungsmechanismus aber auch Grundlage für eine Karyotyp-Phänotyp-Korrelation.

**Tönnies H, Neumann LM, Grüneberg B, Neitzel H (2003) Characterization of a supernumerary ring chromosome 1 mosaicism in two cell systems by molecular cytogenetic techniques and review of the literature. Am J Med Genet 121A:163-167.**

In dieser Übersichtsarbeit wurden, unter Einbeziehung eines eigenen neuen Falles, alle bisher in der Literatur beschriebenen Kasuistiken mit überzähligem Ringchromosomen 1 miteinander verglichen (Tönnies et al. 2003c). Anhand des eigenen Falles wurde exemplarisch dargestellt, wie mittels konventionell-zytogenetischer und molekularzytogenetischer Techniken, sowie unter Einbeziehung der Mikrodissektion, der Marker als Ringchromosom 1 charakterisiert werden konnte. Zudem konnte das überzählige Ringchromosom in zwei verschiedenen Zellsystemen (peripheres Blut, Mundschleimhautzellen) in unterschiedlicher Verteilung nachgewiesen werden. Ein eingehender Karyotyp-Phänotyp-Vergleich ist aufgrund der in der Literatur vorliegenden Datenlage jedoch kaum möglich, da die molekularzytogenetischen Charakterisierungen der Chromosomen unvollständig sind und keine Daten zu ihrer gewebsspezifischen Verteilung vorliegen.

**Trimborn M, Grueters A, Neitzel H, Tönnies H (2005) First small supernumerary ring chromosome carrying 10q euchromatin in a patient with mild phenotype characterized by molecular cytogenetic techniques and review of the literature. *Cytogenet Genome Res* 108(4):278-82.**

Zytogenetische und phänotypische Beschreibungen von Patienten mit kleinen Markerchromosomen, die sich von Chromosom 10 ableiten, sind sehr selten. Ringchromosomen 10 wurden bisher nur für drei Fälle beschrieben. Keiner der bekannten Fälle wies euchromatisches Material aus dem proximalen Bereich des langen Arms von Chromosom 10 auf, wie es in unserem Fall mittels chromosomaler Mikrodissektion und FISH nachgewiesen werden konnte (Trimborn et al. 2005). Das *de novo* entstandene Ringchromosom konnte in etwa gleichem Anteil in peripheren Blutzellen und Mundschleimhautzellen nachgewiesen werden. Der Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen ähnlichen Kasuistiken ergab nur geringe Hinweise (Entwicklungs- und Wachstumsverzögerung, Hypotonie) auf eine Korrelation des Phänotyps mit der chromosomalen Zusammensetzung des kleinen Ringchromosoms und dem Grad des Mosaiks in den untersuchten Geweben.

**Tönnies H, Gerlach A, Heineking B, Starke H, Neitzel H, Neumann LM (2006).**  
**Molecular cytogenetic identification and characterization of a de novo supernumerary neocentromeric derivative chromosome 13. Cytogenet Genome Res 114(3-4):325-29.**

Überzählige Markerchromosomen müssen ein funktionelles Zentromer aufweisen, um mitotisch stabil zu sein. C-Banden negative Markerchromosomen ohne zentromerische alphanoid Sequenzen sind selten. Sie weisen jedoch eine primäre Konstriktion auf, die die Lage eines aktiven Kinetochors anzeigt. Der Nachweis aktiver Kinetochoren in diesen Fällen und somit der Nachweis sog. Neozentromeren (neo), kann unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen einzelne zentromerische Proteine (CENP) erfolgen.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde ein überzähliges Derivatchromosom 13 unter Anwendung verschiedener molekularzytogenetischer Analysemethoden wie chromosomale Mikrodissektion, FISH, cenM-FISH und Multicolor-Banding bezüglich seiner euchromatischen Zusammensetzung und der Lage des Neozentromers charakterisiert (Tönnies et al. 2006). Die Analyse ergab, dass das Derivatchromosom 13 als invertierte partielle Duplikation vorliegt. Demnach lag in einem Teil der Zellen der Patientin eine partielle Tetrasomie für den distalen Bereich von Chromosom 13 bei gleichzeitigem Verlust des konstitutionellen Zentromers vor. Zusätzlich konnte, unter Verwendung eines Kombinationsprotokolls aus Antikörpernachweis und FISH, die genaue Lage des Neozentromers bestimmt werden. Dieses kartierte überraschenderweise nicht im Inversionsbruchpunkt, wie für andere Fälle beschrieben, sondern in der weiter distal gelegenen Region 13q31.3. Diese Arbeit eröffnet damit die Möglichkeit, genauere Analysen bezüglich der Entstehung von Neozentromeren durchzuführen (laufendes Kooperationsprojekt mit M Rocchi, Bari, Italien).

## **2.2. CGH-basierte Analyse chromosomaler Imbalancen in sporadischen Tumoren**

Ein Ziel genetischer Analysen sporadischer Tumoren ist die Tumorklassifikation, um einen Bezug zu dem Metastaserisiko, dem Krankheitsverlauf insgesamt aber auch bezüglich der Abgrenzbarkeit gegenüber histologisch ähnlichen Tumoren herzustellen. Unter Verwendung gesamtgenomischer Analysemethoden werden zudem Informationen gewonnen, die Rückschlüsse auf den Verlust von Tumorsuppressorgenen bzw. den Zugewinn von Onkogenen ermöglichen. Die Kombination genomischer Informationen mit denen der Genexpressionsanalyse an asserviertem Tumormaterial kann darüber hinaus neue Einsichten in die Tumorgenese vermitteln.

### **2.2.1 Analyse charakteristischer chromosomaler Imbalancen verschiedener Tumorentitäten und deren Bedeutung für die Tumorklassifikation**

**Tönnies H, Toliat MR, Ramel C, Pape UF, Neitzel H, Berger W, Wiedenmann B (2001) Analysis of sporadic neuroendocrine tumors of the enteropancreatic system by comparative genomic hybridization. Gut 48(4):536-41.**

Midgut-Tumoren sind neuroendokrine Tumore (NET) des Dünndarms, Appendix und Coecum. Zu den Foregut-Tumoren hingegen zählen z.B. die NET des Magens und des Thymus. Insgesamt wurden in dieser Studie 26 sporadische neuroendokrine Tumoren mittels CGH analysiert (12 Foregut; 14 Midgut), um einen umfassenden Überblick über Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Auftreten chromosomaler Imbalancen zu erfassen (Tönnies et al. 2001d).

Die Analysen zeigten, dass nahezu alle Tumoren chromosomale Imbalancen aufwiesen (96%). Hierzu zählten neben vollständigen chromosomalen Aneuploidien (Monosomien, Trisomien) auch partielle Aberrationen wie Deletionen und Amplifikationen kleinerer chromosomaler Bereiche. Midgut-Tumoren zeigten insgesamt weniger Kopienzahlveränderungen („copy number aberrations“, CNA).

Insgesamt definierten die Analysen sowohl gemeinsame, als auch neue, distinkte chromosomale Kandidatenregionen, die genetische Unterschiede in den beiden Tumorentitäten aufzeigen. Ein Grund für das Vorkommen chromosomaler Instabilität in Tumorzellen kann durch Alterationen in Genen hervorgerufen werden, deren Expression direkt in die Chromosomensegregation einbezogen ist. Hier seien nur *STK15/BTAK* und *BRCA1* zu nennen, deren Genprodukte das Vorhandensein einer regelrechten Zentrosomenanzahl gewährleisten. Es ist bekannt, dass eine Überexpression von *STK15*, welches in der chromosomalen Bande 20q13 lokalisiert ist, die nach unseren Analysen in 58% der Foregut-Tumoren Zugewinne zeigte, zu multiplen funktionalen Zentrosomen in einem Nukleus führen kann. Als Konsequenz kommt es zu einer fehlerhaften Chromosomensegregation und somit zu Aneuploidien.

**Fischer TC, Gellrich S, Muche M, Sherev T, Audring H, Neitzel H, Walden P, Sterry W, Tönnies H (2004) Genomic Aberrations and Survival in Cutaneous T Cell Lymphomas. *J Invest Dermatol* 122(3):579-86.**

Kutane T-Zell Lymphome (CTCL) gehören der Gruppe der extranodalen Non-Hodgkin Lymphome an. CTCL werden klassischerweise aufgrund klinischer, histologischer und immunhistochemischer Charakteristika in die Untergruppen indolent und aggressiv unterteilt (European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC).

Tumormaterial von 32 CTCL-Patienten (Tumorstadien Ia-IVb) vor Tumorthherapie wurde in die Analysen einbezogen (Fischer et al. 2004).

21 Tumorproben zeigten nach CGH-Analyse chromosomale Imbalancen (66%). Die Gesamtanzahl der Imbalancen pro Tumorprobe variierte von 0-19 und korrelierte mit dem klinischen Tumorstadium: so zeigten Patientenproben des Stadiums Ia keine nachweisbaren Aberrationen, während Proben im Spätstadium IVa durchschnittlich 8,75 Aberrationen aufwiesen. Ebenso wurde ermittelt, dass die aggressiven Subtypen mit 9,33 Aberrationen deutlich häufiger chromosomale Imbalancen aufwiesen, als die indolenten Formen mit durchschnittlich nur 2,88 Aberrationen. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Anzahl von Imbalancen eindeutig mit einem kürzeren Überleben korreliert. Speziell die Kombination aus Zugewinnen von Chromosom 8q und Verlust von 6q sowie 13q-Material stellten eine signifikant schlechtere Überlebensprognose dar.

Insgesamt konnten charakteristische Muster chromosomaler Imbalancen für die Subklassifizierungen der CTCL nachgewiesen werden. Die Assoziation der detektierten chromosomalen Imbalancen mit den klinischen Verläufen der Erkrankung weisen darauf hin, dass in den betroffenen chromosomalen Loci Gene vorliegen, die vermutlich die Tumorentwicklung und Progression direkt beeinflussen.

**Petrausch U, Martus P, Tönnies H, Bechrakis NE, Lenze D, Wansel S, Hummel M, Bornfeld N, Thiel E, Foerster MH, Keilholz U (2007) Significance of gene expression analysis in uveal melanoma in comparison to standard risk factors for risk assessment of subsequent metastases. Eye [Epub ahead of print].**

*\* U Petrausch hat die Expressionsanalysen durchgeführt. H Tönnies hat die CGH-Analysen durchgeführt und bewertet.*

Einige Patienten mit uvealem Melanom entwickeln nach Tumorentfernung bzw. Entfernung des gesamten betroffenen Auges Metastasen, bevorzugt in der Leber. Da es keine Hinweise dahingehend gibt, dass die Entfernung des Tumors selbst ursächlich für die Metastasenbildung ist, wurden vergleichende klinische und genetische Analysen an 28 Tumorproben von Patienten mit und ohne Metastasenbildung nach Tumorentfernung bzw. Enukleation durchgeführt, um gezielt die verlässlichsten Prädiktoren für ein Metastaserisiko zu identifizieren (Petrausch et al. 2007).

Seit mehr als 30 Jahren werden rein klinische Risikofaktoren für die Metastasenbildung herangezogen. Als weiterer zuverlässigerer Faktor konnte vor mehr als 10 Jahren der Nachweis einer Monosomie 3 im Tumorgewebe für eine folgende Metastasierung definiert werden. Anhand unserer Studie sollte ermittelt werden, welche der drei Analysemethoden: die klinisch-histologische Analyse, die CGH, oder die Genexpression die präziseren Daten zur Metastaserisikobestimmung hervorbringt.

Insgesamt konnten 28 Tumoren in zwei Gruppen unterteilt werden:

1. Metastasenbildung im Median von 68 Monaten (n=12)
2. keine Metastasen (n=16)

Die klinisch-histologische Analyse ließ im Vergleich zu den CGH- und Expressionsanalysen keine valide Risikostratifizierung zur Metastaseentstehung zu. Die CGH-Daten zeigten einen kompletten Verlust von Chromosom 3 in 11 der 28 Fälle. Neun dieser Fälle zeigten im Nachuntersuchungszeitraum eine Metastasenbildung. Diese Daten unterstützen zwar die Rolle der Monosomie 3 für die Metastasenbildung, jedoch konnten auch Fälle mit Metastasenbildung ohne Monosomie 3 im Tumor ermittelt werden.

Mittels der in der Publikation detailliert beschriebenen Genexpressionsanalysen konnten hingegen nahezu alle Tumoren ihrer jeweiligen Gruppe (Metastasenbildung, keine Metastasenbildung) zugeordnet werden. Es konnte ein Set von 42 „Klassifikatorgenen“ definiert werden, die offenbar eine grundlegende Rolle in der Metastasenbildung des uvealen Melanoms wahrnehmen.

### **2.2.2 Analyse der Assoziation genomischer Imbalancen mit Therapeutika- und Thermoresistenz**

Therapieresistente Tumorzellen stellen ein spezielles Problem in der Entwicklung erfolgreicher Behandlungsprotokolle dar. Konsequenterweise ist das Verständnis der genetischen Mechanismen, die Grundlage für die Entstehung von Chemo- und Thermoresistenzen in Tumoren sind, für die Entwicklung neuer Erfolg versprechender Behandlungskonzepte zur Verhinderung bzw. Überwindung dieser Resistenzen von grundlegender Bedeutung. Da eine gezielte und reproduzierbare Untersuchung der Resistenzmechanismen am Patientenmaterial selbst nur schwer bzw. überhaupt nicht zu realisieren ist, werden in der Regel Zellkulturmodelle zur näheren Analyse herangezogen.

**Tönnies H, Poland J, Sinha P, Lage H (2003) Association of genomic imbalances with drug resistance and thermoresistance in human gastric carcinoma cells. Int J Cancer 103(6);752-758.**

Magenkarzinomzellen besitzen häufig pleiotrope oder auch Multidrug-Resistenzen (MDR) gegenüber Chemotherapeutika. Da Veränderungen in der Expression von Genen der Chemo- und Thermoresistenz bzw. -sensitivität aufgrund chromosomaler Imbalancen ursächlich für den Phänotyp der betroffenen Tumorzellen sein können, wurden in diesem Projekt gesamtgenomische CGH-Analysen an Zelllinien mit verschiedenen Typen erworbener MDR und Thermoresistenz durchgeführt (Tönnies et al. 2003d). Hierfür wurde ein zuvor etabliertes *in vitro* Modell gastrointestinaler Zelllinien herangezogen.

Die Parentallinie EPG85-257P zeigte die klassischen chromosomalen Imbalancen von Magenkarzinomzellen. Somit wurden diese Basisimbalancen nicht als ursächlich für die später auftretenden Resistenzen angenommen. In dieser Studie konnte erstmalig in den abgeleiteten, resistenten Sublinien eine größere Anzahl zusätzlicher genomischer Imbalancen detektiert und ihren chromosomalen Loci zugeordnet werden. Inwiefern diese Veränderungen ursächlich für die Entstehung der Resistenzmechanismen sein können, wird in der Arbeit eingehend diskutiert. Die Vielfalt zusätzlicher Aberrationen in den resistenten Sublinien machte einmal mehr deutlich, dass die Resistenz der Tumorzellen gegenüber antineoplastischen Therapeutika und Hyperthermie nicht das Ergebnis einzelner Mutationen sein kann. Obwohl aus generellen Überlegungen nicht ausgeschlossen werden kann, dass die genomischen Imbalancen nur eine Konsequenz der zugrunde liegenden genomischen Instabilität dieser Tumorzellen sind, weist die charakteristische Assoziation bestimmter betroffener chromosomaler Loci, welche mit Chemo- und Thermoresistenz assoziierte Gene enthalten, auf einen chemo- und hyperthermieinduzierten Selektionsdruck in diesen Zellen hin.

**Tönnies H, Lage H (2004) Chromosomal imbalances associated with drug resistance and thermoresistance in human pancreatic carcinoma cells. Europ J Cell Biol 83(10):591-601.**

Auch in diesem Projekt wurden gezielt segmentale Aneuploidien, die möglicherweise Gene beinhalten, welche eine Chemo- bzw. Thermoresistenz verursachen können, genauer analysiert (Tonnie and Lage 2004). Resistenzen gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung sind der Hauptgrund für einen Therapieversagen beim Pankreaskarzinom. Dies ist darauf zu begründen, dass pankreatische Tumorzellen intrinsisch Resistenzen gegenüber verschiedene antineoplastische Agenzien zeigen. Um einen höheren Behandlungserfolg bei diesen Patienten zu erreichen, wird häufig eine Kombinationstherapie aus Chemo- und Hyperthermiebehandlung angewendet. Diese führt jedoch nicht selten zusätzlich zur Induktion bzw. Verstärkung eines Chemo- bzw. Thermoresistenz-Phänotyps.

Wie in der vorgenannten CGH-Studie, wurden die detektierten chromosomale Imbalancen als Zielregionen für mögliche Resistenzgene definiert, die nicht auch in der Parentallinie nachgewiesen wurden. Überraschenderweise zeigten die Pankreaskarzinomlinien Aberrationen in ähnlichen chromosomalen Loci, wie die zuvor analysierten Magenkarzinomzelllinien (Tonnie et al. 2003d). Beide Modellsysteme ließen auf die Beteiligung von Zielgenen schließen, die den Gruppen der ABC-Transporter, molekularen Chaperonen und der DNA-Reparatur zuzuordnen sind.

Zusammenfassend kann für die beiden o.g. Studien festgehalten werden, dass die CGH ein hervorragendes Instrument darstellt, verschiedenste therapieresistente Tumorzellgenome bezüglich chromosomaler Kandidatenregionen und darin enthaltener relevanter Resistenzgene vergleichend zu analysieren.

### **2.3 Charakterisierung und Bedeutung genomischer Imbalancen am Beispiel des Chromosomeninstabilitätssyndroms Fanconi Anämie**

Die chromosomale Instabilität ist eines der Hauptmerkmale von Tumorzellen und ebenfalls charakteristisch für Chromosomeninstabilitätssyndrome, die ein hohes Krebsrisiko sowie eine hohe Sensitivität gegenüber spezifische Klastogene zeigen. Es ist heute unbestritten, dass ein Zusammenhang zwischen einer fehlerhaften Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und der Initiation von Tumoren besteht.

Die Fanconi Anämie (FA) ist ein genetisch heterogenes Chromosomeninstabilitätssyndrom mit einem extrem hohen Risiko für ein Knochenmarkversagen. Bereits in der ersten Lebensdekade setzen bei FA-Patienten in der Regel die ersten hämatologischen Komplikationen ein. Viele FA-Patienten mit aplastischer Anämie, myelodysplastischem Syndrom (MDS) und akuter myeloischer Leukämie (AML) entwickeln frühzeitig klonale Chromosomenaberrationen in ihren Knochenmarkzellen. Über die genauen genetischen Veränderungen, welche sich während der malignen Transformation in FA-Knochenmarkzellen manifestieren, als auch über die Biologie der FA-assoziierten AML, war zum Zeitpunkt der im Folgenden dargestellten Publikationen nur wenig bekannt.

**Tönnies H, Huber S, Kuhl JS, Gerlach A, Ebell W, Neitzel H (2003) Clonal chromosome aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. Blood 101(10):3872-4.**

Die hier vorgestellte Prospektivstudie wurde mit der Zielstellung durchgeführt, prognostisch relevante FA-spezifische chromosomale Aberrationen in Knochenmarkzellen zu erfassen und genau zu charakterisieren (Tönnies et al. 2003b). In dieser erstmalig unter Verwendung der CGH durchgeführten Studie an 53 FA-Patienten konnten wir zeigen, dass 25 der untersuchten Patienten nachweisbare klonale Chromosomenaberrationen in ihren Knochenmarkzellen aufwiesen. 18 der 25 Patienten zeigten als spezifische gemeinsame Veränderung einen partiellen Zugewinn von Chromosom 3q. Diese wurde bei FA-Patienten mit aplastischer Anämie, MDS oder AML, sowie bei Non-FA-Patienten mit MDS und AML, nicht zuvor in der Literatur beschrieben.

Um die klinische und prognostische Relevanz dieser häufigsten Aberration in FA-Zellen zu bestimmen, wurden die zytogenetischen und morphologischen Daten des Knochenmarks und der klinische Verlauf der Patienten mit und ohne Aberration in 3q in dieser Arbeit gegenübergestellt. Die Datenanalyse zeigte deutlich, dass Patienten ohne 3q-Aberration eine wesentlich geringere Wahrscheinlichkeit für die Progression in ein MDS oder eine AML zeigten, als die Patienten, welche eine unbalancierte Translokation unter Beteiligung von Chromosom 3q trugen. Eine sekundär auftretende Monosomie 7 erhöhte zusätzlich das Risiko für das Auftreten eines MDS bzw. einer AML.

Die Ergebnisse dieser Studie haben Eingang in die „Standards for Clinical Care“ des Fanconi Anemia Research Funds (USA) gefunden und somit die Basisdiagnostik um einen molekularzytogenetischen Ansatz erweitert, um frühzeitig und gezielt diese prognostisch hochrelevante Aberration zu erfassen (Alter 2003).

**Neitzel H, Kühl JS, Gerlach A, Ebell W, Tönnies H (2007) Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: results and implications. Monogr Hum Genet, [im Druck].**

In dieser aktuellen Übersichtsarbeit wurden die bisherigen Literaturdaten den eigenen, neuen Daten molekularzytogenetischer Studien an Knochenmarkzellen von Fanconi Anämie Patienten gegenübergestellt und bezüglich ihrer prognostischen Relevanz umfassend bewertet (Neitzel et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnten die eigenen Daten von 2003 um zusätzliche fünf Patienten mit Aberrationen in Chromosom 3q erweitert werden. Zugleich konnte verifiziert werden, dass ein deutlicher Trend zum männlichen Geschlecht in der Gruppe der 3q-Patienten vorzuliegen scheint. Im Jahr 2004 wurden unsere Daten bezüglich der häufigsten chromosomalen Imbalance von Chromosom 3q von der University of Minnesota an einem Kollektiv von 99 FA-Patienten bestätigt (Hirsch, unpubliziert). Beide Studien sind bis heute die Einzigen, die molekularzytogenetische Analysen zur Detektion chromosomaler Aberrationen bei FA einsetzten. In der vorliegenden Arbeit wurde die strukturelle Ähnlichkeit der FA-KM Aberrationen zu denen der sekundären AML bei Non-FA Patienten ebenso diskutiert, wie das Auftreten und die mögliche Bedeutung uniparentaler Disomien durch Reduplikationen komplex aberranter Chromosomen im Rahmen der Karyotypevolution. Unter Berücksichtigung der o.g. Daten kann zusammenfassend festgestellt werden, dass spezifische klonale Chromosomenaberrationen offenbar, auch in Knochenmarkzellen von Fanconi Anämie Patienten, einen wichtigen Schritt hin zur Leukämieinitiation darstellen und somit ihrem frühzeitigen sensitiven Nachweis eine hohe prognostische Bedeutung zukommt.

**Tönnies H, Huber S, Volarikova E, Gerlach A, Neitzel H (2007) Interphase FISH-Assay for the Detection of MDS- and AML-Associated Chromosomal Imbalances in Native Bone Marrow and Blood Cells. Monogr Hum Genet, [im Druck].**

Diese vorgestellten Ergebnisse lieferten die Grundlage zur Entwicklung einer sensitiven molekularzytogenetischen Analysestrategie zum frühzeitigen Nachweis prognostisch relevanter und FA-spezifischer Aberrationen auf Einzelzellniveau (Tönnies et al. 2007). In dieser aktuellen Arbeit wird die Etablierung und Validierung dieses FA-spezifischen Interphase FISH-Assays (I-FISH-Assay) ausführlich dargestellt. Die zuvor vorgestellten klonalen Chromosomenaberrationen wurden primär in Knochenmarkpräparationen von FA-Patienten nachgewiesen. Erste Hinweise auf das Vorhandensein der 3q-Aberrationen auch in Zellen des peripheren Blutes ergaben sich aus CGH-Analysen an DNA aus peripherem Blut. Um eine schnellere und sensitivere Detektion der Chromosomenaberrationen zu gewährleisten, etablierten wir einen YAC-basierenden FA-spezifischen Interphase FISH-Assay. Diesen wendeten wir zur Analyse von Direktpräparationen der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBD) an, die zum gleichen Zeitpunkt wie die Zellen des Knochenmarks gewonnen wurden. Der Einsatz der Interphase FISH ermöglicht somit Analysen in einem engeren Zeitraster, ohne häufigere Knochenmarkentnahmen. Zudem eröffnet dieser Ansatz die Möglichkeit, eine *in vivo* Quantifizierung klonaler Aberrationen sensitiv und spezifisch durchzuführen. Dieser neu etablierte diagnostische Ansatz ermöglichte zusätzlich eine weitgehend automatisierbare zytogenetische Analytik unter Einsatz eines Scanningmikroskops und somit die Durchführung einer internationalen Prospektivstudie an Zellen des peripheren Blutes von Fanconi Anämie Patienten in unserem Labor.

**Meyer S, Fergusson WD, Whetton AD, Moreira-Leite F, Pepper SD, Miller C, Saunders EK, White DJ, Will AM, Eden T, Ikeda H, Ullmann R, Tuerkmen S, Gerlach A, Klopocki E, Tönnies H (2007) Amplification and translocation of 3q26 with overexpression of *EVI1* in Fanconi anemia derived childhood acute myeloid leukemia with biallelic *FANCD1/BRCA2* disruption. *Genes Chromosomes Cancer*. 46(4):359-72.**

Um die Bedeutung der häufigen Aberration von Chromosom 3q im Transformationsprozess zur Leukämie näher zu charakterisieren, wurden seltene FA-AML-Zelllinien eingehend analysiert (Meyer et al. 2007). Von den bisher weniger als 30 weltweit beschriebenen Patienten mit biallelischen Mutation in *FANCD1/BRCA2*, existieren bisher nur von zwei Patienten AML-Zelllinien (Ikeda et al. 2003; Meyer et al. 2005). In diesem internationalen Kooperationsprojekt standen uns alle bisher beschriebenen FA-AML-Zelllinien für eingehende molekularzytogenetische und molekulargenetische Analysen zur Verfügung. Hierzu zählten auch die bisher nur zytogenetisch charakterisierten Zelllinien SB1685CB, welche aus Knochenmarkszellen zum Zeitpunkt der AML-Diagnose von einem FA-Patienten der Komplementationsgruppe FA-D1 etabliert wurde, und die Linie SB1690CB aus peripheren Blasten des selben Patienten (Meyer et al. 2005). Diese Linien, immunophänotypisch CD34 positiv, zeigten sowohl die FA-charakteristische chromosomale Instabilität als auch die charakteristische induzierbare MMC-Hypersensitivität. Nach initialen CGH-Analysen konnte gezeigt werden, dass beide Zelllinien desselben Patienten zytogenetisch voneinander abwichen. Hieraus konnte geschlussfolgert werden, dass diese Unterschiede verschiedene Stadien der malignen Progression (Karyotypevolution) darstellen. Eingehende molekularzytogenetische SKY-, FISH- und Array-CGH Studien führten zur Eingrenzung einer nur 3,7Mb großen kritischen chromosomalen Region in 3q26.2q26.31. Als Kandidatengen in der Region identifizierten wir den onkogenischen Transkriptionsfaktor *EVI1*, welcher in den betroffenen Linien, aufgrund drei- bzw. vierfachen Vorhandenseins im Vergleich zu ausgewählten Kontrollzelllinien, massiv überexprimiert wurde. Anhand dieser Daten konnte erstmalig bei der FA eine direkte Verknüpfung zytogenetischer Daten und molekulargenetisch nachweisbarer Überexpression von *EVI1* hergestellt werden. Rearrangements von Chromosom 3q, welche sehr selten in kindlichen Non-FA-AMLs gefunden werden, resultierten nach Literaturangaben ebenso in einer Überexpression von *EVI1* und sind zudem ein genetischer Marker für eine schlechte Prognose.

### 3. ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG UND AUSBLICK

Die Zytogenetik trägt als Grundlagenwissenschaft der Humangenetik und der molekularen Medizin dazu bei, entscheidende biologisch-medizinische Sachverhalte in einen logischen Zusammenhang zu stellen. So ist die exakte Charakterisierung chromosomaler Aberrationen Grundvoraussetzung zum Verständnis klinischer und tumorbiologischer Fragestellungen.

Im Rahmen dieser Habilitationsschrift wird an drei Themengebieten illustriert, wie durch Anwendung eines breiten molekularzytogenetischen Methodenspektrums chromosomale Imbalancen charakterisiert und neue Erkenntnisse bezüglich ihrer pathogenetischen Relevanz und der zugrunde liegenden Entstehungsmechanismen gewonnen werden konnten.

1. Auf der Basis vergleichender genomischer Hybridisierungen (CGH) und unter Anwendung molekulargenetischer und immunologischer Methoden konnten unterschiedliche intra- und interchromosomale Aberrationen, die *de novo* entstanden waren, eingehend charakterisiert werden. Aus der Größe und den jeweils betroffenen Genen, im Falle von Mosaizismus auch aus der Verteilung in verschiedenen Geweben, konnten aussagefähige Karyotyp-Phänotyp-Korrelationen erstellt und Aussagen zum Wiederholungsrisiko getroffen werden. Dies sind wichtige Informationen für die genetische Beratung der betroffenen Familien.

Heute ist die Chip-basierte Array-CGH, als direkte Weiterentwicklung der konventionellen CGH, dabei, diese weitgehend zu ersetzen, da sie einige deutliche Vorteile bietet. Unter der Verwendung tausender BAC-Klone (BAC-Array) bzw. Oligonukleotide (Oligo-Array), welche nahezu lückenlos das gesamte menschliche Genom gleichmäßig abdecken, ist es heute möglich, hochauflösend genetische Imbalancen effizient nachzuweisen (Lockwood et al. 2006; Ylstra et al. 2006; Coe et al. 2007). Erste eigene Arbeiten unter Verwendung von BAC-Arrays konnten dies bestätigen (Klopocki et al. 2006a; Klopocki et al. 2006b; Stumm et al. 2007). Allerdings treten dabei auch neue Probleme auf. Mittels Array-CGH werden, gerade auch unter Kontrollpersonen, regelmäßig „copy number variants“ gefunden, bei denen es durchaus zum Verlust mehrerer Gene gekommen sein kann. Nach bisheriger Kenntnis scheinen sie keine direkte klinische Relevanz zu haben. Was aber ist der Fall, wenn der betreffende Abschnitt des homologen Chromosoms eine Mutation bzw.

epigenetische Veränderung aufweist oder ebenfalls deletiert ist? Vor dem Einsatz dieser neuen Analyseverfahren in der Routinediagnostik müssen diese Fragen erst geklärt werden.

2. Die Analysen verschiedener sporadischer Tumorentitäten führten zum Nachweis spezifischer chromosomaler Imbalancen, die eine bessere Klassifikation der Tumoren und eine genauere Aussage zum Metastasierisiko ermöglichten. Zudem konnten anhand der Charakterisierung zweier Tumorzelllinien erstmalig chromosomale Abschnitte ermittelt werden, die offensichtlich Gene beinhalten, die für die Entwicklung von Resistenzen verantwortlich sein können. Aufgrund dieser Daten konnte unter Verwendung von RNA-Interferenz-Techniken gezeigt werden, dass einzelne Resistenzen wieder aufgehoben werden können, was die Möglichkeit eines gentherapeutischen Ansatzes eröffnet (Pribsch et al. 2006). Weiterführende Analysen, auch mittels Expressionsstudien, werden zusätzliche Einblicke in die komplexen Prozesse der Resistenzentstehung von Tumorzellen ermöglichen. Die Lokalisierung und Identifizierung tumorinitiierender und resistenzrelevanter Gene ist sowohl für die Aufklärung der Ätiologie als auch für das Verständnis der Progression maligner Tumoren unerlässlich und eröffnet neue Wege in der Diagnostik und der spezifischen, personalisierten Tumorthherapie.

3. Anhand einer langjährigen Verlaufsstudie an Fanconi Anämie-Patienten konnten erstmals unter Verwendung molekularzytogenetischer Methoden spezifische chromosomale Imbalancen in präkanzerösen hämatopoetischen FA-Zellen nachgewiesen werden, die von erheblicher prognostischer Bedeutung sind und Eingang in die internationalen Leitlinien zur FA-Diagnostik gefunden haben. Dies belegt, wie die Ergebnisse zytogenetischer Grundlagenforschung in die klinische Praxis überführt werden können. Heute werden FA-Patienten mit Imbalancen von Chromosom 3q, aufgrund ihres extrem erhöhten Leukämierisikos, umgehend knochenmarktransplantiert. Unabdingbar in diesem Zusammenhang ist der frühzeitige Nachweis erster klonaler Veränderungen, der mittels Interphase-FISH auch an Zellen des peripheren Blutes möglich ist. Derzeit führen wir eine internationale Prospektivstudie unter Einbeziehung von FA-Patienten durch, die zeigen soll, wie wirkungsvoll diese FA-spezifische, automatisierte Analyseverfahren für FA-Patienten der verschiedenen Komplementationsgruppen ist.

Aufgrund des erstmaligen Nachweises der Überexpression des *EVII*-Gens in Zelllinien eines FA-Patienten mit einer Duplikation von Chromosom 3q, untersuchen wir derzeit

weitere FA-Proben mittels Expressions- und Array-CGH-Analysen, um tiefere Kenntnisse über diese neue leukämierelevante Aberration und die zugrunde liegenden Entstehungs- und Wirkmechanismen zu erlangen.

Die wissenschaftlichen Ergebnisse der letzten Jahre haben die Fanconi Anämie aus der Nische einer seltenen Anämieform ins Zentrum der Forschung gerückt, da hier grundlegende Einsichten in die DNA-Reparaturmechanismen und die Pathogenese verschiedener hämatologischer und solider Tumoren gewonnen werden können. Es bleibt zu hoffen, dass hieraus auch eine verbesserte Therapie für die Fanconi Anämie-Patienten resultiert.

In den nächsten Jahren wird noch ein großes Maß an patientenorientierter Grundlagenforschung zu leisten sein, um mehr Einsicht in die Entstehung und Folgen chromosomaler Imbalancen zu gewinnen. Den neuen Chip-basierten Analysemethoden wird dabei eine zentrale Bedeutung in einer personalisierten, modernen Medizin zukommen.

#### 4. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, et al. (1994) Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 54:1645-1648
- Alter BP (1996) Fanconi's anemia and malignancies. *Am J Hematol* 53:99-110
- Alter BP, Caruso JP, Drachtman RA, Uchida T, Velagaleti GV, Elghetany MT (2000) Fanconi anemia: myelodysplasia as a predictor of outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 117:125-131
- Alter BP (2003) Diagnostic Evaluation of FA. In: *Fanconi Anemia, Standards for Clinical Care*. Owen J, Frohnmayer L, Eiler ME (eds.), FARF, Eugene, Oregon (USA).
- Alter BP, Greene MH, Velazquez I, Rosenberg PS (2003) Cancer in Fanconi anemia. *Blood* 101:2072
- Angell R (1997) First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet* 61:23-32
- Aten JA, Stap J, Krawczyk PM, van Oven CH, Hoebe RA, Essers J, Kanaar R (2004) Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303:92-95
- Auerbach AD, Allen RG (1991) Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genet Cytogenet* 51:1-12
- Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D (2006) Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 21:223-233
- Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE (2002) Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297:1003-1007
- Balmain A (2001) Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer* 1:77-82
- Balmain A, Gray J, Ponder B (2003) The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* 33 Suppl:238-244
- Barber JC (2005) Directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities and euchromatic variants. *J Med Genet* 42:609-629
- Barber JC, Maloney V, Hollox EJ, Stuke-Sontheimer A, du Bois G, Daumiller E, Klein-Vogler U, Dufke A, Armour JA, Liehr T (2005) Duplications and copy number variants of 8p23.1 are cytogenetically indistinguishable but distinct at the molecular level. *Eur J Hum Genet* 13:1131-1136
- Barber JC, Maloney VK, Kirchhoff M, Thomas NS, Boyle TA, Castle B (2007) Transmitted duplication of 12q21.32-12q22 includes 48 genes and has no apparent phenotypic consequences. *Am J Med Genet A* 143:615-618
- Beneden van E, Neyt A (1887) *Nouvelles Recherches sur la Fécondation et la Division Mitosique chez L'Ascaride Mégalocéphale*. Brüssel: Bulletin de L'Académie Royale de Belgique 14 (3 sér).
- Biggio JR, Jr., Descartes MD, Carroll AJ, Holt RL (2004) Congenital diaphragmatic hernia: is 15q26.1-26.2 a candidate locus? *Am J Med Genet A* 126:183-185
- Borck G, Wirth J, Hardt T, Tonnies H, Brondum-Nielsen K, Bugge M, Tommerup N, Nothwang HG, Ropers HH, Haaf T (2001) Molecular cytogenetic characterisation

- of a complex 46,XY,t(7;8;11;13) chromosome rearrangement in a patient with Moebius syndrome. *J Med Genet* 38:117-121
- Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49:4682-4689
- Bouchard C, Staller P, Eilers M (1998) Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol* 8:202-206
- Boveri (1914) Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fischer, Jena
- Boveri T (1888) Zellen-Studien II. Die Befruchtung und Teilung des Eies von *Ascaris megalocephala*. *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft* 22::685-882
- Brannan CI, Bartolomei MS (1999) Mechanisms of genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 9:164-170
- Burger J, Horn D, Tonnie H, Neitzel H, Reis A (2002) Familial interstitial 570 kbp deletion of the UBE3A gene region causing Angelman syndrome but not Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 111:233-237
- Butschli (1876) Studien über die ersten Entwicklungsvorgänge der Eizelle, die Zelltheilung und die Conjugation der Infusorien. Frankfurt a. M.: Christian Winter
- Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD (1994) Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 84:1650-1655
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 9:M57-60
- Callen E, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Ortega JJ, Olive T, Badell I, Surralles J (2002) Relationship between chromosome fragility, aneuploidy and severity of the haematological disease in Fanconi anaemia. *Mutat Res* 504:75-83
- Carter NP (2004) As normal as normal can be? *Nat Genet* 36:931-932
- Charames GS, Bapat B (2003) Genomic instability and cancer. *Curr Mol Med* 3:589-596
- Chen H, Tuck-Muller CM, Batista DA, Wertelecki W (1995) Identification of supernumerary ring chromosome 1 mosaicism using fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 56:219-233
- Cho EK, Tchinda J, Freeman JL, Chung YJ, Cai WW, Lee C (2006) Array-based comparative genomic hybridization and copy number variation in cancer research. *Cytogenet Genome Res* 115:262-272
- Clarke DJ, Gimenez-Abian JF, Tonnie H, Neitzel H, Sperling K, Downes CS, Johnson RT (1998) Creation of monosomic derivatives of human cultured cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:167-171
- Coe BP, Ylstra B, Carvalho B, Meijer GA, Macaulay C, Lam WL (2007) Resolving the resolution of array CGH. *Genomics* 89:647-653
- Conrad DF, Andrews TD, Carter NP, Hurler ME, Pritchard JK (2006) A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet* 38:75-81
- Cowell JK (1982) Double minutes and homogeneously staining regions: gene amplification in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 16:21-59
- Cremer T (1985) Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo
- D'Andrea AD, Grompe M (2003) The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3:23-34
- de Ravel TJ, Balikova I, Thienpont B, Hannes F, Maas N, Fryns JP, Devriendt K, Vermeesch JR (2006) Molecular karyotyping of patients with MCA/MR: the blurred boundary between normal and pathogenic variation. *Cytogenet Genome Res* 115:225-230
- Delhanty JD (1997) Chromosome analysis by FISH in human preimplantation genetics. *Hum Reprod* 12:153-155

- Digweed M, Demuth I, Rothe S, Scholz R, Jordan A, Grotzinger C, Schindler D, Grompe M, Sperling K (2002) SV40 large T-antigen disturbs the formation of nuclear DNA-repair foci containing MRE11. *Oncogene* 21:4873-4878
- Duker NJ (2002) Chromosome breakage syndromes and cancer. *Am J Med Genet* 115:125-129
- Emanuel BS, Shaikh TH (2001) Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet* 2:791-800
- Emmert S, Leibelung D, Runger TM (2006) Syndromes with genetic instability: model diseases for (skin) cancerogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges* 4:721-731
- Engel E (1998) Uniparental disomies in unselected populations. *Am J Hum Genet* 63:962-966
- Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767
- Fischer TC, Gellrich S, Muche JM, Sherev T, Audring H, Neitzel H, Walden P, Sterry W, Tonnies H (2004) Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 122:579-586
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE (1995) The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132-140
- Gadzicki D, Baumer A, Wey E, Happel CM, Rudolph C, Tonnies H, Neitzel H, Steinemann D, Welte K, Klein C, Schlegelberger B (2006) Jacobsen syndrome and Beckwith-Wiedemann syndrome caused by a parental pericentric inversion inv(11)(p15q24). *Ann Hum Genet* 70:958-964
- Gardner R, Sutherland G (2003) *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. Oxford University Press
- Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O (2001) Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 68:874-883
- Giglio S, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R, Ragusa A, Gueneri S, Selicorni A, Stumm M, Tonnies H, Ventura M, Zollino M, Neri G, Barber J, Wiczorek D, Rocchi M, Zuffardi O (2002) Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. *Am J Hum Genet* 71:276-285
- Gobbel L, Schultka R, Klunker R, Stock K, Wand D, Olsson L, Gerlach A, Tonnies H (2005) Acrofacial dysostosis (AFD) with preaxial limb hypoplasia (Nager AFD) and club foot diagnosed in a fetus from 1812 in the anatomical collections at the University of Halle, Germany. *Am J Med Genet A* 137:263-268
- Gobbel L, Schultka R, Klunker R, Stock K, Helm J, Olsson L, Opitz JM, Gerlach A, Tonnies H (2007) Nuchal cystic hygroma in five fetuses from 1819 to 1826 in the Meckel-anatomical collections at the University of Halle, Germany. *Am J Med Genet A* 143:119-128
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531-537
- Guschmann M, Tonnies H, Buhner C, Mau H, Vogel M (2002) Myoid differentiation in mesoblastic nephroma: clinicopathologic and cytogenetic findings of a rare case. *J Pediatr Surg* 37:E22

- Guschmann M, Tonnies H, Neitzel H, Schmidt G, Wickede Mv, Stover B (2005) Kongenitaler melanotischer neuroektodermaler Tumor. *Monatsschrift Kinderheilkd* 153:157-163
- Hahn WC, Weinberg RA (2002) Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347:1593-1603
- Handyside AH, Delhanty JD (1997) Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. *Trends Genet* 13:270-275
- Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, Kidd A, Mehes K, Nash R, Robin N, Shannon N, Tolmie J, Swansbury J, Irrthum A, Douglas J, Rahman N (2004) Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet* 36:1159-1161
- Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2:280-291
- Heim S, Mitelman F (1995) *Cancer Cytogenetics*. Wiley Liss Inc, New York
- Henegariu O, Pescovitz OH, Vance GH, Verbrugge J, Heerema NA (1997) A case with mosaic di-, tetra-, and octacentric ring Y chromosomes. *Am J Med Genet* 71:426-429
- Hertwig O (1876) Beiträge zur Kenntnis der Bildung, Befruchtung und Teilung des thierischen Eies. *Morphologisches Jahrbuch* 1::347-434
- Hillgenberg M, Tonnies H, Strauss M (2001) Chromosomal integration pattern of a helper-dependent minimal adenovirus vector with a selectable marker inserted into a 27.4-kilobase genomic stuffer. *J Virol* 75:9896-9908
- Hinds DA, Kloek AP, Jen M, Chen X, Frazer KA (2006) Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet* 38:82-85
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374
- Holmquist GP (1992) Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am J Hum Genet* 51:17-37
- Horn D, Neitzel H, Tonnies H, Kalscheuer V, Kunze J, Hinkel GK, Bartsch O (2003) Familial MCA/MR syndrome due to inherited submicroscopic translocation t(18;21)(q22.1q21.3) with breakpoint at the Down syndrome critical region. *Am J Med Genet A* 117:236-244
- Horn D, Tonnies H, Neitzel H, Wahl D, Hinkel GK, von Moers A, Bartsch O (2004) Minimal clinical expression of the holoprosencephaly spectrum and of Currarino syndrome due to different cytogenetic rearrangements deleting the Sonic Hedgehog gene and the HLXB9 gene at 7q36.3. *Am J Med Genet A* 128:85-92
- Hummel S, Herrmann B, Rameckers J, Muller D, Sperling K, Neitzel H, Tonnies H (1999) Proving the authenticity of ancient DNA by comparative genomic hybridization. *Naturwissenschaften* 86:500-503
- Iafraite AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36:949-951
- Ikeda H, Matsushita M, Waisfisz Q, Kinoshita A, Oostra AB, Nieuwint AW, De Winter JP, Hoatlin ME, Kawai Y, Sasaki MS, D'Andrea AD, Kawakami Y, Joenje H (2003) Genetic reversion in an acute myelogenous leukemia cell line from a Fanconi anemia patient with biallelic mutations in BRCA2. *Cancer Res* 63:2688-2694
- Jacobs PA (1981) Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet* 33:44-54
- Jakubiczka S, Bettecken T, Mohnike K, Schneppenheim R, Stumm M, Tonnies H, Volleth M, Wieacker P (2006) Symptoms of OTC deficiency but not DMD in a female

- carrier of an Xp21.1 deletion including the genes for dystrophin and OTC. *Eur J Pediatr*
- Jefford CE, Irminger-Finger I (2006) Mechanisms of chromosome instability in cancers. *Crit Rev Oncol Hematol* 59:1-14
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821
- Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761, 763
- Klopocki E, Fiebig B, Robinson P, Tonnies H, Erdogan F, Ropers HH, Mundlos S, Ullmann R (2006a) A novel 8 Mb interstitial deletion of chromosome 8p12-p21.2. *Am J Med Genet A* 140:873-877
- Klopocki E, Neumann LM, Tonnies H, Ropers HH, Mundlos S, Ullmann R (2006b) Ulnar-mammary syndrome with dysmorphic facies and mental retardation caused by a novel 1.28 Mb deletion encompassing the TBX3 gene. *Eur J Hum Genet*
- Klunker R, Gobbel L, Musil A, Tonnies H, Schultka R (2002) [Johann Friedrich Meckel the Younger (1781-1833) and modern teratology]. *Ann Anat* 184:535-540
- Knight SJ, Flint J (2000) Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37:401-409
- Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820-823
- Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y (1998) DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 152:1107-1123
- Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorkqvist AM, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, Lushnikova T, Monni O, Pere H, Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius VM, Wolf M, Zhu Y (1999) DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol* 155:683-694
- Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, Tonnies H, Weise D, Lafferty A, Schwarz S, DeFelice M, von Deimling A, van Landeghem F, DiLauro R, Gruters A (2002) Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest* 109:475-480
- Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS (2003) The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats. *Am J Hum Genet* 72:733-738
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921
- Lee C (2005) Vive la difference! *Nat Genet* 37:660-661
- Lemke J, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Muhlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Grummt UW, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Claussen U (2002) The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Am J Hum Genet* 71:1051-1059
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649
- Lengauer C (2005) Aneuploidy and genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* 15:1
- Liehr T, Nietzel A, Starke H, Heller A, Weise A, Kuechler A, Senger G, Ebner S, Martin T, Stumm M, Wegner R, Tonnies H, Hoppe C, Claussen U, Von Eggeling F (2003) Characterization of Small Marker Chromosomes (SMC) by Recently Developed Molecular Cytogenetic Approaches. *J Assoc Genet Technol* 29:5-10

- Lockwood WW, Chari R, Chi B, Lam WL (2006) Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur J Hum Genet* 14:139-148
- Lupski JR (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14:417-422
- Lupski JR, Stankiewicz P (2005) Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 1:e49
- McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C, Daly MJ, Altshuler DM (2006) Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 38:86-92
- Meijer GA (2005) Chromosomes and cancer, Boveri revisited. *Cell Oncol* 27:273-275
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6:924-935
- Meyer S, Fergusson WD, Oostra AB, Medhurst AL, Waisfisz Q, de Winter JP, Chen F, Carr TF, Clayton-Smith J, Clancy T, Green M, Barber L, Eden OB, Will AM, Joenje H, Taylor GM (2005) A cross-linker-sensitive myeloid leukemia cell line from a 2-year-old boy with severe Fanconi anemia and biallelic FANCD1/BRCA2 mutations. *Genes Chromosomes Cancer* 42:404-415
- Meyer S, Fergusson WD, Whetton AD, Moreira-Leite F, Pepper SD, Miller C, Saunders EK, White DJ, Will AM, Eden T, Ikeda H, Ullmann R, Tuerkmen S, Gerlach A, Klopocki E, Tonnie H (2007) Amplification and translocation of 3q26 with overexpression of EVI1 in Fanconi anemia-derived childhood acute myeloid leukemia with biallelic FANCD1/BRCA2 disruption. *Genes Chromosomes Cancer*
- Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD (2004) Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 18:115-136
- Murnane JP (2006) Telomeres and chromosome instability. *DNA Repair (Amst)* 5:1082-1092
- Musebeck J, Mohnike K, Beye P, Tonnie H, Neitzel H, Schnabel D, Gruters A, Wieacker PF, Stumm M (2001) Short stature homeobox-containing gene deletion screening by fluorescence in situ hybridisation in patients with short stature. *Eur J Pediatr* 160:561-565
- Neitzel H, Kuhl J, Gerlach A, Ebell W, Tonnie H (2007) Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: results and implications. *Monogr Hum Genet* [Epub ahead of print]
- Niedernhofer LJ, Lalai AS, Hoeijmakers JH (2005) Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell* 123:1191-1198
- Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23-28
- Pellestor F, Andreo B, Anahory T, Hamamah S (2006) The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic studies of human oocytes. *Eur J Med Genet* 49:103-116
- Peoples R, Franke Y, Wang YK, Perez-Jurado L, Paperna T, Cisco M, Francke U (2000) A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome--deletion region at 7q11.23. *Am J Hum Genet* 66:47-68
- Petrausch U, Martus P, Tonnie H, Bechrakis NE, Lenze D, Wansel S, Hummel M, Bornfeld N, Thiel E, Foerster MH, Keilholz U (2007) Significance of gene expression analysis in uveal melanoma in comparison to standard risk factors for risk assessment of subsequent metastases. *Eye* [Epub ahead of print]
- Pihan G, Doxsey SJ (2003) Mutations and aneuploidy: co-conspirators in cancer? *Cancer Cell* 4:89-94

- Priebsch A, Rompe F, Tonnies H, Kowalski P, Surowiak P, Stege A, Materna V, Lage H (2006) Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance by RNA interference in human carcinoma cells. *Oligonucleotides* 16:263-274
- Rabl C (1885) Über Zellteilung. *Morphologisches Jahrbuch* 10:214-330
- Rajagopalan H, Lengauer C (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature* 432:338-341
- Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, Wurm M, Batish SD, Lach FP, Yetgin S, Neitzel H, Ariffin H, Tischkowitz M, Mathew CG, Auerbach AD, Rahman N (2007) Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* 39:162-164
- Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schrock E, Auer G (1999) Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* 25:195-204
- Roback EW, Barakat AJ, Dev VG, Mbikay M, Chretien M, Butler MG (1991) An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1-qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene. *Am J Med Genet* 38:74-79
- Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP (2003) Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* 101:822-826
- Schinzl A (2001) A Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Schleiden M (1838) Beiträge zur Phytogenesis. *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin (Müllers Archiv)* 5:137-176
- Schroeder TM, Kurth R (1971) Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease. *Blood* 37:96-112
- Schroeder TM (1974) Relationship between chromosomal instability and leukemia. *Hamatol Bluttransfus* 14:94-96
- Schwab M (1999) Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 9:319-325
- Schwab M (2001) *Encyclopedic Reference of Cancer*. Springer
- Schwann T (1839) *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen*. Berlin: Verlag der Sanderschen Buchhandlung (G E Reimer)
- Seidel J, Heller A, Senger G, Starke H, Chudoba I, Kelbova C, Tonnies H, Neitzel H, Haase C, Beensen V, Zintl F, Claussen U, Liehr T (2003) A multiple translocation event in a patient with hexadactyly, facial dysmorphism, mental retardation and behaviour disorder characterised comprehensively by molecular cytogenetics. Case report and review of the literature. *Eur J Pediatr* 162:582-588
- Shaffer LG, Lupski JR (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 34:297-329
- Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA (2006) Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr* 149:98-102
- Siebert R (2003) Familiäre lymphatische und myeloische Neoplasien. In: *Molekulare Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*. Springer Verlag
- Siebler T, Lopaczynski W, Terry CL, Casella SJ, Munson P, De Leon DD, Phang L, Blakemore KJ, McEvoy RC, Kelley RI, et al. (1995) Insulin-like growth factor I receptor expression and function in fibroblasts from two patients with deletion of the distal long arm of chromosome 15. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3447-3457
- Slavotinek AM, Moshrefi A, Davis R, Leeth E, Schaeffer GB, Burchard GE, Shaw GM, James B, Ptacek L, Pennacchio LA (2006) Array comparative genomic hybridization in patients with congenital diaphragmatic hernia: mapping of four

- CDH-critical regions and sequencing of candidate genes at 15q26.1-15q26.2. *Eur J Hum Genet* 14:999-1008
- Sperling K, Neitzel H (2003) Zytogenetische Grundlagen der molekularen Medizin. In: Grundlagen der molekularen Medizin. Ganten D, Ruckpaul K (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 18:74-82
- Strasburger E (1875) Über Vorgänge bei der Befruchtung. *Tageblatt der 48 Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Graz* 18-24 Sept 1875 V Sekt für Botanik und Pflanzenphysiologie:150
- Stumm M, Koch A, Wieacker PF, Phillip C, Steinbach F, Allhoff EP, Buhtz P, Walter H, Tonnies H, Wirth J (1999a) Partial monosomy 2p as the single chromosomal anomaly in a case of renal metanephric adenoma. *Cancer Genet Cytogenet* 115:82-85
- Stumm M, Tonnies H, Mandon U, Gotze A, Krebs P, Wieacker PF (1999b) Mosaic tetrasomy 9p in a girl with multiple congenital anomalies: cytogenetic and molecular-cytogenetic studies. *Eur J Pediatr* 158:571-575
- Stumm M, Tonnies H, Wieacker PF (1999c) Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood disease. *Eur J Pediatr* 158:531-536
- Stumm M, Musebeck J, Tonnies H, Volleth M, Lemke J, Chudoba I, Wieacker P (2002) Partial trisomy 9p12p21.3 with a normal phenotype. *J Med Genet* 39:141-144
- Stumm M, Klopocki E, Gasiorek-Wiens A, Knoll U, Wirjadi D, Sarioglu N, Wegner RD, Tonnies H (2007) Molecular cytogenetic characterisation of an interstitial deletion 12p detected by prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* [Epub ahead of print]
- Sullivan BA, Jenkins LS, Karson EM, Leana-Cox J, Schwartz S (1996) Evidence for structural heterogeneity from molecular cytogenetic analysis of dicentric Robertsonian translocations. *Am J Hum Genet* 59:167-175
- Taniguchi T, D'Andrea AD (2006) Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood* 107:4223-4233
- Teixeira MR, Heim S (2005) Multiple numerical chromosome aberrations in cancer: what are their causes and what are their consequences? *Semin Cancer Biol* 15:3-12
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718-725
- Templado C, Bosch M, Benet J (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111:199-205
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260:816-819
- Thomas NS, Durkie M, Potts G, Sandford R, Van Zyl B, Youings S, Dennis NR, Jacobs PA (2006a) Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11. *Eur J Hum Genet* 14:831-837
- Thomas NS, Durkie M, Van Zyl B, Sanford R, Potts G, Youings S, Dennis N, Jacobs P (2006b) Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet* 119:444-450
- Tischkowitz M, Dokal I (2004) Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *Br J Haematol* 126:176-191
- Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF (1996) The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14800-14803

- Tonnies H, Schulze I, Hennies H, Neumann LM, Keitzer R, Neitzel H (2001a) De novo terminal deletion of chromosome 15q26.1 characterised by comparative genomic hybridisation and FISH with locus specific probes. *J Med Genet* 38:617-621
- Tonnies H, Sperling K, Neitzel H (2001b) Analysis of chromosomal imbalances in routine cytogenetic diagnostics by comparative genomic hybridization (CGH). *Oman Medical Journal* 17:5-13
- Tonnies H, Stumm M, Neumann L, Volleth M, Grumpelt U, Musebeck J, Annuss G, Neitzel H (2001c) Two further cases of WHS with unbalanced de novo translocation t(4;8) characterised by CGH and FISH. *J Med Genet* 38:E21
- Tonnies H, Stumm M, Wegner RD, Chudoba I, Kalscheuer V, Neitzel H (2001d) Comparative genomic hybridization based strategy for the analysis of different chromosome imbalances detected in conventional cytogenetic diagnostics. *Cytogenet Cell Genet* 93:188-194
- Tonnies H, Toliat MR, Ramel C, Pape UF, Neitzel H, Berger W, Wiedenmann B (2001e) Analysis of sporadic neuroendocrine tumours of the enteropancreatic system by comparative genomic hybridisation. *Gut* 48:536-541
- Tonnies H (2002) Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. *Trends Mol Med* 8:246-250
- Tonnies H, Klunker R, Saar K, Gobbel L, Musil A, Schultka R (2002) Molecular-cytogenetic analysis of ancient DNA (aDNA) from preparations from the Meckel collection in Halle (Saale). *Ann Anat* 184:541-545
- Tonnies H, Hennies HC, Spohr HL, Neitzel H (2003a) Characterization of the first supernumerary trivalent ring chromosome 1 mosaicism by conventional and molecular cytogenetic techniques. *Cytogenet Genome Res* 103:28-33
- Tonnies H, Huber S, Kuhl JS, Gerlach A, Ebell W, Neitzel H (2003b) Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood* 101:3872-3874
- Tonnies H, Neumann LM, Gruneberg B, Neitzel H (2003c) Characterization of a supernumerary ring chromosome 1 mosaicism in two cell systems by molecular cytogenetic techniques and review of the literature. *Am J Med Genet A* 121:163-167
- Tonnies H, Poland J, Sinha P, Lage H (2003d) Association of genomic imbalances with drug resistance and thermoresistance in human gastric carcinoma cells. *Int J Cancer* 103:752-758
- Tonnies H (2004) Comments on "congenital Diaphragmatic Hernia: Is 15q26.1-26.2 a candidate locus?" *Am J Med Genet A* 131:224
- Tonnies H, Lage H (2004) Chromosomal imbalances associated with drug resistance and thermoresistance in human pancreatic carcinoma cells. *Eur J Cell Biol* 83:591-601
- Tonnies H (2005) Molecular cytogenetics in molecular diagnostics. In: *Molecular Diagnostics*. Ansorge W and Patrinos GP (eds.). Elsevier
- Tonnies H, Gerlach A, Klunker R, Schultka R, Gobbel L (2005) First systematic CGH-based analyses of ancient DNA samples of malformed fetuses preserved in the Meckel Anatomical Collection in Halle/Saale (Germany). *J Histochem Cytochem* 53:381-384
- Tonnies H, Gerlach A, Heineking B, Starke H, Neitzel H, Neumann LM (2006) Molecular cytogenetic identification and characterization of a de novo supernumerary neocentromeric derivative chromosome 13. *Cytogenet Genome Res* 114:325-329
- Tonnies H, Huber S, Volarikova E, Gerlach A, Neitzel H (2007a) Interphase FISH-Assay for the detection of MDS- and AML-associated chromosomal imbalances in native bone marrow and blood cells. *Monogr Hum Genet* [Epub ahead of print]

- Tonnies H, Pietrzak J, Bocian E, Macdermont K, Kuechler A, Belitz B, Trautmann U, Schmidt A, Schulze B, Rodriguez L, Binkert F, Yardin C, Kosyakova N, Volleth M, Mkrtchyan H, Schreyer I, von Eggeling F, Weise A, Mrasek K, Liehr T (2007b) New Immortalized Cell Lines of Patients With Small Supernumerary Marker Chromosome (sSMC): Towards the Establishment of a Cell Bank. *J Histochem Cytochem* [Epub ahead of print]
- Trimborn M, Grueters A, Neitzel H, Tonnies H (2005a) First small supernumerary ring chromosome carrying 10q euchromatin in a patient with mild phenotype characterized by molecular cytogenetic techniques and review of the literature. *Cytogenet Genome Res* 108:278-282
- Trimborn M, Liehr T, Belitz B, Pfeiffer L, Varon R, Neitzel H, Tonnies H (2005b) Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of an unusual complex structural rearrangement in a pregnancy following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *J Histochem Cytochem* 53:351-354
- Trimborn M, Wegner RD, Tonnies H, Sarioglu N, Albig M, Neitzel H (2006) Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterisation of a small de novo interstitial duplication 16q11.2-q13. *Prenat Diagn* 26:273-276
- Tzschach A, Krause-Plonka I, Menzel C, Kalscheuer V, Toennies H, Scherthan H, Knoblauch A, Radke M, Ropers HH, Hoeltzenbein M (2006a) Molecular cytogenetic analysis of a de novo interstitial deletion of 5q23.3q31.2 and its phenotypic consequences. *Am J Med Genet A* 140:496-502
- Tzschach A, Krause-Plonka I, Menzel C, Knoblauch A, Toennies H, Hoeltzenbein M, Radke M, Ropers HH, Kalscheuer V (2006b) Molecular cytogenetic analysis of a de novo interstitial chromosome 10q22 deletion. *Am J Med Genet A* 140:1108-1110
- Varon R, Muer A, Wagner K, Zierler H, Sodja S, Rauter L, Petek E, Tonnies H, Neitzel H, Sperling K, Kroisel PM (2007) Nijmegen breakage syndrome (NBS) due to maternal isodisomy of chromosome 8. *Am J Med Genet A* 143:92-94
- Virchow R (1855) Cellular-Pathologie. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin (Virchows Archiv)* 8::3-39
- Virchow R (1858) Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Berlin: August Hirschwald
- Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD (2004) Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol* 24:5850-5862
- Wang X, D'Andrea AD (2004) The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 3:1063-1069
- Weaver BA, Cleveland DW (2006) Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol* 18:658-667
- Weimer J, Kiechle M, Wiedemann U, Tonnies H, Neitzel H, Ruhenstroth E, Ovens-Raeder A, Arnold N (2000) Delineation of a complex karyotypic rearrangement by microdissection and CGH in a family affected with split foot. *J Med Genet* 37:442-445
- Weinberg RA (1994) Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin* 44:160-170
- Weinert T (1998) DNA damage checkpoints update: getting molecular. *Curr Opin Genet Dev* 8:185-193
- Weise A, Starke H, Heller A, Tonnies H, Volleth M, Stumm M, Gabriele S, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (2002) Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterised by high resolution multicolour banding and region specific FISH probes. *J Med Genet* 39:434-439

- Wieczorek D, Krause M, Majewski F, Albrecht B, Meinecke P, Riess O, Gillessen-Kaesbach G (2000) Unexpected high frequency of de novo unbalanced translocations in patients with Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS). *J Med Genet* 37:798-804
- Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA (2006) BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res* 34:445-450
- Zakrzewski S, Sperling K (1980) Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum Genet* 56:81-84
- Zumkeller W, Volleth M, Muschke P, Tonnie H, Heller A, Liehr T, Wieacker P, Stumm M (2004) Genotype/phenotype analysis in a patient with pure and complete trisomy 12p. *Am J Med Genet A* 129:261-264

## 5. DANKSAGUNG

Meinem langjährigen Mentor, Herrn Prof. Dr. Karl Sperling, Leiter des Instituts für Humangenetik der Charité, bin ich für die großzügige Unterstützung, die stete Diskussionsbereitschaft und die Überlassung des notwendigen wissenschaftlichen Freiraumes sehr zu Dank verpflichtet.

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. Heidemarie Neitzel, der Leiterin der Chromosomendiagnostik, für Ihre immerwährende tatkräftige Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Antje Gerlach, ohne deren Tatkraft viele experimentelle Ideen kaum umgesetzt worden wären. Die molekulare Zytogenetik des Instituts für Humangenetik wäre ohne dich nicht das, was sie heute ist!

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Chromosomendiagnostik des Instituts für Humangenetik, Diplomanden und Doktoranden eingeschlossen, gilt mein allerherzlichster Dank für die langjährige angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre, die Grundvoraussetzung zum Gelingen dieser Arbeiten war.

Mein besonderer Dank gilt meinem guten Freund und Mitstreiter der ersten Tage, Priv.-Doz. Dr. Markus Stumm, für die langjährige fruchtbare Zusammenarbeit, sowie für die vielen konstruktiven Diskussionen.

An dieser Stelle möchte ich gerne allen Kooperationspartnern und Freunden meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die mir auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt oder indirekt zum Gelingen meiner Arbeiten beigetragen haben.

Und nicht zuletzt möchte ich allen Patienten für die freundliche Überlassung der Proben danken.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung der experimentellen Arbeiten danke ich der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V., dem Aktionskreis Fanconi-Anämie e.V., der universitären Forschungsförderung der Charité, der Deutschen Krebshilfe, dem BMBF und dem Fanconi Anemia Research Fund (USA).

Meinen tiefsten und aufrichtigen Dank empfinde ich meinen Eltern gegenüber, die mich immer mit größter Kraft und Liebe unterstützt haben. Diese Habilitationsschrift ist meinem Vater gewidmet, der leider ihre Fertigstellung nicht mehr erleben durfte.

**ERKLÄRUNG**

§ 4 Abs.3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum.....  
Unterschrift