
**Karyotypeevolution, Genomorganisation und
Zellkernarchitektur der Neuweltaffen**

Michaela Neusser

**Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**vorgelegt von
Michaela Neusser
aus München**

München, den 27.5.2004

Karyotypevolution, Genomorganisation und Zellkernarchitektur der Neuweltaffen

Dissertation der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians Universität München (LMU)

vorgelegt von

Dipl. Biol. Michaela Neusser

aus München

Erstgutachter: Prof. Dr. Johannes Wienberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2004

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Zusammenfassung	10
2	Einleitung	15
2.1	Systematische Stellung der Neuweltaffen innerhalb der Primaten	15
2.2	Biologie der Neuweltaffen	16
2.3	Phylogenie und Taxonomie der Neuweltaffen	18
2.3.1	Methoden der vergleichenden Biologie	18
2.3.2	Morphologische und molekular-genetische Studien zur Phylogenie der Neuweltaffen	20
2.4	Vergleichende Zytogenetik der Primaten	26
2.4.1	Klassische Zytogenetik	26
2.4.2	Molekulare Zytogenetik	27
2.4.3	Rekonstruktion chromosomaler Landmarken bei Primaten	31
2.5	Die Architektur des Zellkerns	36
2.5.1	Modell der funktionellen Zellkernarchitektur	36
2.5.2	Höhere Ordnung der Chromatin Anordnung	38
2.5.3	Radiale und nachbarschaftliche Chromatin Anordnung im Zellkern	38
2.5.3.1	Radiale Anordnung von Chromosomenterritorien	38
2.5.3.2	Nachbarschaftliche Chromatin Anordnung	40
2.5.4	Einfluss von Heterochromatin auf die Chromatin Anordnung	41
2.5.5	Vergleichende Zellkernarchitektur	43
2.6	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	46
3	Material und Methoden	48
3.1	Zellmaterial	48
3.2	Zellkultur	49
3.2.1	Primäre Lymphozytenkulturen	49
3.2.2	Kultur von lymphoblastoiden Zelllinien	49
3.2.3	Kultur von Fibroblasten	50
3.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen	50
3.3	Metaphasenpräparation für die <i>in situ</i> Hybridisierung	51
3.4	Zellpräparation für die 3D <i>in situ</i> Hybridisierung	52

3.4.1	Lymphoblastoide Zellen	52
3.4.1.1	Puls-Markierung mittels BrdU und Adhäsion der Zellen auf Deckgläser	52
3.4.1.2	3D Fixierung, Postfixierung und Lagerung	53
3.4.1.3	Enzymatischer Verdau mit Pepsin	54
3.4.2	Fibroblasten	55
3.5	DNA Sonden	55
3.5.1	Gesamtgenomische DNA	55
3.5.1.1	DNA Präparation nach Miller et al. (1988)	55
3.5.1.2	DNA Präparation mittels „Makrodissektion“	57
3.5.1.3	DNA Präparation unter Verwendung kommerziell erhältlicher Kits	57
3.5.2	Chromosomen-spezifische DNA Sonden	58
3.5.3	Generierung subregionaler DNA Sonden mittels Mikrodissektion	59
3.6	Amplifikation und nichtradioaktive Markierung von DNA Sonden	60
3.6.1	Prinzip der DOP-PCR	60
3.6.2.	Anreicherung von DNA über DOP-PCR (Primäramplifikation)	61
3.6.3.	Re-Amplifikation der Primäramplifikate mittels DOP-PCR	62
3.6.4	Markierung von DNA Sonden mittels DOP-PCR	64
3.6.5	Markierung von DNA Sonden mittels Nicktranslation	66
3.7	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	67
3.7.1	Vorbereitung von DNA Sonden	70
3.7.2	Denaturierung von DNA Sonden und Präparaten	71
3.7.3	Hybridisierung <i>in situ</i> und stringentes Waschen	71
3.8	Detektion hybridisierter DNA Sonden und von BrdU	72
3.8.1	Detektion hybridisierter DNA Sonden	73
3.8.2	Nachweissysteme bei Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	73
3.8.3	Nachweis von inkorporiertem BrdU	74
3.8.4	Kolorimetrische Detektion nach <i>in situ</i> Hybridisierung	75
3.8.5	Chromosomale Gegenfärbung	75
3.8.6	Eindecken von Präparaten	76
3.9	Sequentielle Hybridisierung: <i>ReFISH</i>	76
3.10	Mikroskopie	77
3.10.1	Phasenkonstrastmikroskopie	77
3.10.2	Epifluoreszenzmikroskopie	78
3.10.3	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	79

3.11	Bildbearbeitung, quantitative Auswertung und Statistik	80
3.11.1	<i>Adobe Photoshop</i>	80
3.11.2	<i>Quips CGH/Karyotyper</i>	81
3.11.3	<i>ImageJ</i>	81
3.11.4	<i>Volocity</i>	82
3.11.5	<i>3D-RRD (3D Relative Radius Distribution)</i>	83
3.11.6	Statistische Tests zur Bestimmung der Signifikanz	85
3.12	Rekonstruktion chromosomaler Phylogenien mittels <i>PAUP</i>	86
3.13	Verbrauchsmaterial	87
3.13.1	Chemikalien	87
3.13.2	Nährmedien und Zusätze	88
3.13.3	Enzyme, Nukleinsäuren und Primer	88
3.13.4	Biotinnachweis und Antikörper	88
3.13.5	Puffer und Lösungen	88
3.13.6	Kommerziell erhältliche Kits	93
4	Ergebnisse	94
4.1	Vergleichende Karyotypanalyse mittels <i>multi-directional cross species chromosome painting</i>	94
4.1.1	Zusammensetzung von <i>multi-color</i> Sonden Sets	96
4.1.1.1	Menschliche sechsfarben DNA Sonden Sets	97
4.1.1.2	<i>Saguinus oedipus</i> sechs- und siebenfarben Sonden Sets	98
4.1.1.3	Chromosomen-spezifische DNA Sonden des Wollaffen <i>L. lagothericha</i>	100
4.1.1.4	<i>Hylobates concolor</i> (Gibbon) sechsfarben Sonden Sets	104
4.1.1.5	M-FISH Karyotypierung mittels sequentieller Hybridisierung (<i>ReFISH</i>)	104
4.1.2	Resultate des <i>multi-directional cross species chromosome painting</i>	106
4.1.2.1	<i>Cross species chromosome painting</i> bei Callitrichinae (Krallenaffen)	107
4.1.2.1.1	<i>Callithrix jacchus</i>	108
4.1.2.1.2	<i>Callithrix penicillata</i>	110
4.1.2.1.3	<i>Callithrix jacchus</i> X <i>Cebuella pygmaea</i> Inter-Spezies Hybrid	112
4.1.2.1.4	<i>Saguinus oedipus</i>	114
4.1.2.1.5	<i>Saguinus imperator</i>	114
4.1.2.1.6	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	116
4.1.2.2	<i>Cross species chromosome painting</i> bei Cebinae (Kapuzineraffen)	116

4.1.2.2.1	<i>Cebus apella paraguayanus</i>	116
4.1.2.2.2	<i>Cebus albifrons</i>	118
4.1.2.2.3	<i>Saimiri boliviensis</i>	120
4.1.2.2.4	<i>Saimri ustus</i>	121
4.1.2.2.5	<i>Saimiri sciureus</i>	121
4.1.2.3	Cross species chromosome painting bei Aotinae (Nacht- und Springaffen)	123
4.1.2.3.1	<i>Aotus infulatus</i>	123
4.1.2.3.2	<i>Aotus trivirgatus</i>	125
4.1.2.3.3	<i>Callicebus donacophilus</i>	128
4.1.2.4	Cross species chromosome painting bei Pitheciinae (Sakis und Uakaris)	131
4.1.2.4.1	<i>Cacajao calvus</i>	131
4.1.2.4.2	<i>Chiropotes satanas</i>	133
4.1.2.5	Cross species chromosome painting bei Atelinae (Brüllaffen, Klammeraffen und Wollaffen)	133
4.1.2.5.1	<i>Ateles paniscus paniscus</i>	133
4.1.2.5.2	<i>Ateles belzebul marginatus</i>	135
4.1.2.5.3	<i>Lagothrix lagothricha</i>	136
4.1.2.5.4	<i>Brachyteles archnoides</i>	137
4.1.2.5.5	Gattung <i>Alouatta</i> (Brüllaffen)	138
4.1.2.5.5.1	<i>Alouatta caraya</i>	139
4.1.2.5.5.2	<i>Alouatta seniculus macconnelli</i>	140
4.1.2.5.5.3	<i>Alouatta fusca</i>	141
4.1.3	Vergleichende Genomkarten der untersuchten Neuweltaffen	144
4.1.4	Phylogenetische Rekonstruktion mit Hilfe des Programms <i>PAUP</i>	159
4.2	<i>Inter-species Comparative Genome Hybridization</i> (iCGH)	161
4.3	Mikrodissektion zum Nachweis chromosomaler Polymorphismen	168
4.3.1	Vergleichende Kartierung der <i>S. sciureus</i> Mikrodissektions-Sonde	171
4.3.2	Vergleichende Kartierung der Mikrodissektions-Sonde des <i>C. jacchus</i> x <i>C. pygmaea</i> Inter-Spezies Hybriden	173
4.4	Vergleichende Untersuchungen zur Zellkernarchitektur	176
4.4.1	Radiale Anordnung der menschlichen Chromosom 1 und 19 Homologen	177
4.4.1.1	DNA Sonden Sets	177
4.4.1.2	3D FISH an Zellkernen von Mensch und Neuweltaffen	182
4.4.1.2.1	3D FISH mit Sonden Set S1	182

4.4.1.2.2	3D FISH mit Sonden Set S2	184
4.4.1.3	Quantitative Auswertung der 3D FISH Experimente	186
4.4.1.3.1	Quantitative Auswertung der 3D FISH mit Sonden Sets S1 und S2	187
4.4.1.3.2	Quantifizierung der radialen Verteilung von Heterochromatin bei <i>S. sciureus</i>	191
4.4.2	Radiale Anordnung der menschlichen Chromosom 13, 17 und 20 Homologen	194
4.4.2.1	DNA Sonden Sets	195
4.4.2.2	3D FISH an Zellkernen von Mensch und <i>C. jacchus</i>	196
4.4.2.3	Quantitative Auswertung der 3D FISH Experimente	197
5	Diskussion	201
5.1	Aspekte zur Methodik	201
5.1.1	<i>Multidirectional chromosome painting</i>	201
5.1.1.1	Sechs- und siebenfarben DNA Sonden Sets	202
5.1.1.2	Massgeschneiderte DNA Sonden Sets	203
5.1.1.3	M-FISH Karyotypierung mittels sequentieller Hybridisierung (<i>ReFISH</i>)	204
5.1.2	3D Zoo-FISH in Studien zur Zellkernarchitektur	205
5.1.2.1	Zellpräparation für die 3D <i>in situ</i> Hybridisierung	205
5.1.2.2	DNA Sonden für 3D Zoo-FISH Experimente	206
5.1.2.3	Quantitative Auswertung von 3D FISH Experimenten	208
5.1.3	<i>Inter-species Comparative Genome Hybridization (iCGH)</i>	208
5.1.4	Generierung von DNA Sonden mit Hilfe der Mikrodissektion	210
5.2	Rekonstruktion chromosomaler Phylogenie der Neuweltaffen	210
5.2.1	Der hypothetische ancestrale Karyotyp aller Neuweltaffen	211
5.2.2	Chromosomale Umbauten bei Cebidae	216
5.2.3	Chromosomale Umbauten bei Atelinae (Familie Atelidae)	221
5.2.3.1	Gattung <i>Alouatta</i>	224
5.2.3.2	Gattung <i>Ateles</i>	228
5.2.3.3	Chromosomale Phylogenie der vier Gattungen der Atelinae	229
5.2.4	Chromosomale Umbauten bei Callitrichidae	231
5.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der phylogenetischen Rekonstruktion	237
5.2.6	Mechanismen der Chromosomenevolution bei Neuweltaffen	241
5.3	Vergleich chromosomaler, molekularer und morphologischer Stammbäume	242
5.3.1	Callitrichinae	243
5.3.2	Atelinae	244

5.3.3	Aotinae, Cebinae und Pitheciinae	246
5.4	Organisation und Evolution repetitiver Sequenzmotive	248
5.4.1	Genomische Imbalancen & chromosomale Polymorphismen bei Callitrichinae	251
5.4.2	Chromosomale Polymorphismen in der Gattung <i>Saimiri</i>	254
5.5	Evolutionäre Aspekte der Zellkernarchitektur	256
5.5.1	Vergleichende Untersuchungen zur radialen Chromatin Anordnung	256
5.5.1.1	Radiale Anordnung der menschlichen Chromosom 13, 17 & 20 Homologen	256
5.5.1.2	Radiale Anordnung der menschlichen Chromosom 1 und 19 Homologen	258
5.5.1.3	Einfluss von Heterochromatin auf die radiale Verteilung von Chromatin	261
5.5.1.4	Schlussfolgerungen zur vergleichenden Zellkernarchitektur	262
6	Ausblick	265
7	Literaturverzeichnis	267
8	Anhang	282
8.1	Abkürzungen	282
8.1.1	Chemikalien und Medien	282
8.1.2	Nukleinsäuren	282
8.1.3	Maßeinheiten	283
8.1.4	Sonstiges	183
9	Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen	285
10	Danksagung	286
11	Lebenslauf	288

Inhaltsverzeichnis der beiliegenden CD-ROM

- Die vorliegende Dissertation als PDF Dokument Neusser.pdf
- Tabelle 4.6 als Microsoft Excel Dokument Matrix.xls
- Abbildung 5.9 als Stammbaum.jpg

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit der Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) eine vergleichende Charakterisierung der Karyotypen von 28 Individuen von 20 verschiedenen Arten der Neuweltaffen (Platyrrhini) durchgeführt. Die Untersuchung chromosomaler Veränderungen, die im Laufe der Evolution aufgetreten sind, diente der Rekonstruktion der Phylogenie dieser Neuweltaffen. Zum Nachweis chromosomaler Homologien wurden chromosomen-spezifische DNA Sonden des Menschen, der Neuweltaffen *Saguinus oedipus*, *Lagothrix lagothricha* und des Gibbons *Hylobates concolor* eingesetzt. Die multi-direktionale Anwendung dieser DNA Sonden erlaubte es, chromosomale Homologien reziprok zu überprüfen und in höherer Auflösung eine sub-chromosomale Definition zu erzielen, als mit *chromosome painting* unter Verwendung von menschlichen Sonden allein. Mit menschlichen 24-Farben und *L. lagothrix* 31-Farben multiplex Sonden konnte demonstriert werden, dass eine simultane Differenzierung des gesamten Karyotyps eines Neuweltaffen in einem Experiment möglich ist. Dazu wurde eine neue M-FISH Methode angewandt. Diese als *ReFISH* bezeichnete Technik basiert auf der sequentiellen Hybridisierung von Subsets einer komplexen Vielfarben Sonde auf dasselbe Präparat.

Durch die vergleichende Karyotypanalyse konnten gemeinsam abgeleitete und ancestrale Charaktere der Neuweltaffen identifiziert werden, auf deren Basis ein hypothetischer ancestraler Karyotyp aller Neuweltaffen formuliert wurde. Durch die Rekonstruktion der Abfolge chromosomaler Umbauten wurde ein Stammbaum aller bisher mit *chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen erstellt. Mit dieser Untersuchung wurden deutliche Anhaltspunkte dafür gewonnen, dass Neuweltaffen monophyletischen Ursprungs sind, da eine große Mehrzahl von ihnen die abgeleiteten Assoziationen menschlicher homologer Chromosomensegmente 2/16, 5/7, 8/18, und 10/16 teilen. Als wichtige kladistische Landmarken konnten bei Callitrichinae die Assoziation der menschlichen Homologen 2/15, 13/17/20 und 13/9/22 sowie bei Atelinae die Assoziation 4/15 und die Fission der homologen menschlichen Chromosomen 1, 4 und 5 ermittelt werden. Anhand der chromosomalen Evidenz konnte auch eine verwandtschaftliche Zuordnung von Spezies der Gattungen *Callimico*, *Aotus* und *Callicebus* abgeleitet werden, deren taxonomische Stellung kontrovers diskutiert wird. Innerhalb der Primaten stellen die Neuweltaffen eine Gruppe mit abgeleiteten Karyotypen dar, mit Robertson'schen und Tandem Fusionen, sowie Fissionen als prädominante chromosomale Umbauten.

Die Technik der Vergleichenden Genom Hybridisierung zwischen verschiedenen Spezies (iCGH) diente als komplementäres Werkzeug zu *chromosome painting*, um einen Einblick in die Organisation und den Evolutionsmodus von repetitiven Genomelementen der Neuweltaffen zu gewinnen. Die Experimente verdeutlichten, dass heterochromatische Regionen häufig qualitativ, als auch quantitativ Spezies-spezifische Eigenschaften zeigten, während euchromatische Regionen balanciert waren. Es konnte demonstriert werden, dass verschiedene Klassen repetitiver Sequenzmotive innerhalb einer Spezies unterschiedlich schnell evolvieren können. Über das Spezies-spezifische Verteilungsmuster repetitiver Genomelemente war es auch möglich, die Karyotypen von Spezies zu unterscheiden, die in ihren euchromatischen Syntenien identisch sind, wie z.B. *C. pygmaea* und *C. argentata*, als auch die paternale Herkunft (*C. pygmaea*) von zahlreichen Chromosomen eines *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden nachzuweisen.

Mit Hilfe der chromosomalen Mikrodisektion wurden zwei DNA Sonden spezifisch für polymorphe heterochromatische Chromosomenregion isoliert. Die anschließende inter-, als auch intraspezifische Charakterisierung verschiedener Neuweltaffen mit diesen Mikrodisektions-Sonden erlaubte es, Aussagen über Spezies-Spezifität, sowie über qualitative und quantitative Polymorphismen dieser repetitiven Genomelemente zu treffen.

Schließlich wurden Untersuchungen zu evolutionären Aspekten der Zellkernarchitektur durchgeführt. Die Neuweltaffen *S. sciureus* und *C. jacchus* und Mensch dienten hierbei als Modell, um in FISH Experimenten an 3D fixierten Interphasezellkernen Auswirkungen evolutionärer chromosomaler Umbauten auf die Anordnung von Chromatin im Zellkern zu untersuchen. Anhand der menschlichen Chromosomen (-regionen) 13, 17, 19, 20, 1q32-qter, 1p34-pter und deren Homologer bei Neuweltaffen konnte gezeigt werden, dass die radiale Anordnung von Chromatin in Abhängigkeit von der Gendichte auch im Falle chromosomaler Umbauten bei diesen Spezies evolutionär konserviert ist. An zwei Beispielen wurde demonstriert, dass auch chromosomale Subregionen eine Gendichte-abhängige radiale Verteilung zeigen. Schliesslich wurde der Einfluss von Heterochromatin auf die radiale Verteilung von benachbartem Chromatin an Homologen von *S. sciureus*, die sich durch einen polymorphen interstitiellen Heterochromatinblock voneinander unterscheiden, studiert. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der radialen Verteilung der Territorien, mit und ohne Heterochromatinblock festgestellt.

Folgende Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits publiziert bzw. zum Druck angenommen:

Müller S, Neusser M, O'Brien PC, Wienberg J (2001) Molecular cytogenetic characterization of the EBV-producing cell line B95-8 (*Saguinus oedipus*, Platyrrhini) by chromosome sorting and painting. *Chromosome Res*: 689-93

Neusser M, Stanyon R, Bigoni F, Wienberg J, Müller S (2001) Molecular cytotaxonomy of New World monkeys (Platyrrhini) – comparative analysis of five species by multi-color chromosome painting gives evidence for a classification of *Callimico goeldii* within the family of Callitrichidae. *Cytogenet Cell Genet* 94: 206-15

de Oliveira EH, Neusser M, Figueiredo WB, Nagamachi C, Pieczarka JC, Sbalqueiro IJ, Wienberg J, Müller S (2002) The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): Reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. *Chromosome Research* 10(8): 669-683

Tanabe H, Müller S, Neusser M, von Hase J, Calcagno E, Cremer M, Solovei I, Cremer C, Cremer T (2002) Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *PNAS* 99(7): 4424-4429

Barros RM, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Rodrigues LR, Neusser M, de Oliveira EH, Wienberg J, Muniz JA., Rissino JD, Müller S (2003) Chromosomal studies in *Callicebus donacophilus pallescens*, with classic and molecular cytogenetic approaches: multicolour FISH using human and *Saguinus oedipus* painting probes. *Chromosome Res* 11(4): 327-34.

Neusser M, Münch, Anzenberger G, Müller S (im Druck) Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* X *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and Comparative Genomic Hybridization. *Cytogenet Genome Res*

De Oliveira EH*, Neusser M*, Pieczarka JC, Nagamachi C, Sbalqueiro IJ, Müller S (im Druck) Phylogenetic inferences of Atelinae (Platyrrhini) based on multi-directional chromosome painting in *Brachyteles arachnoides*, *Ateles paniscus paniscus* and *Ateles b. marginatus*. Cytogenet Genome Res

*beide Autoren trugen in gleichem Maße zu dieser Publikation bei

Tanabe H, Küpper K, Ishida T; Neusser M, Mizusawa H (im Druck) Inter- and intra-specific gene-density correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. Cytogenet Genome Res

Darüber hinaus wurden folgende Arbeiten publiziert bzw. zum Druck angenommen, die methodisch im Zusammenhang mit dieser Dissertation stehen:

Müller S, Neusser M, Wienberg J (2002) Towards unlimited colors for fluorescence in-situ hybridization (FISH). Chromosome Res 10: 223-32

Müller S, Finelli P, Neusser M, Wienberg J (im Druck) The evolutionary history of human chromosome 7. Genomics

Rütten KB, Pietsch C, Olek K, Neusser M, Gadau J (im Druck) Chromosomal anchoring of linkage groups and identification wing size QTL using markers and FISH probes derived from microdissected chromosomes in *Nasonia* (Pteromalidae: Hymenoptera). Cytogenet Genome Res

Kongressbeiträge:

Neusser, M., Müller, S., Stanyon, R., Wienberg, J. Chromosomal homologies between human, *Callitrix jacchus* and *Saimiri sciureus* revealed by reciprocal chromosome painting Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Nürnberg, 1999 (Vortrag).

Neusser, M., Müller, S., Stanyon, R., Wienberg, J. Chromosomal homologies between human, *Callitrix jacchus*, *Saimiri sciureus*, *Saguinus nigricollis* and *Cebuella pygmaea* revealed by comparative chromosome painting. 2nd European Cytogenetic Conference, Vienna, Austria, 1999 (Vortrag)

Neusser M., Müller S., de Oliveira E., Wienberg J. M-FISH and interspecies CGH: high resolution analysis of genome reorganisation and definition of polymorphic characters in New

World Monkeys. Gordon Research Conference on Molecular Cytogenetics, Oxford, UK, 2000 (Posterpräsentation)

Neusser M, de Oliveira E, Pieczarka, J, Wienberg, J, Müller, S. Towards a comprehensive overview of New World monkey chromosome evolution. 3rd European Cytogenetics Conference, Paris 2001 (Posterpräsentation)

Neusser M, de Oliveira E., Pieczarka J, Wienberg J., Müller S. Towards a comprehensive overview of New World monkey chromosome evolution. 14th International Chromosome Conference, Würzburg, 2001 (Vortrag)

Müller S, Neusser M, Wienberg J. ReFISH - an approach to multiple M-FISH with three fluorors 3rd European Cytogenetics Conference, Paris, 2001 (Posterpräsentation)

Neusser M, Anzenberger G, Münch M, Wienberg J, Müller S. Chromosomal polymorphisms in New World monkeys (Platyrrhini) delineated by multi-colour FISH, Interspecies Comparative Genome Hybridization (iCGH) and micro-dissection. Quantitative Molecular Cytogenetics Conference, Stockholm, 2002 (Vortrag)

Neusser M, Koch A, Cremer T, Müller S. Effects of chromosome rearrangements during primate evolution on the higher order chromatin architecture- a pilot study. 2nd Biophysics of the Genome Conference, Hlohovec, 2003 (Vortrag)

Koch A, Neusser M, Cremer T, Müller S. The gene-density correlated radial organisation of chromatin is evolutionary conserved in gibbons despite extensive chromosome reshuffling. 2nd Biophysics of the Genome Conference, Hlohovec, 2003 (Posterpräsentation)

Neusser M, Koch A, Schwarz V, Cremer T, Müller S. Effects of chromosome rearrangements during primate evolution on the higher order chromatin architecture. 4th European Cytogenetics Conference, Bologna, 2003 (Posterpräsentation)

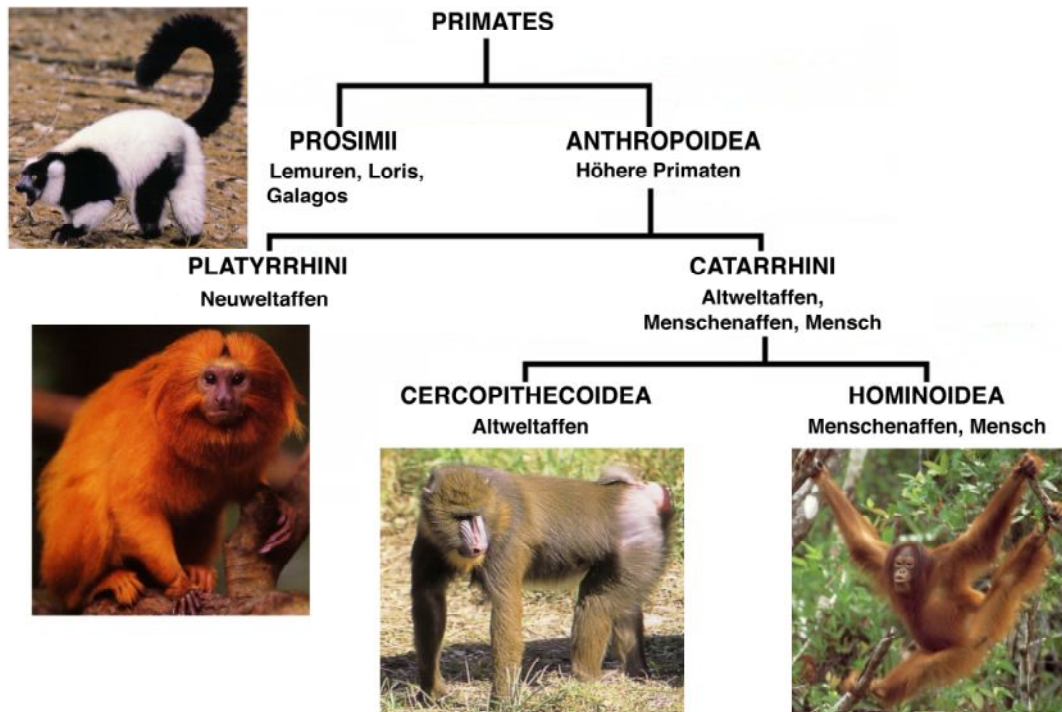
2 Einleitung

In dieser Dissertation wurden mit molekular-zytogenetischen Methoden Untersuchungen zur Phylogenie, Genomorganisation und Zellkernarchitektur der Neuweltaffen durchgeführt. Die folgenden Kapitel geben einem Überblick über die systematische Stellung der Neuweltaffen innerhalb der Primaten (2.1), sowie einen Abriss der Biologie und Herkunft der Neuweltaffen (2.2). Weiterhin werden Aspekte zur Phylogenie und Taxonomie, sowie Methoden der vergleichenden Biologie erläutert (2.3). In diesem Kontext wird die vergleichende Zytogenetik eingehender beschrieben und die bisherigen Erkenntnisse, die mittels dieser Methode zur Chromosomenevolution der Primaten gewonnen wurden, kurz zusammengefasst (2.4). Schließlich wird eine Zusammenfassung über Studien zur Zellkernarchitektur gegeben, die als Hintergrund zu den hier durchgeführten vergleichenden Untersuchungen bei Neuweltaffen dienen soll (2.5).

2.1 Systematische Stellung der Neuweltaffen innerhalb der Primaten

Die Systematik der Primaten unterliegt kontinuierlichen Veränderungen in der taxonomischen Klassifikation einzelner Familien und Gattungen. Gegenstand gegenwärtiger Diskussionen ist etwa die taxonomische Stellung der großen Menschenaffen. So sprachen sich einige Autoren kürzlich publizierter Studien (Goodman et al. 1998, Wildman et al. 2003) für eine taxonomische Integration aller rezenten großen Menschenaffen in die Familie Hominidae aus. Auch sollte nach diesen Autoren der Schimpanse in die Gattung *Homo* klassifiziert werden, um der nahen genetischen Verwandtschaft des Schimpansen mit dem Menschen gerecht zu werden und gleichzeitig einer traditionell antropozentrischen Sichtweise des Menschen entgegenzutreten. Nach einer von Simons (1972) aufgestellten Klassifizierung (Übersicht bei Martin 1990) setzt sich die Ordnung der Primaten aus den beiden Unterordnungen Prosimia (Halbaffen), mit den Infraordnungen Lemuriformes und Tarsiiformes, und den Simia (Affen oder Anthropoidea) mit den Infraordnungen Platyrrhini (Neuweltaffen) und Catarrhini (Altweltaffen) zusammen. Die Catarrhini werden in die Superfamilie Cercopithecoidea (Familie Cercopithecidae, mit den Unterfamilien Cercopithecinae und Colobinae) und die Superfamilie Hominoidea (Familien Hylobatidae, Pongidae und Hominidae) unterteilt.

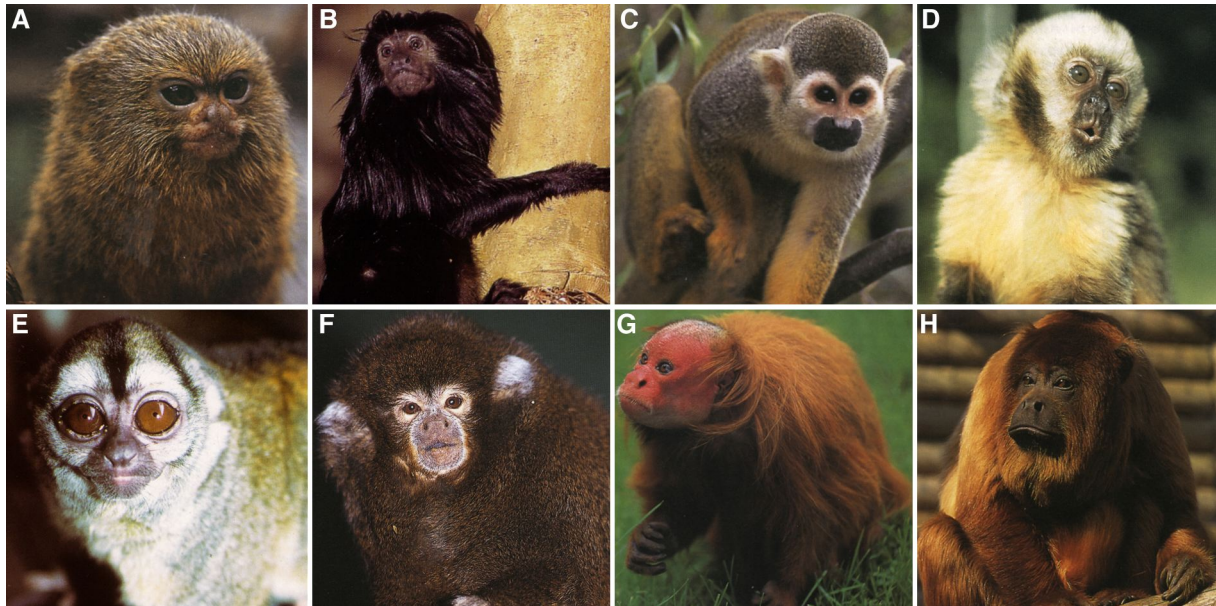
Abbildung 2.1: Systematische Stellung der Neuweltaffen innerhalb der Primatenordnung nach der von Simons (1972) vorgeschlagenen Klassifikation. Fotografien aus „The Pictorial Guide to the Living Primates“, Pogonias Press, 1996, East Hampton, New York.



2.2 Biologie der Neuweltaffen

Neuweltaffen besitzen eine charakteristische breite Nasenscheidewand, wovon sich ihr wissenschaftlicher Name Platyrrhini ableitet. Im Unterschied zu Altweltaffen haben sie keine Backentaschen und Gesäßschwien. Sie zeichnen sich durch eine enorme morphologische Variabilität aus (siehe Abb. 2.2), welche auch Ausdruck darin findet, dass sie Spezies mit einem Gewicht von nur 100g (*Cebuella pygmaea*) bis zu 12kg (*Brachyteles arachnoides*), umfassen. Auch zeigen Neuweltaffen verschiedene Arten der sozialen Organisation. Einige Neuweltaffen sind monogam und leben in Kleinfamilien, wie z.B. Spezies der Gattung *Aotus*, andere leben in Großgruppen mit über 12 Individuen, z.B. Spezies der Gattung *Cebus*. Mit Ausnahme der Gattung *Aotus* sind alle Neuweltaffen tagaktiv. Sie sind Baumbewohner, die nur selten auf den Boden herabkommen und ernähren sich in erster Linie von Blättern, Früchten und Insekten.

Abbildung 2.2: Verschiedene Neuweltaffenspezies zur Dokumentation der morphologischen Vielfalt. **A)** *Cebuella pygmaea*, **B)** *Leontopithecus chrysopygus*, **C)** *Samiri sciureus*, **D)** *Cebus apella*, **E)** *Aotus trivirgatus*, **F)** *Callicebus donacophilus*, **G)** *Cacajao calvus* und **H)** *Alouatta sara*. Fotografien aus „The Pictorial Guide to the Living Primates“, Pogonias Press, 1996, East Hampton, New York.



Der Lebensraum der rezenten Neuweltaffen ist das tropische Zentral- und Südamerika. Ihre geografische Verbreitung erstreckt sich von Südmexiko bis zur südlichen Urwaldgrenze Argentiniens (siehe Abb. 2.3). Nahezu von allen Gattungen der Neuweltaffen sind Arten bekannt, die durch die kontinuierlich fortschreitende Abholzung in ihrem Lebensraum stark gefährdet sind. Zu den besonders bedrohten Arten zählen die Tamarine, insbesondere *Leontopithecus*, wie auch die Brüllaffen *Alouatta fusca* und *Alouatta coinbesis*.

Abbildung 2.3: Verbreitung der rezenten Primaten (grün hervorgehoben). Die Neuweltaffen sind in Südamerika beheimatet (rot eingrahmt). Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Südmexiko bis Nordargentinien.



Die Entstehungsgeschichte von Neuweltaffen liegt etwa 30 Millionen Jahre zurück, datiert auf das Oligozän. Das Alter des ältesten Fossils *Branisella boliviana*, das bislang aufgefunden wurde, wird auf ca. 25 Millionen Jahre geschätzt. Eine der größten offenen Fragen bezüglich der Neuweltaffen bezieht sich auf den geografischen Ursprung der ancestralen Neuweltaffen, sowie darauf, wie die Neuweltaffen nach Südamerika gelangt sind. Südamerika stellte nach paleogeografischen Studien eine Insel im frühen Cenozoikum (vor ca 28-65 Mio Jahren) dar, die von Afrika durch den Südatlantik und von Nordamerika durch das Karibische Meer getrennt war. Die Diskussion über ihren geografischen Ursprung konzentriert sich daher darauf, ob Nordamerika oder Afrika der wahrscheinlichere Ursprungsort der ancestralen Neuweltaffen war (ausführlich beschrieben in Fleagle 1988). Paleogeologische Rekonstruktionen implizieren, dass es im mittleren Oligozän Perioden mit niedrigem Wasserstand im Südatlantik und möglicherweise eine Reihe von Inseln gab. Auch wird vermutet, dass es zu dieser Zeit günstige Strömungen gab, die eine Überquerung von Afrika nach Südamerika begünstigt hätten. All diese Gegebenheiten sprechen zugunsten der Hypothese, dass die ancestralen Neuweltaffen von Afrika nach Südamerika geflößt sind.

2.3 Phylogenie und Taxonomie der Neuweltaffen

2.3.1 Methoden der vergleichenden Biologie

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Phylogenie der bisher untersuchten Neuweltaffen basiert auf einer Vielzahl verschiedener Methoden. Das Spektrum reicht vom Vergleich anatomischer Merkmale über die Analyse fossiler Funde bis hin zu biochemischen, zytogenetischen und molekular-genetischen Methoden. Selbst vergleichende Studien zur Morphologie von Parasiten erlauben Rückschlüsse auf die Verwandtschaftsbeziehung zwischen Neuweltaffen. Mit den verschiedenen methodischen Ansätzen werden distinkte Merkmale bei verschiedenen Spezies untersucht, die Aussagen über die phylogenetische Beziehung zwischen den Arten ermöglicht. In ihrer Gesamtheit erlauben die gewonnenen Erkenntnisse die Rekonstruktion von Stammbäumen. Von den Methoden der vergleichenden Biologie werden hier nur einige Beispiele aufgeführt, die für phylogenetische Fragestellungen innerhalb der Primaten Bedeutung erlangt haben.

Vor der Einführung biochemischer und molekularbiologischer Techniken in die Evolutionsforschung wurden Erkenntnisse über die phylogenetischen Beziehungen zwischen

Spezies primär über vergleichende Untersuchungen der Morphologie und Anatomie verschiedener rezenter Arten, sowie von Fossilfunden gewonnen. Bei Neuweltaffen wurden für die Rekonstruktion verwandtschaftlicher Beziehungen insbesondere der Zahnkronenbau, die Gebissmorphologie und die Schädelknochenanatomie, wie auch einige postcraniale Skelettmerkmale (Intermembral- und Humero-femoral-Index, Anatomie der Beckens, der Fuß- und Fingerknochen) verglichen, da diese signifikante artspezifische Charakteristika aufweisen.

Biochemische Verfahren für die Analyse verwandtschaftlicher Beziehungen verloren seit der Etablierung molekular-genetischer Methoden an Bedeutung. Sie trugen jedoch in der Vergangenheit zur Aufklärung von Verwandtschaftsbeziehungen bei. Von den biochemischen Methoden seien die Technik der Isoelektrischen Fokussierung (Goodman 1962) zu erwähnen, einem hochauflösenden elektrophoretischen Verfahren, das Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) trennt. Mit Hilfe der Differenzierung von Proteinen anhand ihres unterschiedlichen IEP bei verschiedenen Spezies können Aussagen über die genetische Distanz verschiedener Populationen und auch Arten getroffen werden. Ferner können über den Proteinsequenzvergleich und verschiedene immunologische Verfahren Rückschlüsse auf die Verwandtschaftsbeziehung von Spezies gezogen werden. Nach einem von Goodman (1962) sowie Sarich und Wilson (1966) entwickelten Verfahren der Immunpräzipitation ist es möglich, Aussagen über die Ähnlichkeiten von Proteinen und damit über den Verwandtschaftsgrad von Arten zu treffen.

Mit der Entwicklung molekular-genetischer Methoden konnte ein breites Spektrum an neuen Erkenntnissen über die phylogenetischen Beziehungen zwischen Spezies gewonnen werden. Sibley und Ahlquist (1984) etablierten ein Verfahren, bei dem der Grad der DNA Sequenzdivergenz von verschiedenen Spezies über die Reassoziationsgeschwindigkeit der Heteroduplex DNA abgeschätzt werden kann. Durch die vergleichende Genkartierung an somatischen Zellhybriden und durch *in situ* Hybridisierung, konnte eine Vielzahl von Genen und anderer Loci beim Menschen und anderen Vertebraten lokalisiert werden (Ruddle 1981, Ma et al. 1982, O'Brien et al. 1999). Die vergleichende DNA Sequenzanalyse trug seit den 80iger Jahren wesentlich dazu bei, phylogenetische Beziehungen zwischen Spezies aufzuklären. Zur Bestimmung der evolutionären Distanz zwischen Spezies wurden hierbei häufig schnell evolvierende DNA Sequenzen, wie mitochondriale DNA (Brown et al. 1982, Hayasaka et al. 1988), repetitive Sequenzen (Baldini et al. 1991a, b, Wayne et al. 1987),

Pseudogene (Miyamoto et al. 1987) und ribosomale RNA (Gonzalez et al. 1990) untersucht. Als komplementäre kladistische Marker zu vergleichenden DNA Sequenz Daten, die meist auf Einzelnukleotidsubstitutionen basieren und daher nicht zwingend geeignete phylogenetische Marker darstellen, können *rare genomic changes* (Rokas und Holland 2000) dienen. Diese repräsentieren z.B. Intron Indels, Retrotransposon Intergrationen von SINES und LINES, Genduplikationen und zytogenetische Marker. Diesen Markern kann eine hohe Aussagekraft beigemessen werden, da sie einen sehr niedrigen Grad an Homoplasie aufweisen. Singer et al. (2003) verwendeten z.B. die Insertion von Alu Elementen als Marker für die phylogenetische Analyse von Neuweltaffen. Die gegenwärtige Entwicklung in der Molekulargenetik fokussiert sich auf die DNA Sequenzierung gesamter Genome. Nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms (The International Genome Sequencing Consortium 2001; Venter et al. 2001) wird derzeit die Sequenzierung des Schimpansengenoms durchgeführt (Pennisi 2003).

Die zytogenetische Analyse erlangte seit den 70iger Jahren Bedeutung in vielen Bereichen der biomedizinischen- und Grundlagenforschung, so auch in der vergleichenden Biologie zur Beleuchtung evolutionärer Zusammenhänge. Über eine vergleichende Analyse der Chromosomen von Spezies können Aussagen über chromosomale Veränderungen, die in einer Speziesgruppe aufgetreten sind, getroffen werden. Chromosomale Charaktere, die von Spezies geteilt werden lassen Rückschlüsse über deren phylogenetische Beziehung zu. Da die Zytogenetik in dieser Arbeit als vergleichende Methode zur Analyse chromosomaler Umbauen in den untersuchten Neuweltaffen angewandt wurde, wird sie detaillierter in einem eigenen Kapitel (siehe 2.4.1-2.4.2) beschrieben.

2.3.2 Morphologische und molekular-genetische Studien zur Phylogenie der Neuweltaffen

Über die Taxonomie und Phylogenie der Neuweltaffen bestehen trotz wachsender Erkenntnisse noch kontroverse Ansichten (siehe Übersichtsartikel von Hugot 1998, Schneider 2000, Schneider et al. 2001). Während weit gehend Einigkeit über die Einteilung der Neuweltaffen in 16 Gattungen und fünf Unterfamilien (Callitrichinae, Atelinae, Cebinae, Pitheciinae und Aotinae) besteht, wurden verschiedene Vorschläge zur taxonomischen Einordnung der Neuweltaffen in Familien formuliert. Basierend auf morphologischen Vergleichen, klassifizierten einige Autoren die Neuweltaffen in die zwei Familien

Callitrichidae und Cebidae (Napier 1967, Fleagle 1988). Rosenberger (1981) schlug eine taxonomische Klassifikation der Neuweltaffen in die Familien Cebidae und Atelidae vor. Ford (1986) erkannte die Familien Cebidae, Atelidae und Callitrichidae. Vergleichende Sequenzanalysen (zur Übersicht, siehe Tabelle 2.1) und andere molekulare Studien lieferten weitere Hypothesen zur Klassifikation von Neuweltaffen. Goodman et al. (1998) stellten anhand von DNA Sequenzanalysen, die durch Erkenntnisse über Fossilfunde ergänzt wurden, einen umfassenden zeitlich bezogenen Stammbaum der Primaten auf. Hierbei wurden die Neuweltaffen in die Familien Cebidae, Pitheciidae und Atelidae klassifiziert. Die Tendenz, die sich gegenwärtig anhand kürzlich publizierter molekular-genetischer Studien abzeichnet, weist ebenfalls auf eine Klassifikation der Neuweltaffen in diese drei Familien hin (Schneider et al. 2001, Singer et al. 2003, Seuánez im Druck). Die Veröffentlichung der Ergebnisse des interdisziplinären *workshops* mit dem Titel „Primate Taxonomy for the New Millenium“ (Rylands et al. 2000), an dem Primatologen, Taxonomen, Biogeografen, Morphologen und Genetiker zusammenkamen, zeigt hingegen eine taxonomische Klassifizierung der Neuweltaffen in fünf Familien (Cebidae, Atelidae, Pitheciidae, Aotidae und Callitrichidae) auf.

Unterschiedliche Vorstellungen wurden nicht nur über die Einteilung der Neuweltaffen in Familien, sondern auch über die phylogenetische Verzweigungssequenz innerhalb der Neuweltaffenfamilien formuliert. Die Abbildungen 2.4 und 2.5 illustrieren beispielhaft zwei verschiedene Stammbäume, die auf verschiedenen Methoden beruhen. Darüber hinaus ist der Status von Spezies und Subspezies Gegenstand kontinuierlicher Revisionen. Ein Beispiel für die noch ungewisse Speziesdefinition innerhalb der Neuweltaffen stellt die Gattung *Callicebus* dar, innerhalb dieser die Anzahl von ursprünglich 13 erkannten Spezies (Hershkovitz 1990) kürzlich auf 28 angehoben wurde (van Roosmalen et al. 2002). Nach einer aktuellen Liste aller Spezies und Subspezies der Platyrrhini, die von Rylands et al. (2000) zusammengestellt wurden, umfassen die Platyrrhini insgesamt 110 Spezies und 95 Subspezies. Insgesamt 60 Spezies und Subspezies wurden von diesen Autoren innerhalb der Familie Callitrichidae, 45 bei Cebidae, 13 bei Aotidae, 45 bei Atelidae und 42 bei Pitheciidae notiert.

Abbildung 2.4: Phylogenie der Neuweltaffen, basierend auf anatomischen Merkmalen nach Ford (1986).

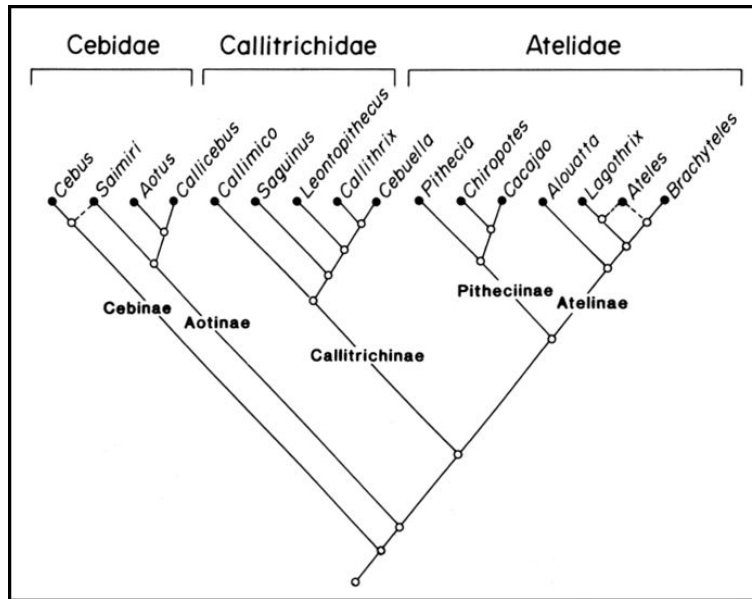
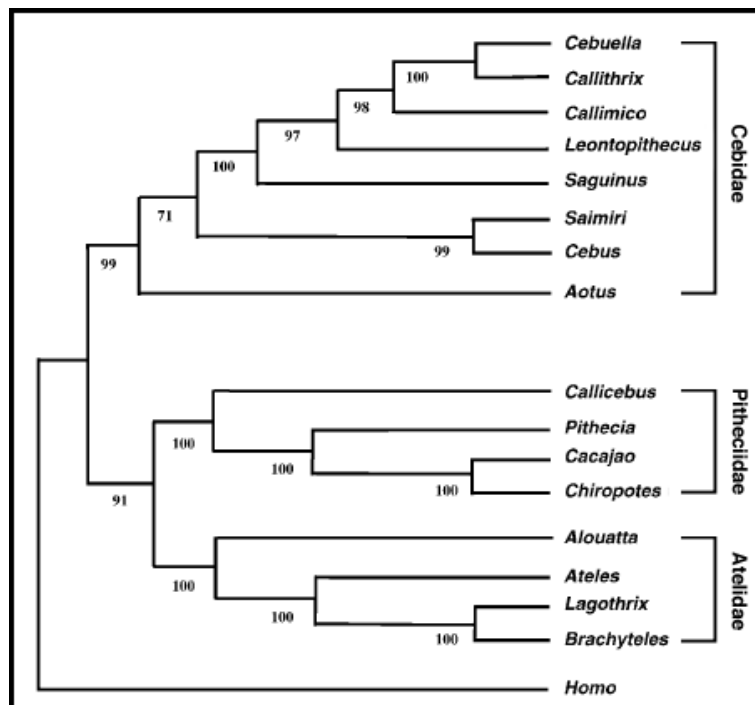


Abbildung 2.5: Phylogenie der Neuweltaffen auf der Basis multipler DNA Daten Sätze (IRBP, G6PD, β -2-microglobulin und ϵ -globin) nach Schneider et al. (2001). Die Zahlen unterhalb der Verzweigungslinien stellen *bootstrap* Werte dar, welche die prozentuale Wahrscheinlichkeit einer Klade angeben.



Basierend auf Erkenntnissen morphologischer Studien, erkannten Hershkovitz (1977), Rosenberger (1981, 1984), Ford (1986) und Kay (1990) übereinstimmend drei monophyletische Kladen innerhalb der Neuweltaffen: Eine Klade würde die Gattungen *Alouatta*, *Lagothrix*, *Brachyteles* und *Ateles* repräsentieren, eine zweite die Gattungen *Pithecia*, *Chiropotes* und *Cacajao* und eine dritte Klade die Callitrichinae mit den Gattungen *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callithrix*, *Cebuella* und bei Rosenberger (1981, 1984), Ford (1986) und Kay (1990) zudem *Callimico*. Hinsichtlich der phylogenetischen Verzweigungssequenz innerhalb und zwischen diesen Kladen scheiden sich die Meinungen dieser Autoren. Auch wurden unterschiedliche Klassifikationen für die verbliebenen Gattungen *Callimico*, *Cebus*, *Saimiri* und *Aotus* vorgestellt. Innerhalb der Callitrichinae klassifizierten Ford (1986), Rosenberger (1981, 1984) und Kay (1990) die Tamarine (*Saguinus* und *Leontopithecus*) als ursprüngliche Klade im Vergleich zu den Marmosetten (*Callithrix* und *Cebuella*), in Übereinstimmung mit der *Phyletic dwarfism* Hypothese (Ford 1986), die besagt, dass die Reduzierung der Körpergröße bei den Callitrichinae ein abgeleitetes Merkmal darstellt. Hershkovitz (1977) betrachtete *Saguinus* hingegen als abgeleitetes Taxon. Die Klassifikation der Gattung *Callimico* ist nach wie vor Gegenstand kontroverser Diskussionen, da sie hinsichtlich anatomischer Merkmale und anderer Charakteristiken wie Einzelgeburten einen intermediären Status zwischen den Callitrichinae und Cebinae einnimmt. Während Ford (1986), Rosenberger (1981, 1984) und Kay (1990) vorschlugen, dass die Gattung *Callimico* als ursprünglichste phylogenetische Linie in die Callitrichinae integriert werden sollte, argumentierten Hill (1959), Hershkovitz (1977) und Mittermeier et al. (1988), dass die Spezies *C. goeldii* eine eigene Familie (Callimiconidae) darstellen sollte. Die Gattungen *Cebus* und *Saimiri* wurden von Ford (1986) und Rosenberger (1984) als eine Klade betrachtet, die entweder die früheste Abspaltungslinie der Neuweltaffen bildete (Ford 1986) oder als Schwestergruppe zu den Callitrichinae gestellt wurde (Rosenberger 1984). Kay (1990) erkannte hingegen keine verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Gattungen *Cebus* und *Saimiri* und positionierte *Saimiri* als Schwestergattung zu den Callitrichinae und *Cebus* als erste Verzweigungslinie der Neuweltaffen nach *Callicebus*. Die Gattung *Callicebus* wurde von diesen Autoren entweder als eine ursprüngliche Linie der Neuweltaffen betrachtet (Kay 1990) oder stellte als Schwestergattung von *Aotus* eine abgeleitete Linie dar (Ford 1986, Rosenberger 1981, 1984). Rosenberger (1981, 1984), argumentierten weiterhin, dass *Callicebus* und *Aotus* nahe verwandt mit den Pitheciinae sind. Ford (1986) hingegen platzierte diese beiden Gattungen an der Basis der Platyrrhini, als erste Abspaltungslinie nach der Klade, die von *Saimiri* und *Cebus* gebildet wird. Morphologische

Studien basierend auf den Ergebnissen von Ford (1986), Rosenberger (1981, 1984) und Kay (1990) dokumentieren inkonsistente Erkenntnisse bezüglich der phylogenetischen Verzweigungssequenz innerhalb der Atelinae. Während Rosenberger (1981, 1984) die Gattungen *Ateles* und *Brachyteles* als Schwestergattungen klassifizierte, präsentierte Ford (1986) eine unaufgelöste Trichotomie der Gattungen *Lagothrix*, *Ateles* und *Brachyteles*. Kay (1990) schließlich, gruppierte die Gattungen *Ateles* und *Lagothrix* in eine separate Schwesterklade zu der Klade mit *Alouatta* und *Brachyteles*.

Molekulare Studien resultierten in kongruenteren Ergebnissen hinsichtlich der phylogenetischen Verzweigungssequenz der Neuweltaffen. Die Bandbreite durchgeführter DNA Sequenzvergleiche zur Phylogenie der Neuweltaffen ist in Tabelle 2.1 illustriert. Schneider et al. (2001) führte darüber hinaus eine kombinierte Analyse durch anhand von Daten, die durch vergleichende DNA Sequenzanalysen der ϵ -globin, IRBP, G6PD und β -2-microglobulin Gene (siehe Tabelle 2.1) gewonnen wurden. Der aus dieser Analyse hervorgegangene Stammbaum ist in Abbildung 2.5 (siehe oben) dargestellt.

Tabelle 2.1: Übersicht über vergleichende DNA Sequenzanalysen zur Rekonstruktion phylogenetischer Beziehungen bei Neuweltaffen.

Gen bzw. mitochondriale DNA	Referenz
16s mitochondrial DNA	Horovitz and Meyer 1995
ϵ -globin, ϵ -globin 5' region	{Schneider, 1993 #87}, Harada et al. 1995, Porter et al. 1997, Porter et al. 1999
Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Proteins (IRBP)	Schneider et al. 1996
β -2-microglobulin	Canavez et al. 1999
Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PD)	von Dornum and Ruvalo 1999
Willebrand Faktor (vWF)	Chaves et al. 1999
ND4, tRNAs	Pastorini et al. 1998
γ -globin	Meireles et al. 1999
SRY	Moreira 2002

Die Erkenntnisse molekularer Daten (siehe Tabelle 2.1) zeigen einen Konsens in der Einteilung der Neuweltaffen in drei monophyletische Kladen. Diese unterschieden sich jedoch von den Kladen, die, basierend auf morphologischen Vergleichen vorgeschlagenen wurden. So wurden die Callitrichinae und die Gattungen *Cebus*, *Saimri* und *Aotus* zu einer Klade (Familie Cebidae) zusammengefasst. Weiterhin wurde im Unterschied zu morphologischen Daten vorgeschlagen, dass die Pitheciinae eine separate Klade mit Familienstatus repräsentieren sollten (siehe Goodman et al. 1998). Die dritte Klade stellen die Atelidae mit den Gattungen *Alouatta*, *Ateles*, *Brachyteles* und *Lagothrix* dar. Viele Autoren (Harada et al.

1995, Porter et al. 1997, Canavez et al. 1999, von Dornum and Ruvolo 1999, Schneider et al. 2001, Singer et al. 2003) zeigten Übereinstimmung in der Gruppierung der Gattung *Callicebus* mit den Pitheciinae. Die Befunde von Horovitz and Meyer (1995) zeigen hingegen, dass die Gattung *Callicebus* eine separate Linie darstellt, die keine direkte phylogenetische Verknüpfung zu einer anderen Klade der Neuweltaffen bildet. Kontroverse Ergebnisse resultierten in der Klassifikation der Gattung *Aotus*. Die Resultate von von Dornum und Ruvolo (1999) ergaben eine unaufgelöste Trichotomie, bei welcher die Gattung *Aotus* eine Schwesterklade zu *Samiri-Cebus* und den Callitrichinae darstellt. Porter et al. (1997), und Harada et al. (1995) positionierten die Gattung *Aotus* als nächsten Verwandten der Callitrichinae, während Schneider et al. (1996, 2001) und Canavez et al. (1999) die Klade *Samiri-Cebus* als Schwestergruppe der Callitrichinae erkannten und die Gattung *Aotus* die erste phylogenetische Verzweigungslinie der Cebidae bildete. Horovitz und Meyer (1995), schließlich, stellten *Aotus* als Schwesterlinie zu der Klade *Cebus-Pithecia* dar.

Im Unterschied zu den Ergebnissen morphologischer Studien weisen die Befunde der meisten molekularen Studien darauf hin, dass die Gattung *Callimico* innerhalb der Callitrichinae eine Schwestergattung zu den Marmosetten darstellt. Einzig Schneider et al. (1996) gruppierte *Callimico* mit *Leontopithecus* und stellte diese als Schwesterklade zu *Cebuella* und *Callithrix* dar. Weiterhin zeigten Schneider et al. (2001), Canavez et al. (1999) und von Dornum und Ruvolo (1999) eine Verzweigungssequenz innerhalb der Callitrichinae mit der Gattung *Saguinus* als ursprünglichste Linie, gefolgt von *Leontopithecus*, *Callimico*, und schließlich *Callithrix* und *Cebuella*. Harada et al. (1995), Porter et al. (1997), sowie Horovitz und Meyer (1995) präsentierten eine dazu übereinstimmende Verzweigungssequenz, konnten jedoch keine nähere phylogenetische Beziehung von *Saguinus* oder *Leontopithecus* zu den Marmosetten ableiten. Stattdessen bildeten die Gattungen *Saguinus* und *Leontopithecus* eine Schwesterklade der Marmosetten.

Innerhalb der Pitheciidae klassifizierten die meisten Autoren (Schneider et al., 1996, 2001, von Dornum and Ruvolo 1999, Harada et al. 1995, Porter et al. 1997 und Canavez et al. 1999) die Gattung *Callicebus* als basale Linie. Die nächste Abspaltungslinie repräsentierte *Pithecia*, gefolgt von *Cacajao* und *Chiropotes*, die einen letzten gemeinsamen Vorfahren teilen.

Die Befunde der genannten Autoren zeigten weit gehend Übereinstimmung hinsichtlich der phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Atelidae. Demnach bildet die Gattung *Alouatta*

die erste phylogenetische Verzweigungslinie innerhalb der Atelidae. Die zweite Linie setzt sich aus den Gattungen *Ateles*, *Brachyteles* und *Lagothrix* zusammen, die einen letzten gemeinsamen Vorfahren teilen. *Brachyteles* und *Lagothrix* wurden als Schwestergattungen klassifiziert. Im Kontrast zu diesen Ergebnissen schlugen Horovitz und Meyer (1995) vor, dass die Gattungen *Ateles* und *Lagothrix* eine Klade repräsentieren, die im Vergleich zu *Alouatta* eine ursprünglichere Linie bilden.

2.4 Vergleichende Zytogenetik der Primaten

2.4.1 Klassische Zytogenetik

Die klassische Zytogenetik erlangte insbesondere in den 70iger und 80iger Jahren Bedeutung bei der Untersuchung evolutionärer Zusammenhänge. Mit Chromosomen-Bänderungstechniken, wie der G-Bänderung (Gallimore und Richardson 1973), R-Bänderung (Dutrillaux und Lejeune 1971), Q-Bänderung (Caspersson et al. 1968) oder C-Bänderung (Arrighi and Hsu 1971) wurden die Karyotypen einer Vielzahl von Säugerspezies vergleichend charakterisiert. Auch innerhalb der Primatenordnung liegen zahlreiche Erkenntnisse klassischer Bänderungsanalysen über Altweltaffen, Neuweltaffen und Prosimier vor (Dutrillaux 1979, Seuánez 1979, Stanyon et al. 1983). Es wurde postuliert, dass sich die chromosomale Phylogenie von den Prosimiern bis zum Menschen mittels der Chromosomen-Bänderung rekonstruieren ließe (Dutrillaux 1979, Clemente et al. 1990). Jedoch zeigte sich, dass vergleichende Bänderungsanalysen bei komplexen chromosomalen Umbauten, wie auch bei chromosomalen Umbauten, die Translokationen von kleinen chromosomalen Fragmenten involvieren, häufig unvollständige oder fehlerhafte Ergebnisse lieferten (Müller et al. 1997a, 1999). So konnte beispielsweise die Abfolge chromosomaler Umbauten bei Gibbon Spezies, die sich durch multiple chromosomale Rearrangements vom Menschen unterscheiden mittels der vergleichenden Bänderungsanalyse nicht aufgeschlüsselt werden. Auch mit zunehmender phylogenetischer Distanz der untersuchten Spezies, wie z.B. Lemur und Mensch resultierten mittels klassischen Bänderungsanalysen entweder keine Aussagen über chromosomale Homologien zu einigen Chromosomen oder kontroverse Interpretationen im Vergleich zu molekular-zytogenetischen Daten (Müller et al. 1997a). Bei Neuweltaffen wurden gleichfalls enorme Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der klassischen und molekularen Zytogenetik festgestellt. So stellten Dutrillaux und Couturier (1981), basierend auf vergleichenden R-Bandenanalysen von Chromosomen, einen hypothetischen anzestral

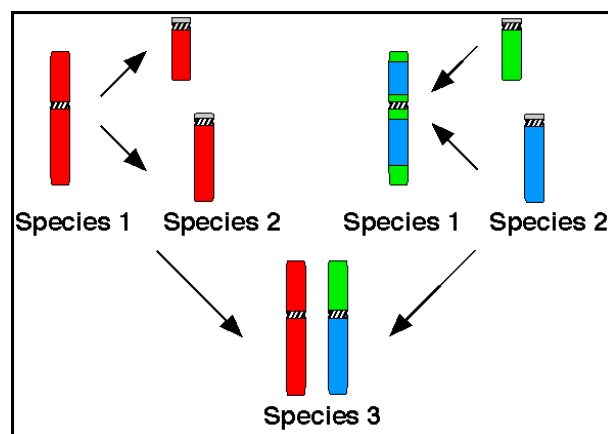
Karyotyp der Neuweltaffen mit $2n=58$ Chromosomen auf, während die Befunde molekular zytogenetischer Daten auf einen Chromosomensatz von $2n=54$ Chromosomen hinweisen (Neusser et al. 2001, de Oliveira et al. 2002). Zudem wurden wichtige ancestrale Chromosomenformen der Neuweltaffen, wie die Assoziation der menschlichen Homologen 3/21 oder 14/15 nicht erkannt oder Assoziationen als ancestrale Charakter der Neuweltaffen vorgestellt, die nicht mit molekular-zytogenetischen Daten übereinstimmen (siehe Stanyon et al. 2000). Insgesamt ergab eine konservative Schätzung nur etwa 70% Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der vergleichenden Bänderungsanalyse und der vergleichenden Kartierung mittels *chromosome painting* (siehe Müller et al. 1997a; Wienberg et al. 1992). Dies demonstriert, dass die Methode der klassischen Zytogenetik nicht ausreichend sensitiv für die Rekonstruktion chromosomaler Stammbäume ist.

2.4.2 Molekulare Zytogenetik

Die Einführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in die vergleichende Karyotypanalyse zu Beginn der 90iger Jahre (Wienberg et al. 1990) stellte einen Wendepunkt dar von der reinen Betrachtung der Chromosomenmorphologie hin zu der Möglichkeit, auf DNA Ebene chromosomale Homologien zwischen Spezies gezielt nachzuweisen. Im Besonderen die Methode des *chromosome painting* erlaubte eine präzise Darstellung chromosomaler Homologien und den Nachweis interchromosomaler Umbauten zwischen Mensch und nichtmenschlichen Spezies. Im Vergleich zur klassischen zytogenetischen Methoden erzielte sie eine größere Zuverlässigkeit und Auflösung in der Unterscheidung von Merkmalen, die auf Konvergenz oder Homologie beruhen (Jauch et al. 1992, Wienberg und Stanyon 1995). Mit der Einführung der *ZOO-FISH* (Scherthan et al. 1994) wurde ein weiterer wichtiger Meilenstein gelegt, indem demonstriert wurde, dass prinzipiell jede Säugetierart mit menschlichen chromosomen-spezifischen DNA Sonden unter entsprechender Anpassung von FISH Protokollen untersucht werden kann. Die Entwicklung der Methode des *reciprocal chromosome painting* (Arnold et al. 1996), bei der chromosomen-spezifische DNA Sonden von zwei Spezies reziprok hybridisiert werden, konnte eine zusätzliche Verbesserung der sub-chromosomalen Auflösung erzielt werden. Ferner beinhaltet diese Methode den Vorteil, dass chromosomale Homologien, die in zwei unabhängigen Experimenten nachgewiesen wurden, reziprok überprüft werden können. Eine Erweiterung des *reciprocal chromosome painting* stellt die von Müller et al. (1999) etablierte Methode des *multidirectional chromosome painting* dar, mit der eine noch zuverlässigere Darstellung sub-chromosomaler Homologien

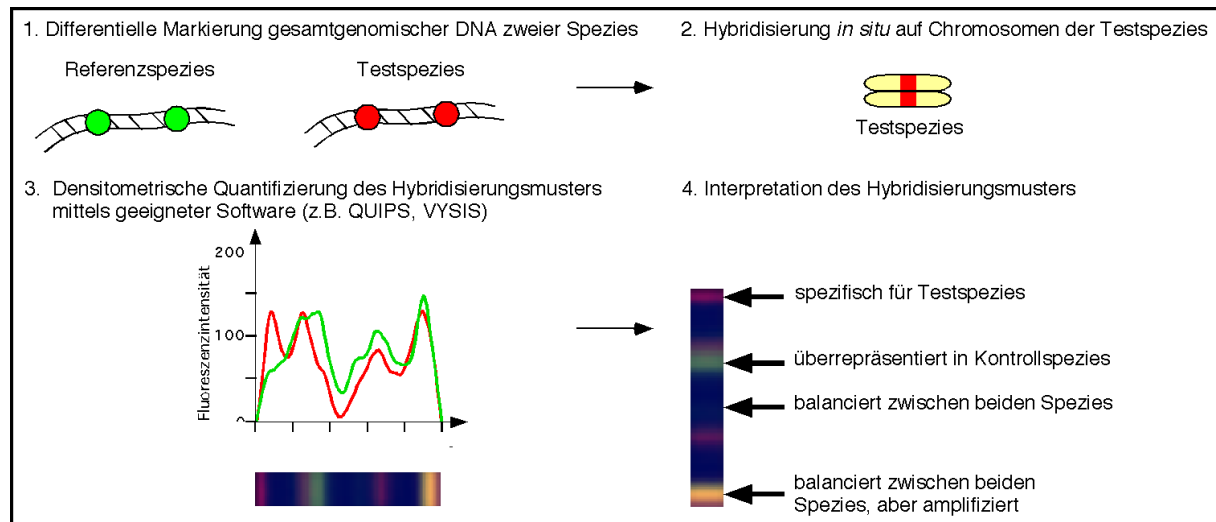
möglich ist und insbesondere bei vergleichenden Analysen zwischen entfernter verwandten Spezies Bedeutung erlangt hat. Die Abbildung 2.6 illustriert schematisch das Prinzip des *multidirectional chromosome painting*.

Abbildung 2.6: Prinzip des *multidirectional chromosome painting* unter Einsatz chromosomenspezifischer DNA Sonden unterschiedlicher Spezies. Im Vergleich zu chromosomen-spezifischen DNA Sonden der Spezies 1 erlauben diejenigen der Spezies 2 eine Differenzierung der Chromosomenarme der Spezies 3 und die Definition von chromosomalen Subregionen der Spezies 1. Die Anwendung von mehreren chromosomen-spezifischen Sonden ermöglicht zudem eine kreuzweise Überprüfung chromosomaler Homologien.



Die vergleichende Genomhybridisierung (*Comparative Genome Hybridization*, CGH, Kallioniemi et al. 1992) findet vor allem in der Tumorzytogenetik zum Nachweis chromosomaler Imbalancen (Deletionen bzw. Amplifikationen) Anwendung. Die von Toder et al. (1998) entwickelte Strategie der *inter-species* CGH stellt eine Adaptation von konventionellem CGH dar und erlaubt sowohl qualitative, als auch quantitative Aussagen über Chromosomenimbalancen zwischen verschiedenen Spezies zu treffen. So konnte über den Vergleich der Genome von Mensch, Gorilla, Schimpanse und Orangutan ein Eindruck über das Vorkommen, den Amplifikationsgrad, sowie die Spezies-spezifität von repetitiven Genomelementen gewonnen werden (Toder et al. 1998, Toder et al. 2001). Die Abbildung 2.7 veranschaulicht schematisch die Strategie von Inter-Spezies CGH Experimenten.

Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Vorgehensweise und Auswertung von Inter-Spezies CGH Experimenten



In den letzten Jahren konnte durch die Analyse der Karyotypen einer Vielzahl von Spezies mittels der Methode des *chromosome painting* ein detaillierter Überblick über chromosomale Veränderungen in verschiedenen Linien der Säugetiere und vor allem auch der Primaten gewonnen werden. Über die Rekonstruktion der Abfolge chromosomaler Umbauten konnten die phylogenetische Beziehung zwischen Spezies beleuchtet werden und Erkenntnisse zur Chromosomenevolution innerhalb und zwischen verschiedenen Speziesgruppen gesammelt werden. Für die Rekonstruktion phylogenetischer Zusammenhänge von Spezies sind insbesondere Assoziationen der zum Menschen homologen Chromosomenformen informativ, da gemeinsam abgeleitete Assoziationen bei bestimmten Untergruppen von Spezies eine phylogenetische Verknüpfung zwischen diesen Spezies herstellen und Hinweise auf ihren gemeinsamen Ursprung in der Evolution geben. Unter Assoziationen sind Chromosomenformen zu verstehen, die in Folge chromosomaler Umbauten neue Syntenien homologer chromosomaler Regionen entstehen ließen. Das Entstehen von Assoziationen kann als seltene genomische Veränderung (*rare genomic change*, Rokas and Holland 2000) betrachtet werden.

Da eine Zusammenfassung der Ergebnisse der vergleichenden Karyotypanalyse bei Säugetieren im Rahmen dieser Arbeit zu umfassend wäre, wird hier nur Bezug genommen auf die Chromosomenevolution der Primaten. Seit 1990 wurden, mittels FISH mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden des Menschen und in einigen Fällen zusätzlich mit solchen von anderen Primaten, vergleichende Chromosomenkarten zwischen dem Menschen

und 44 Primaten erstellt. Die Tabelle 2.2 gibt eine Übersicht über die bisher mittels *chromosome painting* untersuchten Spezies der Primaten.

Tabelle 2.2: Übersicht über bisher mittels *chromosome painting* untersuchten Primatenspezies (Stand Januar 2004). Die mit * gekennzeichneten Neuweltaffen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Spezies	Referenz
<i>Pan troglodytes</i> (Pongidae)	Wienberg et al. (1990), Jauch et al. (1992)
<i>Gorilla gorilla</i> (Pongidae)	Jauch et al. (1992), Stanyon et al. (1992)
<i>Pongo pygmaeus</i> (Pongidae)	Jauch et al. (1992)
<i>Hylobates lar</i> (Hylobatidae)	Jauch et al. (1992), Müller et al. (2002)
<i>Hylobates syndactylus</i> (Hylobatidae)	Koehler et al. (1995a)
<i>Hylobates concolor</i> (Hylobatidae)	Koehler et al. (1995b)
<i>Hylobates hoolock</i> (Hylobatidae)	Yu et al. (1997), Nie et al. (2001)
<i>Macaca fuscata</i> (Cercopithecinae)	Wienberg et al. (1992)
<i>Papio hamadryas</i> (Cercopithecinae)	Best et al. (1998)
<i>Cercopithecus aethiops</i> (Cercopithecinae)	Finelli et al. (1999)
<i>Colobus guereza</i> (Colobinae)	Bigoni et al. (1997b)
<i>Presbytis cristata</i> (Colobinae)	Bigoni et al. (1997a)
<i>Nasalis larvatus</i> (Colobinae)	Bigoni et al. (2003)
<i>Semnopithecus francoisi</i> (Colobinae)	Nie et al. (1998)
<i>Semnopithecus phayrei</i> (Colobinae)	Nie et al. (1998)
<i>Callitrix jacchus</i> (Platyrrhini)*	Sherlock et al. (1996), Neusser et al. (2001)
<i>Callithrix argentata</i> (Platyrrhini)	Neusser et al. (2001)
<i>Cebuella pygmaea</i> (Platyrrhini)	Neusser et al. (2001)
<i>Callimico goeldii</i> (Platyrrhini)	Neusser et al. (2001)
<i>Saguinus oedipus</i> (Platyrrhini)	Müller et al. (2001)
<i>Cebus capucinus</i> (Platyrrhini)	Richard et al. (1996)
<i>Cebus apella</i> (Platyrrhini)*	Garcia et al. (2000)
<i>Cebus nigrivittatus</i> (Platyrrhini)	Garcia et al. (2002)
<i>Callicebus moloch</i> (Platyrrhini)	Stanyon et al. (2000)
<i>Callicebus donacophilus</i> (Platyrrhini)*	Barros et al. (2003)
<i>Callicebus lugens</i> (Platyrrhini)	Stanyon et al. (2003a)
<i>Samiri sciureus</i> (Platyrrhini)*	Stanyon et al. (2000)
<i>Alouatta belzebul</i> (Platyrrhini)	Consiglière et al. (1998)
<i>Alouatta seniculus arctoidea</i> (Platyrrhini)	Consiglière et al. (1996)
<i>Alouatta sara</i> (Platyrrhini)	Consiglière et al. (1996)
<i>Alouatta caraya</i> (Platyrrhini)*	de Oliveira et al. (2002)
<i>Alouatta seniculus macconnelli</i> (Platyrrhini)*	de Oliveira et al. (2002)
<i>Alouatta fusca</i> (Platyrrhini)*	de Oliveira et al. (2002)
<i>Ateles geoffroyi</i> (Platyrrhini)	Morescalchi et al. (1997)
<i>Ateles belzebuth hybridus</i> (Platyrrhini)	Garcia et al. (2002)
<i>Ateles belzebuth marginatus</i> (Platyrrhini)*	de Oliveira et al. (im Druck)
<i>Ateles paniscus</i> (Platyrrhini)*	de Oliveira et al. (im Druck)
<i>Brachyteles arachnoides</i> (Platyrrhini)*	de Oliveira et al. (im Druck)
<i>Lagothrix lagothericha</i> (Platyrrhini)*	Stanyon et al. (2001), de Oliveira et al. (im Druck)
<i>Galago moholi</i> (Prosimia)	Stanyon et al. (2002)

<i>Otolemur crassicaudatus</i> (Prosimia)	Stanyon et al. (2002)
<i>Eulemur fulvus mayottensis</i> (Prosimia)	Müller et al. (1997a)
<i>Eulemur macaco macaco</i> (Prosimia)	Müller et al. (1997a)
<i>Lemur catta</i> (Prosimia)	Cardone et al. (2002)

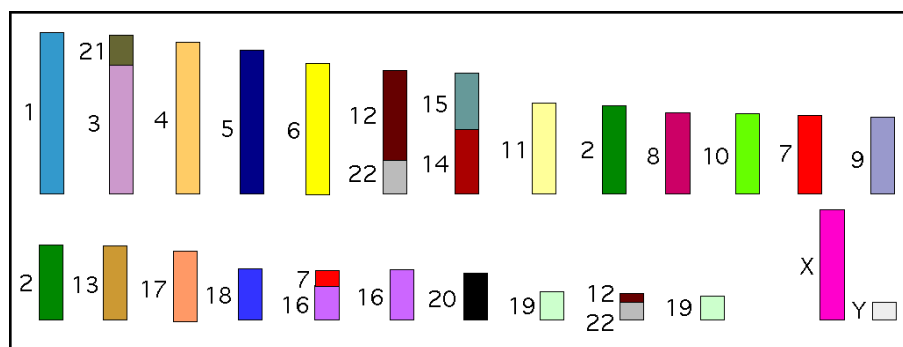
2.4.3 Rekonstruktion chromosomaler Landmarken bei Primaten

Durch die Interpretation der Ergebnisse von *ZOO-FISH* Experimenten bei Primaten (siehe Tabelle 1.2) und einer Reihe *outgroup* Spezies, die verschiedenen Säugetierordnungen angehören, wie z.B. *Tupaia belangeri* (Spitzhörnchen, Ordnung Scadentia, Müller et al. 1999), *Equus caballus* (Pferd, Ordnung Perissodactyla, Raudsepp et al. 1996), *Bos taurus* (Rind, Ordnung Cetartiodactyla, Hayes 1995, Solinas-Toldo et al. 1995 u.a.), *Sus scrofa* (Schwein, Ordnung Cetartiodactyla, Frönicke et al. 1996, Goureau et al. 1996), *Felis catus* (Katze, Ordnung Carnivora, Rettenberger et al. 1995a, Wienberg et al. 1997), *Phoca vitulina* (Seehund, Ordnung Carnivora, Frönicke et al. 1997), *Sorex araneus* (Spitzmaus, Ordnung Insectivora, Dixkens et al., 1998), *Mustela vison* (Nerz, Ordnung Carnivora, Hameister et al. 1997) konnte eine Vorstellung vom ancestralen Karyotyp aller Säuger gewonnen werden. In jüngster Zeit wurden die Karyotypen einer Vielzahl weiterer Säugetiere mittels *ZOO-FISH* charakterisiert (z.B. Frönicke et al. 2003, Stanyon et al. 2003b, Volleth et al. 2002). Basierend auf vergleichenden Chromosomenkarten der bisher untersuchten Säugetierspezies wurden Hypothesen über den ancestralen Karyotyps der Boreo-Eutheria formuliert (Frönicke et al. 2003, Yang et al. 2003). Dieser würde sich aus $2n=46$ Chromosomen zusammensetzen und folgende zum Menschen homologe Chromosomenformen aufweisen: 1, 2a, 2b, 3/21, 4/8a, 8b, 5, 6, 7a, 7b/16a, 9, 10, 11, (12/22)a, (12/22)b, 13, 14/15, 16b/19b, 17, 18, 20, X und Y. Die Nomenklatur dieser Chromosomenformen wurde hierbei folgendermaßen definiert: Die mit a und b gekennzeichneten Chromosomenformen stellen homologe Chromosomen (-regionen) zu Segmenten von menschlichen Chromosomen dar. So entricht z.B. 16a einem Segment mit Homologie zum menschlichen Chromosomenarm 16p und 16b zum menschlichen Chromosomenarm 16q. Die in Klammern gesetzten und mit a und b bezeichneten Chromosomenformen bedeuten, dass die Assoziation der homologen menschlichen Chromosomen 12 und 22 auf zwei verschiedenen Chromosomen vorliegt.

Basierend auf den Ergebnissen des *multidirectional chromosome painting* zwischen Lemuren (*Eulemur macaco macaco*), Mensch und Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) (Müller et al. 1999) im Vergleich mit Zoo-FISH Daten von anderen Säugern (siehe oben) konnten ancestrale Charaktere der Primaten definiert werden, auf deren Grundlage eine Hypothese für

einen ancestralen Karyotyp aller Primaten vorgeschlagen wurde ($2n=50$). Aufgrund neuerer Erkenntnisse zur Evolution der Chromosom 1 und 7 Homologen (Richard et al. 2000; Frönicke et al. 2003) wurde dieser modifiziert und würde folgende zum Menschen homologe Chromosomenformen beinhalten: 1, 2a, 2b, 3/21, 4-6, 7a, 7b/16a, 8-11, (12/22)a, (12/22)b, 13, 14/15, 16b, 17, 18, 19a, 19b, 20, X und Y ($2n=48$). Dieser hypothetische ancestrale Karyotyp der Primaten (siehe Abb. 2.8) zeigt große Ähnlichkeit zu dem postulierten ancestralen Karyotyp der Säuger (Frönicke et al. 2003), weist jedoch im Unterschied zu diesem keine Assoziation der menschlichen Homologen Chromosomen 4/8 und 16b/19b mehr auf.

Abbildung 2.8: Hypothetischer ancestraler Karyotyp der Primaten. Charakteristische ancestrale Chromosomenformen der Primaten stellen die Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomensegmente 12/22, 7/16, 14/15 und 3/21 dar.



Über den Vergleich der Chromosomenformen des hypothetischen ancestralen Karyotyps der Primaten (siehe Abb. 2.8) kann die Abfolge chromosomaler Umbauten innerhalb einzelner Primatenuntergruppen rekonstruiert werden. Nachfolgend werden die bislang gewonnenen Erkenntnisse zur Chromosomenevolution bei den Prosimiern, Altweltaffen den Gibbons und den großen Menschenaffen zusammengefasst. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse der bislang untersuchten Neuweltaffenspezies wird hier nicht gegeben, da die vergleichende Karyotypanalyse von Neuweltaffen Gegenstand dieser Arbeit ist.

Innerhalb der Prosimii (Halbaffen) wurden bisher 5 Spezies aus zwei von insgesamt acht bekannten Familien mittels *chromosome painting* untersucht (siehe Tabelle 2.2). Obwohl die Prosimii innerhalb der Primaten eine ursprüngliche Primatengruppe darstellen, konnte mittels der vergleichenden Karyotypanalyse demonstriert werden, dass sie keineswegs „primitive“ Karyotypen aufweisen. Die Untersuchung der Karyotypen von *Galago moholi* und *Otolemur crassicaudatus* (Stanyon et al. 2002) zeigte beispielsweise, dass nur sieben menschliche

Autosomenformen vollständig konserviert in *Otolemur crassicaudatus* und nur neun in *Galago moholi* vorliegen. Gemeinsame Charaktere der untersuchten Lemuren *Lemur catta* (Cardone et al. 2002), *Eulemur fulvus*, *Eulemur macaco* (Müller et al. 1997a) und den genannten Galagos, stellen die Assoziationen der menschlichen Homologen 3/21, 14/15 und 12/22 dar. Die angenommenen ancestralen Chromosomenformen der Prosimii leiteten sich durch Fissionen der menschlichen Homologen Chromosomen 1, 4-6, 8 und 15 von dem hypothetischen ancestralen Karyotyp der Primaten (siehe Abb. 1.7) ab. Die genannten Lemuren unterscheiden sich von dem hypothetischen gemeinsamen Vorfahren der Prosimii durch vier gemeinsam abgeleitete Fissionen und die Galagos durch fünf gemeinsam abgeleitete Fissionen und sechs Translokationen. Innerhalb der Lemuren können die beiden Eulemuren durch eine gemeinsam abgeleitete Fusion phylogenetisch verknüpft werden. Der *Lemur catta* weist im Vergleich zu den beiden Eulemuren einen ursprünglicheren Karyotyp auf.

Im Unterschied zu den Prosimii, stellen die Platyrrhini eine mit molekular-zytogenetischen Methoden gut charakterisierte Primatengruppe dar. Bisher wurden vergleichende Chromosomenkarten zwischen Mensch und 24 verschiedenen Vertretern der Neuweltaffen publiziert (siehe Tabelle 2.2), basierend auf FISH mit menschlichen und in einigen Fällen auch mit Neuweltaffen chromosomen-spezifischen DNA Sonden. Die vergleichende Karyotypanalyse zeigte, dass die Neuweltaffen sehr divergente Karyotypen aufweisen, mit diploiden Chromosomenzahlen zwischen $2n=16$ bis $2n=62$. Stanyon et al. (2000) stellten einen hypothetischen ancestralen Karyotyp der Neuweltaffen mit einem Chromosomensatz von $2n=56$ vor, der von de Oliveira et al. (2002) und Neusser et al. (2001) aufgrund neuerer Befunde auf $2n=54$ korrigiert wurde. Charakteristische ancestrale Merkmale der Neuweltaffen repräsentieren die Assoziationen der menschlichen Homologen 3/21, 14/15, wie auch 10/16, 8/18 und 5/7, die ausschließlich in Neuweltaffen vorkommen. Phylogenetische Landmarken konnten für die Atelinae und Callitrichinae (de Oliveira et al. 2002, Neusser et al. 2001) definiert werden. Diese stellen bei den Atelinae die gemeinsam abgeleitete Assoziation der menschlichen Homologen 4/15, die Fission der menschlichen Homologen 1, 4, 5, sowie eine Inversion, welche die menschlichen Homologen 5 und 7 involviert, dar. Bei den Callitrichinae können die Assoziationen der menschlichen Homologen 2/15, 9/13/22 und 13/17/20 als phylogenetische Landmarken betrachtet werden.

Rekonstruktionen des ancestralen Karyotyps der Catarrhini (Cercopithecoidea und Hominoidea) deuten darauf hin, dass dieser eine diploide Chromosomenzahl von 46 Chromosomen aufwies und sich aus folgenden zum Menschen homologen Chromosomenformen zusammensetzte: 1, 2a, 2b, 3–13, 14/15, 16–22, X, und Y (Bigoni et al. 2003). Von den Cercopithecidae (Altweltaffen) wurden bislang die Karoytypen von acht Spezies mit menschlichen chromosomen-spezifischen DNA Sonden charakterisiert. Sie weisen im Vergleich zu Neuweltaffen eher konservierte Karyotypen auf. Kennzeichnend für alle Altweltaffen ist die Fission der ancestralen Chromosomenform der Primaten 3/21, sowie Fusionen, welche zu den modernen Chromosomen 7 und 16 führten. Innerhalb der Unterfamilie Cercopitheciae besitzen die untersuchten Vertreter der Papionini, *Macaca fuscata* (Wienberg et al. 1992) und *Papio hamadryas* (Best et al. 1998) hoch konservierte Karoytypen mit einer diploiden Chromosomenzahl von $2n=42$. Die Meerkatze *Cercopithecus aetiops* (Finelli et al. 1999) weist mit $2n=60$ Chromosomen einen abgeleiteten Karyotyp gegenüber den Papionini auf. Der Anstieg der Chromosomenzahl kann auf zentrische und nicht-zentrische Fissionen zurückgeführt werden. Die untersuchten Colobine ($2n=44$ bis 48 Chromosomen) weisen ähnlich konservierte Karyotypen wie die Papionini auf. Charakteristisch für den afrikanischen Colobinae *Colobus guereza* (Bigoni et al. 1997b), als auch für die asiatischen Colobinae *Presbytis cristata* (Bigoni et al. 1997a), *Semnopithecus francoisi*, *S. phayrei* (Nie et al. 1998) und *Nasalis larvatus* (Bigoni et al. 2003), ist eine Assoziation der menschlichen Homologen 21/22. Die asiatischen Colobinae teilen darüber hinaus eine gemeinsam abgeleitete Assoziation 1/19. Innerhalb der asiatischen Colobinae weist *Nasalis larvatus* mit $2n=48$ Chromosomen einen abgeleiteten Karyotyp auf.

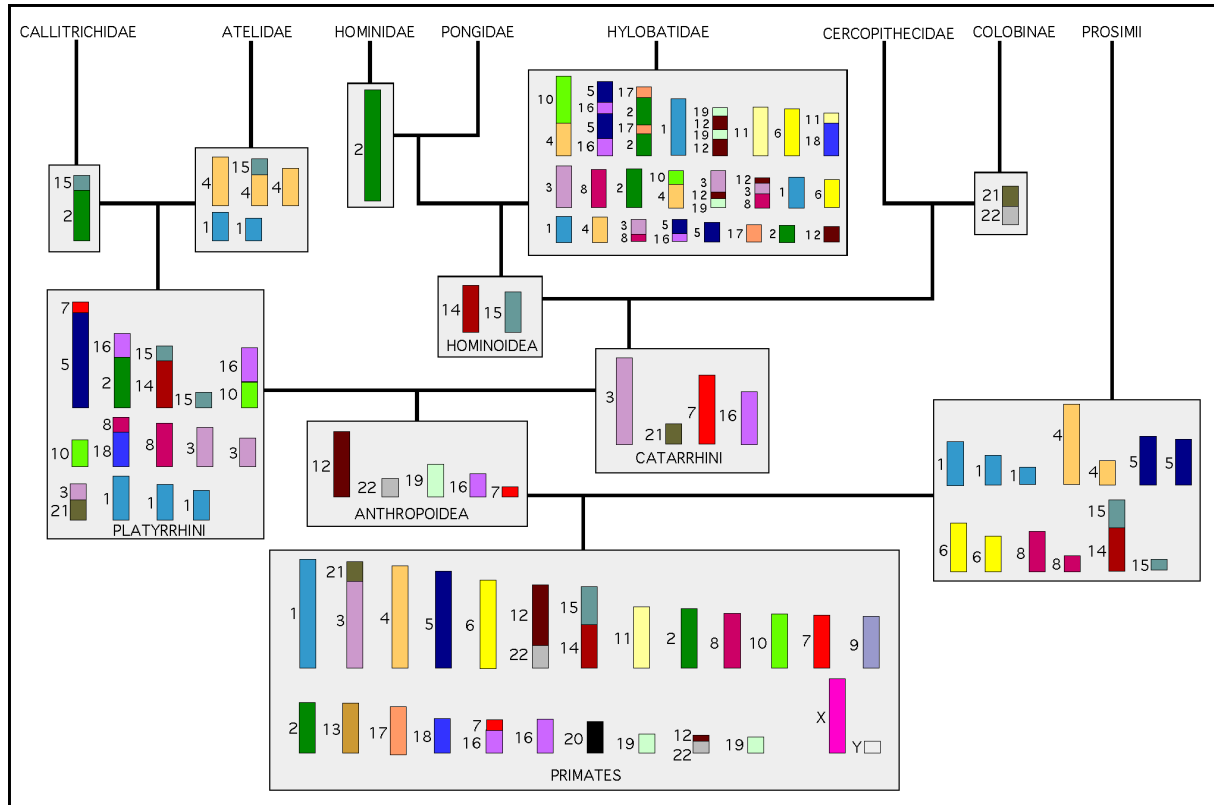
Die Hominoidea (große Menschenaffen und Gibbons) können von den Cercopithecoidea karyotypisch durch die Fission der ancestralen Chromosomenform 14/15 klar unterschieden werden. Die großen Menschenaffen weisen zwei weitere interchromosomale Rearrangements auf: Die Fusion der ursprünglichen homologen menschlichen Chromosomenformen 2a und 2b zum „modernen“ menschlichen Chromosom 2 und die reziproke Translokation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 5/17 in Gorilla. Die Gibbons zeigen gegenüber den großen Menschenaffen extrem abgeleitete Karyotypen, mit einer enormen Anzahl an chromosomalen Umbauten, die auch als „chromosome reshuffling“ bezeichnet werden (Jauch et al. 1992). Chromosomale Homologien zwischen dem Menschen und je einem Vertreter der vier Gattungen der Gibbons, konnten mittels *chromosome painting* nachgewiesen werden (Koehler et al. 1995a, b, Yu et al. 1997, Nie et al. 2001 Jauch et al.

1992, Müller et al. 2002). Auf deren Basis rekonstruierten Muller et al. (2003) die Abfolge chromosomaler Veränderungen innerhalb der Gibbons und stellten einen ancestralen Karyotyp der Gibbons vor. Dieser würde einen Chromosomensatz von $2n=66$ aufweisen und sich von dem hypothetischen Ancestor der Hominoidea durch ein Minimum von 24 chromosomalen Umbauten (sieben reziproke Translokationen, sieben Inversionen und 10 Fissionen) unterscheiden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Gibbons zahlreiche spezies-spezifische Chromosomenformen (bis zu 21 in *Hylobates hoolock*) aufweisen. Der von Muller et al. (2003) rekonstruierte Stammbaum der Gibbons zeigt eine phylogenetische Verzweigungssequenz mit *Hylobates hoolock* als ursprünglichste Linie, gefolgt von *Hylobates lar* und schließlich *Hylobates syndactylus* und *Hylobates concolor*, die einen letzten gemeinsamen Vorfahren teilten.

Prädominante chromosomale Umbauten bei den großen Menschenaffen und dem Menschen (Hominidae) sind Inversionen, Repositionierung von Zentromeren und Heterochromatinaddition. In jüngster Zeit wurde darüber hinaus eine Vielzahl von segmentalen Duplikationen bei den großen Menschenaffen aufgespürt. Eine detaillierte vergleichende Analyse intra-chromosomaler Umbauten aller großen Menschenaffen und dem Makaken als *outgroup* Spezies gelang Müller und Wienberg (2001) mit Hilfe eines Vielfarben *bar code* unter Verwendung von chromosomen-spezifischen DNA Sonden des Gibbons in Kombination mit DNA Sonden die über *fragmented hybrids* gewonnen wurden. Mit dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der Orangutan die größte Anzahl an konservierten Chromosomen und demnach den ursprünglichsten Karyotyp innerhalb der großen Menschenaffen aufweist.

Die Abbildung 2.9 bietet eine Übersicht über die wichtigsten chromosomalen Landmarken, die mittels *chromosome painting* in den einzelnen phylogenetischen Linien der Primaten nachgewiesen wurden.

Abbildung 2.9: Chromosomale Charaktere, die als kladistische Landmarken eine klare Unterscheidung der einzelnen phylogenetischen Linien der Primaten erlauben. An der Basis des Stammbaums ist der postulierte ancestrale Karyotyp der Primaten illustriert.



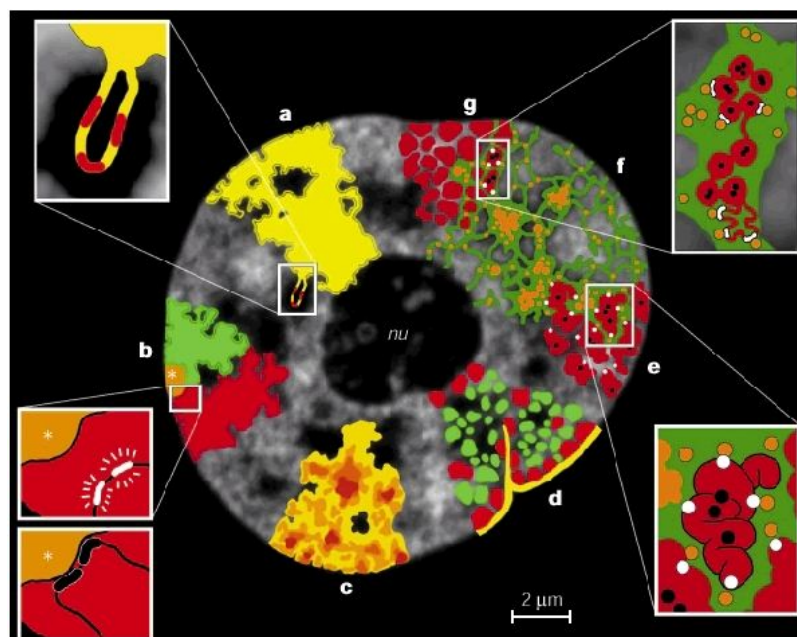
2.5 Die Architektur des Zellkerns

2.5.1 Modell der funktionellen Zellkernarchitektur

Die technischen Fortschritte in der Mikroskopie, sowie die Entwicklung von Methoden zur Darstellung spezifischer DNA Sonden und Protein Epitope, erlauben heute einen detaillierten Einblick in die Organisation des Zellkerns. Maßgeblich waren hierbei die Fortschritte in der Elektronenmikroskopie, der konfokalen Mikroskopie, wie auch die Entwicklung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und der immuno-histochemischen Darstellung von Proteinen durch spezifische Antikörper. Die Einführung rekombinanter DNA Konstrukte für die Expression GFP- (*Green Fluorescent Protein*) gekoppelter Proteine ermöglichen seit einigen Jahren, spezifische Proteine in lebenden Zellen zu verfolgen. So konnten Einsichten in die Topologie und in dynamische Interaktionen zwischen Chromatin- und Nicht-Chromatindomänen gewonnen werden. Diese führten zum Modell der funktionellen Zellkernarchitektur (siehe Übersichtsartikel von Cremer T. und Cremer C. 2001). Nach

diesem Modell (siehe Abb. 2.10) weisen Zellkerne von Säugetieren eine kompartimentalisierte Struktur auf, deren Hauptkompartimente die Chromosomenterritorien (CT) und das „Interchromatin Compartment“ (IC) sind. Das IC enthält makromolekulare Komplexen, die wichtig sind für die DNA Replikation, Transkription, dem Splicing und der DNA Reparatur. Weitere wichtige Komponenten des Zellkerns stellen die nukleäre Lamina, der Nukleolus und die Kernporen dar.

Abbildung 2.10: Modell der funktionellen Zellkernarchitektur anhand eines optischen Serienschchnittes durch einen Hela-Zellkern (aus Cremer T. und Cremer C. 2001). Strukturelle Merkmale des CT-IC („chromosome-territory-interchromatin-compartment“) Modells sind farblich hervorgehoben. **(a)** CT haben eine komplex gefaltete Oberfläche. Vergrößerter Ausschnitt: Topologisches Modell der Genregulation. Eine Chromatinschleife mit zahlreichen aktiven Genen ragt von der Oberfläche des CT in den IC Raum hinein. **(b)** CT enthalten separate Subdomänen für den kurzen und langen Chromosomenarm, sowie eine Zentromerdomäne (Stern). Vergrößerter Ausschnitt: Oben: aktiv transkribierte Gene (weiß dargestellt) liegen auf einer Chromatinschleife in Entfernung zu zentromerischem Heterochromatin. Unten: Repositionierung der gleichen Gene (schwarz dargestellt) in Nachbarschaft zu zentromerischem Heterochromatin führt zu deren Inaktivierung. **(c)** CT haben eine unterschiedliche Chromatindichte (dunkelbraun: hohe Dichte, hellgelb geringe Dichte). Locker gepacktes Chromatin ragt in das IC hinein, während dicht gepacktes Chromatin entfernt von IC positioniert ist. **(d)** CT mit früh replizierenden (grün) und mittel bis spät replizierenden (rot) Chromatindomänen. Jede Domäne enthält ~1 Mbp DNA. Genarmes Chromatin (rot) ist bevorzugt an der Kernperipherie lokalisiert und in engem Kontakt zur nukleären Lamina (gelb), als auch zu den Einfaltungen der Lamina und um den Nukleolus (nu). Genreiches Chromatin (grün) liegt zwischen den genarmen Kompartimenten. **(e)** Höhere Ordnung der Chromatinstruktur, bestehend aus hierarchisch aufgebauten Chromatinfibern. Vergrößerter Ausschnitt: Aktive Gene (weiße Punkte) liegen an der Oberfläche der gewundenen Fibern, inaktive Gene (schwarze Punkte) eher im Inneren der Chromatinstruktur. **(f)** Das CT-IC Modell basiert auf der Vorstellung, dass das IC (grün) Komplexe enthält, die für die Transkription, DNA-Replikation und Reparatur und dem Splicing benötigt werden (orange Punkte). **(g)** CT mit ~1 Mbp Chromatindomänen (rot) und IC (grün), das sich zwischen diesen Chromatindomänen durchzieht. Vergrößerter Ausschnitt: topologische Beziehung zwischen dem IC und aktiven und inaktiven Genen. Die feinsten Verzweigungen des IC enden zwischen ~100 Kbp Chromatindomänen. Oben: Aktive Gene (weiße Punkte) sind auf der Oberfläche dieser Domänen lokalisiert, während inaktive Gene (schwarze Punkte) im Inneren liegen. Unten: „geschlossene“ ~100 Kbp Chromatindomänen mit inaktiven Genen wandeln sich in eine „offene“ Konfiguration um, bevor sie transkribiert werden.



2.5.2 Höhere Ordnung der Chromatin Anordnung

Das Chromatin individueller Chromosomen ist im Interphasekern in Chromosomenterritorien (CT) organisiert. Diese werden als eine essentielle höhere Ordnungsstruktur in Zellkernen aller Vertebraten angesehen (siehe Übersichtsartikel von Chevret et al. 2000, Cremer T. und Cremer C. 2001, Cremer et al. 2000, Lamond und Earnshaw 1998). CT sind aufgebaut aus Chromatindomänen mit einem DNA Gehalt von etwa 1 Mbp dar, die den sog. „Replikations-Foci“ zyklischer Zellen entsprechen (Sadoni et al. 1999, Schermelleh et al. 2001). Der Aufbau dieser ~1 Mbp Chromatindomänen ist derzeit noch nicht im Detail geklärt. Es wird vermutet, dass diese Chromatindomänen aus kleineren Subdomänen mit einem DNA Gehalt in der Größenordnung zwischen 30 und 200 Kbp zusammengesetzt sind. Die ~1 Mbp Chromatindomänen bleiben offenbar in allen Interphasestadien bestehen und zeigen eine distinkte Anordnung innerhalb des Zellkerns. Bei der Kondensation des Chromatins in der Prophase und Prometaphase der Mitose können sich mehrere ~1Mbp Chromatindomänen zu einer Chromosomenbande zusammenlagern (Cremer T. und Cremer C. 2001, Cremer et al. 2000).

Im Fokus derzeitiger Forschung steht die Analyse epigenetischer Mechanismen, die bei der Chromatinverpackung im Zellkern wirksam sind. Verschiedene Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Modifikation der DNA durch Methylgruppen, als auch Modifikationen der Histone durch Methy- und Acetylgruppen, bewirken, dass Chromatin unterschiedlich verpackt und kondensiert sein kann (siehe z.B. Gilbert et al. 2003 und Übersichtsartikel von Grewal und Elgin, 2002, Sims et al. 2003). Von der jeweiligen Chromatinverpackung scheint wiederum abzuhängen, ob die Transkriptionsmaschinerie RNA von bestimmten Genen ablesen kann oder nicht und ob bestimmte Gene aktiv oder inaktiv sind.

2.5.3 Radiale und nachbarschaftliche Chromatin Anordnung im Zellkern

2.5.3.1 Radiale Anordnung von Chromosomenterritorien

Zahlreiche Studien weisen auf eine nicht zufällige radiale Anordnung von Chromatin im Zellkern hin. Neuere Untersuchungen beleuchten verschiedene Aspekte, der Chromatinanordnung in verschiedenen Zelltypen, Zellzyklus- und Differenzierungsstadien (Bridger et al. 2000, Bickmore und Teague 2002, Cremer et al. 2001, Kozubek et al. 2002). In

menschlichen Lymphozyten, lymphoblastoiden Zellen, sowie in bestimmten Tumorzelllinien wurde eine distinkte radiale Anordnung von Chromatin in Abhängigkeit von der Gendichte nachgewiesen (Croft et al., 1999, Boyle et al., 2001, Cremer et al., 2001, 2003). Die menschlichen 18 und 19 CT zeigen diese distinkte radiale Anordnung auf eindrucksvolle Weise. Diese Chromosomen beinhalten etwa den gleichen DNA Gehalt, unterscheiden sich jedoch gravierend in ihrer Gendichte. Croft et al. (1999), Cremer et al. (2001, 2003), zeigten dass die CT des extrem genreichen Chromosoms 19 zur Kernmitte orientiert waren, während diejenigen des genarmes Chromosoms 18 eine Tendenz der Positionierung hin zur Kernperipherie zeigten. Boyle et al. (2001), beobachteten darüber hinaus, dass in menschlichen lymphoblastoiden Zelllinien eine Korrelation der nukleären Anordnung von CT mit der Gendichte des jeweiligen Chromosoms auch für alle übrigen menschlichen Chromosomen besteht.

Im Unterschied zu menschlichen Lymphozyten und lymphoblastoiden Zelllinien, die eine Gendichte korrelierte Anordnung von Chromatin im Zellkern zeigten, war dies in anderen Zelltypen nicht zu beobachten. Stattdessen weisen die Untersuchungen von Zelltypen mit einer flachen und eher elliptischen Morphologie auf eine größenabhängige Verteilung von Chromosomen hin (Cremer et al. 2001, Sun et al. 2000, Bolzer et al. zur Publikation eingereicht). Bolzer et al. (zur Publikation eingereicht) analysierten kürzlich in 24 Farben 3D FISH Experimenten die radiale Verteilung aller menschlichen CT in Zellkernen von menschlichen G₀ Fibroblasten und Prometaphase Rosetten. Ihre Befunde weisen darauf hin, dass kleine Chromosomen bevorzugt im inneren Kernbereich lokalisiert waren, während große und mittelgroße Chromosomen zur Kernperipherie hin orientiert waren. Diese Tendenz wurde auch in Prometaphase-Rosetten beobachtet. Habermann et al. (2001) diskutierten, dass diese Größen-abhängige radiale Anordnung von CT in Interphasezellkernen zu einem gewissen Grad durch die Organisation der mitotischen Spindel bedingt sein könnte. Wie anhand einer schematischen Darstellung in dieser Publikation illustriert, bilden die Zentromere aller menschlichen Chromosomen einen Ring in der Äquatorialebene und die Schwerpunkte der kleinen Chromosomen liegen näher zur Spindelachse, als diejenigen der großen Chromosomen. Diese Formation von großen und kleinen Chromosomen im Verhältnis zur Spindelachse der Mitose könnte daher einen Ausgangspunkt für die radiale Anordnung von CT in den sich bildenden Tochterzellen darstellen.

Bolzer et al. (zur Publikation eingereicht) zogen als Erklärung für die unterschiedliche radiale Anordnung von CT in Zellkernen von Fibroblasten und Lymphozyten die unterschiedliche Morphologie dieser Zelltypen in Betracht. Fibroblastenkerne zeigen eine elliptische Form und sind im Vergleich zu Lymphozyten und lymphoblastoiden Zellen sehr flach. Die Autoren gingen von der Vorstellung aus, dass während der Rekonstitution des Interphasenukklus in der späten Anaphase/Telophase der Hauptanteil des mittel bis spät replizierenden, fakultativen und konstitutiven Heterochromatins mit der nukleären Lamina an der wiederhergestellten Zellmembran assoziiert ist, im Unterschied zu früh replizierenden, genreichen und transkriptionell aktiven Chromatindomänen (Sadoni et al., 1999, Moir und Spann, 2001). Wenn nun der Zellkern einer lymphoblastoiden Zelle in der frühen G₁-Phase seine kugelförmige Gestalt annimmt, kann genarmes Chromatin das mit der nukleären Lamina assoziiert ist, in die nukleäre Peripherie wandern, während genreiches Chromatin im Kerninneren verbleibt. Bei den vergleichsweise flachen Fibroblasten sind hingegen während der frühen G₁-Phase keine größeren Bewegungen von genarmem Chromatin in z-Richtung zu erwarten. Dies würde erklären, warum in Zellkernen von Fibroblasten z.B. genarme Chromosom 18 Territorien, trotz ihrer Assoziation zur Kernhülle, in der Kernmitte und in der Nähe von genreichen Chromosom 19 Territorien bleiben.

2.5.3.2 Nachbarschaftliche Chromatin Anordnung

Eine probalistische radiale Verteilung von Chromatin im Zellkern ist durch zahlreiche Studien belegt. Hingegen wird die Existenz von nicht-zufälligen nachbarschaftlichen Anordnungen von Chromosomen (-regionen) bislang kontrovers diskutiert. So beobachteten Nagele et al. (1995, 1998, 1999) und Koss (1998) eine nichtzufällige Nachbarschaftsanordnung zwischen homologen und heterologen Chromosomen. Parada et al. (2002) zeigten, dass die Chromosomen 12, 14 und 15, die in einer Lymphom-Zelllinie der Maus in Translokationen involviert sind, in normalen lymphatischen Zellen bevorzugt in naher Nachbarschaft zueinander standen. Die Autoren folgerten daraus, dass die Translokationen in dieser Lymphomzelllinie möglicherweise durch die nachbarschaftliche Anordnung der darin involvierten Chromosomen erleichtert wurden. Nach ihrer Ansicht wäre vorstellbar, dass es gewebespezifische Variationen in der Anordnung von CT gibt, die eine Prädisposition für bestimmte Translokationen darstellen könnten. Demgegenüber stehen unter anderem die Untersuchungen von Popp et al. (1990) und Sun et al. (2000), die Hinweise auf eine weitgehend zufällige Nachbarschaftsanordnung von Chromosomen im Zellkern geben. Letztere

Beobachtungen stehen in Einklang mit den Befunden von Bolzer et al. (zur Publikation eingereicht), wonach die Nachbarschaften von sowohl homologen, als auch heterologen Chromosomen in Zellkernen menschlicher G₀ Fibroblasten hoch variabel sind. Die Autoren demonstrierten weiterhin, dass es keine getrennte Anordnung der mütterlichen und väterlichen Chromosomensätze in Metaphaserosetten gibt.

Auch jüngste Experimente basierend auf Lebendzellbeobachtungen von *fluorescent protein tagged* Chromatin führten zu unterschiedlichen Interpretationen: Gerlich et al., (2003), beobachteten eine stabile globale Transmission von Chromosomen Positionen während des Zellzyklus und von der Mutterzelle auf die Tochterzellen. Diese Beobachtungen implizieren, dass die nachbarschaftliche Anordnung der Chromosomen über mehrere Zellgenerationen hinweg erhalten bleibt. Da die Positionen von CT während der Interphase weit gehend stabil zu sein scheinen, vermuten Gerlich et al. (2003), dass ihre Positionen während der Mitose etabliert werden. Im Unterschied zu Gerlich et al. (2003) zeigten die Experimente von Walter et al. (2003), dass sich die Chromatin Anordnungen in Tochterkernen deutlich von denen des Mutterzellkerns unterscheiden. Auch implizieren ihre Befunde, dass Anordnungen von CT von der mittleren G₁ bis zur späten G₂-Phase/ frühen Prophase weit gehend stabil erhalten bleiben, während Änderungen der Chromosomen Anordnung im Verlauf der Mitose und Chromatinbewegungen in der frühen G₁ Phase erfolgen können, so dass sich die Nachbarschaften im Verlauf der Zellgenerationen stark ändern können. Zusätzlich konnten sie mittels 3D FISH demonstrieren, dass verschiedene Paare von Tochterkernen variable Nachbarschaftsanordnungen von CT zeigten.

2.5.4 Einfluss von Heterochromatin auf die Chromatin Anordnung

Die Eigenschaften von Heterochromatin werden aus heutiger Sicht im Kontext der Herabregulierung der Genexpression und Inaktivierung von Genen, der X Chromosom Inaktivierung, sowie der Zentromerfunktion gesehen (siehe Übersichtsartikel von Hennig 1999, Spector 2003). In jüngster Zeit hat auch die Hypothese von Hsu (1975) wieder an Popularität gewonnen (Tanabe et al. 2002a), die Heterochromatin eine Bedeutung im Sinne einer Schutzfunktion gegenüber z.B. Mutagenen und Viren beimisst, obwohl bisher noch keine Evidenz dafür gefunden wurde.

Es werden zwei Typen von Heterochromatin unterschieden - konstitutives und fakultatives Heterochromatin, welche von Brown (1966) erstmals als solche definiert wurden. Konstitutives Heterochromatin ist nahezu frei von Protein codierenden Genen, enthält einen hohen Anteil von repetitiven Sequenzen und ist zumeist in peri- und para-zentromerischen sowie subtelomerischen Chromosomenregionen lokalisiert. Fakultatives Heterochromatin enthält vorwiegend transkriptionell inaktive Gene. Insbesondere bei der Inaktivierung des X-Chromosoms in weiblichen Säugetieren, die für die Dosiskompensation der Genprodukte der beiden X Chromosomen als wichtig erachtet wird, wird der Bildung von fakultativem Heterochromatin eine Bedeutung beigemessen (siehe zur Übersicht Cowell et al. 2001).

Die Repositionierung von Genen in enge Nachbarschaft zu konstitutivem Heterochromatin oder die Verpackung von Genen in fakultative Heterochromatindomänen stellen vermutlich wichtige Mechanismen der epigenetischen Regulation der Inaktivierung von Genen dar (siehe Übersichtsartikel von Grewal und Elgin 2002). Karpen und Allshire (1997) stellten darüber hinaus fest, dass peri-zentromerisches Heterochromatin bedeutend für die Zentromerfunktion ist. Es wird angenommen, dass einer der Hauptmechanismen in der Formierung von Heterochromatin die Modifizierung von Histon H3 durch die Methylierung von Lysin in der Position 9 darstellt (Lachner und Jenuwein 2002). Peters et al. (2001) zeigten, dass der Verlust der Suv39h Histonmethyltransferase, die für die Methylierung von Histon H3, Lysine 9 verantwortlich ist, zu einer Beeinträchtigung der Heterochromatin- und Genomstabilität bei Mäusen führen kann. Diese war korreliert mit einer herabgesetzten Lebensfähigkeit und einem höheren Risiko für B-Zell Lymphome. Auch wird die Methylierung von Lysin an anderen Histon Positionen oder bei anderen Histonen, wie Histon H3-K27 und Histon H4-K20 in Zusammenhang mit einer Geninaktivierung diskutiert. So wurde festgestellt, dass die Histon Methylierung von H4-K20 eine Acetylierung von H4-H16 unterbindet, welche einen Marker für transkriptionell aktives Chromatin darstellt (siehe Übersichtsartikel von Sims et al. 2003).

Inwieweit die Zellkernarchitektur Einfluss auf die Genexpression hat, ist weit gehend unbekannt. Viele Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Positionierung von Genen in Nachbarschaft zu heterochromatischen Regionen zur Geninaktivierung führen kann (siehe Übersichtsartikel von Dundr und Misteli 2001). Brown et al. (1999), zeigten dass die nukleäre Positionierung von Genen in Nachbarschaft zu Heterochromatinblöcken das Transkriptionsmuster dieser Gene stark beeinflussen kann. So zeigten transkriptionell inaktive

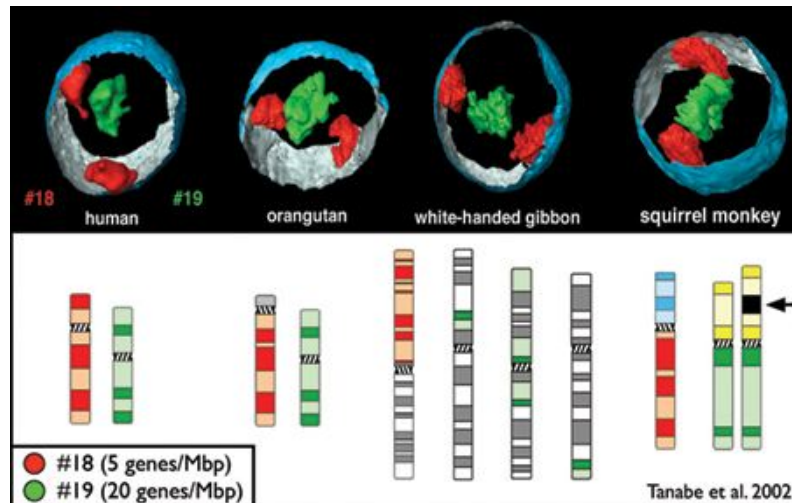
Gene in Zellkernen von zyklierenden primären B Lymphozyten die Tendenz der Lokalisation nahe zu zentromerischem Heterochromatin, nicht jedoch in ruhenden B Lymphozyten. Bei Wiedereintritt nicht zyklirender B Lymphozyten in den Zellzyklus wurde eine Repositionierung dieser Gene hin zu zentromerischem Heterochromatin beobachtet, die dem Muster von zyklierenden B Lymphozyten entsprach. Ebenso fand eine Reposition von Genen hin zu zentromerischem Heterochromatin während einer durch die Differenzierung induzierten transkriptionellen Inaktivierung von Genen in T-Lymphozyten statt.

2.5.5 Vergleichende Zellkernarchitektur

Vergleichende Studien zur Zellkernarchitektur, mit dem Ziel evolutionär konservierte Motive aufzuzeigen, sowie den Einfluss evolutionärer chromosomaler Umbauten auf die nukleäre Topologie zu beleuchten, stellen einen bislang noch kaum untersuchten Aspekt in der Zellkernarchitektur dar.

Erste vergleichende Studien zur radialen Chromatinanordnung im Zellkern in Primaten wurden von Tanabe et al. (2002b) durchgeführt. Am Beispiel der menschlichen Chromosom 18 und 19 Homologen untersuchten Tanabe et al. (2002b) die radiale Chromatinanordnung in Zellkernen lymphoblastoider Zelllinien von verschiedenen Vertretern der Menschen- und Neuweltaffen (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Pongo pymaeus*, *Hylobates lar*, *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus* und *Saguinus oedipus*). Tanabe et al. (2002b) demonstrierten, dass eine Gendichte-korrelierte radiale Organisation der homologen menschlichen 18 und 19 CT evolutionär in verschiedenen Vertretern der höheren Primaten auch im Falle chromosomaler Umbauten, die während der Evolution dieser Spezies stattgefunden haben, konserviert ist. Chromosom 19 homologe Territorien waren tendenziell zur Kernmitte hin orientiert, während Chromosom 18 homologe Territorien eine Tendenz der Positionierung zur Kernperipherie zeigten. Bemerkenswert ist insbesondere die Konservierung dieser distinkten radialen Anordnung von Chromatin in der Spezies *Hylobates lar* (Gibbon), die sich durch extensive chromosomale Umbauten vom Menschen unterscheidet. So sind die homologen Chromosomensegmente des menschlichen Chromosoms 19 auf drei verschiedenen Chromosomen transloziert. Die Abbildung 2.11 veranschaulicht die Konservierung der radialen Anordnung der homologen menschlichen 18 und 19 CT in Zellkernen von vier verschiedenen Vertretern der Primaten.

Abbildung 2.11: Radiale Organisation von genreichem Chromatin, homolog zum menschlichen Chromosom 19 und genarmem Chromatin, homolog zum menschlichen Chromosom 18 in 3D rekonstruierten Zellkernen des Menschen und dreier Primatenspezies verschiedener phylogenetischer Linien (aus Tanabe et al 2002b). Während die homologen Chromosomen 18 und 19 beim Orangutan konserviert sind, unterscheiden sich die Homologen des Gibbons (White-handed gibbon) und des Totenkopffaffen (Squirrel monkey) durch verschiedene chromosomale Umbauten vom Menschen.

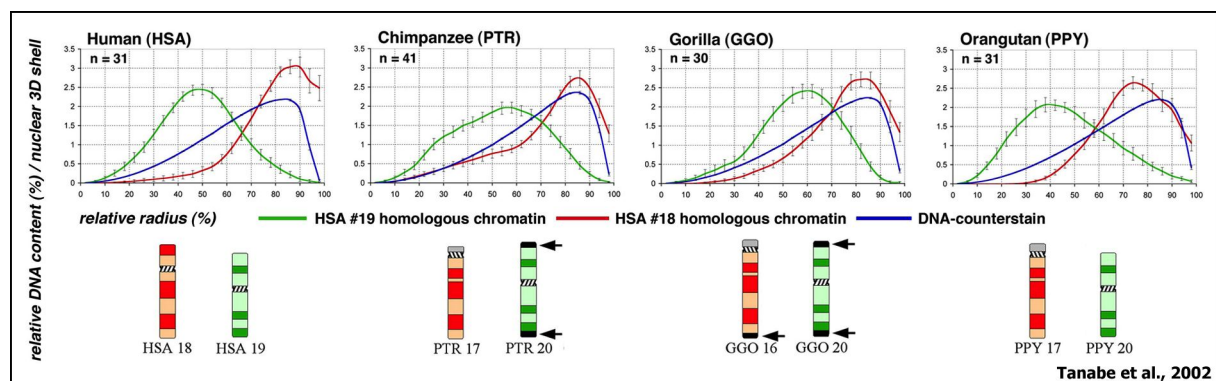


Eine nachfolgende Studie von Tanabe et al. (im Druck), dokumentiert eine Gendichte-abhängige radiale Anordnung der homologen menschlichen 18 und 19 CT auch in Zellkernen lymphoblastoider Zellen der Altweltaffen *Macaca fascicularis*, *Macaca fuscata* und einem Inter-Spezies *Cercopithecus aethiops* x *Erythrocebus patas* Hybriden. Somit konnte Tanabe et al. (2002b) und Tanabe et al. (im Druck) demonstrieren, dass die radiale Anordnung der homologen menschlichen 18 und 19 CT in Abhängigkeit von der Gendichte über einen Zeitraum von etwa 30 Millionen Jahre evolutionär in allen phylogenetischen Hauptlinien der höheren Primaten konserviert ist. Tanabe et al. (2002b) und Tanabe et al. (im Druck) argumentierten, dass diese Konservierung für eine funktionell bedeutende Rolle der höheren Ordnung von distinkten Gendichte-abhängigen radialen Chromatin Anordnungen sprechen würde.

In Zellkernen des Schimpansen und Gorillas beobachteten Tanabe et al. (2002b) jedoch eine deutlich mehr zur Peripherie orientierte Lokalisation der Chromosom 19 Homologen, als bei Mensch und Orangutan. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Vorhandensein von subtelomerischen Heterochromatinblöcken in den Chromosom 19 Homologen bei Schimpanse und Gorilla, welche im Menschen und Orangutan fehlen. Abbildung 2.12 zeigt

einen Vergleich der quantitativen Auswertungen der radialen Verteilung der homologen menschlichen 18 und 19 CT zwischen Mensch, Schimpanse, Gorilla und Orangutan.

Abbildung 2.12: Graphische Darstellung der radialen Verteilung der menschlichen Chromosom 18 und 19 homologen Territorien in Zellkernen von Mensch und Menschenaffen (aus Tanabe et al. 2002b). Zur Veranschaulichung ist jeweils unterhalb der Graphen eine idiogramatische Darstellung der entsprechenden Metaphasechromosomen dieser Spezies illustriert. Die homologen menschlichen 19 CT zeigen bei Schimpanse und Gorilla eine mehr periphere Lokalisation, als beim Menschen und Orangutan. Diese ist möglicherweise auf das Vorhandensein von genarmen Heterochromatinblöcken in den homologen menschlichen 19 CT bei Schimpanse und Gorilla (schwarz gekennzeichnete Chromosomenregionen, siehe Pfeile) zurückzuführen, welche einen positionellen Shift von genreichem Chromosom 19 homologen Material zur Kernperipherie bewirkt haben.



Die von Tanabe et al. (2002b), Tanabe et al. (im Druck) beobachtete Konservierung von Gendichte-korrelierten radialen Arrangements in höheren Primaten lässt sich evolutionär noch weiter zurückverfolgen. So zeigten Habermann et al. (2001) dass eine distinkte Anordnung in Abhängigkeit von der Gendichte auch in Zellkernen des Huhns (*Gallus domesticus*) zu finden ist: Die genreichen Mikrochromosomen waren bevorzugt in der Kernmitte positioniert, während die im Vergleich dazu genärmeren Makrochromosomen in der Kernperipherie lokalisiert waren. Vergleichende Genkarten zwischen Huhn und Mensch lassen eine Korrelation zur radialen Chromatinanordnung in Zellkernen des Menschen insoweit erkennen, dass das menschliche Chromosom 19 Homologie zu Mikrochromosomen des Huhns zeigt, während das menschliche Chromosom 18 homolog zu einem Segment eines Makrochromosoms (*Gallus domesticus* Chromosom 2) ist. Die Konservierung einer distinkten Gendichte-abhängigen radialen Anordnung von Chromatin in Zellkernen des Huhns geben erste Hinweise darauf, dass diese schon vor der Aufspaltung der Linien zu den rezenten Säugetieren und Vögeln, also vor mindestens 300 Millionen Jahren, entstanden ist.

2.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Infraordnung Platyrrhini sind gegenwärtig noch nicht vollständig geklärt. Auch die taxonomische Position einzelner Familien, Gattungen und Spezies ist Gegenstand kontroverser Diskussion. Im Rahmen dieser Arbeit sollten chromosomale Homologien zwischen dem Menschen und verschiedenen Vertretern der Neuweltaffen mit der Methode *multi-directional cross species chromosome painting* nachgewiesen werden. Hierzu sollten chromosomen-spezifische DNA Sonden des Menschen, der Neuweltaffen *Saguinus oedipus*, *Lagothrix lagothricha* und eines Gibbons (*Hylobates concolor*) im Vielfarben Format eingesetzt werden, um eine effiziente Charakterisierung dieser Spezies zu ermöglichen. Durch die vergleichende Karyotypanalyse sollten gemeinsam abgeleitete Charaktere der Neuweltaffen identifiziert und die evolutionäre Richtung chromosomaler Veränderungen in den einzelnen phylogenetischen Linien rekonstruiert werden. Aus der Summe der gewonnen Daten sollte ein Stammbaum der untersuchten Neuweltaffen erstellt werden.

Ergänzend zu der Analyse euchromatischer Homologien zwischen Neuweltaffen sollten Experimente zur Evolution repetitiver Sequenzmotive und zu Polymorphismen heterochromatischer Regionen des Genoms bei Neuweltaffen durchgeführt werden. Hierzu sollte die Technik der vergleichenden Genomhybridisierung (*Comparative Genome Hybridization*, CGH) adaptiert werden, um in sog. Inter-Spezies CGH Experimenten sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über repetitive Genomelemente treffen zu können, die mittels *chromosome painting* nicht nachweisbar sind. Weiterhin sollten mit Hilfe der chromosomalen Glasnadel Mikrodisektion gezielt DNA Sonden für polymorphe heterochromatische Chromosomenregionen etabliert werden. Diese DNA Sonden sollten anschließend in FISH Experimenten eingesetzt werden, um die inter- und intraspezifische Variabilität von repetitiven Motiven zu analysieren.

Schliesslich sollte eine Studie zu evolutionären Aspekten der Zellkernarchitektur durchgeführt werden. Die Neuweltaffen *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus* sowie der Mensch sollten hierbei als Modell dienen, um in FISH Experimenten an 3D fixierten Interphasezellkernen Auswirkungen chromosomaler Umbauten, die im Laufe der Evolution der Primaten aufgetreten sind, auf die höhere Ordnung der Zellkernarchitektur zu beleuchten. Es sollten die Fragestellungen bearbeitet werden, ob die radiale Organisation von Chromosomenterritorien

und subchromosomaler Regionen auch im Falle evolutionärer Umbauten zwischen verschiedenen Spezies konserviert ist und ob konstitutives Heterochromatin einen Einfluss auf die radiale Position von benachbartem Chromatin zeigt.

3 Material und Methoden

3.1 Zellmaterial

Das verwendete Zellmaterial (Fibroblasten) der Neuweltaffen *Callimico goeldii*, *Callithrix jacchus*, *Callithrix argentata*, *Cebuella pygmaea*, *Chiropotes satanas* und *Lagothrix lagothericha* wurde von Prof. Dr. J. Wienberg (Department Biologie II - Humangenetik), Dr. S. O'Brien, und Dr. R. Stanyon (Comparative Molecular Cytogenetics Core, Genetics Branch, National Cancer Institute, Frederick, USA) zur Verfügung gestellt. Die menschliche lymphoblastoide Zelllinie 1431665 wurde von Prof. Dr. J. Wienberg überlassen. Die lymphoblastoide Zelllinie von *Saimiri sciureus* (533B) wurde von C. Roos (Deutsches Primatenzentrum, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurde von der *European Collection of Animal Cell Cultures* die lymphoblastoide Zelllinie B95-8 des Neuweltaffen *Saguinus oedipus* (ECACC Ref No: 85011419), wie auch die Fibroblasten-Zelllinie von *Aotus trivirgatus* (OMK 637-69, ECACC Ref No: 90110510) bezogen.

Chromosomenpräparate der Neuweltaffen *Callicebus donacophilus*, *Ateles belzebuth marginatus*, *Ateles paniscus paniscus*, *Saimiri ustus*, *Saimiri boliviensis*, *Leontopithecus chrysopygus*, *Saguinus imperator*, *Cacajao calvus*, *Aotus infulatus*, *Callithrix penicillata* und *Cebus apella paraguayanus* wurden aus frischem, heparinisiertem Vollblut gewonnen und von Prof. Dr. J. Pieczarka (Laboratório de Citogenética, Depto de Genética, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. In Methanol-Eisessig fixiertes Zellmaterial der Neuweltaffen *Alouatta caraya* (zwei Individuen), *A. belzebuth*, *A. fusca fusca* (zwei Individuen), *A. f. clamitans* (zwei Individuen), *A. seniculus macconnelli* (zwei Individuen aus der Region um *Jari River*, Pará, Brasilien und ein Individuum aus der Region um *Uatumã River*, Pará, Brasilien), *Lagothrix lagothericha*, *Brachyteles arachnoidea* und *Cebus apella paraguayanus* wurde von Dr. E. de Oliveira (Laboratório de Citogenética, Depto de Genética, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil) bezogen. Im Rahmen seines einjährigen Auslandsaufenthaltes an der LMU München, Department Biologie II - Humangenetik wurde dieses für die molekular-zytogenetische Untersuchung bereitgestellt.

Blutproben von zwei *Cebuella pygmaea* Individuen, zwei Individuen eines *C. pygmaea* x *Callithrix jacchus* Inter-Spezies Hybriden (Geschwister), sowie einem Individuum der

Spezies *C. jacchus* (Mutter der Inter-Spezies Hybriden) wurden freundlicherweise von Dr. G. Anzenberger (Anthropologisches Institut und Museum, Universität Zürich-Irchel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Tiefgefrorenes (-20°C) Zellmaterial von einem weiteren Individuum von *C. pygmaea* (Vater der Inter-Spezies Hybrid Individuen) wurde von Dr. G. Anzenberger zur DNA Isolierung überlassen.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Primäre Lymphozytenkulturen

Material

- Nährmedium RPMI 1640 mit 15% FKS, 4mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin
- Phytohemagglutinin (PHA-E), (0,48mg/ml): BIOCHROM: M 5040
- Heparin

Zu je 10ml des Kulturmediums wurde 0,5ml heparinisiertes Vollblut sowie 80µl PHA-E als Mitogen zugegeben. Eine Metaphasenpräparation (siehe 3.3) erfolgte nach 72 stündiger Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 80% relativer Luftfeuchtigkeit.

3.2.2 Kultur von lymphoblastoiden Zelllinien

Material

- Nährmedium RPMI 1640 mit 15% FKS, 4mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin

Lymphoblastoide Zelllinien wurden in Nährmedium RPMI 1640 mit 15% FKS, 4mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und 80% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Frisches Nährmedium wurde in Abhängigkeit von der Proliferationsgeschwindigkeit der Zelllinie zugeführt. Hierfür wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (157g, 10 Min.) und das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert. Erschien die Teilungsaktivität ausreichend, wurde eine Chromosomenpräparation oder eine 3D Fixierung durchgeführt. Nicht weiter verwendete Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren (siehe 3.2.4).

3.2.3 Kultur von Fibroblasten

Material

- Nährmedium DMEM mit 15% FKS, 4 mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin
- 1x PBS
- Trypsin 0,05% (v/v), 0,02% EDTA (v/v) in 1x PBS

Bei den untersuchten Zelllinien handelte es sich um bereits etablierte Fibroblasten- Zelllinien. Sie wurden in Nährmedium DMEM mit 15% FKS, 4mM L-Glutamin, Penicillin/ Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und 80% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Konfluent gewachsenen Zellen wurde das Nährmedium abgenommen, mit 1x PBS gewaschen und mit Trypsin- Lösung versetzt, die ein Ablösen der Zellen bewirkte. Die Zellsuspension wurde je nach Dichte auf zwei oder mehrere Kulturflaschen verteilt und frisches Nährmedium zugegeben.

3.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen

Material

- Nährmedium RPMI 1640 mit 15% FKS, 4mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin
- Nährmedium DMEM mit 15% FKS, 4 mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin
- 1 x PBS
- Trypsin 0,05% (v/v), 0,02% EDTA (v/v) in 1 x PBS
- Einfriermedium: Nährmedium mit 10% DMSO (v/v)

Die Ablösung von Fibroblastenzellen erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben (entfiel bei lymphoblastoiden Zelllinien). Der Zellsuspension wurde Nährmedium zugesetzt, das die Wirkung des Trypsins aufhebt und 10 Min. bei 157g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 4°C kaltem Einfriermedium resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Der langsamen Abkühlung auf -80°C schloss sich die Lagerung in flüssigem Stickstoff an. Zum Reaktivieren wurde die eingefrorene Zellsuspension direkt in 37°C warmen Nährmedium aufgenommen und in Gewebekulturflaschen ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben.

3.3 Metaphasenpräparation für die *in situ* Hybridisierung

Material

- Colcemid-Lösung (10 mg Colcemid/ml H₂O bidest) 1x PBS
- Trypsin 0,05% (v/v), 0,02% EDTA (v/v) in 1 x PBS
- Hypotone Lösung : 0,075 M KCl
- Fixativ: Methanol/Eisessig 3:1 (v/v)
- Ethanol (70%, 90%, 100%)
- Pepsin-Lösung 0,005% in 0,01N HCL

Die Qualität der Chromosomenpräparationen ist, besonders in Bezug auf das Verhältnis von Signalintensität zu unspezifischem Hintergrund, ein wesentlicher Faktor für die Effizienz der *in situ* Hybridisierung. Der Zellkultur wurde über eine Zeitdauer von 30 - 60 Min. Colcemid-Lösung (10µl/ml Kulturmedium) zugegeben. Colcemid ist ein Zellspindelgift und bewirkt, das sich die Zelle nicht über einen Zellzyklus hinaus teilen kann. Mit der Arretierung des Zellzyklusses kann somit eine Anreicherung von Zellen, die sich in der Methaphase befinden, erreicht werden.

Fibroblasten wurden nach 3.2.2 vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Danach erfolgte ein erster Zentrifugationsschritt bei 157g für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in der hypotonen Lösung resuspendiert, die ein Anschwellen der Zellen bewirkte. Die Zellsuspension wurde in ca. 10ml hypotoner Lösung für 13-20 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Fixativ folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 Min., 157g), bevor das Pellet langsam in eiskaltem Fixativ resuspendiert wurde. Die Fixierung erfolgte für 25 Min. bei 4°C. Anschließend wurde das Pellet mindestens dreimal mit Fixativ gewaschen, um letztlich auf gereinigte (in 70% Ethanol eingelegte) Objektträger aufgetropft zu werden. Die Chromosomenspreitung ist abhängig von verschiedenen Parametern wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Am stärksten wird sie von der Luftfeuchtigkeit beeinflusst. Um eine gute Metaphasenspreitung zu erzielen, wurde die Zellsuspension deshalb auf zuvor angehauchte Objektträger aufgetropft, gefächelt und kurz vor dem Trocknen mit einem Tropfen Fixativ nachgewaschen. Anschließend konnten die Chromosomenpräparate von noch verbliebenen Plasmaresten befreit werden, indem sie enzymatisch mit Pepsin behandelt und nachfixiert wurden. Hierbei wurden die Chromosomenpräparate 1- 4 Min. in 0,005% Pepsin in 0,01M HCL bei 37°C inkubiert und anschließend 3x5 Min. in 1x PBS bei RT gewaschen.

Nachfolgend wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% für 5-10 Min., 90%, 100%, je 3 Min.) dehydriert. Nach einer Stunde Inkubation bei 60°C oder alternativ bei 37°C übernacht im Trockenschrank konnten die Objektträger für die *in situ* Hybridisierung verwendet werden.

3.4 Zellpräparation für die 3D *in situ* Hybridisierung

Die Zellpräparation von Fibroblasten, sowie lymphoblastoiden Zelllinien erfolgte nach dem Protokoll von Solovei et al. (2002b), mit geringfügigen Variationen entsprechend den Anforderungen der jeweils verwendeten Zelllinie.

3.4.1 Lymphoblastoide Zellen

3.4.1.1 Puls-Markierung mittels BrdU und Adhäsion der Zellen auf Deckgläser

Material

- 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) 10mM
- Nährmedium RPMI 1640 15% FKS, 4mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin
- 50% FKS/ RPMI 1640 mit 4mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin
- Deckgläser 26x76mm
- Ethanol/Ether 1:1 (v/v)
- Polylysin- Lösung: Polylysine-hydrobromid 10mg/ml 1:8 mit dest. H₂O verdünnt
- H₂O bidest
- Hypotone Lösung: 0,3x PBS

Bei der Pulsmarkierung mit BrdU wird das Nukleotid BrdU als Thymidinanalogon in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Da die Inkorporation von BrdU nur während der Replikation der DNA, in der S-Phase, stattfindet, dient die Inkorporation und der Nachweis von eingebautem BrdU über einen gegen BrdU gerichteten spezifischen Antikörper zum Nachweis von Zellen in der S-Phase. Als Vorbereitung wurden Deckgläser mit Etanol/Ether gereinigt und luftgetrocknet. Anschließend wurden Deckgläser mit je 300µl einer Polylysin-Lösung mittig auf eine Fläche von 2x2cm beschichtet und eine Stunde bei RT inkubiert. Polylysin dient der besseren Adhäsion von in Suspension wachsender Zellen auf den Deckgläsern. Nach kurzem Eintauchen in dest. Wasser wurden die Deckgläser mindestens

zwei Stunden bei RT getrocknet. Für die Pulsmarkierung wurden je 1ml Nährmedium 1µl BrdU (Endkonzentration 10µM) zugegeben und 30 Min. bei 37°C, 5% CO₂ und 80% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellsuspension (ca. 1,5ml pro Deckglas) wurde anschließend 10 Min. bei 157g abzentrifugiert. Das Pellet wurde sodann in 50% FKS/RPMI 1640 + 1µl BrdU/ml Nährmedium aufgenommen. Das Volumen der Zellsuspension wurde hierbei auf ein Drittel eingengt. Zur Adhäsion der Zellen auf Deckgläser wurden etwa 500µl der Zellsuspension auf die zuvor mit Etanol/Ether gereinigten und mit Polylysin- Lösung beschichteten Deckgläser aufgetragen und weitere 30 Min. bei 37°C, 5% CO₂ und 80% relativer Luftfeuchtigkeit in Quadriperms inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit den adhären Zellen für 1Min. in hypotone Lösung (0,3x PBS) getaucht. Unmittelbar darauf schloss sich die Fixierung der Zellen (siehe 3.4.1.3) an. Lymphoblastoide Zellen haben eine kugelförmige Gestalt und sind gefährdet während der Zellfixierung zu kollabieren. Die hohe Serum (FKS) Konzentration in dem Nährmedium während der Adhäsion der Zellen auf Deckgläsern, sowie die kurze hypotone Behandlung in 0,3xPBS soll dem Kollabieren der Zellen entgegenwirken.

3.4.1.2 3D Fixierung, Postfixierung und Lagerung

Material

- 4% PFA: 4% Paraformaldehyd (w/v) in 0,25x PBS 1xPBS
- 0,5% Triton-x-100 (v/v) in 1xPBS
- 20% Glyzerin in 1xPBS (v/v)
- Stickstoff, flüssig
- 1xPBS
- 0,1N HCL in H₂O bidest
- 2xSSC
- 50% Formamide/2xSSC (v/v) pH 7

Alle Fixierungs- und Postfixierungsschritte erfolgten bei RT. Es wurde darauf geachtet, dass die Präparate hierbei nicht austrocknen, um die 3D Morphologie der Zellen zu erhalten. Die Fixierung der Zellen erfolgte in frisch angesetztem 4% PFA, für 10 Min. PFA induziert eine Quervernetzung zwischen Proteinen und zwischen Proteinen und Nukleinsäuren über Hydroxymethylenbrücken (Werner et al. 2000). Dies erzeugt eine stabile Struktur, die eine

Umverteilung zellulärer Komponenten verhindert (Cavalli et al. 1999) und ermöglicht, dass die 3D Morphologie der Zelle erhalten bleibt.

An die Fixierung schlossen sich drei Waschriffe zu je 5 Min. in 1xPBS an. Anschließend folgte eine Inkubation in 0,5% Triton-x-100 in 1xPBS für 15-25 Min., mit der eine Permeabilisierung der Zell- und Kernmembran erreicht wird. Die Präparate wurden nun für mindestens eine Stunde in 20% Glycerol in 1xPBS gelagert und anschließend 4-5 mal in flüssigen Stickstoff getaucht, wobei nach jeder Behandlung mit Stickstoff ein kurzes Eintauchen in 20% Glycerol in 1xPBS folgte, um dem Aufbrechen der Zellen entgegenzuwirken. Diese Behandlung ermöglicht durch Entfernung von Zytoplasma ein besseres Eindringen von DNA Sonden in den Zellkern. Nach drei Waschriffen in 1xPBS zu je 5 Min. wurden die Präparate für 5-10 Min. in 0,01N HCL inkubiert, das durch Entfernung von Proteinen ebenfalls ein besseres Eindringen von DNA Sonden in den Zellkern bewirkt. Nach zweimaligem Waschen in 2xSSC zu je 5 Min. schloss sich die Äquibrierung und Lagerung der Präparate in 50% Formamid/2xSSC bei 4°C an.

3.4.1.3 Enzymatischer Verdau mit Pepsin

Material

- 0,002% Pepsin in 0,01N HCL
- 1xPBS
- 2xSSC
- 1% Paraformaldehyd/ 1xPBS

Zur Entfernung von Zytoplasmaresten kann wie bei Metaphasepräparaten (siehe 2.3) eine enzymatische Behandlung mit Pepsin durchgeführt werden. Hierbei wurden die 3D fixierten Zellen in 0,002% Pepsin in 0,01N HCL für 1-5 min inkubiert und nachfolgend 2x5 Min. in 1xPBS gewaschen. Zur besseren Erhaltung der 3D Morphologie der Zellkerne kann nachfolgend eine Postfixierung in 1% Paraformaldehyd durchgeführt werden. Die Präparate wurden anschließend kurz in 2xSSC äquibriert bevor sie zur Lagerung in 50% Formamid/2xSSC (siehe 3.4.1.3) überführt wurden.

3.4.2 Fibroblasten

Die Kultivierung von Fibroblasten erfolgte wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Fibroblasten, die zu etwa 80% konfluent gewachsen waren, wurden nach Kapitel 3.2.2 vom Boden einer 75cm² Kulturflasche abgegelöst und 20-25 ml Nährmedium zugegeben. Fünf ml der Zellsuspension wurden anschließend auf je ein zuvor mit Etanol/Ether gereinigtes und abgeflammtes Deckglas (26x76mm) pipettiert. Die Deckgläser wurden bis zur Fixierung der Zellen in Quadriperms kultiviert. Bei Erreichen einer adäquaten Zelldichte, die in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie nach etwa 1-4 Tagen erfolgte, wurde eine Puls-Replikationsmarkierung mit BrdU analog zu 3.4.1.1 durchgeführt. Nach einstündiger Inkubation wurden die Zellen 2x3 Min. in 1xPBS gewaschen. Alle weiteren Fixierungs- und Postfixierungs-Schritte erfolgten analog zu lymphoblastoiden Zelllinien (siehe 3.4.1), mit dem Unterschied, dass Fibroblasten vor der Fixierung nicht in 0,3x PBS hypoton behandelt wurden und die Fixierung mit 4% Paraformaldehyd in 1xPBS, anstatt 0,25xPBS erfolgte.

3.5 DNA Sonden

3.5.1 Gesamtgenomische DNA

Gesamtgenomische DNA wurde isoliert, um in Vergleichenden Genom Hybridisierungen (*Comparative Genome Hybridization*, siehe 4.2), sowie zur Suppression von unspezifischem Hintergrund in *chromosome painting* Experimenten eingesetzt zu werden. In Abhängigkeit von Art und Menge an Ausgangsmaterial wurden verschiedene Präparationsverfahren zur DNA Isolierung angewandt

3.5.1.1 DNA Präparation nach Miller et al. (1988)

Material

- 1 x PBS
- Nährmedium RPMI 1640 15% FKS, 4mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin bzw. DMEM mit 15% FKS, 4 mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin
- Proteinase K (15,3mg/ml): Roche Nr. 1413783
- SDS 20% (v/v)
- 1xSE-Puffer

- NaCl-Lösung saturiert (ca. 6M)
- Ethanol 100%
- 1x TE-Puffer
- H₂O bidest
- GeneQuant II Spektrophotometer: Pharmacia Biotech

Die Präparation gesamt-enomischer DNA nach Miller et al. (1988) wurde durchgeführt, wenn ausreichend Zellmaterial vorhanden war - in der Regel wenn etablierte Zelllinien für die DNA Isolation zur Verfügung standen. Dazu wurden die Zelllinien unter Standardbedingungen kultiviert (siehe 3.2). Fibroblasten wurden nach 3.2.3 vom Boden der Kulturflasche abgelöst und 15 ml Nährmedium zugegeben. Die Fibroblasten-Zellsuspension bzw. in Nährmedium kultivierte lymphoblastoide Zellen wurden in ein Falcontube überführt und abzentrifugiert (10 Min./157g). Anschließend wurde die Proteolyse durchgeführt, indem das Zellpellet in 5ml 1x SE-Puffer resuspendiert und anschließend 16,5µl Proteinase K (15,6mg/ml, 50U/ml) sowie 250µl SDS (20%) zugegeben wurde. Der Ansatz wurde für sechs Stunden bei 55°C inkubiert. Nach der Proteolyse wurde der Ansatz auf 10ml mit 1x SE-Puffer verdünnt und 10 Minuten bei 55°C equilibriert. Daraufhin wurden 3ml saturierte NaCl-Lösung (ca. 6M) hinzupipettiert, sofort von Hand gemischt, 15-20 Sekunden gevortext und abzentrifugiert (15 Min./1140g). Der klare Überstand, der die gelöste DNA enthielt, wurde abpipettiert und mit 2 Volumina 100% Ethanol bei RT gefällt. Die präzipitierte DNA wurde mit einem sterilen Glashaken gefischt, in 70%igem Ethanol gewaschen und in 100µl 1x TE-Puffer oder alternativ dest. Wasser gelöst.

Zur Bestimmung der DNA Konzentration wurde ein Aliquot der DNA 1:100 und 1:200 mit Aqua bidest verdünnt und gegen eine Leerkontrolle (dest. Wasser) bei 260nm photometrisch die Extinktion gemessen. Als zusätzliche Referenz diente ein ebenfalls 1:100 und 1:200 verdünntes Aliquot der DNA einer menschlichen Zelllinie mit bekannter Konzentration. Die DNA-Konzentration errechnete sich über die optische Dichte (OD) nach folgender Formel: $DNA_{Konz.}(ng/\mu l) = OD \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$. Die finale DNA Konzentration wurde aus dem Mittelwert der DNA Konzentration der beiden gemessenen Verdünnungen errechnet.

3.5.1.2 DNA Präparation mittels „Makrodissektion“

Material

- sterile Skalpelle
- PCR Reaktionsansatz für eine Primäramplifikation über DOP PCR (siehe 3.6.2)
- Hybaid TouchDown Thermal Cycler
- 1% Agarose in 1xTAE Puffer
- H₂O bidest
- GeneQuant II Spektrophotometer: Pharmacia Biotech

Die Extraktion von gesamt-enomischer DNA mittels „Makrodissektion“ wurde alternativ zur konventionellen DNA Isolierung (siehe 3.5.1.1) gewählt, wenn weder ausreichend Lebendzell- noch ausreichend tiefgefrorenes Zellmaterial zur Verfügung stand. Hierbei wurde Zellmaterial mit einem sterilen Skalpell von Zellpräparaten abgeschabt und in ein steriles Eppendorf- Röhrchen überführt. Im Unterschied zur „Mikrodissektion“ (siehe 3.5.3) wurde das auf dem Präparat vorhandene gesamte Zellmaterial isoliert. An die Isolierung der so gewonnenen DNA schloss sich unmittelbar eine Primäramplifikation über DOP PCR (siehe 3.6.2) an. Der Erfolg der DNA Amplifikation wurde durch Gelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel überprüft. Die DNA Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.5.1.1)

3.5.1.3 DNA Präparation unter Verwendung kommerziell erhältlicher Kits

Material

- E.Z.N.A. Blood DNA Kit I: PEQLAB Biotechnologie 12-3491-01
- E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II: PEQLAB Biotechnologie 12-3496-01
- 1% Agarose in 1xTAE Puffer
- H₂O bidest
- Photometer GeneQuant II: Pharmacia Biotech

Die Extraktion gesamtgenomischer DNA von Individuen der Neuweltaffenart *Cebuella pygmaea*, von denen gefrorenes Zellmaterial zur Verfügung stand (siehe 3.1), erfolgte mittels E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II gemäß den Angaben des Herstellers. Hierbei wurde etwa 30mg des gefrorenen Gewebes mit einem Mörser fein zermalen und die DNA nach der Lyse des

Gewebes mittels einer Protease (enthalten in E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II) auf eine Silikamembran geladen und gebunden. Nach mehrfachen Wasch- und Zentrifugationsschritten wurde die DNA eluiert. Auf diese Weise konnten DNA-Erträge bis zu 30µg erreicht werden. Lagen Blutproben von Neuweltaffen vor, wurde der E.Z.N.A. Blood DNA Kit I verwendet, bei dem nach demselben Prinzip wie bei Verwendung des E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II verfahren wurde. Hierbei konnte aus ca. 250µl Vollblut bis zu 12µg DNA gewonnen werden. Die DNA Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.5.1.1).

3.5.2 Chromosomen-spezifische DNA Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten chromosomen-spezifischen DNA Sonden sind mittels bidirektionaler Durchflußzytometrie (FACS- *Fluorescence activated chromosome sorting*, (Gray et al. 1979) isoliert worden. Hierbei werden die Chromosomen entsprechend ihrer Größe und Basenpaarzusammensetzung aufgetrennt. Die Differenzierung der Chromosomen nach ihrer Basenpaarzusammensetzung wird durch bestimmte DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht, die spezifisch Adenin/Thymidin reiche (z.B. über Hoechst 33258) und Guanin/Cytosin reiche (z.B. über Chromomycin A3) DNA Abschnitte anfärben und damit eine Bänderung erzeugen. Eine Übersicht über das *Fluorescence activated chromosome sorting* bietet Carter (1994).

Chromosomen-spezifische DNA Sonden des Gibbons *Hylobates concolor*, als auch chromosomen-spezifische DNA Sonden der Neuweltaffen- Zelllinie B95-8 (*Saguinus oedipus*) wurden am Department of Pathology, Cambridge University, Großbritannien, von Dr. S. Müller etabliert und sind in Müller et al. (1998, 2001) beschrieben. Die Isolierung des chromosomalen Materials wurde dabei mittels FACS von P. O'Brien durchgeführt. Die so gewonnene chromosomale DNA wurde von Dr. S. Müller zur Primäramplifikation mittels DOP-PCR („Degenerate Oligonucleotide Primed Polymerase Chain Reaktion“, Telenius et al. 1992) gemäß Standardprotokollen (siehe 3.6.2) verwendet. Das chromosomale Material des Neuweltaffen *Lagothrix lagothericha* wurde ebenfalls von P. O'Brien mittels FACS isoliert. Die anschließende Primäramplifikation mittels DOP-PCR wurde am Department of Pathology, Cambridge University, Großbritannien von Dr. S. Consigliere durchgeführt. Die Etablierung chromosomen-spezifischer DNA Sonden des Neuweltaffen *Lagothrix lagothericha* ist in Stanyon et al. (2001) dokumentiert. Sie wurden freundlicherweise Dr. R. Stanyon zur

Verfügung gestellt. Menschliche chromosomenspezifische DNA Sonden wurden von Prof. Dr. M.A. Ferguson-Smith (Cambridge University, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

3.5.3 Generierung subregionaler DNA Sonden mittels Mikrodissektion

Material

- Glasstäbe aus Borosilicatglas: Hilgenberg No. 7347740 (Länge 10cm, Durchmesser 1mm)
- Nadelzieher PC-10, Narishige Group
- Phasenkontrastmikroskop: Axiovert 135, Zeiss
- Mikromanipulator HS 6/3, Märzhäuser, Wetzlar
- PCR Reaktionsansatz nach 3.6.2

Die Mikrodissektion von Chromosomen und Chromosomen-Subregionen ist eine elegante Methode zur Etablierung von DNA Sonden für FISH Experimente. Etablierte Protokolle erlauben die Generierung entsprechender Sonden von weniger als 10 mit einer feinen Glasnadel mikrodissektierter Chromosomen (-regionen). Weimer et al. (2001) entwickelten ein Protokoll, welches die Mikrodissektion nach Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zur Identifikation der chromosomalen Zielregion erlaubt. Da eine dementsprechende Ausrüstung des Mikroskops für die vorliegende Arbeit nicht zur Verwendung stand, wurde das Protokoll entsprechend adaptiert. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen: Zur Identifizierung der zu mikrodissektierenden chromosomalen Zielregion wurde vor der Mikrodissektion eine *in situ* Hybridisierung mit einer entsprechenden Biotin-dUTP markierten DNA Sonde durchgeführt. Zum Nachweis der DNA Sonde wurde eine Kolorimetrische Detektion (siehe 3.8.2.) angewandt. Hierbei entstand durch die katalytische Aktivität einer Streptavidin gekoppelten Alkalischen Phosphatase unter Umsetzung der Substrate NBT/BCIP ein blaues Farbpräzipitat, das die DNA Sonde auf dem hybridisierten Zielchromosom nachwies. Die Mikrodissektion selbst wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Ziel war die Isolierung von insbesondere heterochromatischen Chromosomenregionen zur Etablierung einer spezifischen repetitiven DNA Sonde. Die chromosomale Mikrodissektion wurde unmittelbar nach der Detektion des Hybridisierungssignals an einem inversen Phasenkontrastmikroskop durchgeführt (Axiovert 135, Zeiss). Vorbereitend wurden mittels eines Nadelziehers feine Glasnadeln aus Borosilicatglasstäben gezogen und diese anschließend 45min mit UV-Licht bestrahlt, um DNA Kontaminationen weitestgehend zu vermeiden. Die Führung der Glasnadeln erfolgte über einen Mikromanipulator. Die Nadelspitze mit dem daran

anheftenden mikrodisssektierten chromosomalen Material wurde unter visueller Beobachtung in ein Eppendorf Röhrchen überführt und darin abgebrochen. Etwa ein bis drei Chromosomenfragmente wurden pro Eppendorf Röhrchen gesammelt. Dieses enthielt einen bereits voraliquotierten PCR Reaktionsansatz (siehe 3.6.2), der alle Komponenten mit Ausnahme von Taq-Polymerase und 6MW DOP Primer, enthielt. Nach gründlichem Abzentrifugieren (1889g, 5 Min.) wurde Taq-DNA Polymerase und 6MW DOP Primer hinzupipettiert und eine primäre Amplifikation mittels DOP PCR nach 2.6.2 durchgeführt.

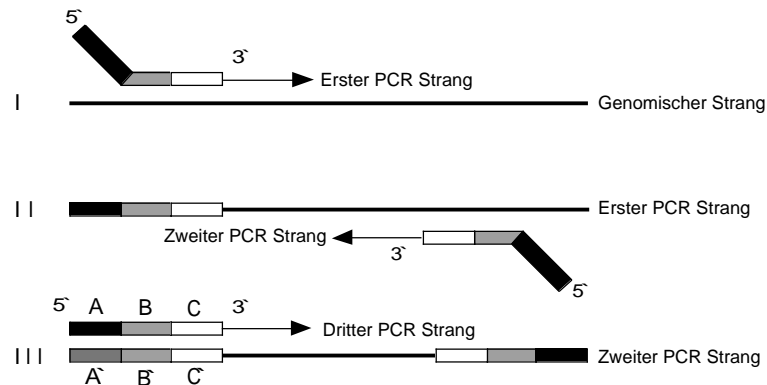
3.6 Amplifikation und nichtradioaktive Markierung von DNA Sonden

3.6.1 Prinzip der DOP-PCR

Mit der Technik der DOP-PCR lassen sich sowohl von normalen und aberranten Zelllinien menschlichen Ursprungs (Telenius et al. 1992, Carter et al. 1992) wie auch von beliebigen nichtmenschlichen Säugerspezies (siehe Übersichtsartikel von Ferguson-Smith 1997) chromosomen-spezifische DNA Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung generieren.

Unter Einsatz eines Primers, der eine partiell degenerierte Nukleotidsequenz enthält und spezifischen PCR Bedingungen, lassen sich zufällig genomische Sequenzen amplifizieren, welche in ihrer Summe theoretisch die gesamte eingesetzte DNA als überlappende Fragmente (200bp-2Kbp) repräsentieren. Die Sequenz des verwendeten Primers 6-MW (5`-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3', N = A, C, G oder T) ist im mittleren Abschnitt (6bp) degeneriert, der 5` flankierende Abschnitt (10bp) enthält eine XhoI Erkennungssequenz, um Klonierung der PCR Produkte möglich zu machen, während der 3` flankierende Abschnitt (6bp) spezifisch gewählt ist, so dass statistisch eine komplementäre Sequenz der Template DNA erkannt wird. Eine schematische Übersicht über den Ablauf der ersten DOP-PCR Zyklen gibt Abbildung 3.1.

Abbildung 3.1: (nach Telenius et al. 1992) Im ersten PCR Zyklus (I) bindet bei niedriger Temperatur (niedrige Stringenz) das spezifisch gewählte 3' Ende des DOP Primers an die Template DNA, stabilisiert durch den partiell degenerierten mittleren Abschnitt. In den folgenden Zyklen (II) werden bei noch immer niedriger Temperatur Fragmente generiert, welche an einem Ende die volle Primer Sequenz, am anderen Ende die dazu komplementäre Sequenz enthalten. In den anschliessenden Zyklen (III) wird die Temperatur erhöht, so dass nur noch Primer Bindung in voller Länge möglich ist.



3.6.2 Anreicherung von DNA über DOP-PCR (Primäramplifikation)

Material

- 6-MW Primer (20µM), siehe 3.6.1, synthetisiert von MWG Biotech
- „Optimized Buffer Kit“: Invitrogen Nr: K-1220-02D:
 - 5x PCR Puffer D;
 - 10x dNTP-Mix dATP, dCTP, dTTP, dGTP (je 2,5 mM)
- H₂O (Glasampullen *Ampuwa*, Fresenius Kabi)
- 20x W1 (0,5g W1 in 100ml H₂O); W1: Sigma P-7516
- Taq-Polymerase (5U/µl): Pharmacia 27-007-99
- Hybaid TouchDown Thermal Cyclers
- 1%ige Agarose in 1xTAE Puffer

Gesamtgenomische DNA (ggDNA), sowie durch die chromosomale Mikrodissektion generierte DNA konnte über diese DOP PCR Reaktion angereichert werden.

Ein 25µl Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

- DNA (ggDNA: bis zu 250ng; Mikrodissektierte DNA: im pg Bereich)
- 5 µl 5x PCR-Puffer D
- 2,5 µl dNTP-Mix

2,5 µl 6 MW-Primer
 1,25 µl 20x W 1
 0,5 µl Taq-Polymerase
 H₂O ad 25µl

Da bei diesem PCR Ansatz mit zum Teil sehr geringer Template DNA gearbeitet wurde (pg Bereich) und so selbst geringe Kontamination durch Fremd-DNA eine effiziente Amplifizierung der chromosomalen DNA beeinträchtigen würde, wurden alle Arbeitsschritte auf einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Es wurden hochgereinigte Chemikalien verwendet (20x W1 Detergenz steril filtriert; 5x PCR Puffer D, dNTP Mix sowie steriles H₂O) und Pipetten, Pipettenspitzen, sowie Reaktionsgefäße wurden UV behandelt. Insbesondere erschien es hilfreich, die erforderliche Anzahl an Arbeitsschritten auf ein Minimum zu reduzieren. Um die eingesetzte DNA unspezifisch und gleichmäßig zu amplifizieren, sowie eine Fragmentlänge von 200-1000 bp zu erzielen, wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten PCR Bedingungen gewählt:

Tabelle 3.1: PCR-Bedingungen, die für die Primäramplifikation von DNA über DOP-PCR gewählt wurden.

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	94°C	9 Min.
8	Denaturierung	94°C	1 Min.
	Primeranlagerung	30°C	1 Min.30 Sek.
	Elongation	72°C	3 Min.
25	Denaturierung	94°C	1 Min.
	Primeranlagerung	62°C	1 Min.
	Elongation	72°C	1 Min.30 Sek
1	Schluss-Elongation	72°C	8 Min.

Unter diesen Bedingungen wurden je nach eingesetzter DNA Menge (siehe oben) bis zu 100ng/µl PCR Produkt erzielt. Die Effizienz der PCR Reaktion wurde überprüft, indem ein Aliquot des PCR Produkts (3-5µl) in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt wurde.

3.6.3 Re-Amplifikation der Primäramplifikate mittels DOP-PCR

Material

- 6-MW primer (20µM), siehe 2.6.1, synthetisiert von MWG Biotech
- dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 2,5 mM); dNTP Set: Roche Nr. 1969064

- H₂O bidest
- 20x W1 Detergenz: Sigma P-7516
- Taq-Polymerase (5U/ μ l): Amersham-Pharmacia Biotech 27-007-99
- 10x TAPS Puffer: Sigma Nr. T-9659
- Hybaid TouchDown Thermal Cycler
- 1%igen Agarose in 1xTAE Puffer

Gesamtgenomische, sowie durch die chromosomale Mikrodisektion generierte DNA und chromosomen-spezifische DNA Sonden der Primäramplifikation (siehe 3.6.2) wurden mittels DOP-PCR unter Verwendung des Primers 6-MW re-amplifiziert. Ein 25 μ l PCR Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

DNA (100-200ng)
 2,5 μ l 10x TAPS Puffer
 2,5 μ l dNTP-Mix
 2,5 μ l 6 MW-Primer
 1,25 μ l 20x W 1
 0,5 μ l Taq polymerase
 ad 25 μ l H₂O bidest

In der Tabelle 3.2 sind die PCR Bedingungen, die für die Re-Amplifikation von Primäramplikaten mittels DOP-PCR gewählt wurden, aufgeführt.

Tabelle 3.2: PCR-Bedingungen, die für die Re-Amplifikation von primären DOP-PCR Produkten gewählt wurden.

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	94°C	3 Min.
30	Denaturierung	94°C	1 Min.
	Primeranlagerung	62°C	1 Min.
	Elongation	72°C	1 Min.30 Sek.
1	Schluss-Elongation	72°C	8 Min.

Die Ausbeute der Reamplifikation über DOP-PCR betrug etwa 100ng DNA/ μ l. Die richtige Fragmentlänge der PCR Produkte ist massgeblich für eine effiziente Hybridisierung. Zur Kontrolle der Fragmentlänge der PCR Produkte wurden 3 μ l PCR Produkt auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

3.6.4 Markierung von DNA Sonden mittels DOP-PCR

Material

- 6-MW primer (20µM), synthetisiert von MWG Biotech
- dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP (je 2mM), dTTP (1,6mM); dNTP Set: Roche 1969064
- X-dUTP:
 - SpectrumGreen dUTP (1mM): Abbott 6J9410
 - Tamra-dUTP (0,4mM): PE Applied Biosystems 401895
 - Biotin-16-dUTP dUTP (0,4mM): Roche 1093070
 - Digoxigenin- 11-dUTP (DIG- 11- dUTP) (0,4mM): Roche 1558706
 - FluoroLink™ Cy3-dUTP (0,4mM) : Amersham-Pharmacia Biotech 53022
 - Dinitrophenol (DNP-11-dUTP) (1mM): NEN Life Science Products NEL 551
- H₂O bidest
- 20x W1 Detergenz Sigma P-7516
- Taq-Polymerase (5U/µl); Amersham-Pharmacia Biotech 27-007-99
- 10x TAPS PCR: Sigma T-9659
- Hybaid TouchDown Thermal cycling system
- 1%ige Agarose in 1xTAE Puffer

Um nach einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung unter dem Mikroskop die eingesetzten DNA Sonden auf den Chromosomen sichtbar zu machen, wurden die DNA Sonden zuvor mit Reportermolekülen markiert. Dabei handelt es sich im allgemeinen um modifizierte Desoxyuraciltriphosphate (dUTPs), die, im Überschuss angeboten, bei der Markierung statt Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die DNA eingebaut werden. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen direkt Fluorochrom gekoppelten dUTPs (z.B. Tamra-dUTP) und Hapten-gekoppelten dUTPs (z.B. Biotin-16-dUTP), die über gegen das Hapten gerichtete Fluorochrom-gekoppelte Antikörper nachgewiesen werden. Zur nichtradioaktiven Markierung von DNA Sonden für die *in situ* Hybridisierung wurden in dieser Arbeit sowohl direkt Fluorochrom-gekoppelte dUTPs (Tamra-dUTP, SpectrumGreen dUTP, Cy3-dUTP, Rhodamine110-dUTP) als auch Hapten-gekoppelte dUTPs (Biotin-dUTP, Digoxigenin-dUTP, DNP-11-dUTP) eingesetzt. Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die Kenngrößen dieser dUTPs.

Tabelle 3.3: Kenngrößen der zur Markierung von DNA Sonden eingesetzten dUTPs.

dUTP	Nachweis	Emission _{max}	Fluoreszenz
Tamra-dUTP	-	575 nm	rot
Cy3-dUTP	-	568 nm	rot
Biotin-dUTP	Avidin-Cy3	568 nm	rot
	Avidin-Cy5	672 nm	infrarot
	Avidin- Alexa 488	519 nm	grün
	Avidin-AMCA	445 nm	blau
Digoxigenin-dUTP	Schaf- α -Dig-FITC	520 nm	grün
	Maus- α -Dig-Cy5	672 nm	infrarot
	Maus- α -Dig-Cy3	568 nm	rot
DNP-11-dUTP	1. Ziege- α DNP,	520 nm	grün
	2. Kanninchen- α -Ziege-FITC		
SpectrumGreen-dUTP	-	524 nm	grün
Rhodamin 110-dUTP	-	525 nm	grün

Welche Reporter-moleküle für die Markierung von DNA Sonden verwendet wurden, richtete sich vor allem nach dem Ziel der *in situ* Hybridisierung (Einzel- oder *multi-color* Hybridisierung). Sie wurden unter Berücksichtigung der Unterschiede zwischen den dUTPs und deren Nachweissystemen in Bezug auf Lichtstabilität, Signalintensität und das Verhältnis von Signalintensität zu unspezifischem Hintergrund ausgewählt.

Die Markierung der DNA Sonden mit Reporter-molekülen erfolgte mittels DOP-PCR unter den gleichen PCR Bedingungen wie bei der Re-Amplifikation (siehe Tabelle 3.2). Hierbei wurden PCR Produkte der Re-Amplifikation (siehe 3.6.3) eingesetzt. Ein 25 μ l PCR Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

DNA (100- 200ng Re-Amplifikationsprodukt)
 2,5 μ l 10x PCR-Puffer
 1,25 μ l dNTP-Mix
 1 μ l X-dUTP
 2,5 μ l 6MW- Primer
 1,25 μ l 20x W 1
 0,5 μ l Taq Polymerase
 ad 25 μ l H₂O bidest

Unter diesen PCR- Bedingungen wurden etwa 100ng DNA/µl PCR Produkt erzielt. Die Effizienz der PCR Reaktion wurde überprüft, indem ein Aliquot des PCR Produkts in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt wurde.

3.6.5 Markierung von DNA Sonden mittels Nicktranslation

Material

- 10x NT-Puffer: Roche
- Mercaptoethanol: Merck 1.12006
- dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP (je 2,5mM), dTTP (1,25mM); dNTP Set: Roche 1969064
- X-dUTP:
 - Biotin-dUTP (0,4mM): Roche 1093070
 - Digoxigenin-dUTP (0,4mM): Roche 1093088
 - Tamra-dUTP (0,4mM): PE Applied Biosystems 401895
- DNA Polymerase I: Roche 104485
- DNase I: Roche 104159 (100mg; 1:250 in aqua bidest)
- H₂O bidest
- EDTA (0,5M; pH 8,0): Merck 1.12029
- 1%ige Agarose in 1xTAE Puffer

Die Nicktranslation wurde insbesondere zur Markierung Gesamt-genomischer DNA angewandt. Bei der Nicktranslation werden die Enzyme DNase I und DNA-Polymerase I erfordert, mit deren Hilfe ebenfalls nichtradioaktive Reportermoleküle in doppelsträngige DNA eingebaut werden können. Dabei führt die DNase I Einzelstrangbrüche („nicks“) in die Doppelstrang-DNA ein. Die Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I entfernt die Nukleotide und katalysiert gleichzeitig den Einbau neuer dNTPs. Indem dUTPs hinzugefügt werden, die, im Überschuss angeboten, bei der Markierung statt Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die DNA eingebaut werden, kann die DNA wie bei der nichtradiaktiven DOP PCR (siehe 3.6.4) mit direkt Fluorochrom gekoppelten dUTPs und Hapten gekoppelten dUTPs markiert werden. Durch das Enzym DNase I und einer Inkubationszeit des Nicktranslationsansatzes von 90 Min bei 15°C, sollte die DNA für die *in situ* Hybridisierung gleichzeitig auf die optimale Fragmentlänge von 200bp–1kb geschnitten werden.

Zur Markierung von 1µg DNA wurde ein 50µl Reaktions-Mix mit folgenden Komponenten angesetzt:

DNA (1µg)
5 µl 10x NT-Puffer
5 µl Mercaptoethanol
5µl dNTP-Mix
1 µl X-dUTP
1 µl DNase I (1:250)
1 µl DNA Polymerase I
ad 50µl H₂O bidest

Die resultierende Fragmentlänge wurde überprüft, indem ein Aliquot in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt wurde. Die Enzymreaktion wurde durch 1/10 Vol. 0,5M EDTA (pH 8,0) gestoppt.

3.7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Material

- Ethanol (70%, 90%, 100%)
- Lachssperma DNA (10mg/ml): Sigma D9156
- Human C₀t-1 DNA (1mg/ml): Gibco BRL 15279-01
- unmarkierte gesamtgenomische DNA verschiedener nichtmenschlicher Primaten
- Natriumacetat 3M
- Hybridisierungspuffer
- Denaturierungslösung: 70% Formamid (v/v) in 1x SSC
- Fixogum
- Waschlösungen: 1x SSC/50% Formamid (v/v), 2x SSC, 0,1x SSC

Mit der Technik der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist es möglich, in Zellkernen (Interphase) oder in einer sich teilenden Zelle (Metaphase) mit nichtradioaktiv markierten DNA Sonden spezifisch ganze Chromosomen (*chromosome painting*, Pinkel et al. 1988, Lichter et al. 1988, Cremer et al. 1988) oder chromosomale Subregionen (Cremer et al. 1986, Landegent et al. 1985, Lengauer et al. 1991) nachzuweisen. Seit der Einführung verschiedener Haptene und Fluorochrome können mehrere DNA Sonden in *multi-color* Fluoreszenz *in situ*

Hybridisierungen (Hopman et al. 1986, Nederlof et al. 1989, Dauwerse et al. 1992) simultan dargestellt werden. Mittels *M-FISH* (*multiplex FISH*) und *Spectral Karyotyping* (*SKY*) gelang Speicher et al. (1996) und Schröck et al. (1996) erstmals eine Differenzierung des menschlichen Karyotyps in 24 verschiedenen Farben. Speicher et al. (1996) verwendeten zur Unterscheidung der Fluorochrome spezielle *narrow band pass* Filter, Schröck et al. (1996) einen Interferometer. Seither wurden verschiedene Methoden vorgestellt wie *combined binary ratio labeling* (COBRA, Tanke et al. 1999), *color changing karyotyping* (CCK, Henegariu et al. 1999) und *ReFISH* (Müller et al. 2002), die alternative Ansätze zu *M-FISH/SKY* darstellen und die Verwendung eines Epifluoreszenz Mikroskops mit einem konventionellen Filtersatz erlauben.

Andere Strategien von Ried et al. (1992), Lengauer et al. (1993), Müller et al. (1997b, 1998), und Chudoba et al. (1999) ermöglichen eine farbliche Differenzierung von Chromosomen durch *multi-color FISH* geeigneter subregionaler DNA Sonden, die farblich unterschiedliche Banden auf Chromosomen (*chromosome bar codes*) erzeugen. Müller et al. (2004) stellten kürzlich einen farblich nicht redundanten *chromosome bar code* vor, der eine Differenzierung des menschlichen Karyotyps in 100 distinkte Chromosomensegmente erlaubte. Auch wurden seit Einführung der FISH kostengünstige und deutlich vereinfachte Markierungsmethoden von DNA Sonden für *multi-color FISH* Experimente entwickelt. Roberts et al. (1999) stellten ein Markierungsverfahren vor, bei dem anstatt von Einzelmarkierungen, DNA Sonden zu *pools* zusammengefasst und diese differenziell markiert werden. Die Kosten für die Markierung von DNA Sonden können weiterhin erheblich reduziert werden, in dem Fluorochrom-gekoppelte d-UTP's nach dem Protokoll von Henegariu et al. (2000) selbst synthetisiert werden.

Im Allgemeinen wird die Hybridisierung unter Suppressionsbedingungen durchgeführt (CISS-, Chromosomen *in situ* Suppressions-Hybridisierung), indem dem Hybridisierungsansatz unmarkierte Kompetitor (C_0t-1) DNA und/oder unmarkierte gesamtgenomische DNA zugegeben wird. Im Genom vorkommende repetitive Sequenzen (z.B Satelliten DNA, SINES, LINES), werden so nach der Denaturierung in einer Vorhybridisierung abgesättigt ("preannealing"). Diese Sequenzen reassoziieren vor der *in situ* Hybridisierung aufgrund ihrer Reassoziationskinetik sehr rasch und werden so supprimiert. Sie stehen dadurch für den Hybridisierungsvorgang auf Chromosomen nicht mehr zur Verfügung. Unter diesen Bedingungen werden unerwünschte Kreuzhybridisierungen der DNA Sonde reduziert,

wodurch eine höhere Spezifität des Hybridisierungssignals, besonders bei Verwendung komplexer DNA Sonden, erzielt werden kann.

Die *in situ* Hybridisierung einer DNA Sonde gliedert sich in mehrere Arbeitsschritte:

- Vorbereitung der DNA Sonde (siehe 3.7.1)
- Denaturierung der DNA Sonde und der Präparate (siehe 3.7.2)
- Hybridisierung *in situ* und Stringenzwaschung (siehe 3.7.3)
- Detektion des Hybridisierungssignals (siehe 3.8)

Ein wichtiges Kriterium ist die Stringenz, unter der *in situ* Hybridisierungen durchgeführt werden. Die Stringenz bestimmt den Prozentsatz korrekt gepaarter Nucleotide im Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz. Sie kann mit der in Tabelle 3.4 angegebenen Formel bestimmt werden.

Tabelle 3.4: Formel zur Berechnung der Stringenz bei *in situ* Hybridisierungen (aus Leitch et al. 1994).

<p>Stringenz (%) = $100 - M_f (t_m - t_a)$</p> <p>M_f = Fehlpaarungsfaktor (1 für Sonden über 150 bp, 5 für Sonden unter 20 bp Länge)</p> <p>t_a = Temperatur (°C) bei der die <i>in situ</i> Hybridisierung bzw. Waschschrte durchgeführt werden</p> <p>t_m = errechnete Schmelztemperatur in (°C) nach der Formel:</p> <p>$0,41 (\% \text{ GC}) + 16,6 \log M - 500/n - 0,61 (\% \text{ Formamid}) + 0,81$</p> <ul style="list-style-type: none"> • % GC = prozentualer Anteil von Guanin und Cytosin • M = Konzentration monovalenter Kationen (Na^+) in der Hybridisierungslösung • n = Sondenlänge in Basenpaaren • % Formamid = Formamidkonzentration in Volumenprozent

Wie der Tabelle 3.4 zu entnehmen, ist die Stringenz abhängig von verschiedenen Parametern, wie der Temperatur, der Ionenstärke und der Konzentration helix-destabilisierender Agenzien (z.B. Formamid) in den Hybridisierungs- und Waschlösungen. Unter hoch stringenten Bedingungen sollten nur nahezu perfekt komplementäre Sequenzen gepaart bleiben. Mit abnehmender Stringenz erhöht sich die Anzahl der tolerierten Basenfehlpaarungen in den DNA Doppelsträngen. Da die Länge und Sequenz der hier eingesetzten DNA Sonden nicht bekannt war, ließ sich die Stringenz nicht exakt berechnen. Die stringenten Bedingungen für Hybridisierungs- Waschschrte wurden deshalb empirisch ermittelt. Eine Übersicht über die Wirkungsweise von Substanzen, die bei FISH eingesetzt werden, gibt Tabelle 3.5.

Tabelle 3.5: Wirkungsweise der wichtigsten Reagenzien, die bei FISH Experimenten eingesetzt werden

Formamid	Sorgt in Denaturierungs- und Waschlösungen dafür, dass die Reaktion bei einer Temperatur stattfinden kann, die die Gewebestruktur nicht schädigt; beeinflusst die Stringenz (siehe oben)
Gelöste Salze z.B in SSC	Bestimmen die Ionenstärke von Hybridisierungs-, Denaturierungslösungen, wirken stabilisierend auf DNA Doppelstränge
Dextansulfat (Komponente der Hybridisierungslösung)	Inertes Polymer, das die Geschwindigkeit der Hybridisierung verdreifacht, Dextansulfat bildet eine Matrix in der Hybridisierungslösung, so daß die Sonde lokal konzentriert wird, ohne die Stringenz zu beeinflussen
C ₀ t-1 bzw. gesamtgenomische DNA	Soll verhindern, dass die Sonde mit unspezifischen Sequenzen hybridisiert
BSA (siehe 3.8.)	Proteinlösung, die unspezifische Bindungsstellen abdeckt, kann somit unspezifische Hybridisierung verhindern
Tween 20 (siehe 3.8.)	Benetzendes Mittel, erleichtert die Zugänglichkeit von Antikörpern
DNA aus Lachssperma	Soll unspezifische Bindung der DNA Sonde vermeiden, indem sie unspezifische Bindungsstellen auf dem Präparat vorher abdeckt

3.7.1 Vorbereitung von DNA Sonden

Die nach 3.6.4 markierten DNA Sonden wurden entsprechend der jeweiligen Zielsetzung des Experiments und der Art der Sonden vorbereitet. Bei Einzelhybridisierungen wurden DOP-PCR Produkte bis maximal 3µl direkt in Hybridisierungspuffer zu einem Endvolumen von 15µl verdünnt. Bei *multi-color* Hybridisierungen, bei denen größere Volumina an markierten DNA Sonden für eine Hybridisierung erforderlich waren, wurde die DNA zusammen mit 0,1 Vol. 3M Natriumacetat und 2,5 Vol. Ethanol gefällt (30 Min., -20°C), abzentrifugiert (15 Min., 1889g), das Pellet getrocknet (5 Min, 37°C) und bei Hybridisierungen auf Metaphasenpräparate in 15µl Hybridisierungspuffer resuspendiert. Bei 3D FISH Experimenten wurde die DNA in 5 bis 8µl Hybridisierungspuffer resuspendiert. Tabelle 3.6 gibt eine Übersicht der jeweils eingesetzten DNA Mengen bei *multi-color* Hybridisierungen.

Tabelle 3.6: DNA Menge, die für eine *multi-color* Hybridisierung auf einer Fläche von 20x20mm bei Metaphasepräparaten bzw. auf eine Fläche von 15x15mm bei 3D Präparaten eingesetzt wurde. Die angegebenen DNA Mengen stellen nur Durchschnittswerte dar, die in Abhängigkeit von der Qualität der Zellpräparate variiert wurde. NWA=Neuweltaffe; HSA=*Homo sapiens sapiens*, SOE=*Saguinus oedipus*, LLA=*Lagothrix lagothricha*, HCO=*Hylobates concolor* (Gibbon), ggDNA=gesamtgenomische DNA von LLA bzw. SOE, je nach Sonden set, NT=Nicktranslatierte DNA.

DNA Sonde	Ziel-DNA	eingesetzte DNA in µg	C ₀ t-1 DNA in µg	gg-DNA in µg	Lachssperma DNA in µg
SOE 6-Farben Sonden Set	NWA/HSA	2,5/3,7	10/10	8/-	50/50
LLA 7-Farben Sonden Set	NWA/HSA	2,5/3,7	10/10	8/-	50/50
SOE/LLA 2-3 Farben Sonden Sets	NWM	1-2	8	8	50

LLA 31-Farben Sonden Set	NWA	12,5	15	10	80
HSA 2-3 Farben Sonden Sets	NWA	1-2	8	-	50
HSA 6- Farben Sondenset	NWA	3,7	10	-	50
HSA 24- Farben Sonden Set	HSA	3,7	10	-	80
HCO 6- Farben Sonden Set	NWA	10	10	-	60
NT von NWA	NWA	1-2	-	-	50
Sonde Sets für 3D FISH (3-6Farben)	NWA/HSA	15-17,5	15	15	80

3.7.2 Denaturierung von DNA Sonden und Präparaten

Die DNA Sonde wurde für 7 Minuten bei 70°C denaturiert und anschliessend im Wasserbad bei 37°C für 30-60 Min. inkubiert, sodass repetitive DNA Sequenzen reassoziieren konnten. Bei Hybridisierungen von repetitiven Sonden entfiel die 30-60 Min. Inkubation zur Reassoziierung. Metaphasenpräparate wurden für 75-90 Sekunden in einer auf 70°C vorgeheizten Küvette mit 70% Formamid/2x SSC inkubiert und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 3 Min. in 70%, 90% (-20°C), 100% EtOH) dehydriert. 3D fixierte Zell-Präparationen wurden 3 Min. denaturiert und unmittelbar anschliessend hybridisiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Präparate während dieses Vorgangs nicht austrocknen, um die 3D Morphologie zu erhalten. Kürzere Denaturierungszeiten greifen die Chromatinsstruktur weniger an, jedoch erwies sich, dass die gewählten Parameter (Temperatur, Formamidkonzentration und Denaturierungszeit) die Stabilität der Chromosomen-, Chromatinmorphologie erhielten, als auch eine gute Hybridisierungseffizienz erzielten.

3.7.3 Hybridisierung *in situ* und stringentes Waschen

Bei Hybridisierungen auf Metaphasepräparate wurden 15µl der denaturierten DNA Sonde auf ein zuvor ausgewähltes Areal des Objektträgers pipettiert, mit einem 20x20mm grossen Deckglas versehen und mit Fixogum versiegelt. Bei 3D FISH Experimenten wurde zuvor 5-8 µl der denaturierten DNA Sonde auf ein 15x15mm großes Deckglas pipettiert. Da hierbei keine Dehydrierung der Präparate nach der Denaturierung erfolgte, liess man das auf den Präparaten vorhandene Formamid nach der Denaturierung kurz abfliessen, bevor ein zuvor ausgewähltes Areal des Präparates mit dem Deckglas mit der vorpipettierten DNA Sonde versehen wurde. Die Ränder des Deckglases wurden anschliessend mit einem *Q-Tip* abgewischt, um eine bessere Haftung des Fixogums zu ermöglichen. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C für 24 bis 72 Stunden (abhängig von der verwendeten DNA Sonde und Spezies). Um eine hohe Stringenz (siehe 3.7) zu erreichen, liegt die Temperatur bei der Waschung nach der Hybridisierung in der Regel etwa 15-20°C unter der Schmelztemperatur

eines perfekt gepaarten Doppelstrangs. Die Stringenzbedingungen wurden hier empirisch ermittelt. Die Präparate wurden nach der Hybridisierung vorsichtig von Fixogum und Deckglas befreit und 2x 5 Min. in 1x SSC/50% Formamid, 2x 5 Min. in 2x SSC (jeweils bei 45°C) und 1x 5 Min. in 0,1x SSC (60°C) gewaschen.

3.8 Detektion hybridisierter DNA Sonden und von BrdU

Material

- Tween 20: Merck: 1.09289.100
- 4xSSCT: 4x SSC/0,2% Tween (v/v)
- 4xSSCT/1% BSA: 4xSSC/0,2% Tween/1% BSA (w/v)
- 1xPBST: 1xPBS/0,05% Tween (v/v)
- 1xPBST/2% BSA: 1xPBS/0,05% Tween/2% BSA (w/v)
- „Blocking-Lösung“: 4xSSCT/3% BSA (w/v); 1xPBST/4% BSA (w/v)
- AP 3 Puffer (0,1 Tris HCL pH 9,5; 0,1 M NaCl, 50mM MgCl₂)
- NBT/BCIP: Gibco BRL 18280-016;
- NBT/BCIP- Färbelösung: 0,44% NBT/0,33% BCIP in AP 3 Puffer (v/v)
- H₂O bidest
- Avidin/Streptavidin-Konjugate (Stammlösungen)
 - Avidin-Cy3: Dianova: 003-160-083
 - Avidin-Cy3.5: Biotrend: S 000-12
 - Avidin-CY5: Dianova: 003-170083
 - Avidin-Alexa 488: Molecular Probes: A-11232
 - Avidin-AMCA: Roche: 2012987
 - Streptavidin-Alkalische Phosphatase: Roche: 1093266
- Antikörper (Stammlösungen)
 - Mouse α -Digoxigenin-Cy5: Dianova: 200-172-156
 - Mouse α -Digoxigenin-Cy3: Dianova: 200-162-156
 - Schaf- α -Digoxigenin-FITC: Roche Nr. 1207741
 - Ziege- α DNP: Sigma: D 9781
 - Kaninchen- α Ziege- FITC: Sigma: F-2016
 - Maus- α -BrdU: Roche: 1170376
 - Ziege- α Maus-AMCA: Molecular Probes: A-11045

3.8.1 Detektion hybridisierter DNA Sonden

Nach der Stringenzwaschung folgte eine kurze Äquilibration der Präparate in 4xSSCT (RT). Anschließend wurden die Präparate für 20 Min. in „Blocking-Lösung“ 4x SSCT/3%BSA bei 37°C inkubiert. Einem weiteren Waschschriff in 4xSSCT bei RT schloss sich die Nachweisreaktion der markierten DNA Sonden an. Wurde ausschließlich mit DNA Sonden gearbeitet, die mit direkt Fluorochrom gekoppelten dUTPs markiert waren, schloss sich stattdessen die chromosomale Gegenfärbung mit DAPI an (siehe 3.8.5). In Abhängigkeit davon, welches Reporter-molekül mit welchem Fluorochrom nachgewiesen werden sollte, wurden verdünnte Arbeitslösungen von Avidin-Konjugaten und Antikörpern hergestellt (siehe Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Verdünnungen der Avidin-, und Antikörperstamm-Lösungen.

Avidin-fluorochrom/ Antikörper	Verdünnung
Avidin-Cy3	1:500 in 4xSSCT/1%BSA
Avidin-Cy3,5	1:200 in 4xSSCT/1%BSA
Avidin-Cy5	1:100 in 4xSSCT/1%BSA
Avidin-Alexa 488	1:200 in 4xSSCT/1%BSA
Avidin-AMCA	1:50 in 4xSSCT/1%BSA
Streptavidin-AP	1:1000 in 4xSSCT/1%BSA
Ziege- α - DNP	1:200 in 4xSSCT/1%BSA
Kaninchen- α Ziege-FITC	1:200 in 4xSSCT/1%BSA
Maus- α - Digoxigenin-Cy3	1:100 in 4xSSCT/1%BSA
Maus- α Digoxigenin-Cy5	1:100 in 4xSSCT/1%BSA
Schaf- α - Digoxigenin-FITC	1:100 in 4xSSCT/1%BSA
Maus- α - BrdU	1:200 in 1xPBST/2%BSA
Ziege- α - Maus-AMCA	1:200 in 1xPBST/2%BSA

Die Antikörperstammlösung wurde 10 Min. bei RT äquilibriert und danach zentrifugiert (3 Min., 1889g), 150-180 μ l einer Verdünnung der Stammlösung (siehe Tabelle 3.7) auf einen Objektträger aufgetragen, mit einem 24x60mm Deckglas versehen und 45 Min. bei 37°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper oder Avidin-Konjugate wurden durch weitere Waschschriffe (3x5Min, 45°C in 4xSSCT) entfernt.

3.8.2 Nachweissysteme bei Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die verwendeten Markierungs- und Nachweissysteme wurden an die entsprechende Zielsetzung des jeweiligen Experiments angepasst, zum Beispiel ob Einzel- oder

Mehrfachhybridisierung durchgeführt werden sollten. Um gleichmäßige Signalintensitäten zu erreichen - insbesondere bei *multi-color* FISH Experimenten - wurde darauf geachtet, dass eine möglichst optimale Kombination von Markierungs- und Nachweissystemen gewählt wurde. Wichtige Kriterien waren hierbei die Signalintensität der Fluorochrome, das Intensitätsverhältnis von spezifischem zu unspezifischem Signal, als auch die Qualität und Komplexität der eingesetzten DNA Sonden..

Der Nachweis Hapten markierter DNA Sonden erfolgte, im Falle von Biotin mit Fluorochrom-gekoppeltem Avidin (z.B. Avidin-Cy5), dass auf einer hochspezifischen kovalenten Bindung von Avidin an Biotin beruht. Digoxigenin wurde durch einen gegen das Molekül gerichteten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper (z.B. Schaf- α -Dig-FITC) nachgewiesen. Das Hapten Dinitrophenol wurde über zwei nacheinander folgende Antikörperreaktionen nachgewiesen: Erstens über den gegen DNP gerichteten Antikörper Ziege- α -DNP und zweitens über den gegen Ziege gerichteten Antikörper Kaninchen- α -Ziege-FITC. Bei DNA Sonden, welche direkt mit Fluorochrom-gekoppelten dUTPs wie Tamra-dUTP oder SpectrumGreen-dUTP markiert waren, entfiel der Nachweis über Fluorochrom-gekoppelte Antikörper bzw. Avidin.

Bei Hybridisierungen auf 3D fixierte Zellen wurden generell Nachweissysteme über Antikörper vermieden, da diese eine schlechtere Zugänglichkeit in den Nukleus bei den hier verwendeten Zelllinien zeigten. Stattdessen wurden die Fluorochrome SpektrumGreen-dUTP, Tamra-dUTP, sowie das Hapten Biotin-dUTP verwendet. Biotin-dUTP wurde über Avidin-Cy5 oder alternativ über Avidin-Alexa 488 nachgewiesen.

3.8.3 Nachweis von inkorporiertem BrdU

Bei Hybridisierungen auf 3D fixierte Zellen, schloss sich nach der Detektion des Hybridisierungssignals (siehe 3.8.2) der Nachweis von inkorporiertem BrdU an. Ein gleichzeitiger Nachweis von BrdU und Hapten-markierten DNA Sonden war nicht möglich, da der verwendete Antikörper gegen BrdU, Maus- α -BrdU, keine Bindung in verdünnten SSC-, sondern nur in PBS-Lösungen zeigte. Nach der letzten Waschung in 4xSSC/0,2%Tween zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper (siehe 3.8.1) wurden die Präparate daher zunächst für 5 Min. in 1xPBST äquilibriert. Anschließend wurden sie in „Blocking-Lösung“ 1xPBST/4%BSA für 15 Min bei 37° C inkubiert. Etwa 180 μ l einer

Verdünnung der Stammlösung des Antikörpers Maus- α -BrdU in 1xPBST/2%BSA (siehe Tabelle 3.6) wurden auf einen Objektträger aufgetragen, mit einem 24x60mm Deckglas versehen und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschschrte in 1xPBST (3x3Min, 37°C) entfernt. Danach folgte eine sekundäre Antikörperinkubation mit dem gegen Maus- anti- BrdU gerichteten Antikörper Ziege- α -Maus-AMCA an. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschschrte in 1xPBST (3x 3Min, 37°C) entfernt.

3.8.4 Kolorimetrische Detektion nach *in situ* Hybridisierung

Die Hybridisierung von Chromosomenpräparaten für die chromosomale Mikrodisektion (siehe 3.5.3) erfolgte mit einer Biotin-dUTP markierten DNA Sonde. Zielregionen auf den Präparaten wurden über die kolorimetrische Detektion nach dem Protokoll von Schwarzacher und Heslop-Harrison (2000) mit geringfügigen Änderungen sichtbar gemacht. Die Biotin-dUTP markierte DNA Sonde wurde über eine Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase (AP) nachgewiesen. AP wiederum katalysierte die Umsetzung der Substrate NBT und BCIP, wodurch ein blaues Farbpräzipitat entstand, das die DNA Sonde auf dem hybridisierten Zielchromosom nachwies. Hierfür wurden die Präparate nach der Antikörperinkubation (mit der in Tabelle 3.6 angegebenen Verdünnung von Streptavidin-AP) und nach der Antikörperwaschung (siehe 3.7.3) für 10 Min. bei RT in AP 3 Puffer äquilibriert und anschließend mit 1ml einer NBT/BCIP-Färbelösung versehen. Nach einer einstündigen Inkubation der Färbelösung bei RT wurden die Präparate unter fließendem Wasser etwa 1 Min. gespült und bei RT getrocknet.

3.8.5 Chromosomale Gegenfärbung

Material

- 4xSSCT: 4xSSC/0,2% Tween 20 (v/v)
- 1xPBST: 1xPBS/0,05% Tween 20 (v/v)
- DAPI: Sigma D-9564
- TOPRO: TO-PRO-3 iodide: Molecular Probes: T-3605,

Der DNA bindende Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der eine spezifische Affinität zu A-T reichen Sequenzen der DNA besitzt, erlaubt eine G-Banden ähnliche Differenzierung der

Chromosomen und ermöglicht so die einfache Lokalisierung von Metaphasen und Interphasekernen im Fluoreszenzmikroskop, sowie die Identifizierung von Chromosomen (Lin et al. 1977). Dazu wurden die hybridisierten Chromosomenpräparate in einer Küvette mit DAPI Arbeitslösung (2µg/ml, in 4x SSCT, 37°C) für 5 Min. inkubiert und kurz mit in 4x SSC/0,2% Tween gewaschen. Die chromosomale Gegenfärbung mit DAPI beschränkte sich in dieser Arbeit jedoch nur auf Metaphasepräparate. Bei 3D FISH mit zwei differentiell markierten DNA Sonden, erfolgte eine Gegenfärbung mit dem Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff TOPRO, der ebenso wie der Farbstoff DAPI eine spezifische Affinität zu A-T reichen Sequenzen der DNA zeigt. Hierzu wurden die 3D Präparate mit 1ml einer TOPRO Arbeitslösung (1µM, in 1xPBST) überschichtet, fünf Min. bei 37°C inkubiert und anschließend kurz in PBST gewaschen bevor die Präparate ohne Auszutrocknen eingedeckt wurden (siehe 3.8.6). Bei 3D Hybridisierung mit mehr als zwei differentiell markierten DNA Sonden entfiel die chromosomale Gegenfärbung, da bei dem zur Verfügung stehenden konfokalen Mikroskop (siehe 3.10.3) keine weitere farbliche Differenzierung möglich war.

3.8.6 Eindecken von Präparaten

Material

- Vectashield Antifade Medium: Vector H-1000

Vectorshield Antifade Medium wirkt dem Ausbleichen der Fluoreszenzsignale entgegen und verlängert so die Haltbarkeit der Präparate. Metaphasenpräparate wurden mit 1-2 Tropfen der Lösung überschichtet und mit einem Deckglas (24x60mm) versehen. Bei 3D FISH Experimenten waren die Zellen auf Deckgläsern fixiert und wurden daher stattdessen mit einem Objektträger überschichtet. Die Präparate waren so bei Lagerung bei 4°C in Dunkelheit bis zu mehreren Monaten haltbar.

3.9 Sequentielle Hybridisierung: *ReFISH*

Im Rahmen dieser Arbeit war ich beteiligt an der Entwicklung eines Protokolls, das eine simultane Darstellung z.B. aller menschlichen Chromosomen mit nur drei kombinatorisch markierten Reportermolekülen, anstatt der bei *M-FISH* (Speicher et al. 1996) oder *SKY* (Schröck et al. 1996) verwendeten fünf Fluorochrome, erlaubt. Die als *ReFISH* (Müller et al. 2002) bezeichnete Technik basiert darauf, dass jede zu hybridisierende *multi-color* Sonde in

Subsets unterteilt wird, die sequentiell auf dasselbe Präparat hybridisiert werden. Das Protokoll wurde so optimiert, dass die DNA Sonden der vorangegangenen Hybridisierung vollständig entfernt wurden. Die erste Hybridisierung wurde hierbei gemäß Standardprotokollen durchgeführt (siehe 3.7 und 3.8). Die Präparate wurden mikroskopisch ausgewertet und die Koordinaten der Metaphasen auf dem Objektträger mittels des Programms *SmartCapture 2* gespeichert (siehe 3.10.2). Danach wurde durch Inkubation in 4x SSCT (RT, 15 Min.) das Deckglas vorsichtig abgelöst und Vectashield Antifade Medium durch eine weitere Inkubation in 4xSSCT, RT, 60 Min. abgewaschen. Die Objektträger wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 100%, je 3 Min) dehydriert und bei RT getrocknet. Danach wurden sie in Fixativ (Methanol/Eisessig, 3:1) für 30 Min inkubiert und übernacht bei 37°C getrocknet. Die zweite Hybridisierung („Re-Hybridisierung“) wurde durchgeführt wie in 3.7 und 3.8 beschrieben, jedoch verlängerte sich die Denaturierungszeit des Präparates bei dieser und jeder weiteren Hybridisierung um 60 Sekunden, um die DNA Sonde der vorangegangenen Hybridisierung vollständig zu entfernen. Die Metaphasen wurden mit Hilfe von *Smart Capture 2* repositioniert und erneut dokumentiert.

3.10 Mikroskopie

3.10.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie diente zur Kontrolle des Wachstumsverhaltens von Fibroblasten und lymphoblastoiden Zelllinien. Auch wurde das vollständige Ablösen von Fibroblasten nach der Behandlung mit Trypsin (siehe 3.2.3) unter dem Phasenkontrast-Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss) überprüft. Bei der 3D Fixierung war es insbesondere wichtig vor der Hybridisierung die Zell-Dichte und -Morphologie zu überprüfen und geeignete Hybridisierungsareale auszuwählen. Da die Präparate hierbei nicht austrocknen durften, wurden sie in 2xSSC in Quadriperms betrachtet. Vor der Hybridisierung von Metaphasepräparaten wurden diese nach Qualität und Vorhandensein von Metaphasen überprüft. Es wurde insbesondere auf Kriterien wie das Vorliegen von Zytoplasma, sowie auf die Chromosomenspreitung geachtet. Ausgewählte Hybridisierungsareale wurden mit einem Diamantschreiber markiert. Die chromosomale Mikrodisektion wurde, wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, an einem inversen Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 135, Zeiss) durchgeführt. Zur Dokumentation von Metaphasen vor und nach der chromosomalen Mikrodisektion (siehe 3.5.3) wurde eine Digitalkamera (Kamera: Nikon N90s, Digitalaufsatz: Kodak DCS

460), die an ein Phasenkontrast-Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss) angeschlossen wurde, verwendet. Die digitalen Bilder wurden über das Programm *Kodak DCS Acquire v5.5.10* auf einen Power Macintosh 9500 geladen und abgespeichert.

3.10.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Auswertung der Chromosomenpräparate erfolgte im Auflichtfluoreszenz Verfahren an einem Zeiss-Axioplan 2 Lichtmikroskop, das mit einer HBO 100 Quecksilberhochdrucklampe ausgestattet war. Zum Auffinden der Metaphasen wurde ein Objektiv mit 40facher Vergrößerung und 1,25facher Optovar Zwischenvergrößerung in Kombination mit einer 10fachen Okularvergrößerung gewählt. Für die anschließende digitale Dokumentation wurden Objektive mit 40, 63 oder 100facher Vergrößerung (Planapochromat) verwendet.

Die detektierten Hybridisierungssignale, sowie die chromosomale Gegenfärbung mit DAPI/TOPRO wurden mit verschiedenen Filtern, die sich aus Anregungsfilter, Strahlenteiler und Emissionsfilter zusammensetzen und auf das jeweilige Emissionsspektrum der Fluoreszenzfarbstoffe (siehe 3.6.4, Tabelle 3.3) ausgerichtet waren, analysiert. Hierzu wurde ein, mit Hilfe der Software *SmartCapture 2* (DigitalScientific, Cambridge, UK) ansteuerbares, externes Filterrad (Zeiss) mit Anregungsfiltern (Chroma Technology) und ein internes Filterrad mit einem Quadrupelbandpassfilter (Chroma Technology, Filterkombination 8004) verwendet. Das interne Filterrad enthielt zudem einen Filterwürfel mit Anregungs- und Emissionsfilter für AMCA (Filtersatz-Nr. 31000). Die Eigenschaften der Filter, aus dem sich der Quadrupelbandpassfilter zusammensetzt und diejenigen der Filter für AMCA, sind in der Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tabelle 3.8: Eigenschaften der für die mikroskopische Auswertung der FISH verwendeten Filter der Firma Chroma Technology

Filter		Anregung (nm)	Farbteiler (nm)	Emissionsfilter (nm)
Quadrupel- bandpass- filter	FITC	450-490	510	515
	TRITC	546	580	590
	CY 5	640	680	690
	DAPI	365	395	397
AMCA		360	400	460

Die Dokumentation erfolgte mittels einer an das Mikroskop gekoppelten CCD Camera (Photometrics C250/A, ausgerüstet mit einem KAF 1400 Chip). Die Grauwert Aufnahmen der einzelnen Filter, das Übereinanderlegen der Grauwert Aufnahmen und die Zuteilung von Falschfarben erfolgte mit der Software *SmartCapture 2*. Diese wurden auf einen Macintosh G4 übertragen, wo die weitere Bildbearbeitung wie Kontrastierung, Einstellung der Bildgröße usw. mittels der Software *Adobe Photoshop* (siehe 3.11.1) durchgeführt wurde. Mit Hilfe von *SmartCapture 2* wurde auch der mit dem Mikroskop gekoppelte motorisierte Tisch (X/Y Richtung) gesteuert. Über diese Steuerungseinheit war nach dem Registrieren der Koordinaten eine Re-Positionierung von Metaphasen bzw. Zellen möglich.

3.10.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Für die dreidimensionale Analyse von Zellkernen wurde die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) verwendet. Die CLSM funktioniert nach dem Prinzip, dass ein Laserstrahl auf einen einzigen Punkt des Präparats fokussiert wird. Das Streulicht von angeregten Fluoreszenzmolekülen in der Nachbarschaft wird reduziert und ermöglicht so einen höheren Kontrast gegenüber der Epifluoreszenzmikroskopie. Durch eine Lochblende, die brennpunktgleich (konfokal) zum fokussierten Lichtstrahl angeordnet ist, wird Licht aus Ebenen über und unter der Fokusebene ausgeschlossen. Somit gelangt nur emittierendes Licht aus der Brennebene in den Photomultiplier. Innerhalb einer Focusebene wird die abzubildende Region abgetastet (gescannt). Die einzelnen Bildpunkte werden vom Photomultiplier aufgenommen und über entsprechende Software dargestellt. Durch Veränderungen der Brennebene in z-Richtung können verschiedene Fokusebenen gescannt werden. Durch Zusammensetzung der so erzeugten optischen Serienschnitte zu einem Bilderstapel (*stacks*) kann ein dreidimensionales Bild eines Zellkerns gewonnen werden kann.

Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten in dieser Arbeit an einem Zeiss LSM 410, das mit einem Argon-Laser (Laserlinie: 488nm) und einem Helium-Neon-Laser (Laserlinien: 543nm und 633nm) ausgestattet war und eine Anregung der Fluorochrome FITC/Alexa 488, Cy3/Tamra und Cy5 ermöglichte. Über spezielle Kurz-, Band- und Langpaßfilter (Reichman 2000) wurde das Licht zu einem Photomultiplier geleitet. Die 50W Quecksilber-Lampe diente zur Durchsicht des Präparates vor der Aufnahme. Bei der Aufnahme von optischen Serienschnitten, wurde ein Plan-Apochromat-Ölimmersionsobjektiv (63x mit 1,4 facher Optovar Zwischenvergrößerung) verwendet und eine Lochblendeneinstellung von 20 gewählt.

Der Zoomfaktor betrug zwischen 8-12, je nach Zellkerngröße. Optische Serienschritte wurden in Abständen von 200nm in z-Richtung durchgeführt. Die Bildgröße betrug 256 x 256 Pixel, die xy- Pixelgröße im Allgemeinen 66 nm. Die Steuerung des Mikroskops, die Darstellung von Grauwertbildern, die Überlagerung von Grauwertbildern, sowie die Falschfarbuzuordnung erfolgte mit Hilfe des Programms *Zeiss LSM* nach erweiterter Programmierung durch Dr. Joachim Walter (Till I.D., Martinsried).

Da bei diesem CLSM in z-Richtung eine chromatische Aberration von etwa 200nm resultierte, war vor der weitergehenden Bildbearbeitung und Dokumentation bei jedem Bildstapel eine „Shift-Korrektur“ (Solovei et al. 2002a) erforderlich. Die chromatische Aberration ergab sich aus den Eigenschaften der unterschiedlichen Wellenlängen der verwendeten Laserlinien: Bei der Aufnahme eines optischen Serienschrittes lag der Fokus von Licht der Wellenlänge 633nm ca. 400nm tiefer als der von Licht der Wellenlänge 488nm und ca. 200nm tiefer als der von Licht der Wellenlänge 543nm. Die Shift-Korrektur bestand darin, dass für das Fluorochrom FITC die letzten beiden Schnitte der aufgenommenen Bilderstapel gelöscht wurden, für CY3, der erste und der letzte Schnitt und für Cy5 die ersten beiden.

3.11 Bildbearbeitung, quantitative Auswertung und Statistik

Für die Bildbearbeitung und quantitative Auswertung der gespeicherten mikroskopischen Aufnahmen, sowie zur Bestimmung der Signifikanz über statistische Tests wurden verschiedene Programme verwendet, die nachfolgend kurz erläutert werden.

3.11.1 *Adobe Photoshop*

Die Software *Adobe Photoshop* (Adobe Systems Inc.) bietet ein breites Spektrum an Bildverarbeitungsmöglichkeiten. *Adobe Photoshop* (Version 7.0.1) wurde in dieser Arbeit zur Auswertung von FISH Experimenten verwendet, da sie eine Darstellung von RGB Bildern in einzelnen Kanälen für Rot Grün und Blau erlaubt. Diese Darstellungsform war insbesondere für die Analyse von *multi-color* FISH Experimenten erforderlich. Ferner diente das Programm zur Bildverarbeitung wie Kontrastierung von Bildern, um spezifische Signale hervorzuheben und das Signal zu Hintergrundverhältnis zu optimieren, zur Einstellung der Bildgröße und Auflösung, zur Übereinanderlagerung von RGB-Bildern durch Zusammenfügung

verschiedener Ebenen und zur Erstellung von Bildgalerien. Die Dokumentation der konfokalen Bilderstapel erfolgte zum einen über die Anordnung der optischen Serienschritte in einer Galerie. Dabei wurden alle Schnitte nach ihrer Reihenfolge in der z-Richtung nebeneinander angeordnet und so in einem Bild dargestellt. Alternativ wurden Galerie-Darstellungen über das Bild-Datenbankprogramm *Curator* (Version 3.1.0) erstellt, das Bilderstapel direkt als Galerie darstellt. Das Galerie-Bild wurde anschließend mit Hilfe des Apple Programms *Bildschirmphoto* (Version 1.1) abgespeichert.

3.11.2 *Quips CGH/Karyotyper*

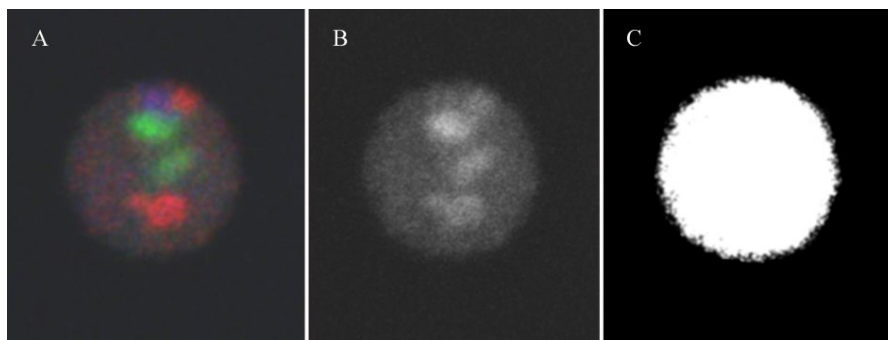
Die quantitative Analyse des Hybridisierungsmusters von CGH (*Comparative Genome Hybridization*, Kallioniemi et al. 1992) Experimenten erfolgte über eine computerdensitometrische Quantifizierung mittels der Software *Quips CGH/Karyotyper* (Vysis, Version 3.0.1). Die Software erlaubt eine Klassifizierung von Metaphasechromosomen entweder nach der Größe oder nach dem Bänderungsmuster. In dieser Arbeit wurde zunächst eine Klassifizierung über die Funktion *Classify unassigned by size* gewählt. Anschließend wurde über manuelle Zuordnung homologer Chromosomen nach der entsprechenden Nomenklatur ein Karyogramm erstellt. Hierbei diente die DAPI-Gegenfärbung (siehe 3.8.5) als Maske, die notwendig für die Klassifizierung und Segmentierung der Chromosomen war. Genomische Imbalancen zwischen verschiedenen Spezies (siehe 4.2) wurden nachgewiesen, indem das Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenzintensität entlang eines Chromosoms nach dem Setzen eines entsprechenden Schwellenwertes (*loss threshold* = 0,80 und *gain threshold* = 1,2, häufig verwendet als diagnostischer Schwellenwert (Bentz et al. 1998)) quantifiziert wurde.

3.11.3 *ImageJ*

Das Programm *ImageJ* (National Institutes of Health, Version 1.31) wurde in dieser Arbeit zur Bearbeitung der am CLSM aufgenommenen Bilder verwendet, da es eine einfache Zusammensetzung der optischen Serienschritte zu einem Bilderstapel, als auch Bearbeitung ganzer Bilderstapel ermöglicht. Mit Hilfe dieses Programms wurden die Helligkeit und der Kontrast der Bilderstapel für die nachfolgende quantitative Auswertung mittels des Programms *3D-RRD* (siehe 3.11.4) eingestellt und unspezifische Hintergrundsignale entfernt. Des Weiteren wurde mit Hilfe von *ImageJ* eine „künstliche Gegenfärbung“ erstellt, da für die

quantitative Auswertung von 3D Zellkernen eine Gegenfärbung als Segmentierungsmaske des Zellkerns erforderlich war. Eine „künstliche Gegenfärbung“ war dann notwendig, wenn bei Hybridisierungen mit drei differentiell markierten DNA Sonden das Potential darstellbarer Fluorochrome an dem verwendeten CSLM erschöpft war. Hierfür wurden die Bilderstapel der einzelnen Farbkanäle (rot, grün und blau) zu einem RGB Bilderstapel zusammengeführt, in einen 8 bit Grauwert Bilderstapel umgewandelt, anschließend der Kontrast auf maximale Fluoreszenzintensität (Grauwert 255) eingestellt und die Helligkeit so weit erhöht bis ein durchgehend weißer Zellkern auf schwarzem Hintergrund erschien. Hierbei wurde die Einstellung so gewählt, dass der daraus resultierende Zellkern die gleiche Abmessung und Morphologie wie der unbearbeitete Zellkern hatte. Schließlich wurde noch eine Glättung der Oberfläche über die Weichzeichnungsfunktion *Gaussian Blur* (Wert 1) vorgenommen. Dadurch wurde die Kernoberfläche homogener und ermöglichte so, in der nachfolgenden quantitativen Auswertung, eine klarere Definition der Kerngrenze. Die Abbildung 3.2 dokumentiert die Erstellung einer „künstlichen Gegenfärbung“.

Abbildung 3.2: Erstellung einer „künstlichen Gegenfärbung“ (C) durch Umwandlung eines RGB Bildes (A) in ein 8-bit Grauwertbild (B) und anschließender Kontrastierung (gezeigt ist ein mittlerer optischer Serienschnitt durch einen Zellkern).



3.11.4 *Volocity*

Das Programm *Volocity* (Improvision, Version 2.0) bietet weitere Möglichkeiten der Darstellung von Bilderstapeln. Mit Hilfe dieses Programms können beispielsweise dreidimensionale Rekonstruktionen von Zellkernen erstellt werden und im Raum durch Drehen der Objekte in alle Richtungen betrachtet werden. Somit gewinnt man einen räumlichen Eindruck über die Verteilung von Chromosomenterritorien im Zellkern.

Für die Erstellung dreidimensionaler Rekonstruktionen eines Zellkerns wurde ein RGB-Bilderstapel importiert, die Funktion *Rendering* gewählt und die optimale Transparenz eingestellt. Der Bilderstapel wurde anschließend als *Quicktime VR Film* exportiert. In diesem Bildformat kann ein Zellkern mittels der Software *QuickTime Player* (Apple Computer Inc., Version 5) aus beliebiger Perspektiver in allen drei Dimensionen betrachtet werden. Mit Hilfe des Programms *GraphicConverter* (Lemke Software, Version 4.3) kann die Zeitserie anschließend über die Funktion *Mehrfachkonvertierung* in Einzelbilder aufgetrennt werden, als *PIC*T Datei abgespeichert und im Programm *Adobe Photoshop* (siehe 3.11.1) geöffnet werden. *Adobe Photoshop* wurde für die weitere Dokumentation, wie z.B. die Erstellung von Bildgalerien, verwendet.

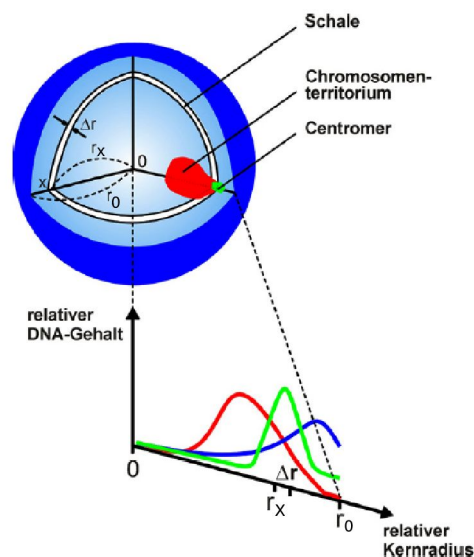
3.11.5 *3D-RRD (3D Relative Radius Distribution)*

Die quantitative Auswertung der radialen Verteilung von CT im Zellkern erfolgte mit Hilfe des von Dr. Johann von Hase (Kirchhoff Institut für Physik, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. C. Cremer) entwickelten Programms *3D-RRD*, ausführlich beschrieben in Cremer et al. (2001). Mit Hilfe dieses Programms wurden zunächst der Kernmittelpunkt und die Kerngrenze über die Gegenfärbung des Zellkerns ermittelt. Für die Segmentierung der Kerngrenze wurde eine gerade Linie von dem Schwerpunkt der Fluoreszenzintensitäten zu jedem gegebenen Bildpunkt (Voxel) gezogen und der Kernmittelpunkt als geometrischer Mittelpunkt der segmentierten Voxel bestimmt. Anschließend erfolgte die Segmentierung der CT für jeden Farbkanal der 3D Bilderstapel. Hierzu wurde der Zellkern in 25 konzentrische Schalen mit identischem relativem Radius unterteilt. Um Zellkerne verschiedener Form und Größe vergleichen zu können, wurde die Entfernung r_0 zwischen dem Kernmittelpunkt und jedem Punkt der segmentierten Kerngrenze normalisiert, indem $r_0 = 100$ gesetzt wurde. Für jeden Voxel innerhalb des Zellkerns wurde die relative Entfernung r von dem Kernmittelpunkt als Anteil von r_0 berechnet. Alle Voxel, die zu einem bestimmten CT gehören, wurden für jede Schale identifiziert und die Fluoreszenzintensitäten des entsprechenden Emissionsspektrums aufsummiert. Mit dieser Vorgehensweise wurde der individuelle DNA Gehalt pro Schale der gefärbten CT, als auch der gesamte DNA Gehalt, der durch die DNA Gegenfärbung reflektiert wird, bestimmt. Zum Vergleich verschiedener Zellkerne, wurde eine Normalisierung angewandt, indem die Summe der Voxelintensitäten, die in jedem Kern gemessen wurden, für jedes Fluorochrom gleich 100% gesetzt wurde. In einem Satz ausgewerteter Zellkernen, entspricht so der

durchschnittliche relative DNA Gehalt in den Kernschalen (als Funktion der relativen Distanz r vom Kernmittelpunkt), der durchschnittlichen radialen Verteilung der DNA der fluoreszenzmarkierten CT. Für jede relative Distanz r wurde die Standardabweichung des gemittelten DNA Schalen-Gehaltes berechnet.

Die über die Berechnung des Programms *3D-RRD* erhaltenen Daten wurden in das Programm MS Excel übertragen und graphisch dargestellt. An der Abszisse wurde der relative Radius in Prozent, an der Ordinate der relative DNA-Gehalt eines CT in der jeweiligen Schale aufgetragen. Abbildung 3.3 illustriert die Auswertung der radialen Verteilung von CT anhand einer schematischen Darstellung.

Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Auswertung der radialen Verteilung von CT in 3D fixierten Zellkernen (aus Cremer et al. 2001). Blaue Strukturen entsprechen der Gegenfärbung, rote Strukturen einem CT und grüne Strukturen zentromerischem Heterochromatin. Im Graphen wird an der Abszisse der relative Radius in Prozent angegeben. An der Ordinate wird der relative DNA-Gehalt des CT in der jeweiligen Schale aufgetragen. Der relative DNA-Gehalt an einem beliebigen Ort innerhalb des Zellkerns entspricht der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität aller Voxel in der jeweiligen Schale. Der Mittelpunkt des Kerns wird mit dem Wert 0 angegeben. Der relative Radius (r_0) erstreckt sich vom Kernmittelpunkt bis zum Rand des Nukleus. Die Dicke einer Schale X beträgt Δr und ihr Abstand zum Mittelpunkt ist r .



Zur näheren Beschreibung einer Kurve der radialen Verteilung von Chromatin wurde bei jedem Experiment der Scheitelpunkt des maximalen DNA Gehaltes in relativer Distanz zur Kernmitte, sowie das Abstandsmittel angegeben. Der Scheitelpunkt und das Abstandsmittel wurden direkt aus dem Datensatz, der mittels des Programms *3D-RRD* (siehe oben) erhalten

wurde, entnommen. Die Schale, die dem höchsten prozentualen DNA Gehalt entsprach, stellte den Scheitelpunkt des maximalen DNA Gehaltes dar. Das Abstandsmittel entsprach dem Mittelwert der Medianwerte der relativen DNA Gehalte der CT aller ausgewerteten Zellkerne. Das Abstandsmittel gab daher den durchschnittlichen Schwerpunkt eines CT im Zellkern an. Die Scheitelpunkte, zusammen mit den Abstandsmitteln vermittelten einen Eindruck über die bevorzugte Position von CT innerhalb des Zellkerns.

3.11.6 Statistische Tests zur Bestimmung der Signifikanz

Zur Bestimmung von Signifikanzunterschieden zwischen den Kurven der radialen Verteilung von Chromatin innerhalb des Zellkerns wurden zwei statistische Tests durchgeführt. Es wurde einerseits der zweiseitige U-Test nach Mann und Whitney (U-Test), als auch der stringendere Homogenitätstest nach Kolmogoroff-Smirnoff (KS-Test) durchgeführt. Beide Signifikanz-Tests gehen von der Annahme zweier unabhängiger Stichproben aus. Mittels des von Johann v. Hase entwickelten Programms *Median-Quartile Test* wurde zunächst die relative Entfernung von Chromatin zur Kernmitte für jeden einzelnen Zellkern ermittelt. Die Daten der relativen Entfernung von Chromatin von zwei miteinander zu vergleichenden CT wurden hierbei aufsteigend in einer Rangfolge gelistet, wobei zu jeder Rangzahl vermerkt wurde, aus welcher der beiden Datensätze der zugehörige Wert stammt. Daten zugehörig zu Chromatin des einen CT wurden mit 0, solche zugehörig zu Chromatin des anderen CT wurden mit 1 gekennzeichnet. Zur Berechnung der Signifikanz wurden die in Sachs (2002) angegebenen Formeln verwendet.

Als unabhängige Stichprobenwerte dienten beim U-Test die Rangsummen. Hierbei wurde die Rangsumme aller Daten, die mit 0 und die Rangsumme aller Daten, die mit 1 gekennzeichnet waren bestimmt. Die Prüfgröße U wurde nach Sachs (2002, S. 383, Formel 3.84) berechnet und anschließend der Wert z nach der Formel 3.87 (Sachs 2002, S. 384) ermittelt. Der Wert z wurde mit Richtwerten (Sachs 2002, S. 119, Tabelle 29) verglichen und der dazugehörige Signifikanzwert P bestimmt. Als signifikant verschieden galten zwei Kurven, wenn eine Signifikanz mit $P \leq 0,05$ resultierte.

Zum Vergleich unabhängiger Stichprobenwerte wurden beim KS-Test die Medianwerte des relativen DNA Gehalts eines CT herangezogen, nicht wie beim U-Test deren Rangfolge. Hierbei wurden die zwei zu vergleichenden Datensätze jeweils in verschiedene Klassen

eingeteilt und die Häufigkeit dieser Werte in einer bestimmten Klasse ermittelt. Den Klassen entsprachen in diesem Fall die 25 konzentrischen Schalen der Aufteilung des Kernraumes, die mittels des Programmes *3D-RRD* zur quantitativen Analyse der radialen Verteilung von Chromatin bestimmt wurden (siehe 3.11.5). Anschließend wurden die normalisierten kumulativen Häufigkeiten (normalisierte Häufigkeit = kumulative Häufigkeit/Anzahl der Zellkerne) für je beide Datensätze berechnet und der höchste Differenzwert der kumulativen Häufigkeiten der beiden Datensätze ermittelt. Der Differenzwert D wurde mit Richtwerten verglichen (siehe Sachs 2002, S. 380, Tabelle 105 und Formel 3.78). Die Stringenz dieses Signifikanztests wird über die Konstante K erreicht. Die Konstante K ist desto höher, je geringer die Irrtumswahrscheinlichkeit signifikanter Unterschiede betragen soll. (α) entspricht hierbei dem Signifikanzwert P (siehe U-Test).

3.12 Rekonstruktion chromosomaler Phylogenien mittels *PAUP*

Die phylogenetische Rekonstruktion aller bisher mit *chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen (siehe Tabelle 4.1) wurde mittels des Programms *PAUP* (Swofford, 1998, Version 4.0) durchgeführt. Hierfür wurden die nachgewiesenen chromosomalen Charaktere (siehe 4.1.4) in eine binäre Matrix übersetzt (siehe beiliegende CD-ROM). Das Vorkommen eines chromosomalen Charakters in einer bestimmten Spezies wurde mit 1, die Abwesenheit mit 0 beziffert. Die resultierenden Daten wurden über die *Maximum Parsimony* Analyse des Programms *PAUP* ausgewertet. Hierbei wurde die Funktion *Exhaustive Search Option* gewählt. Alle chromosomalen Charaktere bekamen hierbei den gleichen Wert, ausgehend von der Annahme, dass alle chromosomalen Umbauten mit der gleichen Wahrscheinlichkeit vorkommen. Der Mensch wurde als *outgroup* angegeben. Die relative Stabilität der Verzweigungspunkte wurde gestützt durch 1000 *bootstrap* Wiederholungen. Jede *bootstrap* Wiederholung bestand in einer heuristischen Parsimonie Suche unter Addition von 10 zufälligen Taxa. Es wurde der *Branch Swapping* (Verzweigungswechsel) Algorithmus *Tree-bisection Reconnection* gewählt, da dieser im Handbuch zur Software *PAUP* (Swofford 1998) für derartige Datensätze empfohlen wird.

3.13 Verbrauchsmaterial

3.13.1 Chemikalien

Chemikalien	Firma
Agarose SeaKem ME	FMC Rockland, Maine, USA
BSA (nur für SSC Lösungen)	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
BSA (nur für PBS Lösungen)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BCIP	Gibco BRL, Karlsruhe
Colcemid (10µg/ml)	Seromed Biochrom, Berlin
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Denhardts	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dextransulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diethyl-Ether	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidium-Bromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid	Merck, Darmstadt
Fixogum	Marabu, Tamm
Glyzerin	Merck, Darmstadt
HCL 1N	Merck, Darmstadt
Heparin	Braun, Melsungen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-Citrat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Nahydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
NBT	Gibco BRL, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Polylysin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SDS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
TAPS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TO-PRO 3	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Tris-HCl (pH 8,0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Vectashield Antifade Medium	Vector, Burlingame CA, USA
W1 Detergenz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.13.2 Nährmedien und Zusätze

Nährmedien/ Zusätze	Firma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Seromed Biochrom, Berlin
FKS	Seromed Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Seromed Biochrom, Berlin
Phytohemagglutinin (PHA-E)	Seromed Biochrom, Berlin
RPMI 1640 Medium	Calbiochem, Darmstadt

3.13.3 Enzyme, Nukleinsäuren und Primer

Enzyme/ Nukleinsäuren/Primer	Firma
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
BrdU	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deoxynucleoside Triphosphat Set (dNTPs)	Roche, Mannheim
FluoroLink™ Cy3-dUTP	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Digoxigenin-16-dUTP	Roche, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
DNA Polymerase I	Roche, Mannheim
DNP-16-dUTP	NEN Life Science Produkts, Boston, USA
human Cot-1 DNA	Gibco-BRL, Karlsruhe
Lachssperma DNA	Gibco-BRL, Karlsruhe
Lamda/Hind III Marker	Roche, Mannheim
Pepsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
6MW-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg
Proteinase K	Roche, Mannheim
Rhodamin 110-dUTP	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
SpectrumGreen dUTP	Abbott, Wiesbaden
Tamra-dUTP	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Taq – Polymerase	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Trypsin/EDTA	Seromed Biochrom, Berlin

3.13.4 Biotinnachweis und Antikörper

α Biotin-dUTP/ Antikörper	Firma
Avidin-Cy3	Dianova, Hamburg
Avidin-Cy3.5	Biotrend, Köln
Avidin-CY5	Dianova, Hamburg
Avidin-Alexa 488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Avidin-AMCA	Roche, Mannheim

Streptavidin-Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Mouse α -Digoxigenin-Cy5	Dianova, Hamburg
Schaf- α -Digoxigenin-FITC	Roche, Mannheim
Ziege- α -DNP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kanninchen- α -Ziege- FITC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Maus- α -BrdU	Roche, Mannheim
Ziege- α -Maus-AMCA	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

3.13.5 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für die Zell-Fixierung, Hybridisierung, stringentes Waschen nach der Hybridisierung und Detektion:

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Ansatz
SSC pH 7	3,0 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, H ₂ O bidest	<u>20x SSC:</u> 350,6g NaCl + 176,4g NaCitrat ad 2l H ₂ O bidest, auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
PBS pH 7,4	140mM NaCl 2,7 mM KCL 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 17,6 mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ H ₂ O bidest	<u>20xPBS:</u> 320g NaCl+ 8g Kcl +57,6g Na ₂ HPO ₄ + 9,6g KH ₂ PO ₄ ad 2l H ₂ O bidest, auf pH 7,4 einstellen, 1x PBS Aliquots autoklavieren
4xSSC/ 0,2% Tween	4x SSC Tween 20	<u>1L Ansatz:</u> 1000ml 4x SSC+ 2ml Tween 20
1xPBS/ 0,05% Tween	1x PBS Tween 20	<u>500ml Ansatz:</u> 500 ml 1xPBS + 250 μ l Tween 20
Polylysine- Lösung	Polylysine-Hydrobromid Stocklösung (10mg/ml) H ₂ O bidest	Stocklösung 1:8 mit H ₂ O bidest ver- dünnen zu 1,25 mg/ml
Paraformaldehyd-Lösung 4%	Paraformaldehyd PBS	<u>100ml Ansatz:</u> Fibroblasten: 4g in 100ml 1xPBS Lymphoblastoide Zellen: 4g in100ml 0,25xPBS, Pulver unter Erhitzen lösen, dann auf RT abkühlen lassen
TritonX-100-Lösung (0,5%)	1x PBS TritonX100	<u>100ml Ansatz:</u> 99,5ml 1xPBS + 0,5ml TritonX100
Glyzerin-Lösung (20%)	Glyzerin 1x PBS	<u>100ml Ansatz:</u> 80ml 1xPBS + 20ml Glyzerin

Hybridisierungspuffer	Formamid 50% Dextransulfat 20x SSC 1M NAPO ₄ Puffer 10% SDS 50x Denhardts H ₂ O bidest	<u>10ml Ansatz:</u> 5ml Formamid + 2ml 50% Dextransulfat + 1ml 20x SSC + 400µl 1M Natriumphosphat-Puffer + 100µl 10% SDS + 200µl 50x Denhardts + 1,3ml H ₂ O
50% Dextransulfat	Dextransulfat H ₂ O bidest	<u>100ml Ansatz:</u> 50g Dextransulfat ad 100ml H ₂ O, bei 60°C lösen
1M Natriumphosphat-Puffer	1M Na ₂ HPO ₄ 1M NaH ₂ PO ₄	577µl 1M Na ₂ HPO ₄ + 423µl 1M NaH ₂ PO ₄
10% SDS Lösung	SDS H ₂ O	<u>100ml Ansatz:</u> 10g SDS ad 100ml H ₂ O
Denaturierungslösung: 70% Formamid in SSC	Formamid 2x SSC	<u>100ml Ansatz:</u> 70ml Formamid + 30ml 2x SSC
Stringenz- Waschlösung 50% Formamid in SSC	Formamid 2x SSC	<u>200ml Ansatz:</u> 100 ml Formamid + 100ml 2x SSC
DAPI-Färbelösung (0,2µg/ml)	DAPI-Stocklösung (500µg/ml)	<u>50ml Ansatz:</u> 50ml 4xSSC/T + 0,2ml DAPI- Stocklösung
TOPRO Färbelösung (5µM)	TO-PRO-3-Stocklösung (1mM in DMSO), 1xPBS/T	TO-PRO 3 Stocksolution 1:1000 in 1xPBS/T verdünnen
AP 3 Puffer	0,1M tris-HCL 0,1M NaCl 50mM MgCl ₂	<u>100ml Ansatz:</u> 10ml 1M Tris-HCL pH 9,5 + 2ml 5M NaCl + 5ml 1M MgCl ₂
NaCl-Lösung (5M)	NaCl H ₂ O	<u>100ml Ansatz:</u> 29,2g NaCl ad 100ml H ₂ O bidest
MgCl ₂ (1M)	MgCl ₂ x 6H ₂ O H ₂ O	<u>100ml Ansatz:</u> 20,33g MgCl ₂ x 6H ₂ O in 80ml H ₂ O bidest lösen, ad 100ml H ₂ O
Tris HCL (1M)	Tris-HCL H ₂ O	<u>100ml Ansatz:</u> 12,11g Tris-HCL ad 100ml H ₂ O bidest, pH 9,5 einstellen
NBT/BCIP Färbelösung	NBT BCIP AP 3-Puffer (siehe oben)	<u>5 ml Ansatz:</u> 22µl NBT + 16,6µl + 5ml AP 3- Puffer
Hypotone Lösung: 0,075M KCL	KCL H ₂ O bidest	<u>100ml Ansatz:</u> 0,56g KCL in H ₂ O bidest

Fixativ	Methanol Eisessig	Methanol + Eisessig 3:1 (v/v)
HCl-Lösung (0,1N bzw 0,01 N)	1N HCl H ₂ O dest	1N HCL mit H ₂ O bidest 1:10 bzw. 1:100 verdünnen
Pepsin-Lösung	10% Pepsin in H ₂ O 0,01M HCL	<u>100ml Ansatz:</u> für <u>Metapaphasenpräparate</u> (0,005% Pepsin): 100ml 0,01M HCL + 50µl Pepsin (10%) für <u>3D Präparate</u> : (0,0025% Pepsin): 100ml 0,01M HCL + 25µl Pepsin (10%)
Natriumacetat (3M), pH 7	NaAc (wasserfrei) H ₂ O bidest	<u>100ml Ansatz:</u> 24,6g NaAc in 70ml H ₂ O bidest lösen, pH 7 mit Eisessig einstellen, ad 100ml H ₂ O

Puffer und Lösungen für die DNA Isolation:

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Ansatz
1x SE Puffer pH 8,2	10 mM Tris-HCL 400 mM NaCl 2mM EDTA	<u>100ml Ansatz:</u> 1ml Tris-HCL (1M) + 6,6 ml NaCl (6M) + 2ml EDTA (0,1M) ad 100ml H ₂ O bidest
EDTA (500mM)	EDTA H ₂ O bidest	<u>100ml Ansatz:</u> 18,61g EDTA+80ml H ₂ O, pH einstellen auf pH 8 (löst sich nicht bis pH 8,0), ad 100ml mit H ₂ O auffüllen
20% SDS Lösung	SDS H ₂ O	<u>100ml Ansatz:</u> 20g SDS ad 100ml H ₂ O
TE –Puffer pH 7,6	10mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA	<u>100ml Ansatz:</u> 1ml 1M Tris-HCL pH 7,6 einstellen + 200µl 500mM EDTA ad 100ml H ₂ O bidest
NaCl-Lösung (6M)	NaCl H ₂ O	<u>100ml Ansatz:</u> 35g NaCl ad 100ml H ₂ O, steril filtrieren

Puffer und Lösungen für DOP-PCR und Nicktranslation:

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Ansatz
10x TAPS PCR Puffer (Nicht für die primäre Amplifikation)	250mM TAPS pH9,3: 500mM KCl 20mM MgCl ₂ Mercaptoethanol (14,4M Stocklösung) H ₂ O	<u>40ml Ansatz:</u> 2,43g TAPS + 1,49g KCl + 800 µl MgCl ₂ (von 1M Stock) + 30ml H ₂ O, auf pH 9,3 einstellen, dann 80µl von 14,4 M Mercaptoethanol dazu und ad 40ml mit H ₂ O auffüllen; steril filtrieren, auf ph 8,5 einstellen
W1 Detergenz	20x W1 H ₂ O bidest	<u>100ml Ansatz:</u> 0,5g W1 + 100ml H ₂ O bidest lösen und steril fitrieren
dNTP Mix für Markierungs-PCR	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 100mM Stocklösung), H ₂ O bidest	<u>500µl dNTP Mix:</u> je 10µl dATP, dCTP, dGTP + 8µl dTTP mischen⇒ ad mit 500µl H ₂ O bidest auffüllen
dNTP Mix für Re-amplikations- PCR	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 100mM Stocklösung), H ₂ O bidest	<u>500µl dNTP Mix:</u> je je 10µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP mischen ad 500µl H ₂ O bidest
dNTP-Mix für Nicktranslation	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 100mM Stocklösung), H ₂ O bidest	2mM Lösung herstellen: 2µl Stocklösung (100mM) + 100µl H ₂ O bidest <u>400µl dNTP Mix:</u> je 100µl 2mM dATP,dGTP, dCTP + 20µl 2mM dTTP + 80µl H ₂ O bidest
NT-Puffer	NT-Puffer 1M Tris-HCl (pH 7,5) 1M MgCl ₂ , BSA	<u>100ml Ansatz:</u> 50ml 1M Tris-HCL+50mg BSA + 45ml H ₂ O bidest
Mercaptoethanol (0,1M)	Mercaptoethanol H ₂ O bidest	0,1ml Mercaptoethanol + 14,4ml H ₂ O bidest

Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Ansatz
TAE-Puffer (pH 8,0)	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA	<u>50x TAE:</u> 242,2g Tris + 18,6g EDTA+ 57,1ml konzentrierte Essigsäure, ad 1L H ₂ O bidest, pH 8 einstellen
1% Agaraose in TAE-Puffer	Agarose 1x TAE-Puffer	<u>100ml Ansatz:</u> 1g Agarose in 100ml 1xTAE-Puffer in Mikrowelle lösen, Gel giessen, abkühlen lassen

Medien und Lösungen für die Zellkultur

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Ansatz
Nährmedium RPMI 1640	RPMI 1640 Medium FKS Penicillin/Streptomycin	500ml RPMI + 75ml FKS + 5ml Penicillin/Streptomycin
Nährmedium Dulbecco`s MEM	Dulbecco`s MEM Medium, FKS Penicillin/Streptomycin	500ml RPMI + 75ml FKS + 5ml Penicillin/Streptomycin
Trypsin-Lösung	Trypsin-EDTA(10x) 0,5%; 0,2% (w/v) in (10xPBS) H ₂ O bidest autoklaviert	Trypsin- EDTA (10x) Lösung 1:10 mit H ₂ O verdünnen, 50ml Aliquots herstellen

3.13.6 Kommerziell erhältliche Kits

Folgende Kits wurden käuflich erworben:

- E.Z.N.A. Blood DNA Kit 1: Peqlab Biotechnologie
- E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II: Peqlab Biotechnologie
- „Optimized Buffer Kit“ (5xPCR Puffer D; 10x dNTP-Mix dATP/ dCTP/ dGTP/ dTTP, je 2,5mM): Invitrogen

4 Ergebnisse

4.1 Vergleichende Karyotypanalyse mittels *multi-directional cross species chromosome painting*

In dieser Arbeit wurden insgesamt 28 Individuen von 20 verschiedenen Neuweltaffenarten mit molekular-zytogenetischen Methoden untersucht. Die Neuweltaffen *Cebus apella paraguayanus*, *Cebus albifrons*, *Ateles paniscus paniscus*, *Ateles belzebul marginatus*, *Lagothrix lagothricha*, *Brachyteles arachnoides*, *Alouatta seniculus macconnelli*, *Alouatta fusca* und *Alouatta caraya* wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Edivaldo de Oliveira untersucht. Die Neuweltaffen *Callithrix penicillata*, *Saguinus imperator*, *Leontopithecus chrysopygus*, *Saimiri boliviensis*, *Saimiri ustus*, *Callicebus donacophilus*, *Aotus infulatus* und *Cacajao calvus* wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Pieczarka analysiert. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen wurden mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden des Menschen, des Gibbons *H. concolor* und der Neuweltaffen *S. oedipus* (Lisztaffe) und *L. lagothricha* (Wollaffe) auf Metaphasepräparate dieser Neuweltaffen durchgeführt.

Um eine effiziente Darstellung chromosomaler Homologien zwischen diesen Neuweltaffen und dem Menschen zu ermöglichen, wurden *multi-color* Sonden Sets aus chromosomen-spezifischen DNA Sonden der oben genannten Spezies etabliert. In Kapitel 4.1.1 ist die Komposition der Sonden Sets beschrieben (menschliche DNA Sonden Sets, siehe 4.1.1.1, *S. oedipus* Sonden Sets, siehe 4.1.1.2, *L. lagothricha* Sonden Sets, siehe 4.1.1.3, *Hylobates concolor* Sonden Sets, siehe 4.1.1.4). Sonden Sets, die für die vergleichende M-FISH Karyotypierung mittels sequentieller Hybridisierung (*Re-FISH*, Müller et al. 2002) etabliert wurden, sind in Kapitel 4.1.1.5 erläutert. Die Charakterisierung der hier untersuchten Neuweltaffen erfolgte mit Hilfe der Methode *multi-directional chromosome painting* (siehe 2.4.2 und Abb. 2.6). Diese ermöglichte eine Überprüfung individueller Experimente.

Die Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf Metaphasen von Spezies der Unterfamilien Callitrichinae, Cebinae, Aotinae, Pithecinae und Atelinae sind im Kapitel 4.1.2 dargestellt. Eine Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse der verwendeten DNA Sonden bietet Kapitel 4.1.3. Die Erkenntnisse über chromosomale Homologien der hier untersuchten Neuweltaffen, wurden mit publizierten Daten aller bisher mit chromosome painting untersuchten Neuweltaffen verglichen. Insgesamt konnten so Daten von 31 verschiedenen

Neuweltaffenspezies und vier Subspezies gewonnen werden. Die Analyse der gewonnenen Daten erlaubte die Erstellung einer binären Matrix, die als Basis für eine phylogenetische Rekonstruktion mit Hilfe des Programms *PAUP* diente (siehe 4.1.4). Die Tabelle 4.1 zeigt eine Zusammenfassung aller Neuweltaffenarten, die bisher mittels chromosome painting untersucht wurden.

Tabelle 4.1: Übersicht über alle bisher mittels chromosome painting untersuchten Neuweltaffen, zusammen mit der in dieser Arbeit verwendeten Chromosomenomenklatur. Die im Rahmen dieser Arbeit mittels *multi-directional chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen sind zur Kennzeichnung Fett geschrieben. Von einigen Neuweltaffen wurden zwei Individuen (= 2 Ind.) untersucht. (**A. seniculus sara* wird, dem Vorschlag von Minezwa et al., 1985 folgend, von der Mehrzahl der Autoren als eigene Spezies, *A. sara* betrachtet, siehe Übersichtsartikel von Groves 1993 und Rylands et al. 2000).

Spezies	Chromosomenomenklatur	FISH
<i>Callithrix jacchus</i>	Sherlock et al. (1996)	Neusser et al. (2001) + diese Arbeit
<i>Callithrix penicilata</i>	Sherlock et al. (1996)	diese Arbeit
<i>Callithrix argentata</i>	Canavez et al. (1996)	Neusser et al. (2001)
<i>Cebuella pygmaea</i>	Canavez et al. (1996)	Neusser et al. (2001)
<i>Callimico goeldii</i>	Seuáñez et al. (1989)	Neusser et al. (2001)
<i>C. jacchus</i> X <i>C. pygmaea</i> (2 Ind.) Inter-Spezies Hybrid	Canavez et al. (1996)	de Oliveira et al. (im Druck)
<i>Saguinus oedipus</i>	Nagamachi et al. (1997)	Müller et al. (2001) + diese Arbeit
<i>Saguinus imperator</i>	Nagamachi et al. (1997)	diese Arbeit
<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	Nagamachi et al. (1997)	diese Arbeit
<i>Saimiri sciureus</i>	Lau und Arrighi (1976)	Stanyon et al. (2000) + diese Arbeit
<i>Saimiri boliviensis</i>	Lau und Arrighi (1976)	diese Arbeit
<i>Saimiri ustus</i>	Lau und Arrighi (1976)	diese Arbeit
<i>Cebus capucinus</i>	Richard et al. (1996)	Richard et al. (1996)
<i>Cebus apella paraguayanus</i>	Ponsa` et al. (1995)	Garcia et al. (2000), diese Arbeit
<i>Cebus albifrons</i>	Ponsa` et al. (1995)	diese Arbeit
<i>Cebus nigrivittatus</i>	Ponsa` et al. (1995)	Garcia et al. (2002)
<i>Callicebus moloch</i>	Stanyon et al. (2000)	Stanyon et al. (2000)
<i>Callicebus donacophilus</i>	Barros et al. (2003)	diese Arbeit
<i>Aotus infulatus</i>	Ma et al. (1976)	diese Arbeit
<i>Aotus trivirgatus</i>	Miller et al. (1977)	diese Arbeit
<i>Cacajao calvus</i>	Moura-Pensin et al. (2001)	diese Arbeit
<i>Chiropotes satanas</i>	Seuáñez et al. (1992)	Neusser (1999)
<i>Brachyteles arachnoides</i>	Viegas Pequignot et al. (1985)	diese Arbeit
<i>Lagothrix lagothricha</i>	Stanyon et al. (2001)	Stanyon et al. (2001) + diese Arbeit
<i>Ateles geoffroyi</i>	Morescalchi et al. (1997)	Morescalchi et al. (1997)
<i>Ateles paniscus paniscus</i>	Morescalchi et al. (1997)	diese Arbeit
<i>Ateles belzebul marginatus</i>	Morescalchi et al. (1997)	diese Arbeit
<i>Ateles belzebul hybridus</i>	Medeiros et al. (1997)	Garcia et al. (2002)

<i>Alouatta seniculus arctoidea</i>	Consigliere et al. (1996)	Consigliere et al. (1996)
<i>Alouatta seniculus sara*</i>	Consigliere et al. (1996)	Consigliere et al. (1996)
<i>Alouatta seniculus macconnelli</i> (<i>Uatumã River</i>)	Lima et al. (1990)	diese Arbeit
<i>Alouatta seniculus macconnelli</i> (<i>Jari River</i>) (2 Ind.)	Lima et al. (1990)	diese Arbeit
<i>Alouatta caraya</i> (2 Ind.)	Mudry et al. (1998)	diese Arbeit
<i>Alouatta belzebul</i>	Armada et al. (1987)	Consiglière et al. (1998)
<i>Alouatta fusca fusca</i> (2 Ind.)	de Oliveira et al. (2002)	diese Arbeit
<i>Alouatta fusca clamitans</i> (2 Ind.)	de Oliveira et al. (2002)	diese Arbeit

4.1.1 Zusammensetzung von *multi-color* Sonden Sets

Bei der Komposition von *multi-color* Sonden Sets wurde eine kombinatorische Markierung angewandt. Hierbei wurde im Allgemeinen nach der Strategie von Roberts et al. (1999) verfahren. Beispielsweise wurden zur Generierung eines sechsfarben Sets je drei Subsets mit je drei Einzel DNA Sonden etabliert. Dabei wurden je nach Qualität bis zu 500ng der einzelnen Sonde eingesetzt. Ein Aliquot der Subsets (100-150ng) wurde anschließend differentiell mit den Reportermolekülen Biotin-dUTP, Digoxigenin-dUTP und Tamra-dUTP (direkt Fluorochrom gekoppeltes dUTPs) mittels DOP-PCR markiert (siehe 3.6.4). Biotin-dUTP wurde im Allgemeinen mit Avidin-Cy5 und Digoxigenin-dUTP mit Schaf- α -Digoxigenin-FITC nachgewiesen (siehe 3.8). Um ausgeglichene Mischfarben, die z.B. bei einer gelben Mischfarbe aus 50% grünem und 50% rotem Anteil bestehen sollte, sowie gleiche Fluoreszenzintensitäten aller Sonden zu erhalten, wurden die Subsets unter Zugabe der entsprechenden einzelnen DNA Sonde „ausbalanciert“. Eine ausreichende Menge dieser Sonden wurde erhalten, indem die so austarierten Sonden Subsets zunächst mittels DOP-PCR re-amplifiziert (siehe 3.6.3) wurden, bevor sie mit Reportermolekülen markiert wurden. Hierbei wurde ca. 100-150ng DNA je Subset für die Re-Amplifizierung, sowie Markierung mittels DOP PCR eingesetzt. Die differentiell markierten Subsets wurden nun zusammengefasst, gemeinsam gefällt (siehe 3.7.1), bevor sie in Hybridisierungspuffer resuspendiert wurden. Die Tabelle 4.2 bietet eine Übersicht über die jeweils verwendeten Sonden Sets bei den untersuchten Neuweltaffenspezies.

Tabelle 4.2 illustriert das Spektrum verwendeter Sonden Sets für die vergleichende Karyotypanalyse der hier untersuchten Neuweltaffen (in Klammern ist jeweils die Individuenanzahl bei mehr als einem untersuchten Individuum =Ind., angegeben) SOE=*Saguinus oedipus*, HSA=*Homo sapiens*, LLA=*Lagothrix lagotrigha*. FISH mit x* gekennzeichneten Sonden wurden vorangehend in meiner Diplomarbeit durchgeführt.

Spezies	SOE 6-farben Sonden Sets	LLA 7 farben Sonden Set	HSA 6-farben Sonden Sets	LLA 31-farben Sonden Set	HSA 24-farben Sonden Set	HCO 6-farben Sonden Sets
<i>C. penicillata</i>	x	-	x	-	-	-
<i>C. jacchus</i>	-	-	-	x	-	x
<i>C. jacchus x C. pygmaea Hybrid</i> (2 Ind.)	x	-	x	x	-	-
<i>S. oedipus</i>	x*	x	x*	-	-	-
<i>S. imperator</i>	x	-	x	-	-	-
<i>L. chrysopygus</i>	x	-	x	-	-	-
<i>C. apella</i>	x	x	x	-	-	-
<i>C. albifrons</i>	x	-	x	-	-	-
<i>S. boliviensis</i>	x	-	x	-	-	-
<i>S. ustus</i>	x	-	x	-	-	-
<i>S. sciureus</i>	x*	-	x*	x	x	-
<i>A. infulatus</i>	x	x	x	-	-	-
<i>A. trivirgatus</i>	x	-	x	x	-	-
<i>C. donacophilus</i>	x	x	x	-	-	-
<i>C. calvus</i>	x	-	x	-	-	-
<i>C. satanas</i>	x*	x	x*	-	-	-
<i>A. p. paniscus</i>	x	-	x	x	-	-
<i>A. b. marginatus</i>	x	x	x	-	-	-
<i>L. lagothricha</i>	x	x	x	-	-	-
<i>B. arachnoides</i>	x	x	x	-	-	-
<i>A. caraya</i> (2 Ind.)	x	x	x	-	-	-
<i>A. s. macconnelli</i> (3 Ind.)	x	x	x	-	-	-
<i>A. f. fucsa/ A. f. clamitans</i> (je 2 Ind.)	x	x	x	-	-	-

4.1.1.1 Menschliche sechsfarben DNA Sonden Sets

Die Charakterisierung von Neuweltaffen mit menschlichen chromosomen-spezifischen DNA Sonden erfolgte mit vier Sonden Sets zu je sechs, kombinatorisch mit drei Fluorochromen markierten DNA Sonden. Für die Komposition der Sonden Sets wurden Erkenntnisse über die bisher mit *chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen herangezogen, um gezielt chromosomale Umbauten und Assoziationen nachzuweisen. Menschliche sechsfarben Sonden Sets wurden bereits in meiner Diplomarbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Müller etabliert und sind in Müller et al. (2001) beschrieben.

4.1.1.2 *Saguinus oedipus* sechs- und siebenfarben Sonden Sets

Die Charakterisierung der Zelllinie B95-8 (*Saguinus oedipus*) mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden ihresgleichen, als auch die Rückhybridisierung (*reverse painting*, Carter et al. 1992) dieser Sonden auf „Wildtypchromosomen“ von *Saguinus oedipus* sind in Müller et al. (2001) beschrieben. Es zeigte sich, dass die Zelllinie die fünf derivativen Chromosomenformen del(8), der(8)del((8)t(8,16), ins(14;8), der (17)t(2;17) und der (1)t(1;2) aufweist, die in unterschiedlicher Frequenz in zwei verschiedenen Zellpopulationen auftreten. Reziprokes *chromosome painting* zwischen Mensch und *Saguinus oedipus* (Müller et al. 2001) deckte folgende zum Menschen homologe Chromosomen und Chromosomenregionen auf: 1a (1p), 1c (q21-31), 1b (q32-qter), 2b (pter-q12)/16b (16q), 2a (q13-qter)/15b (15q11-13, q25-qter), 3b (p24-pter, p12-21, q12-13, q27-qter), 3c (p21-24, q13-26), 3a (p12)/21, 4, 5/7a (7p22, q11, q21), 6, 7b (p11-21, q11-21, q22-qter) 8a (8p)/18, 8b (8q), 10b (10p), 10a (10q)/16a (16p), 11, 12, 13a (13q14-qter)/9/22, 13b (q21-13)/17/20, 14/15a (15q21.3-24), 19, X und Y.

Analog zur Komposition menschlicher Sonden Sets (siehe 4.1.1.1) wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit vier DNA Sonden Sets mit bis zu sieben kombinatorisch markierten chromosomen-spezifischen DNA Sonden der Zelllinie B95-8 (*Saguinus oedipus*) zusammengestellt. Diese Sonden Sets wurden nach Kenntnis über derivative Chromosomenformen dieser Zelllinie neu kombiniert und für die vergleichende Karyotypanalyse der hier zu untersuchenden Neuweltaffenspezies optimiert. Das Markierungsschema der neu zusammengestellten DNA Sonden Sets, zusammen mit den entsprechenden homologen Chromosomenregionen beim Menschen ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3 (siehe nächste Seite): Markierungsschema der *S. oedipus* (Zelllinie B95-8) Sonden Sets 1 bis 4 mit entsprechender Falschfarbenzuordnung der Sonden. Zu den chromosomen-spezifischen DNA Sonden sind jeweils die homologen menschlichen Chromosomenregionen dargestellt. Die Markierung mit den drei Reportermolekülen Biotin-dUTP, Digoxigenin-dUTP und Tamra-dUTP erlaubt eine farbliche Differenzierung von bis zu sieben Chromosomen. * Co-hybridisierung der *S. oedipus* Chromosom der(8)del(8)t(8;16) spezifischen Sonde (rot markiert) mit der *S. oedipus* Chromosom del(8) spezifischen Sonde (grün markiert) ergibt ein mehrfarbiges Hybridisierungssignal auf dem normalen Chromosom 8. Es resultiert ein überlappendes Hybridisierungsmuster mit gelb, rot und grün fluoreszierenden Chromosomenregionen.

Sonden Set 1:

Chromosomen-spezifische DNA Sonde	Homologe menschliche Chromomensegmente	Biotin-dUTP	Dig-dUTP	Tamra-dUTP	Falsch-farbe
1	13a/9/22	x			blau
9	2a/15b		x		grün
17	3b			x	rot
19	3c	x		x	magenta
21	1c		x	x	gelb
5	19	x	x		türkis

Sonden Set 2:

Chromosomen-spezifische DNA Sonde	Homologe menschliche Chromomensegmente	Biotin-dUTP	Dig-dUTP	Tamra-dUTP	Falsch-farbe
11	14/15a	x			blau
3	8a/18		x		grün
10	2b/16b			x	rot
14	11	x		x	magenta
13	7b		x	x	gelb
12	12	x	x		türkis

Sonden Set 3:

Chromosomen-spezifische DNA Sonde	Homologe menschliche Chromomensegmente	Biotin-dUTP	Dig-dUTP	Tamra-dUTP	Falsch-farbe
6	5/7a	x			blau
18	8b		x		grün
7	4			x	rot
4	3a/21	x		x	magenta
X	X		x	x	gelb
Y	Y	x	x		türkis

Sonden Set 4:

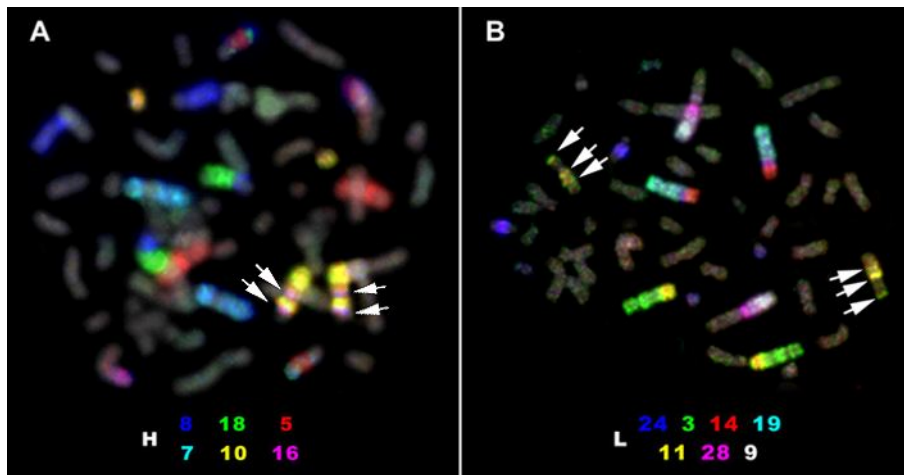
Chromosomen-spezifische DNA Sonde	Homologe menschliche Chromomensegmente	Biotin-dUTP	Dig-dUTP	Tamra-dUTP	Falsch-farbe
15	10a/16a	x			blau
2	13b/17/20		x		grün
der(8)del(8)t(8;16)*	8=HSA 6; 16=HSA 1p del Region=HSA 6p22			x	rot
16	1a	x		x	magenta
del(8)*	HSA 6; del Region=6q14-24		x		grün
22	10b	x	x		türkis
20	1b				weiß

4.1.1.3 Chromosomen-spezifische DNA Sonden des Wollaffen *L. lagothericha*

Der Wollaffe *Lagothrix lagothericha* zeichnet sich durch die höchste Chromosomenzahl ($2n=62$ Chromosomen) aller bisher untersuchten Neuweltaffen aus. Chromosomen-spezifische *painting* Sonden dieser Spezies können deshalb bei Spezies mit einer geringeren Chromosomenanzahl als subregionale *painting* Sonden verwendet werden. Sie bieten folglich zusätzliche Informationen über mögliche intra-chromosomale Umbauten.

Um Kenntnisse über den exakten chromosomalen Ursprung der verwendeten *L. lagothericha* Sonden zu erhalten, wurde *reciprocal chromosome painting* zwischen Mensch und *L. lagothericha* durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit publizierten Daten, die mittels *reciprocal chromosome painting* zwischen Mensch und *L. lagothericha* (Stanyon et al. 2001) gewonnen wurden, verglichen. Die Kartierung menschlicher chromosomen-spezifischer DNA Sonden Sets auf Metaphasen von *L. lagothericha* deckte folgenden Unterschied zu den publizierten Ergebnissen auf: Anstatt der in Stanyon et al. (2001) beschriebenen einfachen Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 10/16 wurde ein komplexeres Muster mit der Abfolge 16/10/16/10 bei dem untersuchten Individuum von *L. lagothericha* nachgewiesen. Die Hybridisierung des *L. lagothericha* siebenfarben Sonden Sets (siehe Tabelle 4.4) auf Metaphasechromosomen des Menschen zeigte weitere Unterschiede im Vergleich zu den publizierten Ergebnissen auf. So kartierte die *L. lagothericha* Chromosom 9 spezifische Sonde auf die menschliche Chromosomenregion 1p21-pter und nicht auf 1p11-p34. Die *L. lagothericha* Sonde 28 kartierte auf die Region 1p12-21 anstatt, wie in Stanyon et al. (2001) dargestellt, auf Chromosom 1p34-1pter. Die *L. lagothericha* Chromosom 11 spezifische DNA Sonde ergab auf dem menschlichen Chromosom 7 drei distinkte Signale. Jedoch kartierte die Sonde nicht, wie in Stanyon et al. (2001) beschrieben, auf die menschliche Chromosomenregion 7q34-qter, sondern auf die Region 7q21. Abbildung 4.1 dokumentiert die Kartierungsergebnisse, die von Stanyon et al. (2001), abweichen, anhand der Hybridisierung eines menschlichen sechsfarben Sonden Sets (siehe Abbildung 4.1 A) auf Metaphasechromosomen von *L. lagothericha* und der Hybridisierung eines *L. lagothericha* siebenfarben Sonden Sets auf Metaphasechromosomen des Menschen (siehe Abbildung 4.1 B).

Abbildung 4.1: A) Nachweis der Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 16/10/16/10 (siehe Pfeile) nach Hybridisierung mit einem menschlichen sechsfarben Sonden Set auf Metaphasechromosomen von *L. lagotrisha*. B) Hybridisierung mit einem *L. lagotrisha* siebenfarben Sonden Set auf Metaphasechromosomen des Menschen. Die *L. lagotrisha* chromosom 9 (weiss) und 28 (magenta) spezifischen Sonden zeigten Unterschiede in der Kartierung im Vergleich zu den publizierten Ergebnissen. Die *L. lagotrisha* chromosom 11 spezifische Sonde (gelb) wies Homologie zu drei chromosomalen Regionen auf dem menschlichen Chromosom 7 nach (siehe Pfeile). Eine Region wurde – im Unterschied zu Stanyon et al., 2001- in der Bande 7q21 nachgewiesen



Zur Überprüfung chromosomen-spezifischer DNA Sonden des Wollaffen *L. lagotrisha* nach Vorhandensein von Verunreinigungen, sowie zum Nachweis chromosomaler Homologien zwischen *S.oedipus* und *L. lagotrisha*, wurden *L. lagotrisha* chromosomen-spezifischen DNA Sonden auf Metaphasen von *S. oedipus* hybridisiert. Hierbei wurden je zwei differentiell markierte *L. lagotrisha* DNA Sonden zu einem Sonden Set zusammengefasst und auf Chromosomen von *S. oedipus* hybridisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass drei Sonden von *L. lagotrisha* chromosomales Material von je zwei verschiedenen Chromosomen enthielten. Diese konnten mittels der Durchflußzytometrie nicht aufgelöst werden. Wie bereits in Stanyon et al. (2001) beschrieben, enthielt die *L. lagotrisha* Chromosom 20 spezifische DNA Sonde auch Chromosom 21 spezifisches Material zu etwa gleichem Anteil. Weiterhin war in der *L. lagotrisha* Chromosom X spezifischen Sonde eine ca. 30% Kontamination von Chromosom 15 spezifischem Material festzustellen. Eine zusätzliche Kontamination konnte nachgewiesen werden, die in Stanyon et al. (2001) nicht beschrieben ist. So zeigte die *L. lagotrisha* Chromosom 24 spezifische Sonde eine ca. 30% Kontamination von Chromosom 23 spezifischem Material.

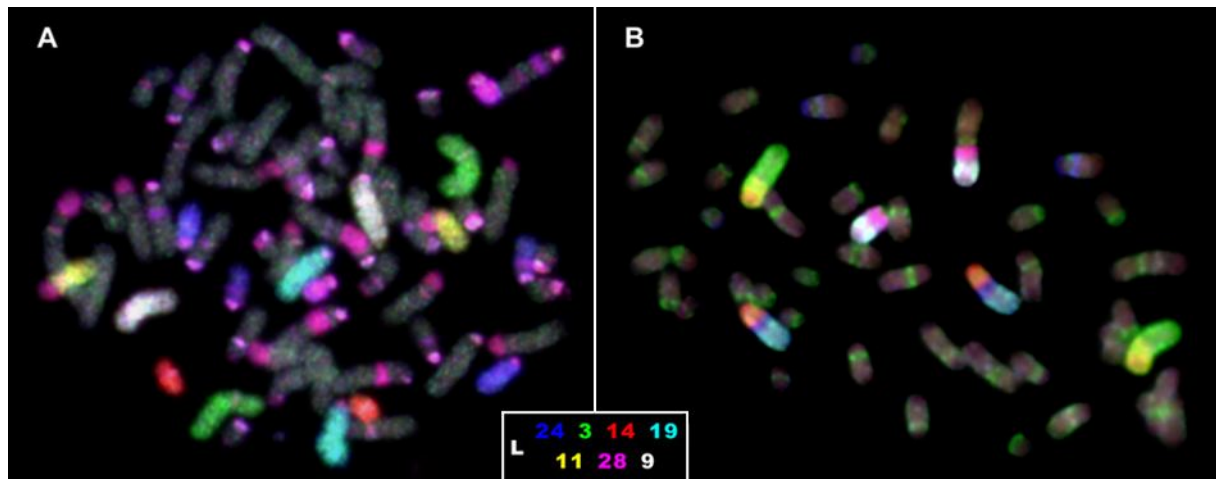
Die Hybridisierung chromosomen-spezifischer DNA Sonden von *L. lagotracha* auf Metaphasen von *S. oedipus* ermöglichte den Nachweis folgender chromosomaler Homologien zwischen diesen Spezies: Die *L. lagotracha* Chromosom 1, 2, 4, 5, 6, 7, 13, 16, 17, 22, 23, 25, 26, 27 und X spezifischen Sonden wiesen vollständig konservierte Chromosomen zwischen *L. lagotracha* und *S. oedipus* nach. Alle übrigen chromosomen-spezifischen DNA Sonden zeigten Homologie zu mehr als einem Chromosom von *S. oedipus* oder färbten eine Chromosomenregion von *S. oedipus* an. Folgende Assoziationen homologer *L. lagotracha* Chromosomen konnten bei *S. oedipus* nachgewiesen werden: 8/18/30, 12/10/8, 11/3, 14/24/19, 24/21, 29/15 und 28/9.

Die Charakterisierung der Spezies *S. oedipus* mit DNA Sonden von *L. lagotracha* erwies, dass die DNA Sonden 3, 9, 11, 14, 19, 24 und 28 im Unterschied zu *S. oedipus* chromosomen-spezifischen DNA Sonden eine höhere subchromosomale Auflösung erzielten. Daher wurde ergänzend zu Sonden Sets der Zelllinie B95-8 (*Saguinus oedipus*) und des Menschen (siehe 4.1.1.1 und 4.1.1.2) ein siebenfarben Sonden Set mit den oben genannten chromosomen-spezifischen Sonden von *L. lagotracha* zusammengestellt. Die Tabelle 4.4 zeigt das Markierungsschema des siebenfarben Sonden Sets, sowie die zum Menschen homologen Chromosomenregionen. Die Abbildung 4.2 illustriert die Hybridisierung mit diesem Sonden Set auf Metaphasechromosomen von *L. lagotracha* (A) und *S. oedipus* (B).

Tabelle 4.4: Markierungsschema des *L. lagotracha* siebenfarben Sonden Sets zusammen mit der Falschfarbuzuordnung und den zum Menschen homologen Chromosomensegmenten. In Klammern ist jeweils die verwendete Nomenklatur dieser Segmente angegeben. * Die *S. oedipus* DNA Sonde 6 wurde in das Sonden Set integriert, da die Qualität der *S. oedipus* besser ist, als die entsprechende *L. lagotracha* Chromosomen 3 spezifische DNA Sonde. ** Co-Hybridisierung der *L. lagotracha* Chromosom 11 mit der *S. oedipus* Chromosom 6 DNA Sonde, erlaubte eine Differenzierung der zum Menschen homologen Chromosomensegmente 5b (grün) und 5a/7a (gelb).

DNA Sonde	Homologe menschliche Chromosomensegmente	Biotin-dUTP	Digoxigenin-dUTP	Tamra-dUTP	Falschfarbe
14	4q31.3-qter (4a)			x	rot
24	4q23-q31.2 (4b), 15q13-q21.2 (15a ₂)	x			blau
19	4pter-q22 (4c)	x	x		türkis
<i>S. oedipus</i> 6*	5q31.3-qter (5a), 5pter-q31.2 (5b), 7p22, 7q11, 7q21 (7a)		x		5bgrün; 5a/7a gelb
11**	5a/7a			x	gelb
9	1p21-pter (1a ₁)	x	x	x	weiß
28	1p12-21 (1a ₂)	x		x	magenta

Abbildung 4.2 dokumentiert die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit dem *L. lagothericha* siebenfarbenen Sonden Set auf Metaphasechromosomen von *L. lagothericha* (A) und *S. oedipus* (B). Der Sonden Set beinhaltet all diejenigen chromosomen-spezifischen DNA Sonden, die im Unterschied zu menschlichen und *S. oedipus* chromosomen-spezifischen Sonden, eine höhere subregionale Auflösung bieten. Kreuzhybridisierung von Zentromer-, peri-zentromerischen und interstitiellen Regionen konnte auf nahezu allen Chromosomen von *L. lagothericha* (A) beobachtet werden. Die Kreuzhybridisierung von Zentromerregionen auf Chromosomen von *S. oedipus* (B) ist auf die in das Sonden Set integrierte *S. oedipus* Chromosom 6 spezifische DNA Sonde zurückzuführen. L=*L. lagothericha*



Die zusätzliche subregionale Information, die mit *L. lagothericha* chromosomen-spezifischen DNA erhalten wurde, erlaubte eine differenziertere Definition der in Kapitel 4.1.1.2 genannten homologen menschlichen Chromosomen (-segmente). Die Kartierung von *S. oedipus* und *L. lagothericha* DNA Sonden auf menschliche Chromosomen erlaubte folglich die folgende Definition der zum Menschen homologen Chromosomen und -segmente (Die Nomenklatur dieser Chromosomensegmente folgt Neusser et al. (2001) und de Oliveira et al. (2002)): 1a₁ (1p21-pter), 1a₂ (1p12-21), 1c (q21-31), 1d (q32-qter), 2a (q12-qter), 2b (pter-q12), 3b (p24-pter, p12-21, q12-13, q27-qter), 3c (p21-24, q13-26), 3a (p12), 4a (4q31.3-qter), 4b (4q23-q31.2), 4c (4pter-q22), 5a (5q31.3-qter), 5b (5pter-q31.2), 6, 7a (p22, q11, q21), 7b (p11-21, q11-21, q22-qter), 8a (8p), 8b (8q), 9, 10a (10q), 10b (10p), 11, 12, 13a (q14-qter), 13b (q11-13), 14, 15a₁ (q11-24), 15a₂ (15q13-q21.2), 15b (q11-13, q25-qter), 16a (16p), 16b (16q), 17, 18, 19, 20, 21, 22, X und Y.

4.1.1.4 *Hylobates concolor* (Gibbon) sechsfarben Sonden Sets

Sechsfarben Sonden Sets mit chromosomen-spezifischen Sonden des Gibbons *Hylobates concolor* wurden im Rahmen der Diplomarbeit von M. Hollatz (2002) etabliert. Sie wurden hier exemplarisch angewandt, da die DNA Sonden des karyotypisch stark rearrangierten Gibbons eine höhere subregionale Differenzierung und damit zusätzliche Informationen über intra-chromosomale Rearrangements bei weniger rearrangierten Spezies wie Neuweltaffen versprechen (Müller et al. 1998). Die Zusammensetzung und das Markierungsschema der vier *H. concolor* sechsfarben Sonden Sets ist in Müller et al. (2003) beschrieben.

4.1.1.5 M-FISH Karyotypierung mittels sequentieller Hybridisierung (*ReFISH*)

Die vergleichende M-FISH Karyotypierung wurde in dieser Arbeit mittels der Technik *ReFISH* (Müller et al. 2002) durchgeführt. Mit dem hierzu entwickelten Zell-Fixierungsprotokoll (siehe 3.9) konnte erreicht werden, das, zum einen die Chromosomenmorphologie erhalten bleibt, zum anderen die zuvor hybridisierte DNA Sonde vollständig entfernt wurde. Dabei war es insbesondere wichtig, die Präparate nach der Hybridisierung mind. 60 Min. in 4xSSC/0,2% Tween (ohne Deckglas) zu inkubieren, um eine restlose Entfernung von *Vectashield Antifade Medium* zu ermöglichen. Weiterhin war es für die Erhaltung der Chromosomenmorphologie entscheidend, die Präparate nach der Postfixierung (aufsteigende Alkoholreihe mit anschließender Inkubation in Fixativ) bei 37°C übernacht zu trocknen. Höhere Temperaturen bewirkten, dass die DNA Sonden der vorherigen Hybridisierung „festgebacken“ wurden. Essentiell für die vollständige Entfernung der DNA Sonden der vorangegangenen Hybridisierung, sowie für die Erhaltung der Chromosomenmorphologie war die geeignete Wahl der Denaturierungszeit. Bei zu langen Denaturierungszeiten quollen die Chromosomen unter DNA Verlust auf, zu kurze Denaturierungszeiten erlaubten keine restlose Entfernung der DNA Sonde. Eine Verlängerung der Denaturierungszeit bei jeder weiteren Hybridisierung um 60 Sek. erschien optimal.

Es konnte demonstriert werden, dass mit diesem Protokoll ein gutes Hybridisierungsergebnis unter gleichzeitiger Konservierung der Chromosomenmorphologie bei bis zu vier sequentiellen Hybridisierungen erzielt werden kann (siehe Müller et al. 2002). Jedoch wurde festgestellt, dass mit Biotin-dUTP markierte DNA Sonden der zweiten Hybridisierung nicht

vollständig entfernt werden konnten. Für die dritte Hybridisierung wurden daher DNA Sonden verwendet, die anstatt Biotin-dUTP mit direkt Fluorochrom gekoppelten dUTPs wie z.B. Tamra-dUTP oder SpectrumGreen-dUTP markiert waren. Bei der vierten Hybridisierung war der Einsatz von Biotin-markierten DNA Sonden wieder möglich.

Die vergleichende M-FISH Karyotypierung von Neuweltaffen mittels sequentieller Hybridisierung gelang zum einen mit kombinatorisch markierten menschlichen DNA Sonden im 24 Farben Format, als auch mit Sonden des Neuweltaffen *Lagothrix lagothricha* in 31 unterschiedlichen Farbkombinationen. Hybridisierungen mit diesen *multi-color* Sonden Sets wurden nur dann durchgeführt, falls es die Qualität der Präparate zuließ. Hierfür wurden jeweils zwei sequentiell zu hybridisierende Subsets etabliert, die aus zwei bis drei differentiell markierten Sonden Set zusammengesetzt waren. Die Sonden Sets wurden analog zu den bereits beschriebenen Sonden zusammengesetzt und markiert. Da es sich um *L. Lagothricha* chromosomen-spezifische DNA Sonden eines weiblichen Individuums handelte, wurde in den 31-Farben Sonden Set eine Y-Chromosomen spezifische DNA Sonde von *Saguinus oedipus* integriert. Die Tabelle 4.5 stellt die Komposition der menschlichen (a) und *L. lagothricha* (b) *multi-color* Sonden Sets dar.

Tabelle 4.5: Markierungsschema der kombinatorisch markierten DNA Sonden und Falschfarbenzuordnung der Reportermoleküle (B=Biotin-dUTP⇒ blau, D=Digoxigenin-dUTP⇒ grün, T=Tamra-dUTP ⇒ rot) des **A)** menschliche 24 Farben Multiplex Sonden Sets (H 24) und **B)** *L. lagothricha* 31 Farben Multiplex Sonden Sets (L 31). Es wurden sechs chromosomen-spezifische DNA Sonden von *S. oedipus* (S) anstatt von *L. lagothricha* verwendet, da die entsprechenden *L. lagothricha* Chromosomen (in Klammern) in der Durchflusszytometrie nicht aufgelöst werden konnten oder die Qualität der *S. oedipus* Sonde besser erschien. Pool = Subset mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden, die mit dem gleichen Reportermolekül markiert wurden.

A)

Subset	pool	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H1	1.1T				X			X	X	X			
	1.2D							X	X		X		
	1.3B											X	
H2	2.1T	X		X		X			X	X	X	X	
	2.2D	X	X					X					X
	2.3B			X	X		X						X

Subset	pool	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
H1	1.1T	X			X			X	X		X		
	1.2D		X			X		X		X		X	
	1.3B			X			X		X	X			X
H2	2.1T										X		
	2.2D	X	X	X							X		
	2.3B					X	X						

B)

Subset	pool	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	17
L1	1.1T	X		X	X			X	X	X	X	X					
	1.2D		X			X	X	X		X			X	X		X	
L2	2.1T			X		X			X		X		X		X		X
	2.2D									X	X	X		X	X	X	X
	2.3B				X		X	X	X			X	X	X	X		
Subset	pool	18	20+ 21	22	23	25	26	27	28	29	30	S9 (15+ 29)	S7 (19+ 24b)	S17 (20)	S11 (21+ 24a)	SX	SY
L1	1.1T		X			X	X	X	X	X	X						
	1.2D			X	X	X	X	X		X	X			X			
L2	2.1T			X	X	X	X		X		X	X				X	X
	2.2D	X		X	X		X	X	X	X					X		
	2.3B	X			X	X		X	X			X	X				

4.1.2 Resultate des *multi-directional cross species chromosome painting*

In den nachfolgenden Kapiteln sind die in Tabelle 4.2 zusammengefassten Hybridisierungsexperimente dargestellt. Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen auf Metaphasen von Spezies der Unterfamilie *Callitrichinae*, *Cebinae*, *Aotinae*, *Pithecinae* und *Atelidae* sind in den Kapiteln 4.1.2.1 bis 4.1.2.5 dokumentiert. Vergleichende Genomkarten der untersuchten Spezies sind in Kapitel 4.1.3 illustriert.

Reproduzierbare Hybridisierungsergebnisse mit den in 4.1.1 genannten Sonden Sets wurden mit Ausnahme des Y Chromosoms auf allen Chromosomen der untersuchten Neuweltaffenarten (siehe Tabelle 4.1) erhalten. Zentromerregionen, wie auch andere heterochromatische Chromosomenregionen wurden zumeist nicht hybridisiert. Selbst Hybridisierungen mit menschlichen *painting* Sonden, die in kleine Translokationen bei Platyrrhini Spezies involviert waren, wie z.B. die Translokation der homologen menschlichen Chromosomen 5 und 7, ergaben eine ausreichend hohe Signalintensität, um von unspezifischem Hintergrund sicher unterschieden werden zu können. Chromosomale Homologien konnten bereits durch die Auswertung von 10 hybridisierten Metaphasen etabliert werden. Die Abbildungen 4.3 bis 4.24 illustrieren Beispiele für FISH Experimente mit den in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Sonden Sets des Menschen (H), der Neuweltaffen *S. oedipus* (S) und *L. lagothericha* (L) und des Gibbons *H. concolor* (G) auf Metaphasechromosomen der hier untersuchten Neuweltaffenspezies (siehe Tabelle 4.1). Jeweils unterhalb einer jeden abgebildeten Metaphase ist die entsprechende

Sondenkomposition und Falschfarbenzuordnung angegeben. Fluoreszenzsignale der DNA Sonden sind jeweils im RGB Modus dargestellt. Die korrespondierende DAPI Gegenfärbung der Chromosomen ist in grau dargestellt und wurde dem RGB Bild unterlegt.

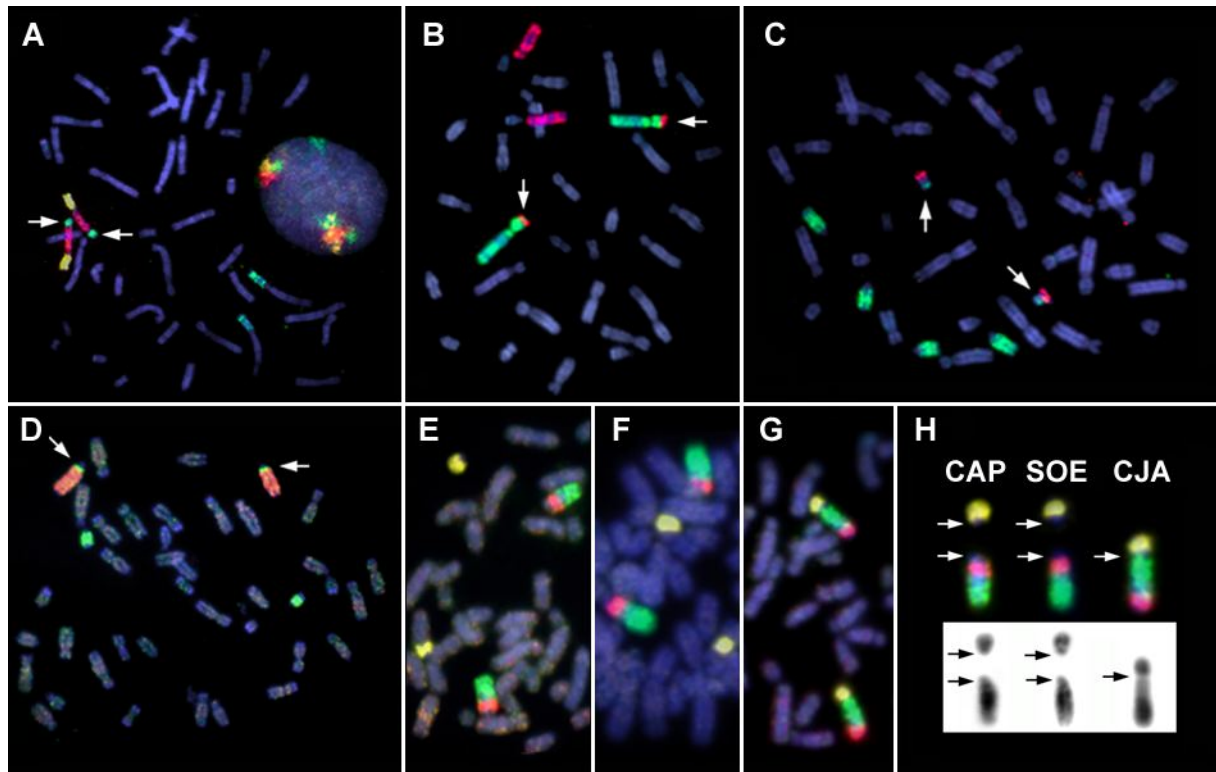
4.1.2.1 *Cross species chromosome painting* bei *Callitrichinae* (Krallenaffen)

Die Charakterisierung der Neuweltaffen *Callithrix jacchus*, *Callithrix argentata*, *Cebuella pygmaea*, *Callimico goeldii* und *Saguinus oedipus* mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden des Menschen und *Saguinus oedipus* wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt. Die DNA Sonden wurden hierbei in vier Experimenten zu Sets von je sechs bis sieben kombinatorisch markierten DNA Sonden (siehe 4.1.1.1 und 4.1.1.2) auf Chromosomen dieser Neuweltaffenarten kartiert. Die Ergebnisse des *reciprocal chromosome painting* zwischen *S. oedipus* und Mensch sind in Müller et al. (2001) beschrieben.

Nachträglich wurden im Rahmen dieser Dissertation ergänzende FISH Experimente mit einer Auswahl von menschlichen und *L. lagothericha* chromosomen-spezifischen Sonden auf Metaphasechromosomen der Spezies *C. jacchus*, *C. goeldii*, *S. oedipus* und der Spezies *Cebus apella* als *outgroup* durchgeführt (siehe Abb. 4.3). Diese Experimente dienten einerseits zur Überprüfung chromosomaler Homologien. Ferner konnten zusätzliche subchromosomale Informationen gewonnen werden, die wichtig für die phylogenetische Rekonstruktion der *Callitrichinae* (Krallenaffen) waren. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Neusser et al. (2001) dokumentiert.

Abbildung 4.3 (siehe nächste Seite): Auswahl an FISH Experimenten aus Neusser et al. (2001). **A-C)** Kontrollexperimente auf Metaphasechromosomen der Spezies *C. jacchus*, die Assoziationen nachweisen, die von Sherlock et al. (1996) nicht beschrieben wurden. **A)** veranschaulicht die dreifarben Hybridisierung mit den menschlichen Chromosom 13 (grün), 17 (rot) und 20 (gelb) spezifischen Sonden, die die Assoziation der homologen menschlichen Chromosomen 13/17/20 (siehe Pfeile) nachwies. **B)** Die zweifarben Hybridisierung mit den menschlichen Chromosom 5 (grün) und 7 (rot) spezifischen Sonden visualisiert die Assoziation 5/7 (siehe Pfeile). **C)** Kartierung der menschlichen Chromosomen 3 (grün) und 21 (rot), die assoziiert auf *C. jacchus* Chromosome 21 vorliegen (siehe Pfeile). **D-H)** Ergänzende Experimente mit *L. lagothericha painting* Sonden für die sub-chromosomale Definition bestimmter Chromosomen. **D)** Cohybridisierung der *L. lagothericha* Chromosome 3 (rot) und 11 (grün) spezifischen Sonden wiesen unterschiedliche Fissionsbruchpunkte (siehe Pfeile) in *L. lagothericha* und *C. goeldii* auf, die auf einen unterschiedlichen evolutionären Ursprung der Chromosom 5/7 Homologen hindeuten. **E-G)** Dreifarben Hybridisierung mit *L. lagothericha* Chromosom 9 (grün), 27 (gelb) und 28 (rot) spezifischen Sonden auf Metaphasen von **E)** *C. apella*, **F)** *S. oedipus* und **G)** *C.*

jacchus. Die chromosomale Gegenfärbung ist in blau dargestellt. **H)** Zusammenfassung der Ergebnisse in **E-G)**, zusammen mit den korrespondierenden DAPI gefärbten Chromosomen (invertiert). *C. apella* (CAP) weist eine identische subchromosomale Organisation wie *S. oedipus* (SOE) auf, im Gegensatz zu der subchromosomalen Organisation, die in *C. jacchus* (CJA) beobachtet wurde. Pfeile deuten auf Zentromerregionen, um die unterschiedliche Kartierung der Sonden in Relation zum Zentromer und die Fusion in *C. jacchus* hervorzuheben.



4.1.2.1.1 *Callithrix jacchus*

Die Charakterisierung der Spezies *C. jacchus* mit menschlichen chromosomen-spezifischen DNA Sonden wurde bereits von Sherlock et al. (1996) beschrieben. Die hier durchgeführten zusätzlichen Kontrollexperimente (siehe Abb. 4.3 A-C) deckten jedoch Unterschiede in der Kartierung der menschlichen Chromosomen 3, 21, 5, 7, 13, 17 und 20 spezifischen DNA Sonden im Vergleich zu Sherlock et al. (1996) auf. Sie wiesen Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomen 13/17/20 (Abb. 4.3 A), 5/7 (Abb 4.3 B) und 3/21 (Abb. 4.3 C) nach, die von Sherlock et al. (1996) nicht gefunden wurden.

Darüber hinaus wurden im Rahmen dieser Arbeit sechsfarben Sonden Sets von *Hylobates concolor* (siehe 4.1.1.4) auf Metaphasen von *C. jacchus* hybridisiert. Auch war die Qualität der Metaphasepräparation von *C. jacchus* ausreichend, um eine M-FISH Karyotypierung mit der 31-farben *multiplex* Sonde von *L. lagothericha* (siehe 4.1.1.5) durchzuführen. Ziel dieser

Hybridisierungen war die Differenzierung subchromosomaler Regionen in höherer Auflösung, als im Vergleich zu menschlichen und *S. oedipus* chromosomen-spezifischen DNA Sonden. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen sind nachfolgend beschrieben. Hierbei wurde ein männliches Individuum mit $2n=46$ Chromosomen wurde untersucht.

Hybridisierung des 31-Farben L. lagothericha Sonden Sets

Die Hybridisierung des 31-Farben Sonden Sets erlaubte die simultane Darstellung aller homologen Chromosomen von *L. lagothericha* und *C. jacchus*. Hierbei wurden die zwei Sonden Subsets L1 und L2 sequentiell auf dasselbe Metaphasepräparat hybridisiert (*ReFISH*, siehe 3.9 und 4.1.1.5). Insgesamt konnten 33 distinkte Chromosomensegmente pro haploidem Chromosomensatz (einschließlich der beiden Geschlechtschromosomen) von *C. jacchus* differenziert werden. Die Homologen zu *L. lagothericha* Chromosomen 1, 4- 7, 13, 16, 20, 22, 23, 25, 26 und X sind im Karyotyp von *C. jacchus* konserviert. Das Y-Chromosom konnte über die, in den Sondenpool integrierte Y-chromosomen-spezifische DNA Sonde von *S. oedipus* nachgewiesen werden. Alle anderen DNA Sonden wiesen folgende Assoziationen homologer *L. lagothericha* Chromosomen nach: 3/11, 8/9/30, 8/10/12, 14/24/19, 15/29, 21/24, 27/9/28. Mit den *L. lagothericha* Chromosom 3, 9, 11, 14, 19, 24, und 28 spezifischen Sonden konnten folgende subchromosomale Regionen, die als homologe menschliche Chromosomensegmente definiert wurden (siehe 4.1.1.3.), differenziert werden: 1a₁/1a₂, 4a/4b/4c, 5b/5a/7a. Die 15a₂ homologe Region kartierte auf Chromosom 10 von *C. jacchus*.

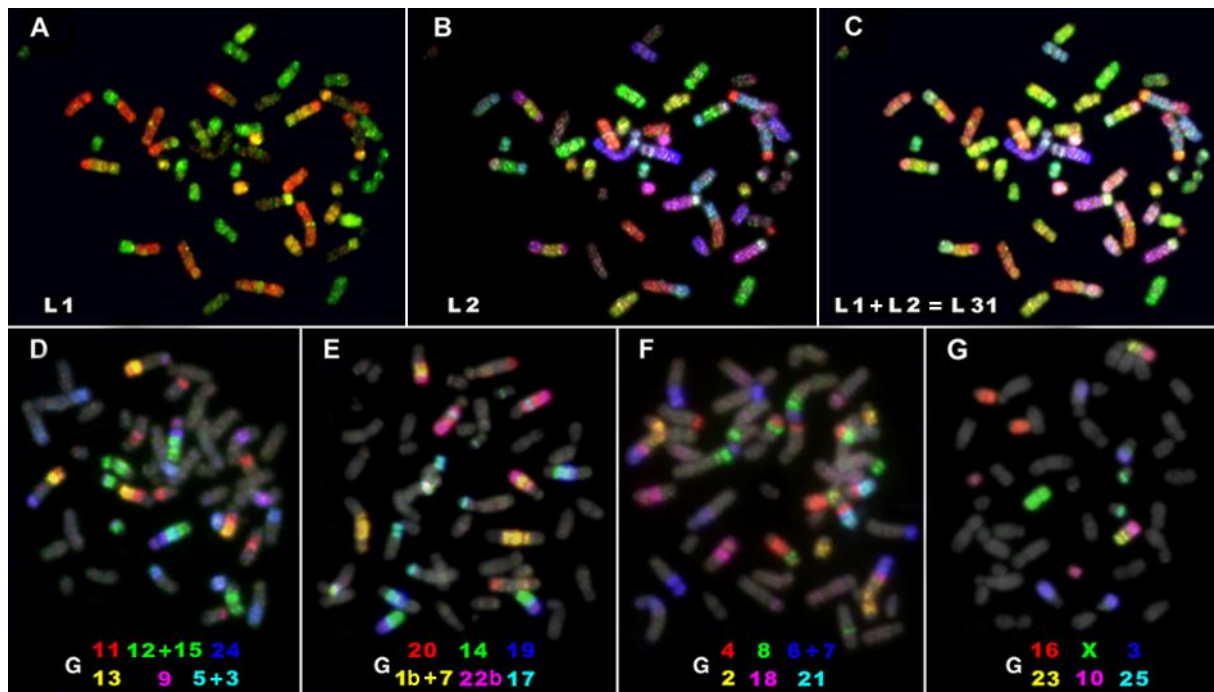
Hybridisierung mit Hylobates concolor Sonden Sets

Die Kartierung von Sonden des im Vergleich zum Menschen stark rearrangierten Gibbons *H. concolor* (Müller et al. 1998) auf Chromosomen von *C. jacchus* erlaubte eine Differenzierung in bis zu 6 subchromosomale Regionen. Mit den vier Sonden Sets wurden insgesamt 79 distinkte Signale pro haploidem Chromosomensatz von *C. jacchus* erhalten. Von den 26 verschiedenen Gibbon Sonden wiesen nur die Chromosom 16 und X spezifischen Sonden konservierte Chromosomen zwischen *C. jacchus* und *H. concolor* nach. Alle anderen chromosomen- spezifischen Sonden von *H. concolor* hybridisierten eine Chromosomenregion oder lieferten multiple Signale auf 2 bis 3 Chromosomen von *C. jacchus*.

Hybridisierungsexperimente mit chromosomen-spezifischen DNA des Neuweltaffen *L. lagothericha* und *H. concolor* veranschaulicht Abbildung 4.4. Die Abbildung 4.25 A zeigt eine Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse mit DNA Sonden des Menschen, *S. oedipus*, *L.*

lagothericha und *Hylobates concolor* anhand eines Karyogramms DAPI gebänderter Chromosomen von *C. jacchus*.

Abbildung 4.4: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit *L. lagothericha* und *H. concolor* Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *C. jacchus*. **A-C)** Vergleichende M-FISH Karyotypierung mit einem 31-farben Sonden Set des Wollaffen *L. lagothericha* (L 31) mittels sequentieller hybridisierung (*Re-FISH*). **A)** Sonden Subset L1, **B)** Sonden Subsets L2, **C)** Übereinanderlagerung der beiden Sonden Subsets (L1+L2), die zusammen 31 differenzierbare Farbkombinationen ergeben. **D-G)** illustrieren Hybridisierungen mit den vier sechsfarben Sets chromosomen-spezifischer DNA Sonden des Gibbons *Hylobates concolor* (HCO). **D)** veranschaulicht die Hybridisierung mit dem HCO Sonden Set 1, **E)** mit dem HCO Sonden Set 2, **F)** mit dem HCO Sonden Set 3 und **G)** mit dem HCO Sonden Set 4.



4.1.2.1.2 *Callithrix penicillata*

Die Ergebnisse der FISH Experimente auf Metaphasen von *C. penicillata* ergaben ein identisches Hybridisierungsmuster wie bei *C. jacchus* (siehe oben). In dieser Arbeit wurde ein männliches Individuum mit einem Chromosomensatz von $2n=46$ untersucht.

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets:

Insgesamt konnten 34 homologe Chromosomensegmente pro haploidem Chromosomensatz mit dem menschlichen Sonden Satz differenziert werden. Die Homologen zu den Chromosomen 4, 6, 11, 12, 19 und X des Menschen sind im Karyotyp von *Callithrix*

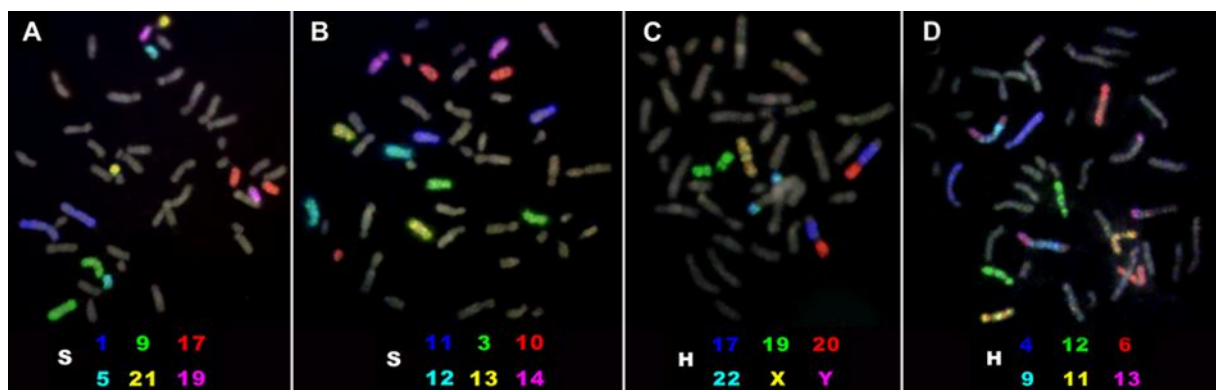
penicillata als ganzes Chromosom konserviert. Die menschlichen Chromosomen 9, 14, 17, 18, 20, 21 und 22 spezifischen Sonden zeigten jeweils Homologie zu einer Chromosomenregion, die jedoch mit anderen Regionen assoziiert war. Mit den menschlichen Chromosom 2, 5, 7, 8, 10, 13, 15 und 16 spezifischen Sonden konnten zwei homologe Chromosomen bzw. Chromosomenregionen identifiziert werden. Die Chromosom 1 und 3 spezifischen Sonden zeigten Signale auf je drei Chromosomen von *C. penicillata*. Folgende Assoziation homologer menschlicher Chromosomen konnten nachgewiesen werden: 1/10, 2/15, 3/21, 5/7, 8/18, 10/16, 13/9/22, 13/17/20 und 14/15.

Hybridisierung mit *S. oedipus* (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Die Charakterisierung mit *S. oedipus* chromosomen-spezifischen DNA Sonden zeigte, dass alle Chromosomen mit Ausnahme der *S. oedipus* Chromosomen 10, 16 und 22 konserviert zwischen *S. oedipus* und *C. penicillata* sind. Das Y-Chromosom von *C. penicillata* konnte mit der homologen *S. oedipus* Sonde identifiziert werden. Die homologen *S. oedipus* Chromosomen 16 und 22 lagen fusioniert auf einem Chromosom von *C. penicillata* vor. Die *S. oedipus* Chromosom 10 spezifische DNA Sonde färbte zwei Chromosomen von *C. penicillata* an.

Repräsentative FISH Experimente mit menschlichen und *S. oedipus* Sonden Sets sind in der Abbildung 4.5 dargestellt. Eine Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse auf Chromosomen von *C. penicillata* ist in Abbildung 4.25 B illustriert.

Abbildung 4.5: FISH mit *S. oedipus* und menschlichen Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *C. penicillata*. **A)** *S. oedipus* Sonden Set 1, **B)** *S. oedipus* Sonden Set 2, **C)** menschliches Sonden Set 4 und **D)** menschliches Sonden Set 3.



4.1.2.1.3 *Callithrix jacchus* X *Cebuella pygmaea* Inter-Spezies Hybrid

Es wurde ein männliches, als auch ein weibliches Individuum eines *Callithrix jacchus* x *Cebuella pygmaea* Inter-Spezies Hybriden mit einem diploiden Chromosomensatz von 45 Chromosomen untersucht. Für eine eingehende Karyotypanalyse der Hybrid Individuen wurde FISH mit menschlichen, *S. oedipus* Sonden Sets, als auch mit dem 31-farben *L. lagothericha* Sonden Set durchgeführt. Die Charakterisierung der Inter-spezies Hybrid Individuen mit diesen Sonden Sets ist in Neusser et al. (im Druck) beschrieben.

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets und S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf Metaphasen der Hybrid Individuen mit menschlichen und *S. oedipus* chromosomen-spezifischen DNA Sonden ergab ein identisches Hybridisierungsmuster zu *C. jacchus* und *C. pygmaea* mit Ausnahme der *S. oedipus* Chromosom 10 spezifischen Sonde, mit der ein asymmetrisches Hybridisierungsmuster erhalten wurde. Mit dieser Sonde wurden sowohl ein submetazentrisches Chromosom, als auch zwei akrozentrische Chromosomen angefärbt. Analog dazu wurde ein asymmetrisches Hybridisierungsmuster mit den menschlichen Chromosom 2 und 16 spezifischen DNA Sonden beobachtet: Die menschliche Chromosom 2 spezifische Sonde färbte ein akrozentrisches und den kurzen Arm des submetazentrischen Chromosoms an und die Chromosom 16 spezifische Sonde ein kleines akrozentrisches und den langen Arm des submetazentrischen Chromosoms. Diese Chromosomen kennzeichnen den Karyotypunterschied der elterlichen Spezies (Mutter=*C. jacchus*, Vater=*C. pygmaea*), die sich durch eine Robertson'sche Translokation voneinander unterscheiden (siehe Neusser et al. 2001). Der Karyotypunterschied der elterlichen Spezies ist daher Ursache der ungeraden Chromosomenzahl von 45 Chromosomen bei den Hybrid Individuen. Mit der *S. oedipus* Chromosom 10 bzw. den menschlichen Chromosom 2 und 16 spezifischen Sonden konnte somit der mütterliche Ursprung der zwei akrozentrischen Chromosomen und der väterliche Ursprung des submetazentrischen Chromosoms bei den Hybrid Individuen identifiziert werden.

Hybridisierung des 31-Farben L. lagothericha Sonden Sets

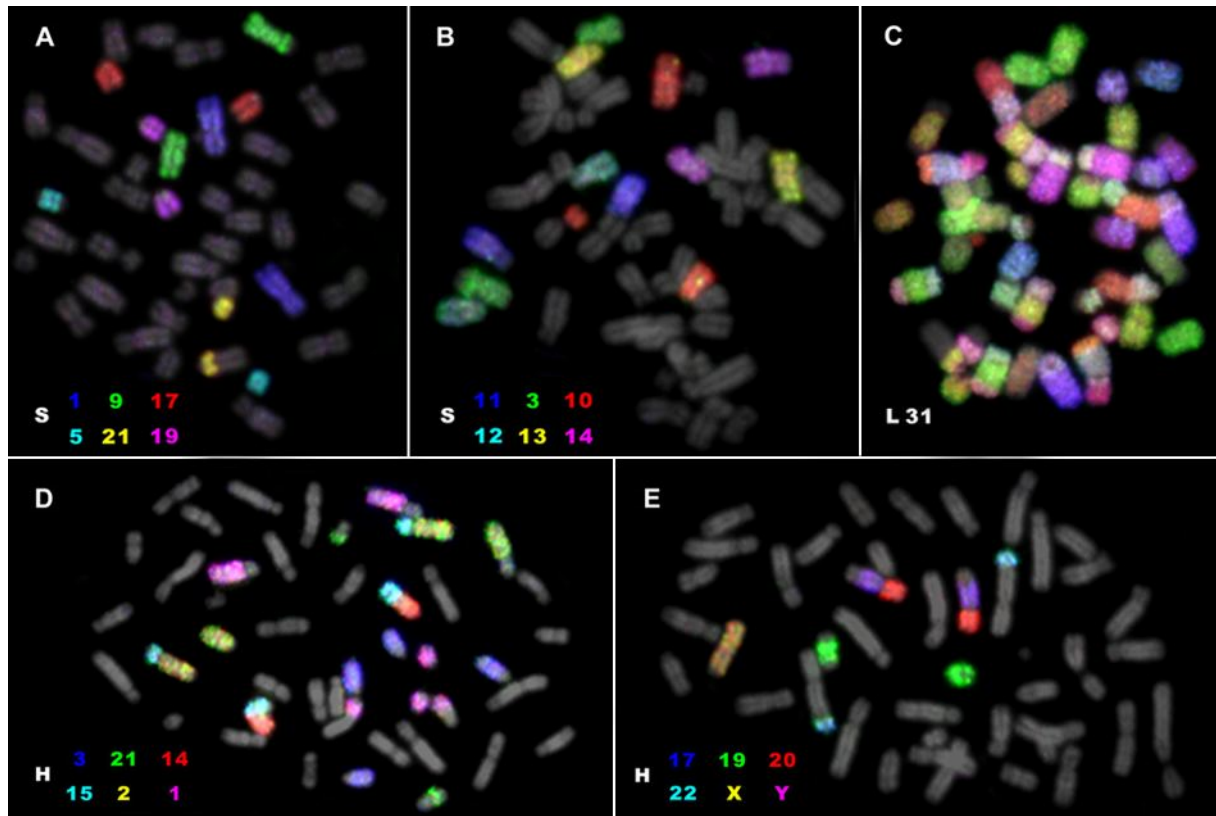
Die M-FISH Karyotypierung mittels *ReFISH* unter Verwendung der 31-farben *multiplex* Sonde von *L. lagothericha* (siehe 4.1.1.5) ergab insgesamt 35 Signale pro haploidem Chromosomensatz und den Geschlechtschromosomen der Hybrid Individuen. Die

Chromosom 1, 4-7, 13, 16, 17, 20, 22, 23, 25, 26 und X spezifischen Sonden wiesen Chromosomen nach, die im Karyotyp der Hybrid Individuen konserviert sind. Die *S. oedipus* Y chromosomen-spezifische DNA Sonde wies Homologie zum Y- Chromosom im männlichen Hybrid Individuum nach. Alle anderen *L. lagothericha* Sonden identifizierten jeweils eine homologe Region auf ein bis zwei Chromosomenpaaren der Hybriden. Die *L. lagothericha* Chromosom 2 spezifische Sonde färbte analog zur *S. oedipus* Sonde 10 zwei akrozentrische und ein submetazentrisches Chromosom an.

Die Charakterisierung mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* DNA Sonden zeigte, dass die untersuchten Hybrid Individuen bei der vorliegenden Auflösung keine aberranten Chromosomen aufweisen. Insgesamt 13 Chromosomen pro diploiden Chromosomensatz wiesen Regionen auf, die von keiner Sonde hybridisiert wurden und offenbar aus Heterochromatin bestehen, die im menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* Genom nicht vorhanden sind. Größenunterschiede zwischen väterlichen und mütterlichen Chromosomen konnten bei zahlreichen Chromosomen der Hybrid Individuen beobachtet werden. Insbesondere konnte ein enormer Größenunterschied zwischen den elterlichen Chromosomen festgestellt werden, die homolog zu *C. jacchus* Chromosom 19 bzw. homolog zu *C. pygmaea* Chromosom 18 sind (siehe Abb. 4.6 A, Nachweis mit *S. oedipus* Chromosom 21 spezifischen Sonde), wobei eines der elterlichen Chromosomen nur teilweise angefärbt wurde und die nicht hybridisierte Chromosomenregion vermutlich aus Heterochromatin zusammengesetzt ist. Karyotypische Unterschiede zwischen dem weiblichen und dem männlichen Hybrid Individuum konnten mit Ausnahme der Geschlechtschromosomen nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 4.6 zeigt Beispiele für FISH Experimente mit *S. oedipus* und menschlichen Sonden Sets, als auch *ReFISH* mit dem 31-farben *L. lagothericha* Sonden Set. Abbildung 4.26 illustriert den Karyotyp des männlichen Hybriden, zusammen mit den Kartierungsergebnissen mit *S. oedipus*, *L. lagothericha* und menschlichen Sonden Sets.

Abbildung 4.6 (siehe nächste Seite) veranschaulicht Beispiele für FISH Experimente mit *S. oedipus*, *L. lagothericha* und menschlichen Sonden Sets auf Metaphasechromosomen eines *C. jacchus* x *C. pygmaea* Hybriden. **A)** zeigt die Hybridisierung mit *S. oedipus* Sonden Set 1, **B)** mit *S. oedipus* Sonden Set 2. **C)** illustriert die Hybridisierung des *L. lagothericha* 31-farben Sonden Sets L 31 (Abbildungen der Sonden Subsets L1 und L2 wurden zu einem Bild überlagert). **D)** zeigt die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 1, **E)** mit dem menschlichen Sonden Set 4.



4.1.2.1.4 *Saguinus oedipus*

Der Karyotyp der Spezies *S. oedipus*, sowie reziprokes *chromosome painting* zwischen Mensch und *S. oedipus* ist in Müller et al. (2001) dokumentiert. Die Charakterisierung von *S. oedipus* mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden von *L. lagothericha* wurde bereits in Kapitel 4.1.1.3 erläutert. Abbildung 4.3 (in Kapitel 4.1.1.3) illustriert die Hybridisierung mit dem *L. lagothericha* siebenfarbenen Sonden Set auf Metaphasechromosomen von *S. oedipus*, die eine nähere subregionale Definition, als mit den genannten menschlichen und *S. oedipus* DNA Sonden erzielten. Das resultierende Hybridisierungsmuster entsprach den Kartierungsergebnissen mit *L. Lagothericha* DNA Sonden bei *C. jacchus* (siehe oben), mit dem einzigen Unterschied, dass die homologen menschlichen Chromosomensegmente 1a₁/1a₂ in Relation zum Zentromer umgekehrt orientiert bei *S. oedipus* waren.

4.1.2.1.5 *Saguinus imperator*

Es wurde ein weibliches Individuum der Spezies *S. imperator* mit einem Chromosomensatz von $2n=46$ Chromosomen charakterisiert. Die Kartierung menschlicher und *S. oedipus* chromosomen-spezifischer DNA Sonden auf Metaphasen von *S. imperator* zeigte

übereinstimmende Hybridisierungsmuster mit *S. oedipus*. Zentromerregionen wiesen nur ein schwaches Hybridisierungssignal auf.

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets:

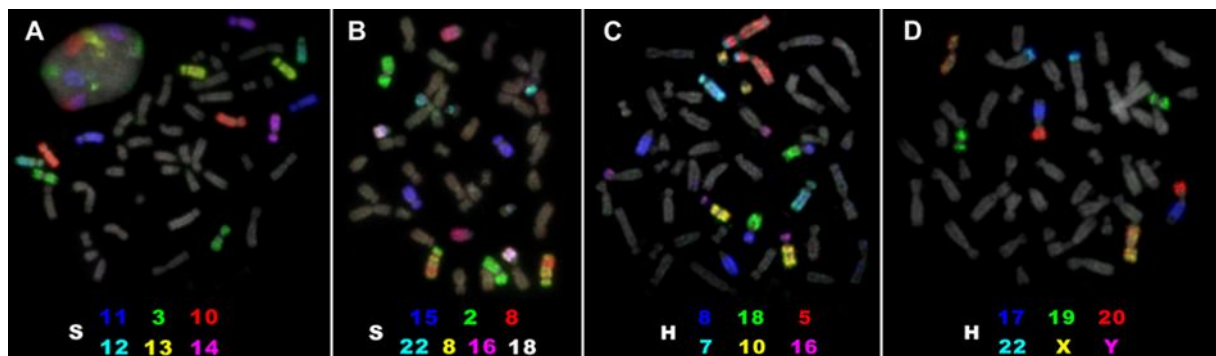
Mit den vier menschlichen Sonden Sets konnten insgesamt 34 distinkte Chromosomenregionen von *S. imperator* identifiziert werden. Die *S. imperator* Homologen zu den menschlichen Chromosomen 4, 6, 11, 12, 19 und X wurden jeweils ganzheitlich mit den entsprechenden menschlichen DNA Sonden angefärbt. Die menschlichen Chromosom 9, 14, 17, 18, 20, 21 und 22 spezifische Sonden kartierten jeweils auf eine Chromosomenregion je eines Chromosomenpaares. Alle übrigen Sonden zeigten Homologie zu zwei oder mehr Chromosomen von *S. imperator*. Es konnten folgende Assoziationen homologer menschlicher Chromosomen (-segmente) nachgewiesen werden: 2/15, 2/16, 3/21, 5/7, 8/18, 10/16, 13/9/22, 13/17/20 und 14/15.

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Die Hybridisierung von *S. oedipus* chromosomen-spezifischen Sonden zeigte, dass alle autosomalen Chromosomen in ihrer Synthese konserviert zwischen *S. oedipus* und *S. imperator* sind. Da ein weibliches *S. imperator* Individuum untersucht wurde, konnte keine Homologie zum Y Chromosom nachgewiesen werden.

Eine Auswahl an FISH Experimenten mit menschlichen und *S. oedipus* Sonden Sets zeigt Abbildung 4.7. Abbildung 4.27 fasst die Ergebnisse der Kartierung menschlicher und *S. oedipus* chromosomen-spezifischer DNA Sonden zusammen.

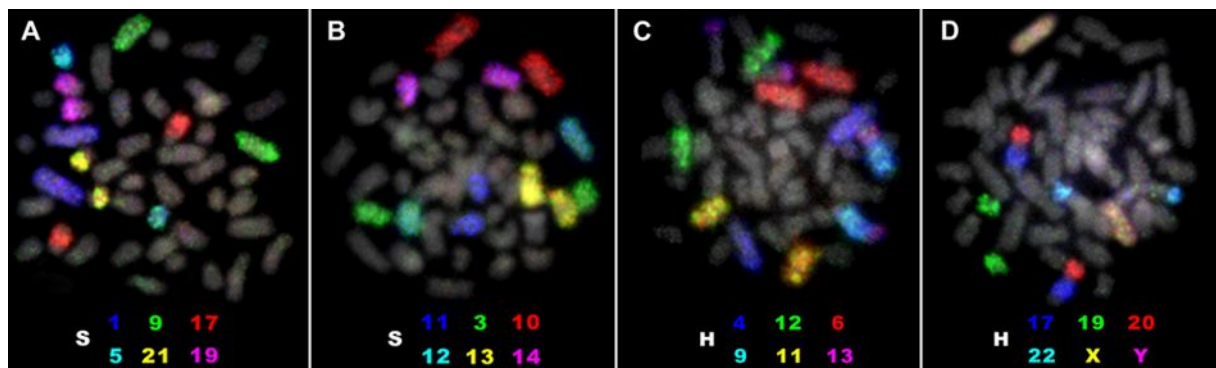
Abbildung 4.7: FISH Experimente mit menschlichen und *S. oedipus* Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *S. imperator*. **A)** zeigt die Hybridisierung mit *S. oedipus* Sonden Set 2, **B)** mit *S. oedipus* Sonden Set 4. **C)** illustriert die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 2, **D)** mit dem menschlichen Sonden Set 4.



4.1.2.1.6 *Leontopithecus chrysopygus*

Die Ergebnisse der Kartierung chromosomen-spezifischer Sonden Sets des Menschen und *S. oedipus* auf Chromosomen des hier untersuchten weiblichen Individuums von *L. chrysopygus* waren identisch zu den bei *S. oedipus* und *S. imperator*. Zentromerregionen, sowie andere heterochromatische Regionen wurden mit *S. oedipus* und menschlichen chromosomen-spezifischen DNA Sonden nicht angefärbt. Beispiele für FISH Experimente mit menschlichen und *S. oedipus* Sonden Sets sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Abbildung 4.27 (B) bietet eine Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse anhand G-gebänderter Chromosomen von *L. chrysopygus*.

Abbildung 4.8 dokumentiert Hybridisierungen mit menschlichen und *S. oedipus* Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *L. chrysopygus*. **A)** veranschaulicht die Hybridisierung mit *S. oedipus* Sonden Set 1, **B)** mit *S. oedipus* Sonden Set 2. **C)** zeigt die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 3 und **D)** mit dem menschlichen Sonden Set 4.



4.1.2.2 *Cross species chromosome painting bei Cebinae (Kapuzineraffen)*

4.1.2.2.1 *Cebus apella paraguayanus*

Die Charakterisierung des Karyotyps von *C. apella* mittels *chromosome painting* mit menschlichen DNA Sonden ist in Garcia et al. (2000) beschrieben. *C. apella paraguayanus* diente in dieser Arbeit als phylogenetische *outgroup* der Speziesgruppen *Callitrichidae* und *Atelidae*. Eine eingehende Untersuchung der Spezies *C. a. paraguayanus* mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagotracha* chromosomen-spezifischen DNA Sonden Sets erschien wichtig,

da ihr Karyotyp in Bezug zu anderen Spezies gesetzt wurde. Es wurde ein männliches Individuum mit $2n=54$ Chromosomen analysiert.

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets:

Die Charakterisierung des hier untersuchten Individuums von *C. apella* mit menschlichen DNA Sonden Sets entsprach den Ergebnissen von Garcia et al. (2000). Die Hybridisierung zeigte, dass die menschlichen Chromosomen 4, 6, 9, 11-13, 17-20, 22 und X im Karyotyp von *C. a. paraguayanus* vollständig konserviert sind. Alle übrigen chromosomen-spezifischen DNA Sonden wiesen Homologie zu einer Chromosomenregion nach, die mit einer anderen chromosomalen Region assoziiert vorlag oder färbten zwei bis drei Chromosomen bzw. Chromosomenregionen von *C. a. paraguayanus* an. *C. a. paraguayanus* Chromosom 4, 11, 12, 15, 19 und 21 wiesen Chromosomenregionen auf, die von keiner menschlichen Sonde hybridisiert wurden und offenbar aus Heterochromatin zusammengesetzt sind, dessen Sequenzen im menschlichen Genom nicht enthalten ist.

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

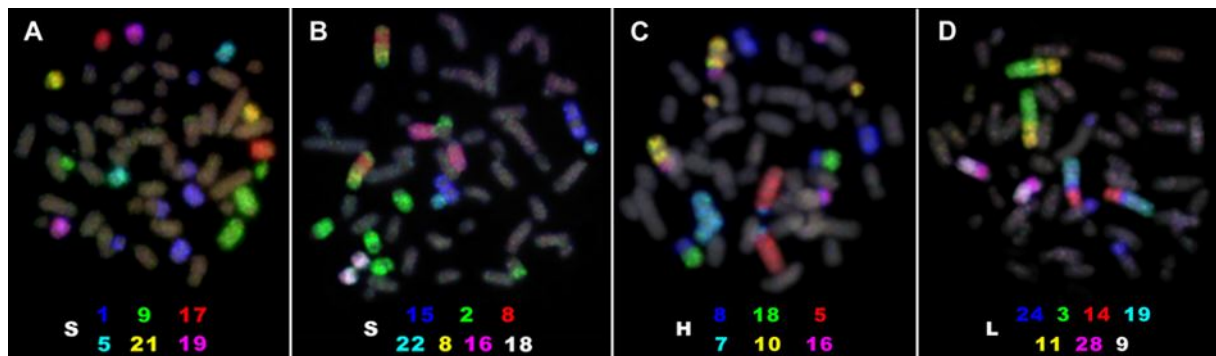
Die Hybridisierung mit *S. oedipus* chromosomen-spezifischen DNA Sonden zeigte, dass mit Ausnahme der *S. oedipus* Chromosomen 1, 2 und 9 alle Chromosomen konserviert zwischen *S. oedipus* und *C. a. paraguayanus* sind, da je eine *S. oedipus* DNA Sonde je ein Chromosomenpaar von *C. apella* ganzheitlich anfärbte. Das Y Chromosom zeigte ein, im Vergleich zu den übrigen Chromosomen, schwächeres Hybridisierungssignal. Die *S. oedipus* Chromosom 1 und 2 spezifischen Sonden hybridisierten insgesamt je drei Chromosomen bzw. Chromosomenregionen. Ein unterbrochenes Hybridisierungssignal wurde wie mit menschlichen Sonden Sets auf *C. a. paraguayanus* Chromosom 4, 11, 12, 15, 19 und 21 erhalten. Diese nicht hybridisierten Chromosomenregionen enthalten offenbar Heterochromatin, dessen Sequenzen keine Homologie zu *S. oedipus* zeigte.

Hybridisierung des siebenfarben L. lagothericha Sonden Sets:

Die Hybridisierung des siebenfarben *L. lagothericha* Sonden Sets erlaubte eine sub-chromosomale Definition der zum Menschen homologen Chromosomensegmente 1a₁, 1a₂, 4a, 4b /15a₂ 4c, 5a/ 7a und 5b in *C. a. paraguayanus*. Sie wies folgende Assoziationen nach: 1a₁/1a₂, 4a/4b/4c und 7a/5a/5b. Die homologe Region zum menschlichen Chromosomensegment 15a₂ konnte auf dem Chromosom 6p von *C. a. paraguayanus* lokalisiert werden.

Eine Zusammenfassung von Hybridisierungen mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* Sonden Sets ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Kartierung dieser Sonden ist in Abbildung 4.28 (A) illustriert.

Abbildung 4.9: Auswahl von FISH Experimenten mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *C. a. paraguayanus*. **A)** veranschaulicht die Hybridisierung mit *S. oedipus* Sonden Pool 1, **B)** mit *S. oedipus* Sonden Pool 4. **C)** zeigt beispielhaft die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Sets 2. **D)** illustriert die Charakterisierung mit dem *L. lagothericha* siebenfarben Sonden Set.



4.1.2.2.2 *Cebus albifrons*

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets:

Die Kartierung menschlicher sechsfarben Sonden Sets auf Metaphasechromosomen des untersuchten weiblichen Individuums von *C. albifrons* ($2n=52$) entsprach den Resultaten der bereits publizierten Spezies *C. apella* und *C. capucinus*, mit Ausnahme der Kartierung der menschlichen Chromosom 14 und 15 spezifischen DNA Sonden, die karyotypische Unterschiede zu *C. apella* und *C. capucinus* aufdeckten: Im Vergleich zu *C. apella* und *C. capucinus*, die getrennte Chromosomen homolog zur menschlichen Chromosomenregion 15b aufwiesen, konnte bei dem hier untersuchten Individuum von *C. albifrons* eine Insertion des homologen menschlichen Chromosomensegments 15b in *C. albifrons* Chromosom 8 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.28 B). Daher reduzierte sich der diploide Chromosomensatz bei der Spezies *C. albifrons* auf $2n=52$ Chromosomen im Vergleich zu 54 Chromosomen bei *C. apella* und *C. capucinus*. Der zweite Karyotypunterschied zu den Spezies *C. apella* und *C. capucinus* involviert die homologen menschlichen Chromosomen 14 und 15. Im Gegensatz zu den Spezies *C. apella* und *C. capucinus*, die eine Assoziation von homologen menschlichen Chromosomenregionen 14/15/14 aufweisen, konnte bei der Spezies *Cebus albifrons* eine Assoziation den menschlichen Homologen 15/14/15/14 festgestellt

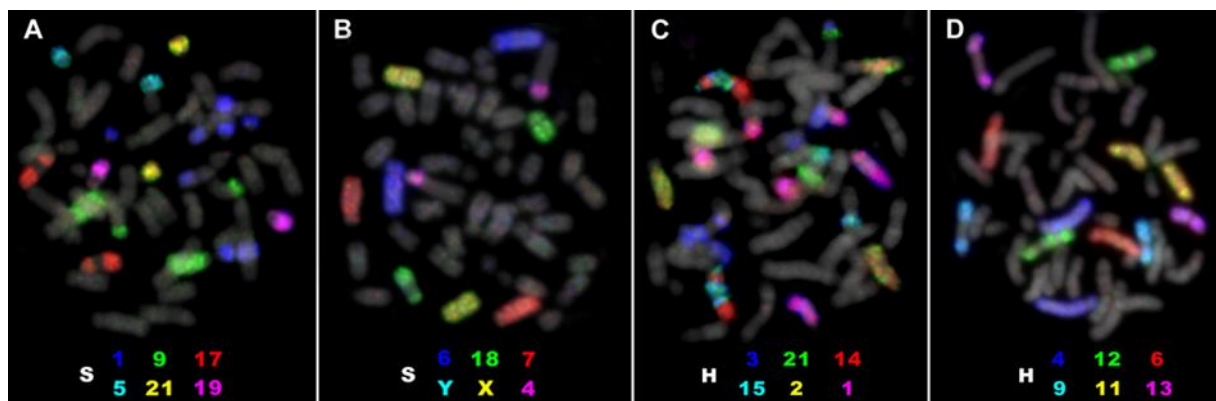
werden (siehe Abbildung 4.9 C). Auf den Chromosomen 4, 11, 12, 15, 19 und 21 von *C. albifrons* wurden wie bei der Spezies *C. apella* Hybridisierungslücken beobachtet, die vermutlich heterochromatische Regionen darstellen. Im Unterschied zu *C. apella* zeigte auch *C. albifrons* Chromosom 18 ein unterbrochenes Hybridisierungssignal.

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Die *S. oedipus* Chromosomen 3-8, 10-22 und X-spezifischen DNA Sonden identifizierten je ein Chromosomenpaar von *C. albifrons*. Die Chromosomen 1 und 2 spezifischen Sonden von *S. oedipus* zeigten Homologie zu Chromosomen (-regionen) von je drei Paaren und die Chromosom 9 spezifische Sonde zu zwei Chromosomenpaaren von *C. albifrons*. Die mit menschlichen Sonden Sets nachgewiesene Insertion von homologem menschlichem Chromosom 15 Material in *C. albifrons* Chromosom 8 (siehe oben), konnte mit der *S. oedipus* Chromosom 9 spezifischen Sonde bestätigt werden. Die mit menschlichen DNA Sonden beobachteten Hybridisierungslücken (siehe oben) waren mit *S. oedipus* DNA Sonden ebenfalls feststellbar.

Beispiele für FISH Experimente mit *S. oedipus* und menschlichen Sonden Sets sind in Abbildung 4.10 illustriert. Abbildung 4.28 (B) zeigt eine Zusammenfassung der Charakterisierung von *C. albifrons* mit *S. oedipus* und menschlichen Sonden Sets.

Abbildung 4.10 dokumentiert die Hybridisierung mit menschlichen und *S.oedipus* Sonden Sets auf Metaphasen von *C. albifrons*. **A)** zeigt die Hybridisierung mit *S. oedipus* Sonden Set 1 und **B)** mit *S. oedipus* Sonden Set 3. **C)** illustriert die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 1 und **D)** mit dem menschlichen Sonden Set 3.



4.1.2.2.3 *Saimiri boliviensis*

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets:

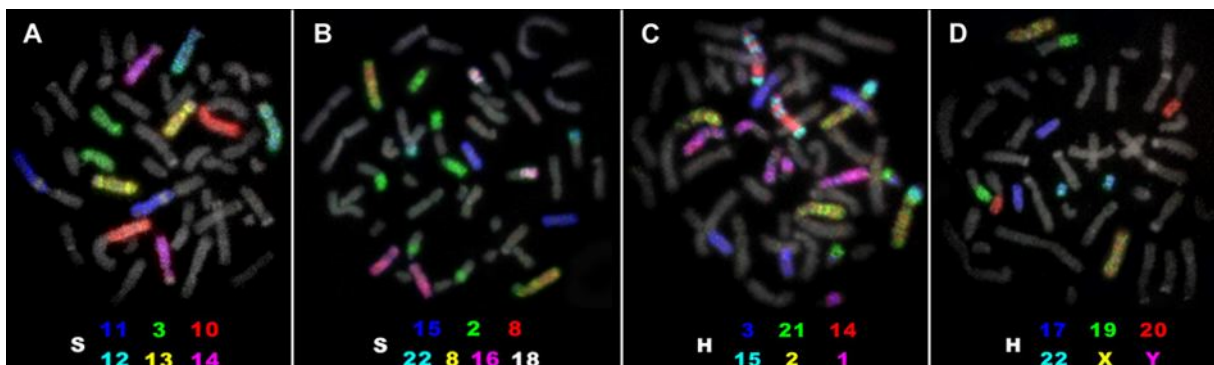
Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit menschlichen sechsfarben DNA Sonden Sets auf Metaphasechromosomen des untersuchten weiblichen Individuums von *S. boliviensis* ($2n=44$) wies ein identisches Hybridisierungsmuster zu der bereits publizierte Neuweltaffenspezies *Saimiri sciureus* (Stanyon et al. 2000) auf. Chromosomenregionen, die mit keiner chromosomen-spezifischen DNA Sonde hybridisierten, stellen offenbar heterochromatische Regionen dar, die im Genom des Menschen nicht vorhanden sind.

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Mit *S. oedipus* Sonden Sets konnten insgesamt 29 Chromosomenregionen differenziert werden. Die Chromosom 3, 4, 7- 9, 12, 13-16, 18, 21 und X spezifischen DNA Sonden färbten je ein Chromosomenpaar von *S. boliviensis* an. Die *S. oedipus* Chromosom 1 und 2 spezifischen DNA Sonden lieferten Signale auf Chromosomen (-regionen) von je drei Paaren und die Chromosom 6 spezifische DNA Sonde zeigte Signale auf zwei Chromosomenpaaren von *S. boliviensis*. Alle übrigen DNA Sonden hybridisierten jeweils nur eine Region eines Chromosomenpaares. Folgende Assoziationen konnten mit *S. oedipus* DNA Sonden nachgewiesen werden: 1/2, 1/11, 2/19, 5/20, 6/10 und 17/22.

Die Ergebnisse der Experimente mit menschlichen und *S. oedipus* chromosomen-spezifischen DNA Sonden sind in Abbildung 4.29 (A) zusammengefasst. Eine Auswahl von FISH Experimenten veranschaulicht Abbildung 4.11.

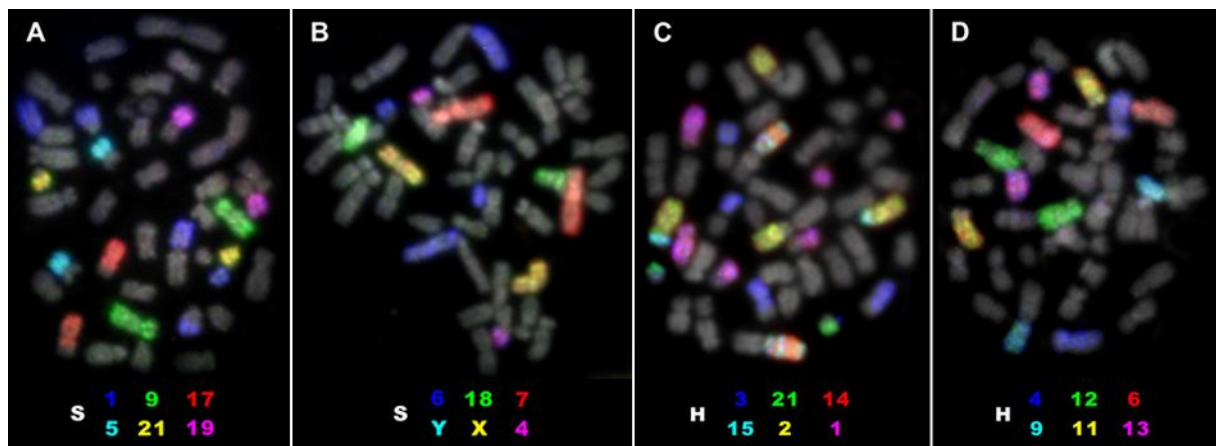
Abbildung 4.11: FISH Experimente mit sechs- und siebenfarben Sonden Sets des Menschen und *S. oedipus* auf Metaphasen von *S. boliviensis*. **A)** repräsentiert die Hybridisierung mit *S. oedipus* Sonden Set S2 und **B)** mit Sonden Set S4. **C)** zeigt die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set H1 und **D)** mit Sonden Set H4.



4.1.2.2.4 *Saimri ustus*

Die Charakterisierung des weiblichen Individuums von *S. ustus* ($2n=44$) ergab sowohl mit menschlichen, als auch mit *S. oedipus* sechsfarben Sonden Sets, identische Hybridisierungsmuster zu *S. sciureus* und *S. boliviensis* - abgesehen von Chromosomenregionen, die offenbar aus Heterochromatin zusammengesetzt sind. Abbildung 4.12 veranschaulicht Beispiele für Hybridisierungsexperimente mit Sonden Sets des Menschen und *S. oedipus*. Eine Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse menschlicher und *S. oedipus* DNA Sonden illustriert Abbildung 4.29 (B).

Abbildung 4.12: Auswahl von FISH Experimenten mit menschlichen und *S. oedipus* sechsfarben Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *S. ustus*. **A)** zeigt die Hybridisierung mit *S. oedipus* Sonden Set 1, **B)** mit *S. oedipus* Sonden Set 3. **C)** illustriert die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 1 und **D)** mit dem menschlichen Sonden Set 3.



4.1.2.2.5 *Saimiri sciureus*

Vergleichende Genomkarten zwischen *S. sciureus*, *S. oedipus* und Mensch wurden bereits in meiner Diplomarbeit erstellt. Die Kartierung menschlicher homologer Chromosomenregionen ist in Stanyon et al. (2000) dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ferner, mittels der Methode *ReFISH*, M-FISH Karyotypierungen mit menschlichen und *L. lagothericha* Sonden Sets im 24- bzw. 31-farben Format durchgeführt. Hierbei wurde ein weibliches Individuum von *S. sciureus* mit $2n=44$ Chromosomen untersucht.

Hybridisierung des 31-Farben L. lagotracha Sonden Sets:

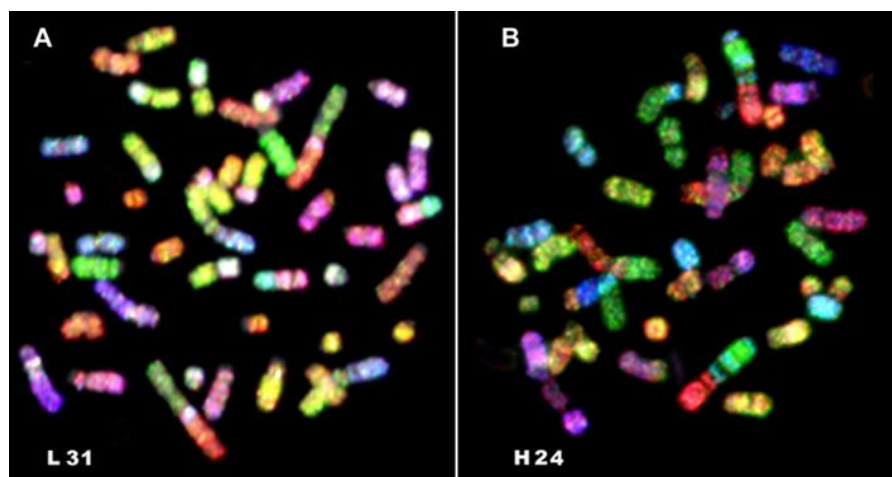
Die Hybridisierung der *L. lagotracha multiplex* Sonde auf Metaphasechromosomen von *S. sciureus* zeigte, dass von den 31 verschiedenen *L. Lagotracha* Chromosomen nur die Homologen zu den *L. Lagotracha* Chromosomen 1, 2, 4- 6, 7, 8, 10, 23, 26 und X vollständig konserviert bei *S. sciureus* waren. DNA Sonden, spezifisch für die übrigen *L. lagotracha* Chromosomen, wiesen Homologie zu einer Region auf einem oder zwei Chromosomenpaaren von *S. sciureus* nach. Folgende Assoziationen homologer *L. lagotracha* Chromosomen (-regionen) konnten identifiziert werden: 2/11/3, 9/28, 10/27, 12/22, 13/25, 15/29, 18/21/24/21/24/21 und 14/24/14/19. *L. lagotracha* Chromosom 3, 9, 11, 14, 19, 24, und 28 spezifische Sonden erlaubten eine Differenzierung folgender homologer menschlicher Chromosomensegmente: 1a₁/1a₂, 4a/4b/4a/4c, 5a/5b, 5a/7a, 14/15a₂/14/15a₂/14/15a₁.

Hybridisierung des menschlichen 24-Farben Sonden Sets:

Durch die Hybridisierung der menschlichen *multiplex* Sonde konnte eine simultane Darstellung aller 24 menschlichen Homologen erzielt werden. Die Ergebnisse dieser Hybridisierung deckten sich mit den Kartierungsergebnissen von Stanyon et al. (2000).

Die Abbildung 4.13 dokumentiert *ReFISH* Experimente mit dem menschlichen 24-farben und *L. lagotracha* 31-farben Sonden Set. Die Ergebnisse der Kartierung menschlicher und *L. lagotracha* DNA Sonden, sowie der bereits in meiner Diplomarbeit eingesetzten *S. oedipus* DNA Sonden, sind in der Abbildung 4.30 zusammengefasst.

Abbildung 4.13: M-FISH Karyotypierung mittels sequentieller Hybridisierung (*ReFISH*) bei *S. sciureus*. **A)** zeigt die Hybridisierung des 31-farben Sets von *L. lagotracha* (L 31) und **B)** die Hybridisierung des menschlichen 24-farben Sonden Sets (H 24).



4.1.2.3 *Cross species chromosome painting bei Aotinae (Nacht- und Springaffen)*

4.1.2.3.1 *Aotus infulatus*

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets:

Die Hybridisierungen mit menschlichen sechsfarben DNA Sonden Sets auf Metaphasen eines männlichen Individuums mit $2n=49$ Chromosomen ergaben insgesamt 42 Signale pro haploidem Chromosomensatz von *A. infulatus*. Die menschlichen Chromosomen 6, 9, 12, 13, 17, 19 und X sind im Karyotyp von *A. infulatus* als separate Chromosomen konserviert. Die Chromosom 14, 18, 21 und 22 spezifischen DNA Sonden hybridisierten zusammen mit anderen menschlichen Sonden auf je eine Region eines Chromosomenpaares von *A. infulatus*. Die übrigen 13 chromosomen-spezifischen DNA Sonden lieferten multiple Signale auf zwei bis drei Chromosomenpaaren. Folgende homologe menschliche Chromosomensegmente lagen assoziiert auf je einem Chromosom von *A. infulatus* vor: 1/16, 1/3/21, 2/20, 2/7, 4/15/5, 5/7/11/10, 5/15, 8/18, 10/22/16 und 15/14/15/14. Die ungerade Anzahl von 49 Chromosomen bei *A. infulatus* ist auf eine Y-autosomale Translokation zurückzuführen. Die Y-chromosomen-spezifische Region konnte mit der menschlichen Y chromosom-spezifischen DNA Sonde nicht identifiziert werden. Sie ist vermutlich mit dem zum Menschen homologen Chromosomensegment 15a₁ assoziiert und am p Terminus des entsprechenden Chromosoms von *A. infulatus* lokalisiert, da diese p-terminale Region im heterozygoten Zustand vorlag und von keiner Sonde hybridisiert wurde (siehe hierzu Abbildung 4.14 C und Abbildung 4.30 B).

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Mit den *S. oedipus* sechs- und siebenfarben Sonden Sets konnten insgesamt 37 distinkte Chromosomenregionen unterschieden werden. Die Chromosom 3, 5, 7, 8, 12, 16- 18, 19 und X spezifischen DNA Sonden wiesen Chromosomenformen nach, die im Karyotyp von *S. oedipus* und *A. infulatus* konserviert sind. Alle übrigen DNA Sonden hybridisierten homologe Regionen auf je zwei bis drei Chromosomenpaaren von *A. infulatus*. Die Y-spezifische Chromosomenregion konnte auch mit der *S. oedipus* Y chromosomen-spezifischen Sonde nicht nachgewiesen werden. Zur Überprüfung bestimmter chromosomaler Homologien wurde ein dreifarben Kontrollexperiment mit den *S. oedipus* chromosom 1 (Biotin-dUTP markiert), 2 (Digoxigenin-dUTP markiert) und 9 (Tamra-dUTP markiert) -spezifischen DNA Sonden durchgeführt. Biotin und Digoxigenin markierte Sonden wurden hierbei nach dem gleichen Detektionsschema nachgewiesen wie die menschlichen und *S. oedipus* sechsfarben Sonden

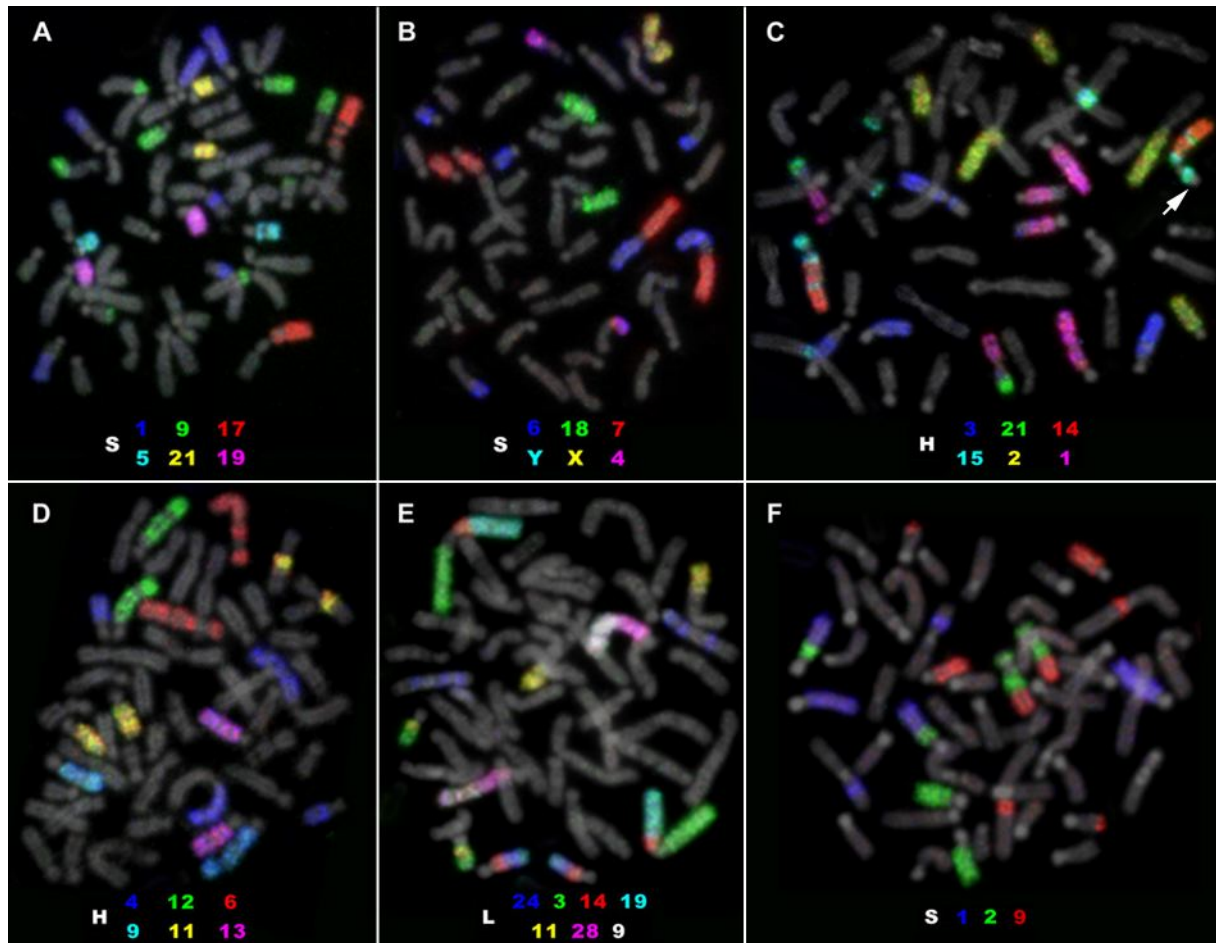
Sets. Die Hybridisierung mit diesem Sonden Set bestätigte die mit *S. oedipus* sechsfarben Sonden Sets nachgewiesenen Homologien und das Vorliegen der Assoziationen der *S. oedipus* homologen Chromosomen 1/2 und 2/9 (siehe Abbildung 4.14 F).

Hybridisierung des siebenfarben L. lagothericha Sonden Sets:

Die Charakterisierung von *A. infulatus* mit dem *L. lagothericha* siebenfarben Sonden Set ergab folgendes Hybridisierungsmuster (definiert als homologe menschliche Chromosomen-segmente): Die Segmente 1a₁ und 1a₂ lagen assoziiert auf einem Chromosom von *A. infulatus* vor. Die Segmente 4a, 4b und 4c bildeten syntene Regionen entlang eines Chromosoms von *A. infulatus*. Mit den übrigen Sonden dieses Sonden Sets konnten folgende subchromosomale Regionen differenziert werden: 5b/15/4a/4c, 5a/5b/15, 5a/7a/11/10 und 15a₂/15a₁/14/15₂/15a₁/14.

Eine Auswahl von FISH Experimenten mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* Sonden Sets ist in Abbildung 4.14 veranschaulicht. Eine Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse mit den genannten Sonden ist anhand des Karyotyps von *A. infulatus* (siehe Abbildung 4.31 B) illustriert.

Abbildung 4.14 (siehe nächste Seite): Auswahl von FISH Experimenten mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* sechs- und siebenfarben Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *A. infulatus*. **A)** veranschaulicht die Hybridisierung mit *S. oedipus* Sonden Set 1 und **B)** mit *S. oedipus* Sonden Set 3. **C)** zeigt die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 1. Ein heteromorphes Chromosomenpaar von *A. infulatus* konnte mit diesem Sonden Set identifiziert werden, wobei ein Homologes eine zusätzliche Chromosomenregion am p-terminalen Ende aufwies (siehe Pfeil) und das andere Homologe nicht. Dieses Hybridisierungsmuster und des Fehlen eines separaten Y Chromosoms bei der Spezies *A. infulatus*, deuten auf eine Y- autosomale Translokation hin. **D)** repräsentiert die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 3. **E)** illustriert FISH mit dem *L. lagothericha* siebenfarben Sonden Set und **F)** ein Kontrollexperiment mit den *S. oedipus* chromosomen-spezifischen Sonden 1, 2 und 9.



4.1.2.3.2 *Aotus trivirgatus*

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets

Die Hybridisierung mit menschlichen Sonden auf Metaphasen eines weiblichen Individuums mit $2n=54$ Chromosomen erlaubte eine Differenzierung von 40 Chromosomensegmenten pro haploidem Chromosomensatz. Von den 24 verschiedenen menschlichen DNA-Sonden wiesen nur die Chromosomen 6, 9, 12, 13, 17, 18 und X spezifische Sonden homologe Chromosomen von *A. trivirgatus* nach, die zwischen Mensch und *A. trivirgatus* konserviert sind. Alle übrigen zum Menschen homologen Chromosomen lagen im Karyotyp von *A. trivirgatus* fragmentiert vor. Folgende Assoziationen menschlicher homologer Chromosomensegmente konnten identifiziert werden: 1/3/21, 1/16, 2/20, 4/15, 5/7/11/10, 11/19, 14/15/14/15 und 16/22.

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Die Chromosomen 8, 11-13, 16, 17, 19 und X spezifischen DNA-Sonden färbten jeweils ein Chromosompaar von *A. trivirgatus* vollständig an. Die übrigen DNA-Sonden identifizierten

jeweils nur eine homologe Chromosomenregion und/oder hybridisierten an mehrere Chromosomenpaare von *A. trivirgatus*.

Hybridisierung des 31-Farben L. lagothericha Sonden Sets:

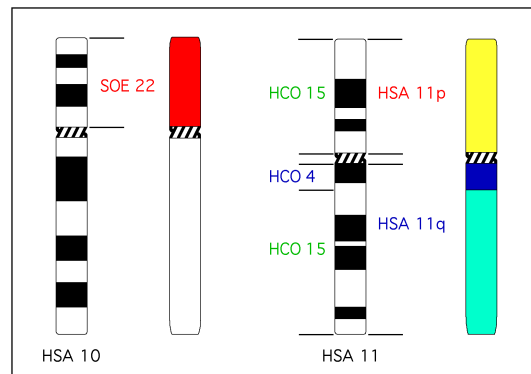
Die Hybridisierung der *L. lagothericha multiplex* Sonde zeigte, dass von den 31 verschiedenen *L. Lagothericha* Chromosomen nur die Homologen zu den Chromosomen 1, 5, 7, 8, 10, 15, 18, 20, 22 und X vollständig konserviert bei *A. trivirgatus* waren. DNA Sonden, spezifisch für die übrigen *L. lagothericha* Chromosomen lieferten multiple Signale auf einem oder mehreren Chromosomenpaaren von *A. trivirgatus*. Es konnten folgende Assoziationen von homologen *L. lagothericha* Chromosomen (-segmenten) nachgewiesen werden: 2/26, 11/3, 12/15, 13/17, 14/24/19, 21/24/21/24/21, 23/25, 27/17/11, 28/9, 29/14/19 und 30/6. Die Kartierung der *L. lagothericha* Chromosom 3, 9, 11, 14, 19, 24, und 28 spezifischen Sonden erlaubten eine, im Vergleich zu menschlichen und *S. oedipus* DNA Sonden nähere Differenzierung folgender subchromosomaler Regionen (als homologe menschliche Chromosomensegmente definiert): 1a₁/1a₂, 4a/4b/4c, 5a/5b, 5a/7a, 4c/4a und 15a₁/15a₂.

Subregionale Differenzierung des homologen menschlichen Chromosoms 11

Ziel dieses FISH Experimentes war die Überprüfung, ob es sich bei der nachgewiesenen Assoziation der zum Menschen homologen Chromosomensegmente 10b/11 bei *A. trivirgatus* und *C. donacophilus* um die gleichen Chromosomenregionen des homologen menschlichen Chromosoms 11 handelt, die assoziiert mit der homologen menschlichen Chromosomenregion 10p sind. Zur subregionalen Differenzierung des zum Menschen homologen Chromosoms 11 wurden Chromosom 4 (Biotin-dUTP markiert) und 15 (Digoxigenin-dUTP markiert) spezifische DNA Sonden des Gibbons *H. concolor* verwendet, als auch chromosomarm-spezifische DNA Sonden des menschlichen Chromosoms 11 (11p Tamra-dUTP markiert, 11q Biotin-dUTP markiert). Die *S. oedipus* Chromosom 22 spezifische Sonde (Tamra-dUTP markiert) diente zum Nachweis der zum Menschen homologen Chromosomenregion 10p. Die genannten Sonden wurden zu einem Sonden Set zusammengefasst und auf Metaphasen von *A. trivirgatus* und *C. donacophilus* hybridisiert. Der Nachweis der Reportermoleküle erfolgte analog zu dem der bereits erwähnten menschlichen und *S. oedipus* Sonden Sets. Die Kartierung dieser Sonden auf menschliche Chromosomen 10 und 11 ist in der Abbildung 4.15 schematisch dargestellt. Die Hybridisierung dieses Sonden Sets auf Metaphasen von *A. trivirgatus* zeigte, dass die türkisfarbene Chromosomenregion, homolog zu einer Region des menschlichen

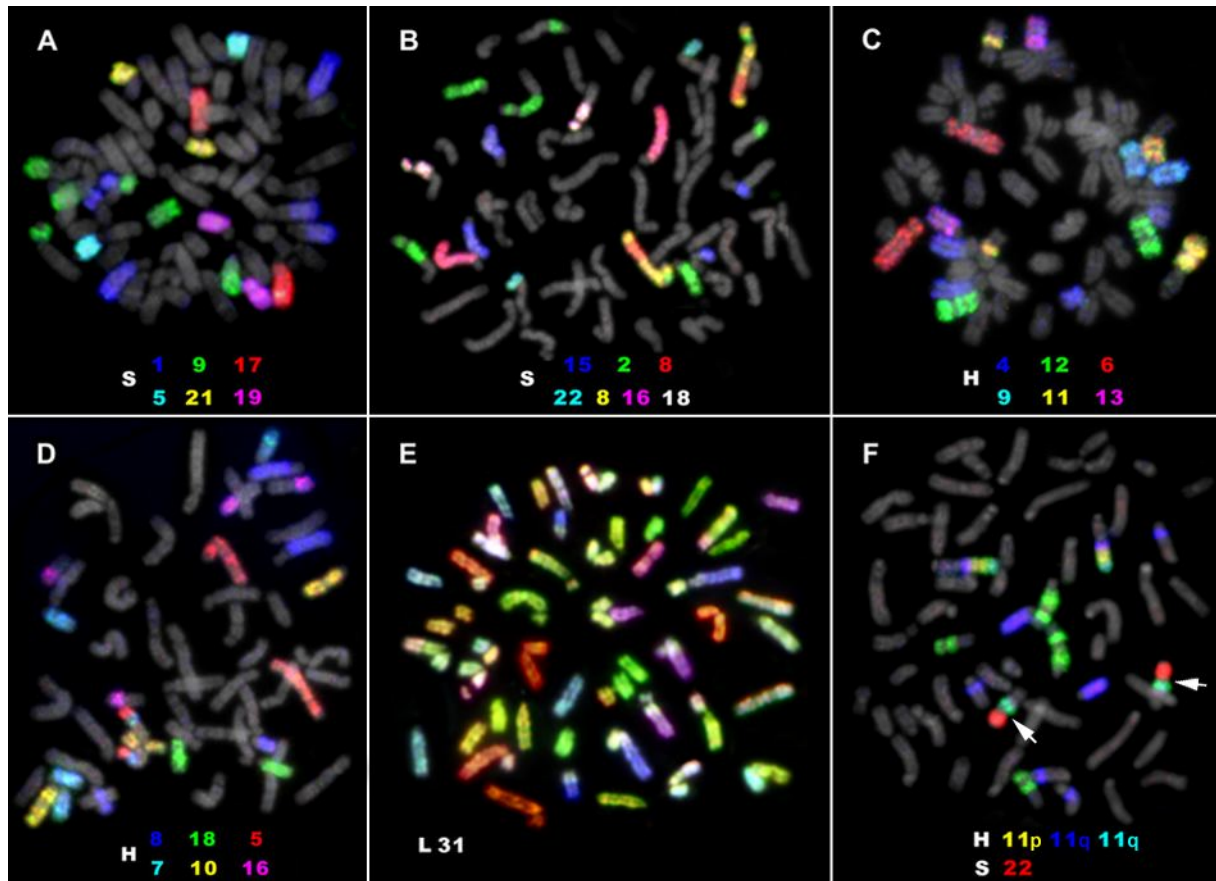
Chromosomenarms 11q assoziiert mit dem homologen menschlichen Chromosomensegment 10p (10b) war (siehe Abbildung 4.15 F).

Abbildung 4.15: Schematische Darstellung der menschlichen G-gebänderten Chromosomen 10 und 11 mit der Kartierung Chromosom 4 und 15 spezifischer DNA Sonden des Gibbons, chromosomarm-spezifischer Sonden des menschlichen Chromosoms 11 und der Chromosom 22 spezifischen Sonde des Lisztaffen *S. oedipus*. Co-hybridisierung der Gibbon Chromosom 15 (=HSA 11p, 11q13.1-qter) spezifischen Sonden mit der menschlichen chromosomarm 11p spezifischen Sonde resultierte in einer gelben Mischfarbe. Co-hybridisierung der Gibbon Chromosom 4 (=HSA 11q11-13.1) spezifischen Sonden mit der menschlichen Chromosom 11q spezifischen Sonde ergab eine blaue Farbe. Da die Gibbon Chromosom 15 spezifische Sonde auch Homologie zu einer Region des homologen menschlichen Chromosomenarms 11q zeigte, wurde dieser zusätzlich in eine türkisfarbene Region (durch Co-hybridisierung mit der menschlichen Chromosom 11q spezifischen Sonden) differenziert. HSA=*Homo sapiens*



Eine Zusammenfassung der Hybridisierungsexperimente mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* Sonden Sets veranschaulicht Abbildung 4.16. Die Ergebnisse der Kartierung dieser Sonden auf Chromosomen von *A. trivirgatus* sind in der Abbildung 4.31 A dargestellt.

Abbildung 4.16 (siehe nächste Seite): Repräsentative FISH Experimente mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* chromosomen-spezifischen Sonden Sets. **A)** veranschaulicht die Hybridisierung mit dem *S. oedipus* Sonden Set 1, **B)** mit dem *S. oedipus* Sonden Set 4. **C)** illustriert die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 3 und **D)** die Hybridisierung des siebenfarbenen *L. lagothericha* Sonden Sets. **E)** zeigt *Re-FISH* mit dem *L. lagothericha* 31-farbenen Sonden Set (L 31). **F)** illustriert ein Kontrollexperiment mit chromosomarm-spezifischen Sonden des menschlichen Chromosoms 11, Chromosom 4 und 15 spezifischen Sonden des Gibbons *H. concolor* und einer Chromosom 22 spezifischen DNA Sonde von *S. oedipus*. Diese *multiplex* Sonde erlaubte eine Differenzierung des homologen menschlichen Chromosoms 11 in eine gelbe Region, die homolog zum menschlichen Chromosomenarm 11p ist, und in eine türkisfarbene und blaue Chromosomenregion, die homolog zum menschlichen Chromosomenarm 11q sind. Die *S. oedipus* Chromosom 22 spezifische Sonde diente dem Nachweis der homologen menschlichen Chromosomenregion 10p, die in *A. trivirgatus* assoziiert mit der türkisfarbenen Chromosomenregion, homolog zur menschlichen Chromosomenregion 11q ist (siehe Pfeile).



4.1.2.3.3 *Callicebus donacophilus*

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets

Mit den vier menschlichen sechs-farben Sonden Sets konnten insgesamt 46 distinkte Regionen auf Chromosomen eines männlichen Individuums mit einem Chromosomensatz von $2n=50$ identifiziert werden. Von den 24 verschiedenen menschlichen Chromosomen waren nur die Homologen zu den Chromosomen 6 und X vollständig konserviert in *C. donacophilus*. Die menschlichen Chromosom 9, 14, 18, 20, 21 und 22 spezifische Sonden kartierten jeweils auf eine Region eines Chromosomenpaares von *C. donacophilus*. Alle übrigen chromosomen-spezifischen Sonden zeigten Homologie zu zwei oder mehr Chromosomenpaaren von *C. donacophilus*. Es konnten folgende Assoziationen homologer menschlicher Chromosomen (-segmente) nachgewiesen werden: 2/16/2/16, 3/21, 5/7/5/7/9, 7/15, 8/18, 10/ 11, 10/16/10/16, 13/17, 14/15, 17/20 und 22/2/22. Die Assoziation 12/19 konnte auf zwei Chromosomen von *C. donacophilus* beobachtet werden. Ergänzend zu Hybridisierungen mit menschlichen sechs-farben Sonden Sets wurde ein dreifarben FISH Experiment mit den menschlichen Chromosom 13 (Biotin-dUTP markiert), 17 (Digoxigenin-UTP markiert) und 20 (Tamra-dUTP markiert) spezifischen DNA Sonden durchgeführt. Dieses Experiment diente der

Überprüfung der Assoziation der zum Menschen homologen Chromosomensegmente 13/17 und 17/20 (siehe Abbildung 4.17 E).

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Die Chromosom 3, 4, 8, 10, 11, 15- 21 und X spezifischen DNA Sonden färbten je ein Chromosom von *C. donacophilus* vollständig an. Mit den DNA Sonden 13, 14 und 22 wurde jeweils ein Signal auf einer Region eines Chromosomenpaares von *C. donacophilus* erhalten. Die *S. oedipus* Chromosom 5- 7, 9 und 12 spezifischen Sonden hybridisierten an Chromosomen (-regionen) von je zwei Paaren und die Chromosom 1 und 2 spezifischen Sonden an Chromosomen (-regionen) von je drei Paaren. Das Y-Chromosom wurde mit der *S. oedipus* Y-chromosomen-spezifischen Sonde nicht angefärbt.

Hybridisierung des siebenfarben L. lagothericha Sonden Sets:

Die subregionale Differenzierung mittels *L. lagothericha* DNA Sonden erlaubte die Definition der Chromosomenformen 1a₁/1a₂/1a₁, 4a/4b/4c, 4c, 5b/5a/7a, und 5b (als homologe menschliche Chromosomensegmente definiert). Das zum Menschen homologe Chromosomensegment 15a₂ wurde am q Terminus von *C. donacophilus* Chromosom 12 lokalisiert.

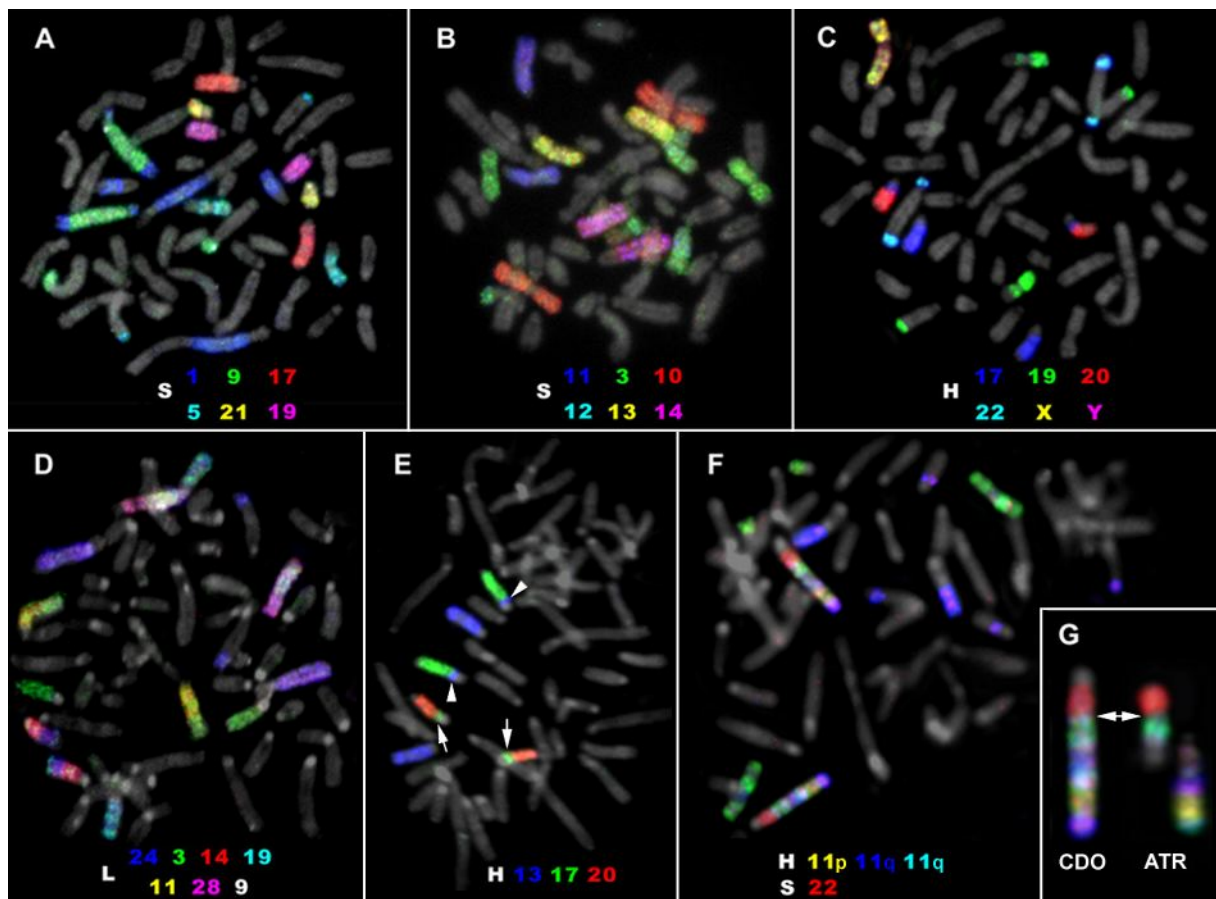
Subregionale Differenzierung des homologen menschlichen Chromosoms 11

Die Kartierung des Sonden Sets zur subregionalen Differenzierung des homologen menschlichen Chromosoms 11 (Sondenkomposition, siehe Hybridisierung auf *A. trivirgatus*, Abb. 4.16F) auf Metaphasechromosomen von *C. donacophilus*, diente der Identifizierung derjenigen subchromosomalen Region des homologen menschlichen Chromosoms 11, welche bei *C. donacophilus* assoziiert vorliegt mit dem homologen menschlichen Chromosomensegment 10b. Das resultierende Hybridisierungsmuster zeigte, dass die türkisfarbene subchromosomale Region des homologen menschlichen Chromosoms 11 assoziiert ist mit dem homologen menschlichen Chromosoms 10b. In der vorliegenden Auflösung von FISH mit den hier verwendeten DNA Sonden deutet dies auf die gleiche Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 10b/11 hin wie bei der Spezies *A. trivirgatus*.

Eine Auswahl an FISH Experimenten mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* sechs- und siebenfarben Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *C. donacophilus* ist in den

Abbildungen 4.17 A-D dargestellt. Abbildung 4.17 E zeigt ein ergänzendes drei-farben FISH Experiment zur Überprüfung chromosomaler Homologien. Die Kartierung des Sonden Sets zur subregionalen Differenzierung des homologen menschlichen Chromosoms 11 auf Chromosomen von *C. donacophilus* ist in Abbildung 4.17 F illustriert. Abbildung 4.17 G bietet hierzu einen Vergleich mit *A. trivirgatus*. Eine Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* Sonden Sets auf Chromosomen von *C. donacophilus* ist in Abbildung 4.32 A dargestellt.

Abbildung 4.17: Beispiele für FISH Experimente mit menschlichen, *S. oedipus*, *L. lagothericha* sechs- und siebenfarben Sonden Sets, sowie verschiedene Kontrollexperimente auf Metaphasen von *C. donacophilus*. **A)** illustriert die Hybridisierung mit dem *S. oedipus* Sonden Set 1 und **B)** mit dem *S. oedipus* Sonden Set 2. **C)** zeigt die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 4 und **D)** mit dem *L. lagothericha* siebenfarben Sonden Set. **E)** repräsentiert die Hybridisierung mit den menschlichen Chromosom 13, 17 und 20 spezifischen DNA Sonden **F)** veranschaulicht die Hybridisierung mit chromosomarm-spezifischen Sonden des menschlichen Chromosoms 11, der Chromosom 4 und 15 spezifischen Sonden des Gibbons *H. concolor* und der *S. oedipus* Chromosom 22 spezifischen DNA Sonde **G)** stellt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abb. 4.16 F und Abb. 4.17 F mit den homologen menschlichen Chromosomen 10b/11 von *A. trivirgatus* (ATR) und *C. donacophilus* (CDO) dar. Sowohl bei der Spezies *C. donacophilus*, als auch bei *A. trivirgatus* ist die türkisfarbene Chromosomenregion assoziiert mit dem homologen menschlichen Chromosomensegment 10b (rot).



4.1.2.4 *Cross species chromosome painting bei Pitheciinae (Sakis und Uakaris)*

4.1.2.4.1 *Cacajao calvus*

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets:

Der menschliche SONDENSATZ differenzierte den Karyotyp eines männlichen Individuums der Spezies *C. calvus* mit $2n=45$ Chromosomen in 35 distinkte Regionen pro haploidem Chromosomensatz. Die homologen menschlichen Chromosomen 4, 6, 9, 13, 17, 19, 22 und X sind bei *C. calvus* als separate Chromosomen konserviert. Die Chromosomen 12, 14, 18, 20 und 21 spezifischen Sonden zeigten Homologie zu je einer Region eines Chromosomenpaares von *C. calvus*. Mit den Sonden 1-3, 5, 7, 8, 10, 15 und 16 identifizierten homologe Chromosomen (-regionen) auf jeweils zwei oder drei Paaren. Folgende homologe menschliche Chromosomensegmente lagen assoziiert vor: 1/12, 2/10, 2/16, 3/5, 3/20/15/14, 3/21, 5/7, 8/18 und 10/16/10/16. Die Chromosom 11 spezifische DNA Sonde färbte sowohl ein akrozentrisches Chromosom vollständig an, als auch den langen Arm eines submetazentrischen Chromosoms. Der kurze Arm dieses Chromosoms wurde von keiner DNA Sonde hybridisiert. Dieses asymmetrische Hybridisierungsmuster, sowie die ungerade Anzahl von 45 Chromosomen im diploiden Chromosomensatz deuten auf eine Y- autosomale Translokation hin, wobei die Y- spezifische Region vermutlich auf dem nicht hybridisierten Chromosomenarm lokalisiert ist.

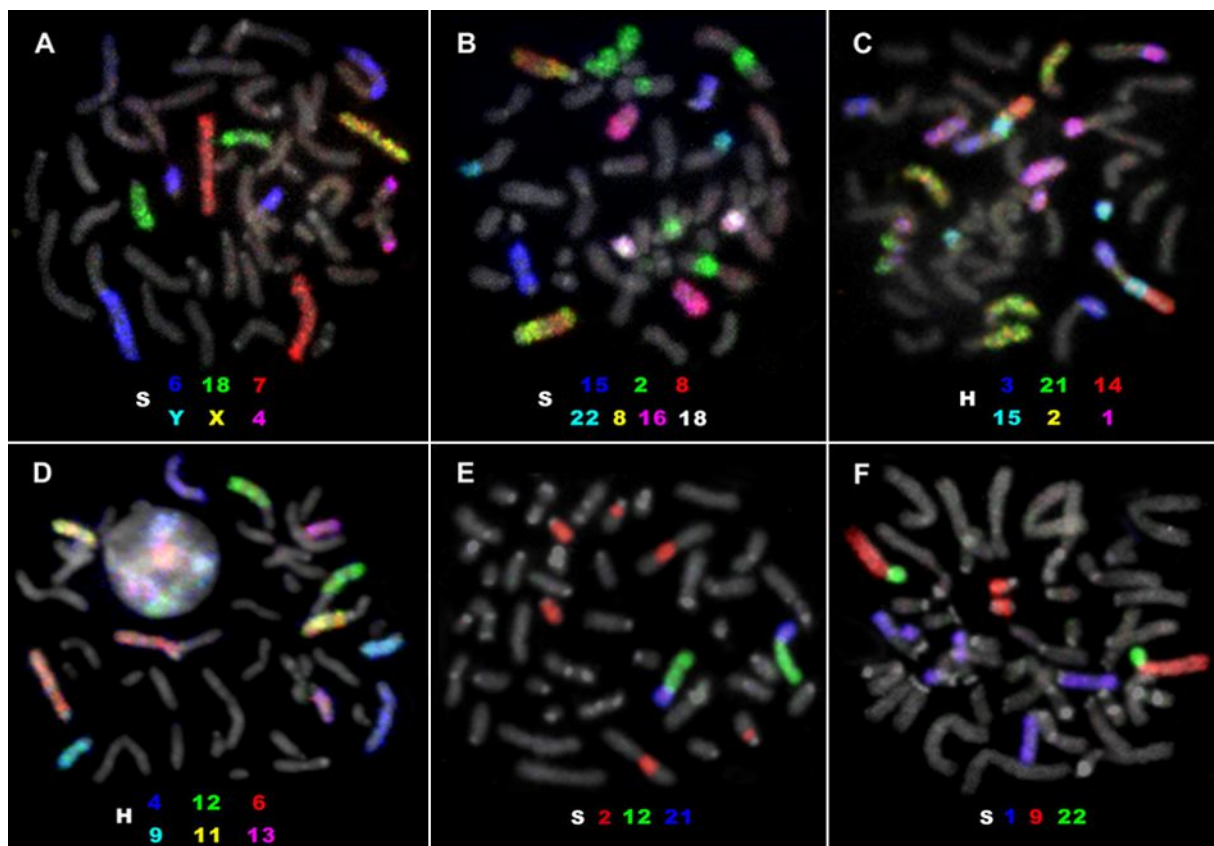
Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Die *S. oedipus* Chromosom 3-5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18, 20 und X spezifischen DNA Sonden färbten je ein Chromosomenpaar von *C. calvus* vollständig an. Die Sonden 11, 12, 17, 21 und 22 hybridisierten je eine Chromosomenregion. Die *S. oedipus* Chromosom 1, 3, 6 und 9 spezifischen Sonden zeigten Homologie zu Chromosomen (-regionen) von je zwei oder 3 Paaren. Die Chromosom 14 spezifische DNA Sonde färbte analog zu der menschlichen Chromosom 11 spezifischen Sonde den langen Chromosomenarm eines metazentrischen Chromosoms, sowie ein akrozentrisches Chromosom von *C. calvus* an. Zur Überprüfung der Assoziation der *S. oedipus* homologen Chromosomen 9/22 und chromosomaler Homologien zu *S. oedipus* Chromosom 1 wurde ein dreifarben Experiment mit *S. oedipus* Chromosom 1, 9 und 22 spezifischen DNA Sonden durchgeführt. Die Überprüfung der Assoziation 9/22 erschien insbesondere wichtig, da diese auch in der Spezies *Chiropotes satanas* (Neusser 1999) nachgewiesen wurde. Ferner wurde zur Überprüfung der Assoziation der *S. oedipus*

homologen Chromosomen 12/21 und zum sicheren Nachweis chromosomaler Homologien zu *S. oedipus* Chromosom 2 eine Hybridisierung mit *S. oedipus* Chromosom 2, 12 und 21 durchgeführt. Beide Kontrollexperimente verifizierten die vorher mit *S. oedipus* und menschlichen DNA Sonden nachgewiesenen Assoziationen (siehe Abbildung 4.18 E und F).

Abbildung 4.18 zeigt Beispiele für FISH Experimente mit menschlichen und *S. oedipus* DNA Sonden Sets. Eine Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse mit den genannten Sonden auf Chromosomen von *C. calvus*, ist in Abbildung 4.32 B dargestellt.

Abbildung 4.18: Auswahl von FISH Experimenten mit menschlichen und *S. oedipus* chromosomen-spezifischen DNA Sonden auf Metaphasen von *C. calvus*. **A)** zeigt die Hybridisierung mit dem *S. oedipus* Sonden Set 3 und **B)** mit dem *S. oedipus* Sonden Set 4. **C)** illustriert die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 1 und **D)** mit dem menschlichen Sonden Set 3. **E)** und **F)** repräsentieren Kontrollexperimente mit *S. oedipus* chromosomen-spezifischen DNA Sonden zur Überprüfung chromosomaler Homologien. Das in **E)** illustrierte Experiment diente dem Nachweis der Assoziation der *S. oedipus* homologen Chromosomen 12/21 und der Homologie zu *S. oedipus* Chromosom 2. Das FISH Experiment in **F)** diente zur Überprüfung der Assoziation der *S. oedipus* homologen Chromosomen 9/22 und der Homologie zu *S. oedipus* Chromosom 1.

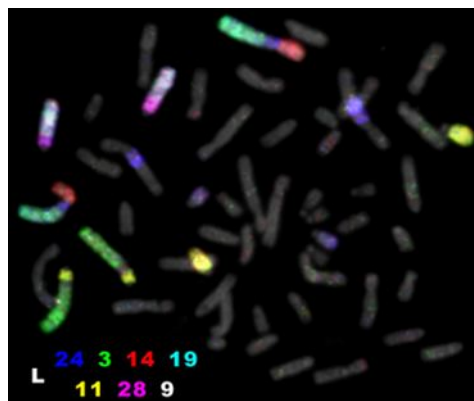


4.1.2.4.2 *Chiropotes satanas*

Hybridisierung des siebenfarben L. lagothericha Sonden Sets:

Vergleichende Genomkarten basierend auf Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit menschlichen und *S. oedipus* DNA Sonden Sets wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit erstellt. Die ergänzende Hybridisierung des siebenfarben *L. lagothericha* Sonden Sets auf Metaphasen eines männlichen Individuums der Spezies *C. satanas* mit $2n=54$ Chromosomen erlaubte eine zusätzliche Differenzierung subchromosomaler Regionen einiger Chromosomen. Folgende assoziierte Chromosomensegmente (als menschliche Homologe definiert) konnten mit diesen Sonden Set definiert werden: $1a_1/1a_2$, $4a/4b/4c$, $5a/5b$ und $5a/7a$. Das homologe menschliche Chromosom $15a_2$ spezifische Segment kartierte auf die perizentromerische Region von *C. satanas* Chromosom 1. Die Hybridisierung mit diesem Sonden Set ist in der Abbildung 4.19 veranschaulicht.

Abbildung 4.19: Differenzierung subchromosomaler Regionen von *C. satanas*, homolog zu den menschlichen Chromosomensegmenten $1a_1$ (weiss), $1a_2$ (magenta), $4a$ (rot), $4b$ (blau) $4c$ (türkis) $5a/7a$ (gelb), $5b$ (grün) und $15a_2$, mittels Hybridisierung des *L. lagothericha* (L) siebenfarben Sonden Sets.



4.1.2.5 *Cross species chromosome painting* bei *Atelinae* (Brüllaffen, Klammeraffen und Wollaffen)

4.1.2.5.1 *Ateles paniscus paniscus*

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets:

Die Charakterisierung eines männlichen Individuums mit einem Chromosomensatz von $2n=32$ mit menschlichen Sonden Sets zeigte, dass die homologen menschlichen

Chromosomen im Karyotyp von *A. p. paniscus* stark fragmentiert wurden. Es wurden insgesamt 46 Signale pro haploidem Chromosomensatz von *A. p. paniscus* erhalten. Einzig die homologen menschlichen Chromosomen 11, 17 und X wurden als separate, zwischen Mensch und *A. p. paniscus* konservierte Chromosomenformen identifiziert. Die Chromosom 9, 13, 14, 18- 22 spezifischen DNA Sonden hybridisierten jeweils an eine Region eines Chromosomenpaares. Alle übrigen chromosomen-spezifischen DNA Sonden lieferten multiple Signale auf zwei bis drei Chromosomenpaaren. Folgende Assoziationen homologer menschlicher Chromosomensegmente konnten nachgewiesen werden: 1/2/16, 1/6/1/6/1, 1/7/3/13, 2/3/15/22, 2/10, 4/7/5/7, 5/8, 6/3/21, 9/18/8/16/10/16, 12/15/14/1/4/15 und 19/20.

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

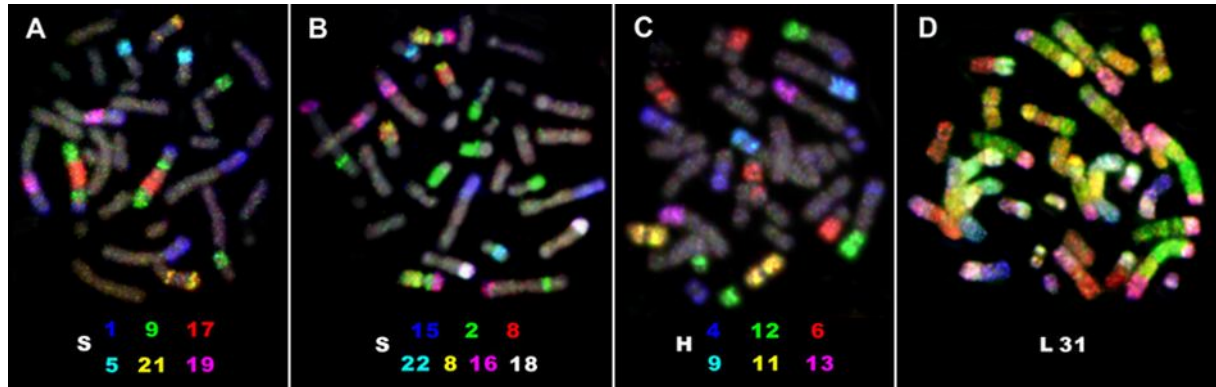
Mit den *S. oedipus* DNA Sonden Sets konnten insgesamt 39 Signale pro haploidem Chromosomensatz von *A. p. paniscus* differenziert werden. Signale von fünf chromosomen-spezifischen Sonden (2, 7, 12, 14 und X) überspannten jeweils ein ganzes Chromosompaar, während die *S. oedipus* DNA Sonden 3- 5, 9-11, 13, 15, 17- 22 jeweils eine Region eines Chromosomenpaares hybridisierten. Die übrigen chromosomen-spezifischen DNA Sonden zeigten Homologie zu Regionen auf mehreren Chromosomenpaaren.

Hybridisierung des 31-Farben L. lagothericha Sonden Sets:

Mittels *ReFISH* der *L. lagothericha multiplex* Sonde konnte nachgewiesen werden, dass von den 31 verschiedenen *L. Lagothericha* Chromosomen nur die Homologen der Chromosomen 10, 14, 17 und X vollständig konserviert auf separaten Chromosomen in *A. p. paniscus* vorlagen. DNA Sonden für die übrigen *L. Lagothericha* Chromosomen lieferten multiple Signale auf mehreren Chromosomenpaaren oder identifizierten eine homologe Region eines Chromosompaares von *A. p. paniscus*.

Beispiele für Hybridisierungen mit menschlichen *S. oedipus* und *L. lagothericha* Sonden Sets, sind in der Abbildung 4.20 dargestellt. Die vergleichende Genomkarte mit den homologen Chromosomenregionen zum Menschen, *S. oedipus* und *L. lagothericha*, ist in Abbildung 4.33 B illustriert.

Abbildung 4.20: FISH mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *A. p. paniscus*. **A)** zeigt die Hybridisierung mit dem *S. oedipus* Sonden Set 1 und **B)** mit dem *S. oedipus* Sonden Set 4. **C)** veranschaulicht die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 3. **D)** dokumentiert die M-FISH Karyotypierung mit der *L. lagothericha* 31-farben *multiplex* Sonde (L 31) anhand einer Übereinanderlagerung der FISH Aufnahmen des *L. lagothericha* Subsets L1 und L2.



4.1.2.5.2 *Ateles belzebul marginatus*

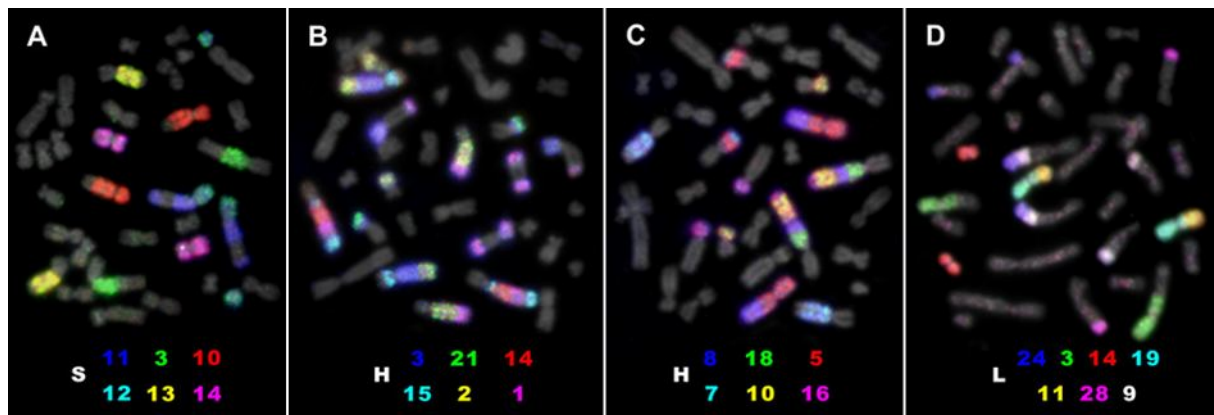
Die Kartierung chromosomen-spezifischer DNA Sonden des Menschen und *S. oedipus* auf Metaphasechromosomen eines männlichen Individuus mit $2n=34$ Chromosomen von *A. b. marginatus* resultierte in übereinstimmenden Hybridisierungsmustern wie bei der Spezies *A. p. paniscus* (siehe oben), mit folgenden Ausnahmen: Im Unterschied zu *A. p. paniscus*, bei der eine Assoziation der zum Menschen homologen Chromosomensegmente 1/7/3/13 nachgewiesen wurde, zeigte die Spezies *A. b. marginatus* eine Assoziation 1/7/3 und ein separates Chromosom homolog zum menschlichen Chromosom 13. Weiterhin wies *A. b. marginatus* Chromosom 7 eine Assoziation der zum Menschen homologen Chromosomenregionen 1/6/1 auf, während in *A. p. paniscus* eine Abfolge der homologen menschlichen Chromosomensegmente 1/6/1/6/1 beobachtet wurde.

Hybridisierung des siebenfarben L. lagothericha Sonden Sets:

Die Hybridisierung des siebenfarben *L. lagothericha* DNA Sonden Sets erlaubte die Identifizierung folgender Chromosomenformen: $1a_1/6/1$, $1a_2/7/3$, $12/15a_1/14/1a_1/4b/15a_2$, $4a$, $4c/7a/5a/7a$ und $5b/8$.

Beispiele für FISH Experimente mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* chromosomen-spezifischen Sonden veranschaulicht Abbildung 4.21. Die Kartierung dieser Sonden auf Chromosomen von *A. b. marginatus* sind Abbildung 4.33 A illustriert.

Abbildung 4.21: Dokumentation von FISH Experimenten mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagotricha* sechs- und siebenfarbenen Sonden Sets auf Metaphasen von *A. b. marginatus*. **A)** illustriert die Hybridisierung mit dem *S. oedipus* Sonden Set 2, **B)** mit dem menschlichen Sonden Set 1 und **C)** mit dem menschlichen Sonden Set 2. **D)** veranschaulicht die Hybridisierung mit dem *L. lagotricha* siebenfarbenen Sonden Set



4.1.2.5.3 *Lagothrix lagotricha*

Reziprokes chromosome painting zwischen Mensch und *L. lagotricha* ist in Stanyon et al. 2001b beschrieben. Die Ergebnisse von Stanyon et al. (2001) wurden überprüft durch Hybridisierung menschlicher sechsfarbenen Sonden Sets auf Metaphasen von *L. lagotricha*, sowie durch Hybridisierung des *L. lagotricha* siebenfarbenen Sonden Sets auf Metaphasen des Menschen. Von den publizierten Daten abweichende Kartierungsergebnisse sind bereits in Kapitel 4.1.1.3 dargestellt worden. Ergänzend dazu wurde reziprokes *chromosome painting* zwischen *S. oedipus* und *L. lagotricha* durchgeführt. Die Hybridisierung des *L. lagotricha* siebenfarbenen Sonden Sets auf Metaphasen von *S. oedipus* ist in Kapitel 4.1.2.1 beschrieben.

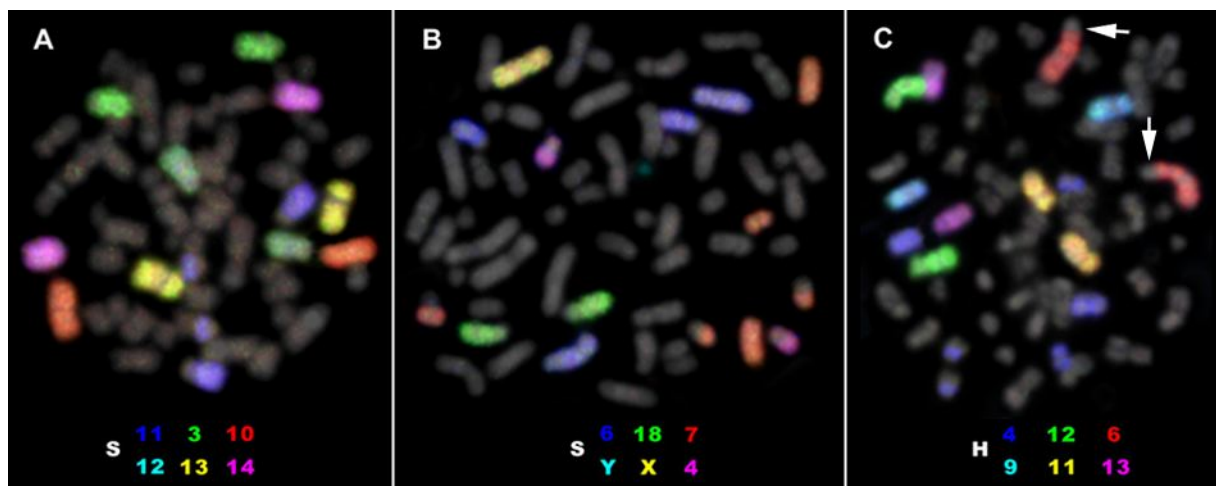
Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets auf Metaphasen von L. lagotricha:

Mit Ausnahme der Chromosom 1, 2, 6, 7, 9, 11 und 16 spezifischen DNA Sonden von *S. oedipus* färbten alle übrigen DNA Sonden je ein Chromosomenpaar von *L. lagotricha* ganzheitlich an. Die *S. oedipus* Sonden 6, 16, 9 und 11 hybridisierten an Chromosomen (-regionen) von je zwei und die DNA Sonden 1, 2 und 7 an Chromosomen (-regionen) von je drei Paaren von *L. lagotricha*. Die *S. oedipus* Chromosom 1 und 2 spezifischen DNA Sonden zeigten Homologie zu *L. lagotricha* Chromosom 8. Die *S. oedipus* Chromosom 7 und 11 spezifischen Sonden identifizierten eine homologe Region auf *L. lagotricha*

Chromosom 24. Das Y-Chromosom von *L. lagothericha* zeigte ein schwaches Hybridisierungssignal.

Die Abbildung 4.22 dokumentiert FISH mit *S. oedipus* und menschlichen Sonden Sets auf Chromosomen von *L. lagothericha* anhand ausgewählter Beispiele. Die vergleichende Genomkarte mit den zum Menschen und *S. oedipus* homologen Chromosomenregionen von *L. lagothericha* ist in Abbildung 4.34 A illustriert.

Abbildung 4.22: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit menschlichen und *S. oedipus* Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *L. Lagothericha*. **A)** illustriert die Hybridisierung mit *S. oedipus* Sonden Set 2, **B)** mit *S. oedipus* Sonden Set 3. **C)** zeigt die Hybridisierung mit dem menschlichen Sonden Set 3. Die menschliche Chromosom 6 spezifische DNA Sonde färbte *L. lagothericha* Chromosom 1 unvollständig an, da die heterochromatische Region am distalen p-Arm von *L. lagothericha* Chromosom 1 (siehe Pfeile) keine Homologie zum menschlichen Genom zeigte.



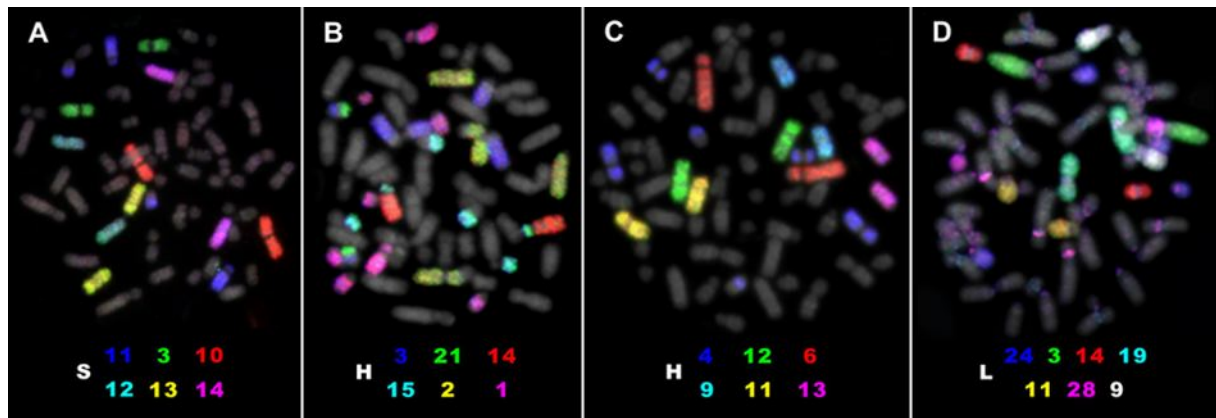
4.1.2.5.4 *Brachyteles archnoides*

Die Charakterisierung des männlichen Individuums der Spezies *B. archnoides* mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* sechs- und siebenfarbenen Sonden Sets resultierte in dem gleichen Hybridisierungsmuster (mit Ausnahme von heterochromatischen Regionen), wie bei der Spezies *L. lagothericha*. Kreuzhybridisierung von Zentromerregionen einiger Chromosomen von *B. archnoides* konnte mit *L. lagothericha* Chromosom 9, 19 und 28 spezifischen Sonden beobachtet werden (siehe Abb. 4.23 D) Diese waren jedoch deutlich schwächer ausgeprägt, verglichen mit der starken Kreuzhybridisierung, die mit *L. lagothericha*

chromosomen-spezifischen Sonden auf Metaphasechromosomen von *L. lagothericha* zu beobachten war (siehe hierzu Abbildung 4.2 A).

Die Abbildung 4.23 zeigt eine Auswahl von FISH Experimenten mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von *B. arachnoides*. In der Abbildung 4.34 (B) sind die Hybridisierungsergebnisse mit diesen Sonden Sets anhand des Karyotyps von *B. arachnoides* zusammengefasst.

Abbildung 4.23: FISH Experimente mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* sechs- und siebenfarbenen Sonden Sets auf Metaphasen von *B. arachnoides*. **A)** zeigt die Hybridisierung mit dem *S. oedipus* Sonden Sets 2, **B)** mit dem menschlichen Sonden Set 1 und **C)** mit dem menschlichen Sonden Set 3. **D)** veranschaulicht die Hybridisierung mit dem *L. lagothericha* siebenfarbenen Sonden Set.



4.1.2.5.5 Gattung *Alouatta* (Brüllaffen)

Die Charakterisierung der Spezies *Alouatta caraya*, *A. seniculus macconnelli* und *A. fusca* mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* chromosomen-spezifischen DNA Sonden wurde im Rahmen dieser Dissertation in Zusammenarbeit mit Dr. Edivaldo de Oliveira durchgeführt und ist in de Oliveira et al. (2002) dokumentiert. Die Abbildung 4.24 zeigt hierzu einige Beispiele von FISH Experimenten. Die Hybridisierungsergebnisse sind anhand vergleichender Genomkarten dieser Spezies zusammengefasst (siehe Abb. 4.35 und 4.36).

4.1.2.5.5.1 *Alouatta caraya*

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets

Es wurde sowohl ein männliches Individuum mit einem Chromosomensatz von $2n=52$, X_1X_2/Y_1Y_2 , als auch ein weibliches Individuum mit einem Chromosomensatz von $2n=52$, X_1X_1/X_2X_2 untersucht. Mit den menschlichen Sonden Sets 1-4 konnten insgesamt 36 distinkte Signale auf Autosomen pro haploidem Chromosomensatz detektiert werden. Die homologen menschlichen Chromosomen 6, 11, 12, 13, 17, 19 und X sind im Karyotyp von *A. caraya* als separate Chromosomen konserviert. Alle übrigen chromosomen-spezifischen Sonden identifizierten eine Region eines Chromosomenpaares oder hybridisierten an mehr als ein Chromosomenpaar von *A. caraya*. Folgende syntene Regionen homologer menschlicher Chromosomen (-segmente) konnten jeweils auf einem Chromosomenpaar nachgewiesen werden: 1/5/7/5/7, 2/20, 3/21, 4/15, 4/16, 8/18, 9/22, 10/16/10/16, 14/15. Die menschlichen Chromosom 3 und 15 spezifischen DNA Sonden zeigten ein asymmetrisches Hybridisierungsmuster im männlichen Individuum: Sie wiesen sowohl eine Assoziation 3/15 auf einem metazentrischen, als auch auf einem submetazentrischen Chromosom nach. Zudem konnte Homologie zum menschlichen Chromosom 3 auf einem akrozentrischen Chromosom identifiziert werden. Dies führte zur Definition der Geschlechtschromosomen $X_1X_2Y_1Y_2$ im männlichen Individuum und $X_1X_1X_2X_2$ im weiblichen Individuum. Homologie zum menschlichen Y Chromosom konnte nicht direkt nachgewiesen werden. Vermutlich ist die Y spezifische Region auf dem kurzen Arm von *A. caraya* Chromosom Y_1 lokalisiert, da dieser von keiner Sonde hybridisiert wurde.

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Mit *S. oedipus* Sonden Sets wurden insgesamt 14 Chromosomen identifiziert (*S. oedipus* 3-5, 8, 12-15, 17, 18, 20-22 und X), die zwischen *S. oedipus* und *A. caraya* konserviert sind. Zehn chromosomen-spezifische DNA Sonden von *S. oedipus* wiesen folgende Assoziationen homologer *S. oedipus* Chromosomen nach: 1/2, 2/9, 6/16, 7/10 und 7/11. Mit den *S. oedipus* Chromosom 9 und 19 spezifischen DNA Sonden konnte ein asymmetrisches Hybridisierungsmuster analog zu den Ergebnissen mit menschlichen Chromosom 3 und 15 spezifischen Sonden, beobachtet werden. Alle übrigen DNA Sonden hybridisierten an zwei oder mehr Chromosomenpaare von *A. caraya*.

Hybridisierung des siebenfarben L. lagothericha Sonden Sets:

Die Hybridisierung mit dem *L. lagothericha* siebenfarben Sonden Set auf Chromosomen von *A. caraya* ergab folgendes Ergebnis: Die Chromosomenformen 1a₁, 4a und 4b/15a₂ (als homologe menschliche Chromosomensegmente definiert) sind zwischen *A. caraya* und *L. lagothericha* konserviert. Die homologen Regionen zu den Chromosomenformen 1a₁, 5b und 5a/7a lagen assoziiert auf Chromosom 1 von *A. caraya* vor. Die homologe Region zu dem menschlichen Chromosomensegment 4c wurde auf dem langen Arm von *A. caraya* Chromosom 4 identifiziert.

4.1.2.5.5.2 *Alouatta seniculus macconnelli*

Zwei Individuen (ein männliches und ein weibliches Individuum) aus der Region um *Jari River, Pará, Brasilien* und ein männliches Individuum aus der Region um *Uatumã River, Pará, Brasilien* (siehe 3.1) wurden untersucht. Alle Individuen wiesen die gleiche Anzahl an Chromosomen (2n=46) auf. Individuen aus verschiedenen geografischen Regionen unterschieden sich jedoch karyotypisch.

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets

Menschliche chromosomen-spezifische DNA Sonden ergaben insgesamt 43 Signale pro haploidem Chromosomensatz bei allen untersuchten Individuen. Die menschlichen Chromosom 12, 17 und X spezifischen DNA Sonden färbten je ein Chromosomenpaar von *A. s. macconnelli* vollständig an. Die übrigen chromosomen-spezifischen Sonden zeigten Homologie zu mehreren Chromosomenpaaren oder hybridisierten eine Region eines Chromosomenpaares. Folgende Assoziationen homologer menschlicher Chromosomen (-regionen) konnten nachgewiesen werden: 1/6, 1/20, 1/22/19, 2/4/15, 3/21, 4/10/16/10, 7/5/7/8, 7/14/15, 8/18, 10/16/11 und 13/19. Mit den menschlichen Chromosom 3 und 15 spezifischen Sonden wurde bei beiden untersuchten männlichen Individuen ein asymmetrisches Hybridisierungsmuster beobachtet, das demjenigen bei dem untersuchten männlichen Individuum von *A. caraya* entsprach. Folglich wurde das Geschlechtschromosomensystem, analog zu *A. caraya*, definiert als X₁X₂Y₁Y₂ für männliche und X₁X₁X₂X₂ für weibliche Individuen. Individuen aus verschiedenen geografischen Regionen (*Jari river* bzw. *Uatumã river*) wiesen folgende karyotypische Unterschiede auf: Das männliche Individuum aus der Region um *Uatumã river* wies die Chromosomenformen 2p/2q und ein separates Chromosom

16 auf, wohingegen bei dem weiblichen und männlichen Individuum aus der Region um *Jari river* die Chromosomenformen 2p/16 und ein separates Chromosom 2q identifiziert wurde.

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

Mit *S. oedipus* Sonden Sets wurden insgesamt 34 Signale auf Autosomen pro haploidem Chromosomensatz erhalten. Die homologen *S. oedipus* Chromosomen 2-4, 12, 17, 20 und X waren im Karyotyp von allen untersuchten Individuen von *A. s. macconnelli* konserviert. Alle weiteren homologen *S. oedipus* Chromosomen lagen im Karyotyp dieser Individuen fragmentiert vor. Folgende Assoziationen homologer *S. oedipus* Chromosomen konnten nachgewiesen werden: 2/21, 5/1/16, 5/2/1, 6/18, 7/15/22, 8/16, 9/7/11, 11/13 und 14/15. Die Chromosom 9 und 19 spezifischen Sonden zeigten ein asymmetrisches Muster von Signalen in männlichen Individuen analog zu den Hybridisierungsergebnissen bei *A. caraya*.

Hybridisierung des siebenfarben L. lagothericha Sonden Sets:

Die Charakterisierung mit *L. lagothericha* Sonden zeigte, dass die Chromosomenformen 4a und 5b zwischen den untersuchten Individuen von *A. s. macconnelli* und *L. lagothericha* konserviert sind. DNA Sonden, spezifisch für die übrigen *L. lagothericha* Chromosomen in diesem Sonden Set identifizierten jeweils eine homologe Region eines Chromosomenpaares dieser Individuen. Die homologe Region zu der Chromosomenform 5a/7a/5a wurde hierbei auf *A. s. macconnelli* Chromosom 12 lokalisiert, zu 4b/15a₂ auf Chromosom 11, zu 1a₁ auf Chromosom 5 und zu 1a₂ auf Chromosom 18.

Die hier untersuchten *A. s. macconnelli* Individuen wiesen 0-3 Chromosomen pro Zelle auf, welche von keiner der oben genannten DNA Sonde hybridisiert wurden und offenbar B-Chromosomen darstellen, wie sie bereits von Lima und Seuanez (1991) beschrieben wurden.

4.1.2.5.5.3 *Alouatta fusca*

Von der Spezies *Alouatta fusca* wurden je zwei Individuen der Subspezies *A. f. fusca* und *A. f. clamitans* untersucht. Die zwei männlichen Individuen von *A. f. clamitans* wiesen eine Chromosomenzahl von 2n=45 Chromosomen auf, während das untersuchte weibliche Individuum von *A. f. fusca* eine Chromosomenzahl von 2n=50 und das männliche Individuum von *A. f. fusca* eine Chromosomenzahl von 2n=49 zeigte.

Hybridisierung mit menschlichen Sonden Sets

Mit menschlichen chromosomen-spezifischen DNA Sonden wurden insgesamt 36 Signale auf Autosomen pro haploidem Chromosomensatz bei allen untersuchten Individuen erhalten. Die menschlichen Chromosom 9, 11, 12, 13, 19 und 20 spezifischen Sonden färbten jeweils ein homologes Chromosomenpaar von Individuen der Subspezies *A. f. fusca* vollständig an. Bei den zwei Individuen von *A. f. clamitans* wurden nur die zum Menschen homologen Chromosomenformen 13, 19 und 20 ganzheitlich angefärbt. In *A. f. fusca*, als auch *A. f. clamitans* konnten folgende Assoziationen homologer menschlicher Chromosomen (-segmente) auf Autosomen beobachtet werden: 1/14/15/6, 2/4/15/7/5/7, 3/21, 17/8/18, 10/16 und 16/10/22. Individuen von *A. f. clamitans* wiesen zudem die zwei weiteren Assoziationen 2/11 und 9/12 auf, welche gleichzeitig den Karyotypunterschied zwischen den beiden Subspezies definieren. In beiden Subspezies wurde ein komplexes asymmetrisches Hybridisierungsmuster bei den männlichen Individuen mit den menschlichen Chromosom 3 und 15 spezifischen DNA Sonden erhalten. Im Unterschied zu *A. caraya* und *A. seniculus* wurde das homologe menschliche Chromosom 3 Segment nicht auf dem Y₁ Chromosom beobachtet. Stattdessen war ein weiteres Segment mit Homologie zum menschlichen Chromosom 1 in die Y-autosomale Translokation involviert. Folglich wurde bei männlichen Individuen von *A. fusca* das Geschlechtschromosomen System als X₁X₂X₃Y₁Y₂ und bei weiblichen Individuen als X₁X₁X₂X₂X₃X₃ definiert. Die Y Chromosom spezifische Region selbst konnte nicht nachgewiesen werden. Sie liegt vermutlich zwischen den zum Menschen homologen Chromosomensegmenten 15b und 1b, da in dieser Region eine Hybridisierungslücke festgestellt wurde.

Hybridisierung mit S. oedipus (Zelllinie B95-8) Sonden Sets:

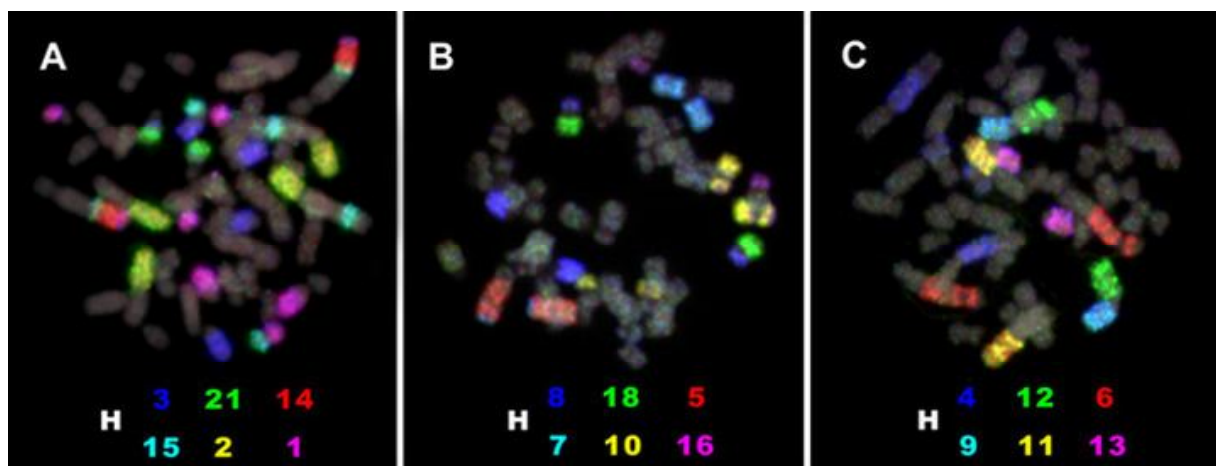
Chromosomen-spezifische Sonden von *S. oedipus* identifizierten neun Chromosomenpaare (homolog zu *S. oedipus* Chromosom 4, 5, 12-14, 17, 18, 21 und 22), die zwischen *S. oedipus* und *A. f. fusca* konserviert sind. In *A. f. clamitans* wurden sieben Chromosomenpaare (homolog zu *S. oedipus* Chromosom 4, 5, 13, 17, 18, 21, und 22) nachgewiesen, die zwischen *S. oedipus* und *A. f. clamitans* konserviert sind. Alle übrigen DNA Sonden *S. oedipus* zeigten Homologie zu mehreren Chromosomenpaaren oder zu einer Region eines Chromosomenpaares von *A. fusca*. Mit Chromosom 9, 19 und 20 spezifischen Sonden wurde ein asymmetrisches Hybridisierungsmuster in den männlichen Individuen von *A. fusca* und *A. f. clamitans* nachgewiesen, analog zu den Hybridisierungsergebnissen mit menschlichen Chromosom 1, 3 und 15 spezifischen Sonden.

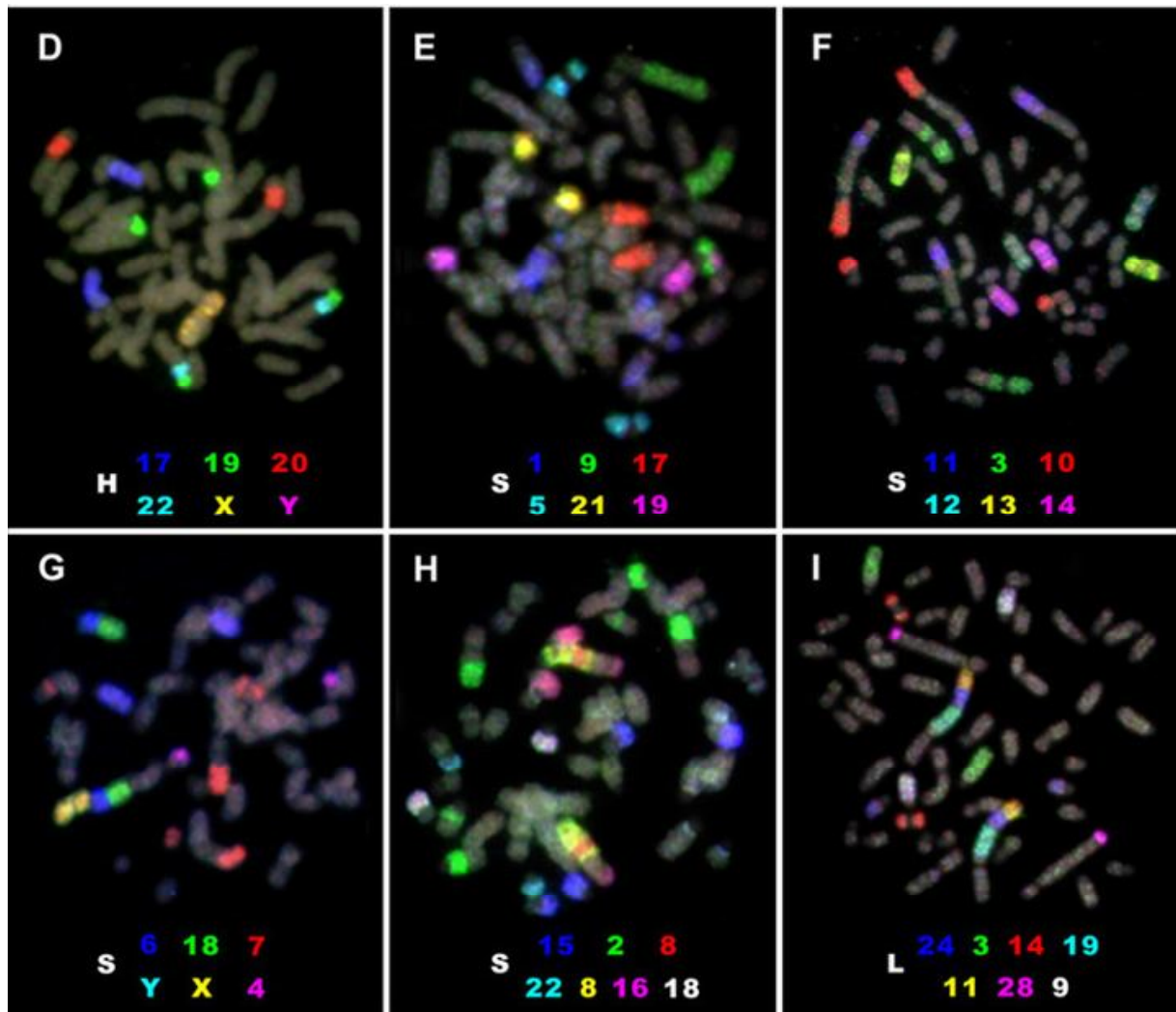
Hybridisierung des siebenfarben *L. lagothericha* Sonden Sets:

Das Hybridisierungsmuster, das mit dem *L. lagothericha* siebenfarben Sonden Sets erhalten wurde, war in beiden *A. fusca* Subspezies identisch. Die Chromosomenformen 1a1, 4a und 5b lagen als separate Chromosomen konserviert zwischen *A. fusca* und *L. lagothericha* vor. Die homologen zu den Chromosomenformen 4c, 4b/15a2, 7a/5a/7a lagen assoziiert auf Chromosom 1q von *A. fusca* vor. Die homologe Region zu der Chromsomenform 1a2 wurde auf Chromosom 2q identifiziert.

Die kurzen Arme der *A. f. clamitans* Chromosomen 6, 9, 11, X₃, sowie der kurze Arm von *A. f. fusca* Chromosom 7, wurden von keiner DNA Sonde hybridisiert. Diese sind vermutlich aus Heterochromatin zusammengesetzt, das weder im menschlichen, noch im *S. oedipus* und *L. lagothericha* Genom vorkommt (siehe hierzu Abbildung 4.24 F und Abbildung 4.36).

Abbildung 4.24: Repräsentative FISH Experimente mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* Sonden Sets auf Metaphasechromosomen von Spezies der Gattung *Alouatta*. **A-D)** illustrieren Hybridisierungen mit menschlichen sechsfarben Sonden Sets 1-4. **A)** zeigt die Hybridisierung des Sonden Sets 1 auf *A. f. clamitans*, **B)** des Sonden Sets 2 auf *A. caraya* (weibliches Individuum), **C)** des Sonden Sets 3 auf *A. f. clamitans* und **D)** des Sonden Sets 4 auf *A. s. macconnelli* (männliches Individuum aus der Region um *Uatumã River*). **E-H)** dokumentieren Hybridisierungen mit *S. oedipus* sechs- und siebenfarben Sonden Sets. **E)** illustriert die Hybridisierung des Sonden Sets 1 auf *A. caraya* (männliches Individuum), **F)** des Sonden Sets 2 auf *A. f. fusca* (weibliches Individuum), **G)** des Sonden Sets 3 auf *A. s. macconnelli* (männliches Individuum aus der Region um *Uatumã River*), **H)** des Sonden Sets 4 auf *A. caraya* (männliches Individuum). **I)** veranschaulicht die Hybridisierung des *L. lagothericha* siebenfarben Sonden Sets auf *A. f. fusca* (weibliches Individuum).





4.1.3 Vergleichende Genomkarten der untersuchten Neuweltaffen

Vergleichende Genomkarten wurden anhand von Karyogrammen G-gebänderter und DAPI gebänderter Metaphasechromosomen erstellt. Abbildungen von G-gebänderten Metaphasechromosomen der Spezies *Callithrix penicilata*, *Saimiri boliviensis*, *S. ustus*, *Saguinus imperator*, *Callicebus donacophilus*, *Lagothrix lagothricha*, *Brachyteles arachnoides*, *Ateles paniscus paniscus*, *Ateles belzebul marginatus*, *Leontopithecus chrysopygus*, *Cebus apella paraguayanus*, *C. albifrons*, *Alouatta seniculus macconnelli*, *A. caraya*, *A. fusca fusca*, *A. f. clamitans* und *Cacajao calvus* wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Pieczarka zur Verfügung gestellt. Das Karyogramm G-gebänderter Chromosomen von *Aotus trivirgatus* stammte aus der Publikation von Miller et al. (1977), dasjenige der Spezies *A. infulatus* aus Ma et al. (1976). Genomkarten der Spezies *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus* und des *C. jacchus x Cebuella pygmaea* Hybriden wurden anhand DAPI gebänderter Metaphasechromosomen erstellt.

Die Kartierung der hier verwendeten chromosomen-spezifischen DNA Sonden erfolgte unter Zuhilfenahme der invertierten DAPI Aufnahmen, die eine Identifizierung der Chromosomen erlaubte. Abbildungen 4.25-4.36 bieten eine Zusammenfassung der Charakterisierung der untersuchten Neuweltaffen mit menschlichen und *Saguinus oedipus* chromosomen-spezifischen DNA Sonden, sowie bei einigen Spezies zusätzlich mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden von *L. lagothericha*. Die vergleichende Genomkarte der Spezies *C. jacchus* beinhaltet darüber hinaus die Kartierung chromosomen-spezifischer DNA Sonden des Gibbons *H. concolor*. Horizontale Linien markieren hierbei die Grenzen der entsprechenden homologen Regionen, die in den jeweiligen Spezies mit den verwendeten *painting* Sonden nachgewiesen wurden. Hybridisierungslücken, die sich häufig aufgrund von zentromerischem Heterochromatin ergaben, wurden hierbei nicht berücksichtigt.

Abbildung 4.25 (siehe nächste Seite): Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse anhand DAPI-gebänderter Chromosomen (invertiert) von *Callithrix jacchus* (A) und G-gebänderter Chromosomen von *C. penicillata* (B). Die Chromosomennomenklatur folgt Sherlock et al. (1996). Jeweils rechts neben den Chromosomen sind die zum Menschen homologen Chromosomenregionen, links diejenigen zu *S. oedipus* angegeben. In A sind zusätzlich die homologen Regionen zu Chromosomen von *H. concolor* (rechts außen) und *L. lagothericha* (links außen) dargestellt.

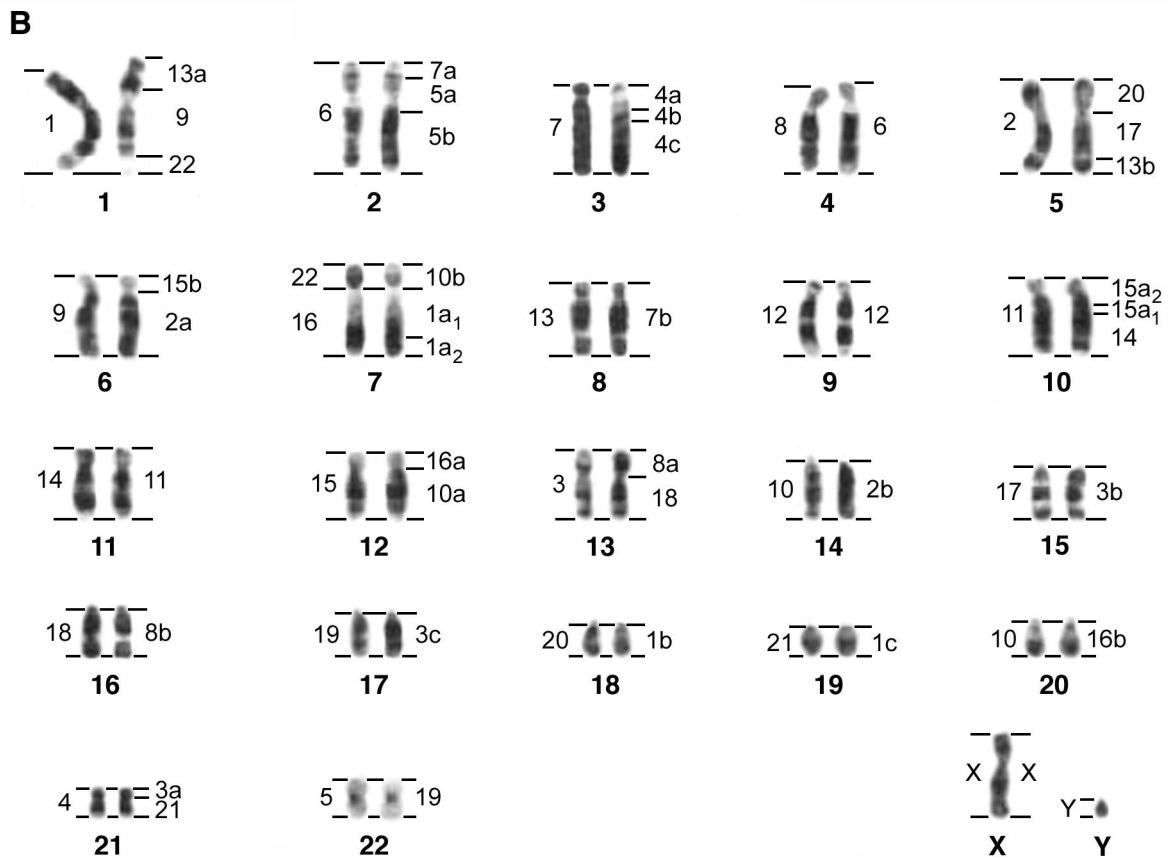
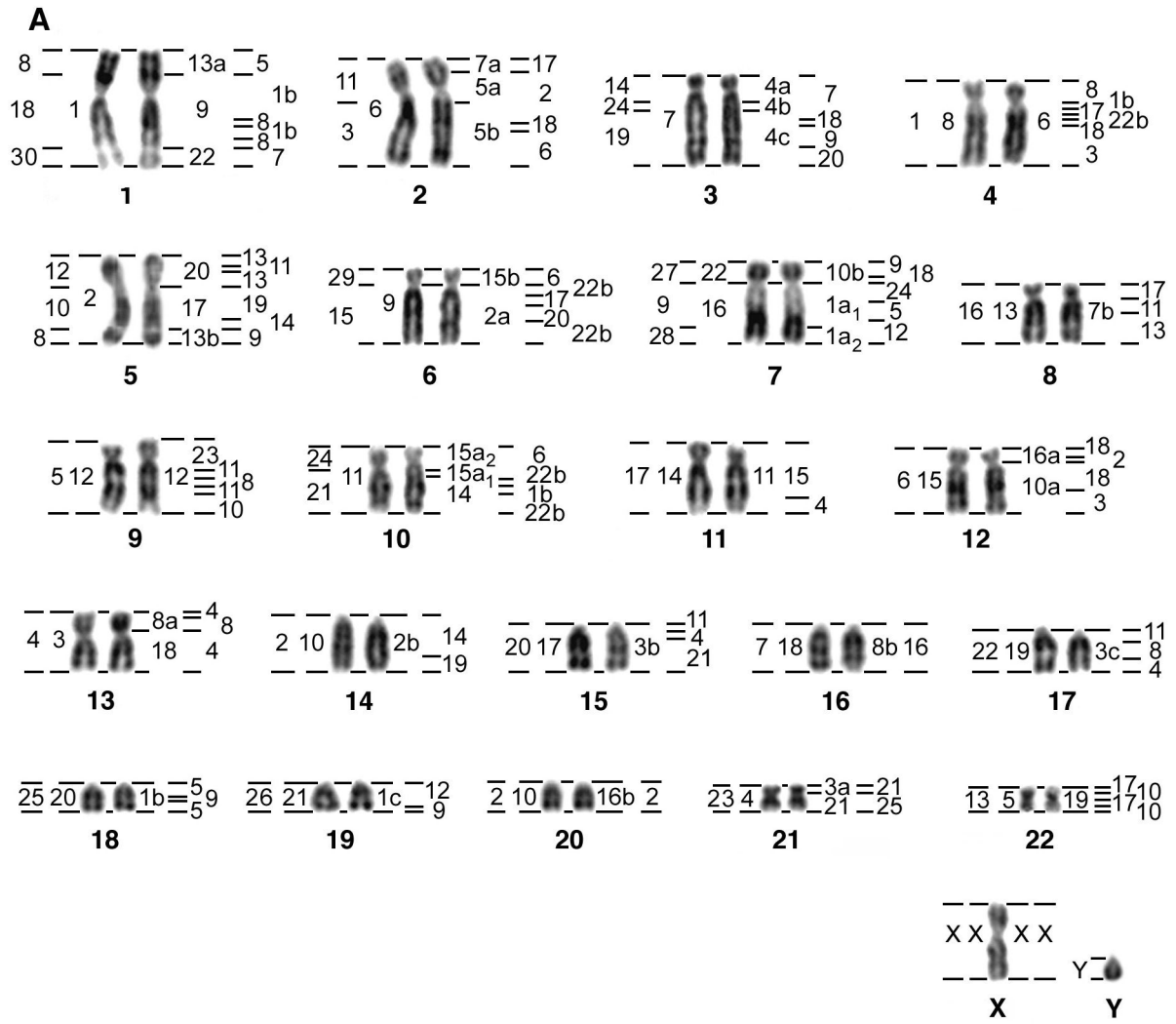


Abbildung 4.26: Karyogramm DAPI-gebänderter Chromosomen (invertiert) des männlichen *Callithrix jacchus* X *Cebuella pygmaea* Inter-Spezies Hybrid Individuums. Die Chromosomennomenklatur folgt Canavez et al. (1996). Zum Vergleich mit den korrespondierenden elterlichen Chromosomen, ist die Nomenklatur der entsprechenden Chromosomen von *C. jacchus* (links) und *C. pygmaea* (rechts) jeweils unterhalb der Chromosomen des Hybriden angegeben. Jeweils rechts neben den Chromosomen des Hybriden sind die zum Menschen homologen und jeweils links die zu *S. oedipus* homologen Chromosomenregionen illustriert. Links außen, ist die Kartierung chromosomen-spezifischer DNA Sonden von *L. lagotracha* dargestellt. Chromosomenregionen außerhalb der horizontalen Linien wurden von keiner Sonde angefärbt und sind vermutlich aus Heterochromatin zusammengesetzt. Insbesondere die Chromosomen 18 und 19 des Hybriden zeigten markante Größenunterschiede zwischen den elterlichen Chromosomen, die auf das Vorhandensein von zusätzlichem und vermutlich stark amplifiziertem Heterochromatin eines Homologen zurückzuführen sind.

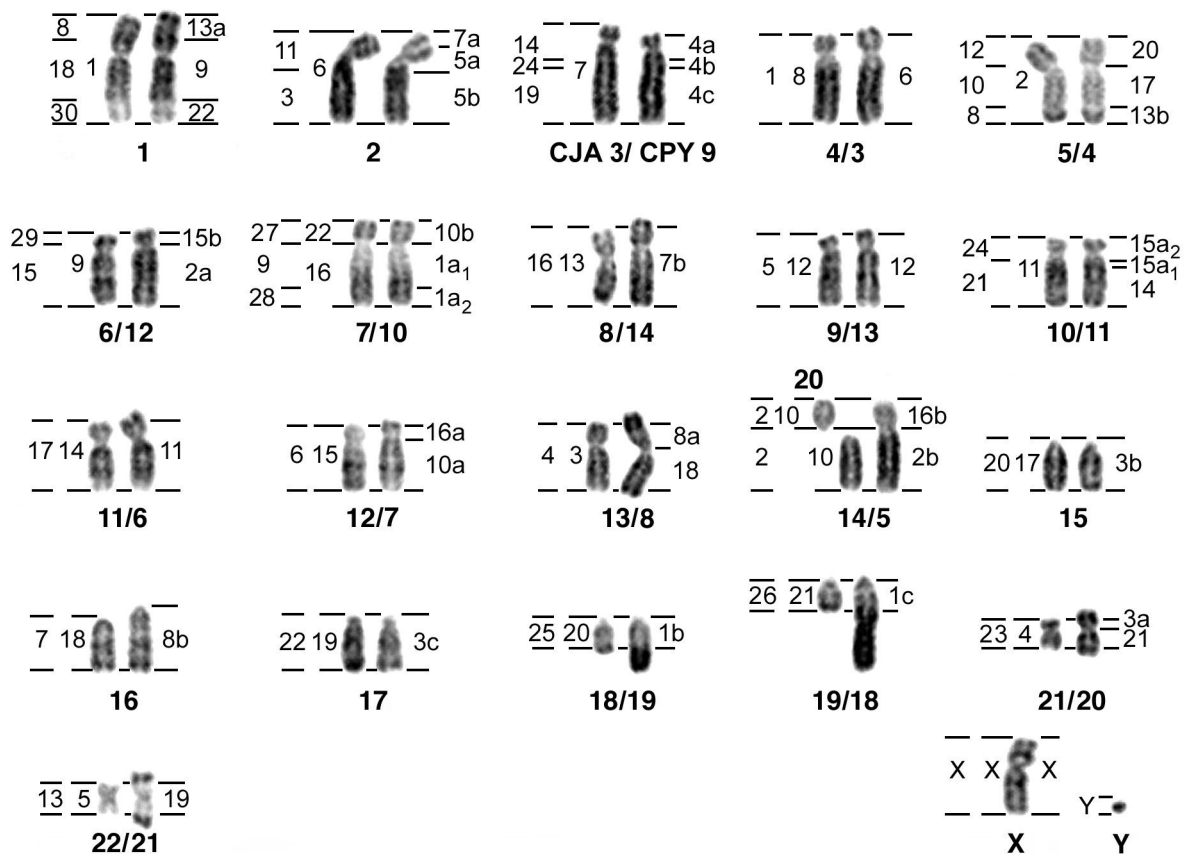
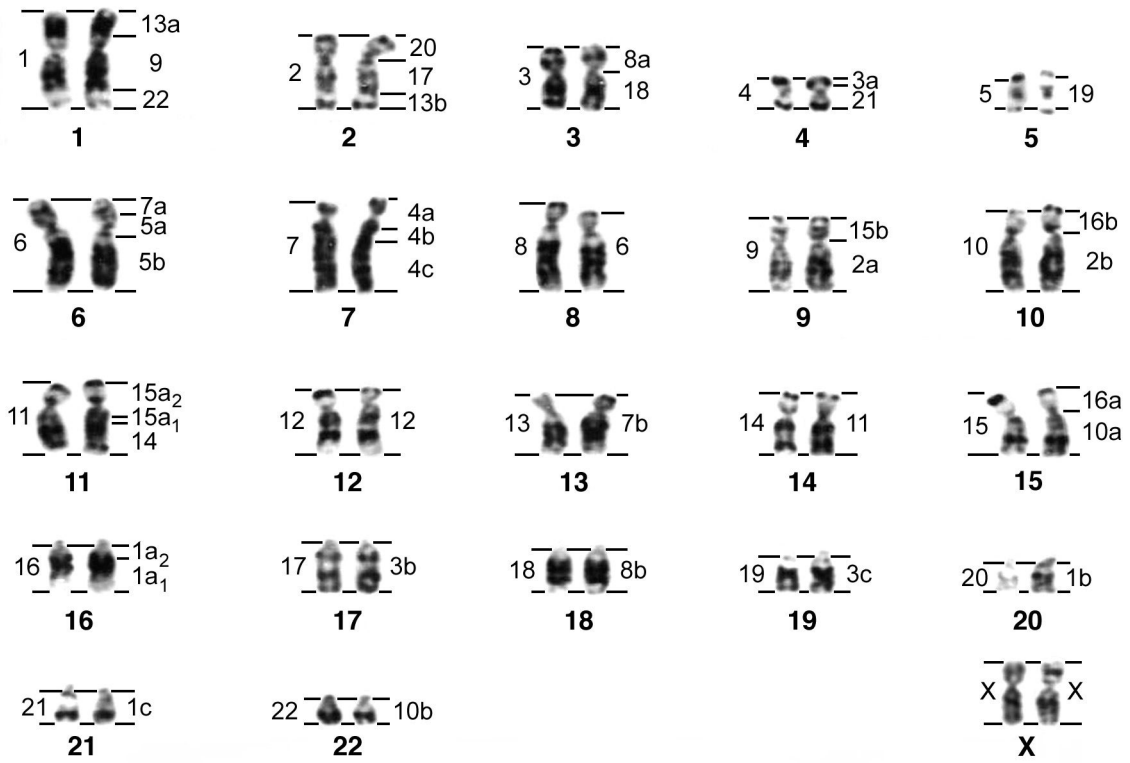


Abbildung 4.27 (siehe nächste Seite): Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse anhand G-gebänderter Chromosomen von *Saguinus imperator* (A) und *Leontopithecus chrysopygus* (B). Die Nomenklatur der Chromosomen in A) und B) folgt Nagamachi et al. (1997). Die zum Menschen homologen Chromosomenregionen sind jeweils rechts und die zu *S. oedipus* jeweils links neben einem Chromosomenpaar dargestellt. Chromosomale Regionen außerhalb der begrenzenden Linien zeigten keine Homologie zu den verwendeten Sonden. Sie sind vermutlich aus Heterochromatin zusammengesetzt, das im Genom des Menschen, sowie *S. oedipus* nicht vorkommt. So wurden die kurzen Arme der Chromosomen 16 bis 22, wie auch p-terminale Regionen der Chromosomen 2, 8 und 15 von *L. chrysopygus* von keiner Sonde angefärbt.

A



B

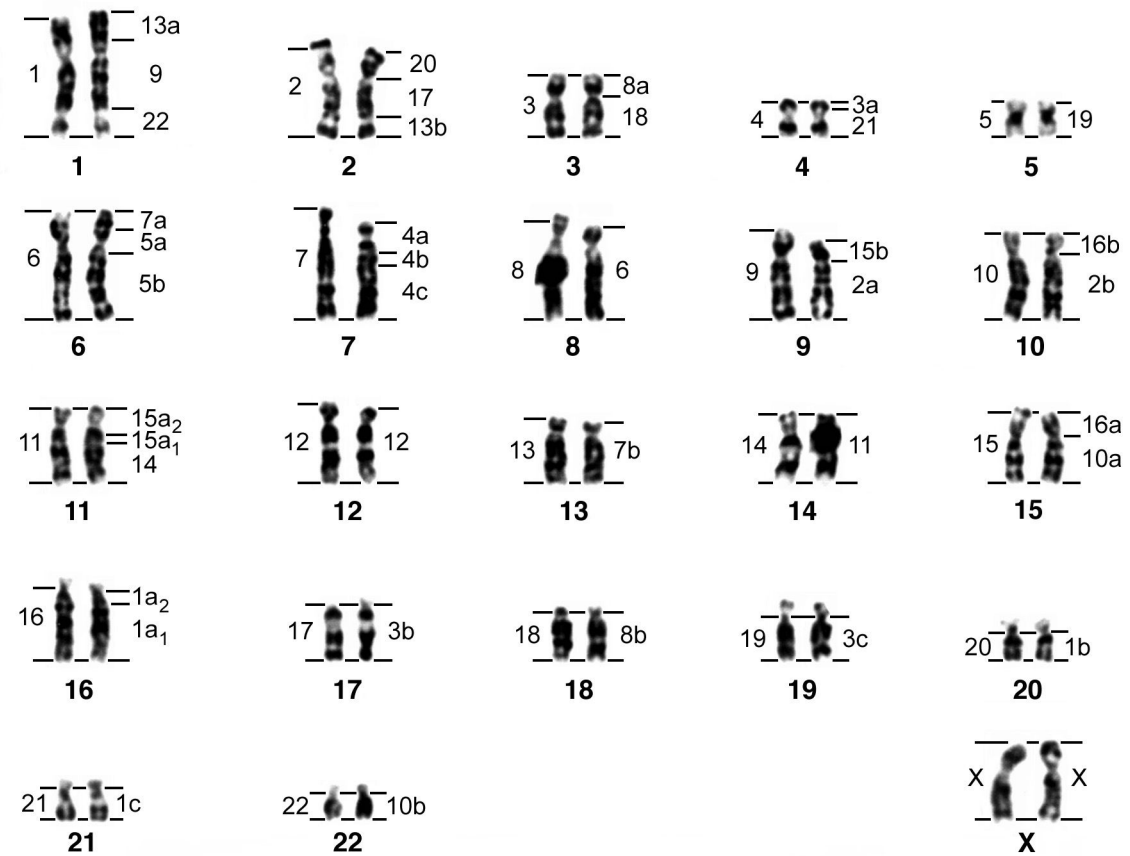


Abbildung 4.28: Karyogramm G-gebänderter Chromosomen von *Cebus apella paraguayanus* (A) und *C. albifrons* (B) nach der Chromosomennomenklatur von Ponsa` et al. (1995). Die Kartierung chromosomen-spezifischer Sonden des Menschen ist jeweils rechts, die von *S. oedipus* jeweils links neben einem Chromosomenpaar dargestellt.

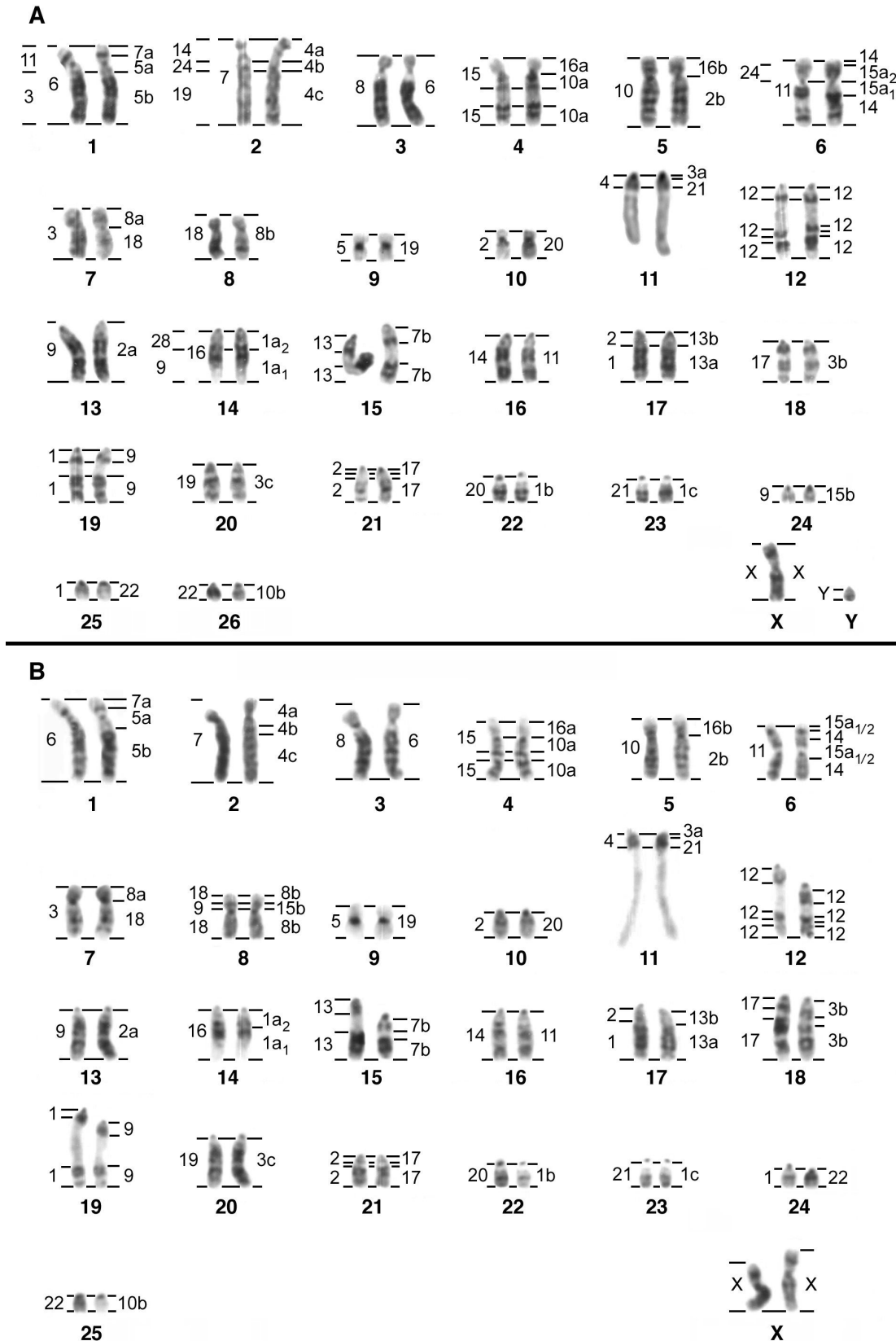


Abbildung 4.29: Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse anhand G-gebänderter Chromosomen von *Saimiri boliviensis* (A) und *S. ustus* (B). Die Chromosomennomenklatur folgt Lau und Arrighi (1976). Jeweils rechts neben einem Chromosomenpaar sind die zum Menschen homologen Chromosomenregionen, links diejenigen zu *S. oedipus* angegeben.

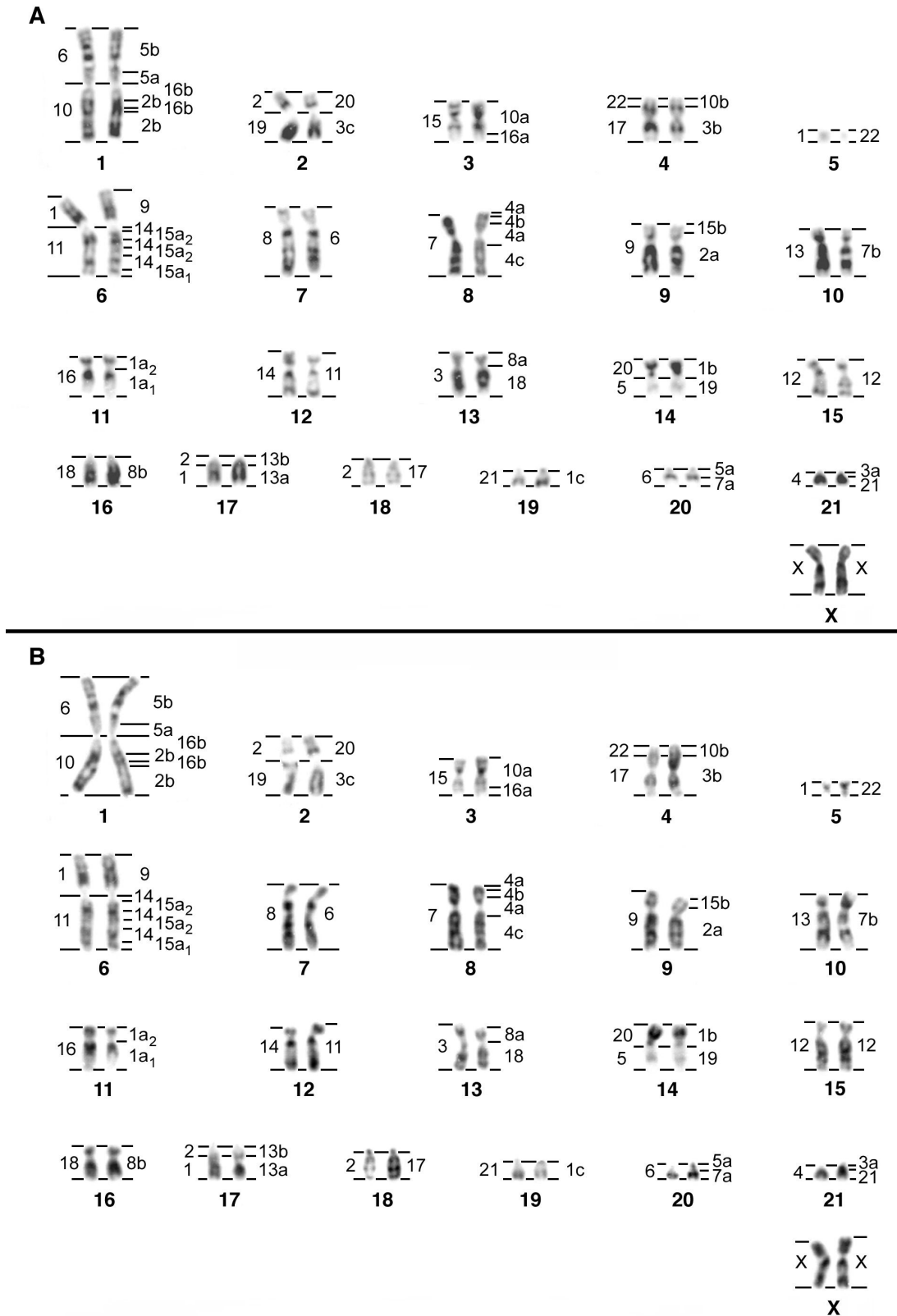


Abbildung 4.30: Karyogramm DAPI-gebänderter Chromosomen (invertiert) von *Saimiri sciureus*. Die Chromosomennomenklatur folgt Lau und Arrighi (1976). Die zum Menschen homologen Chromosomenregionen sind rechts, diejenigen zu *S. oedipus* links und zu *L. lagothericha* links außen neben eines jeden Chromosomenpaares von *S. sciureus* dargestellt. Die p- und q-terminalen Regionen von *S. sciureus* Chromosom 5 zeigten kein Hybridisierungssignal und sind offenbar aus Heterochromatin zusammengesetzt, welches im menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* Genom nicht vorkommt. Auch wurde eine Hybridisierungslücke auf *S. sciureus* Chromosomen 6q, sowie im heterozygoten Zustand auf Chromosom 14 (siehe mit * markierte Regionen) festgestellt, welche vermutlich einen interstitiellen Heterochromatinblock darstellt.

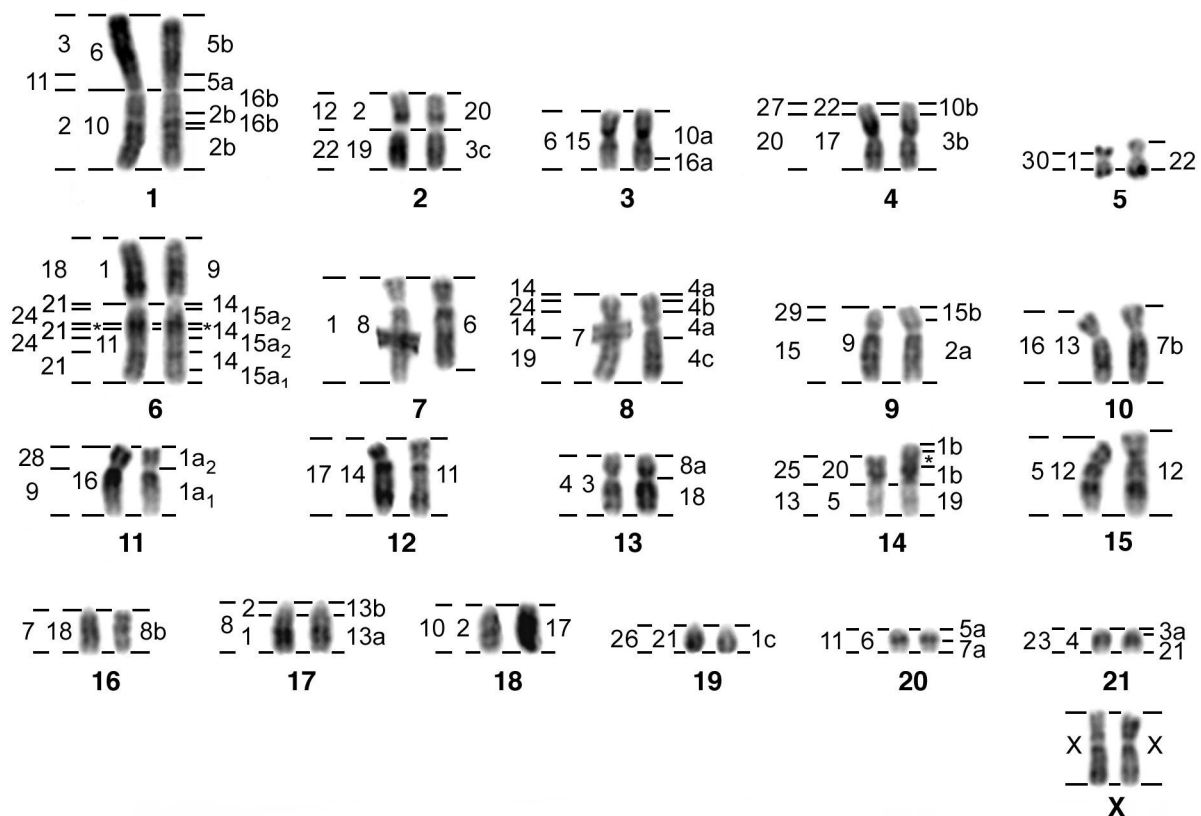
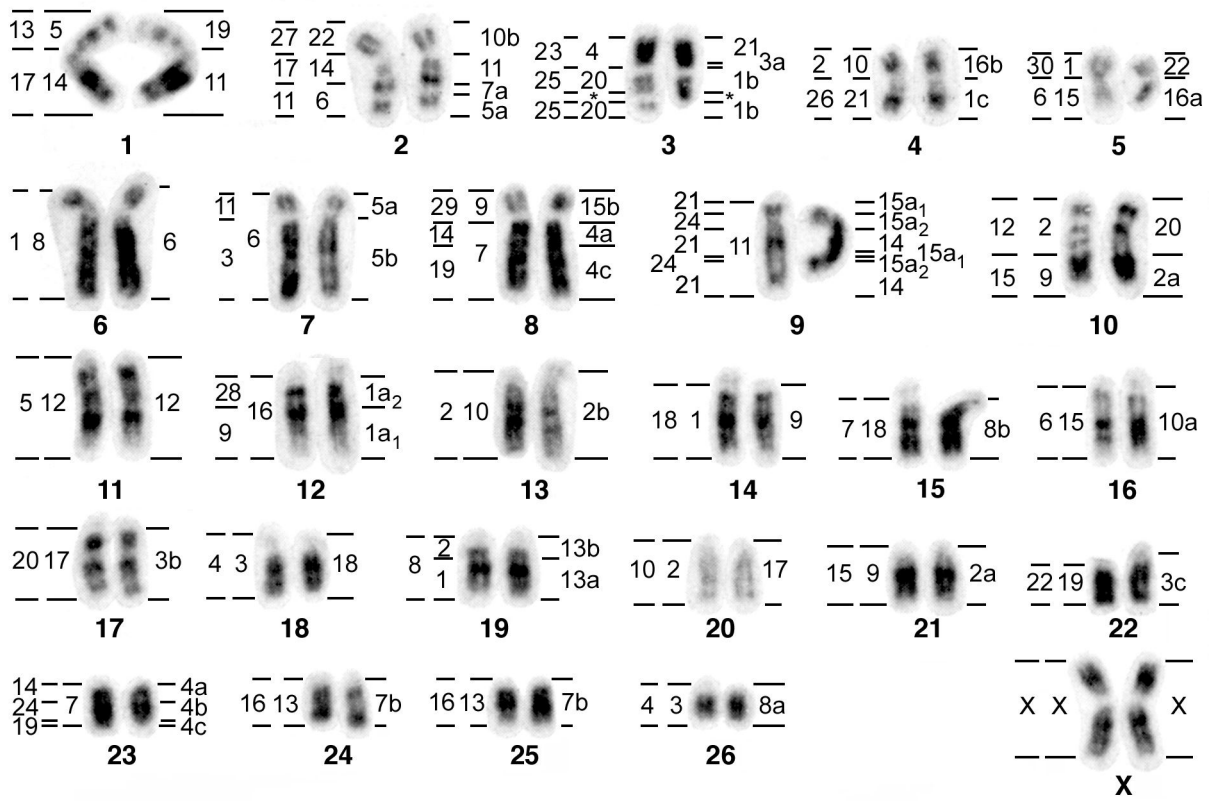


Abbildung 4.31 (siehe nächste Seite): Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse anhand eines publizierten Karyogramms G-gebänderter Chromosomen von *Aotus trivirgatus* (A) und *A. infulatus* (B). Das Karyogramm in (A) stammte aus Miller et al. (1977), dasjenige in (B) aus Ma et al. (1976). Horizontale Linien seitlich der Chromosomen markieren zum Menschen homologe Chromosomenregionen (rechts), zu *S. oedipus* (links) und *L. lagothericha* (links außen). Chromosomenregionen, die nicht von diesen Linien eingeschlossen sind, wurden von keiner Sonde angefärbt und sind vermutlich aus Heterochromatin zusammengesetzt. Mit * markierte Regionen auf Chromosom 3 von *A. trivirgatus* (A), sowie auf dem dazu homologen Chromosom 6 von *A. infulatus* (B) stellen offenbar einen interstitiellen Heterochromatinblock dar. Die Chromosom Y spezifische Region von *A. infulatus* (B) konnte mit keiner Sonde nachgewiesen werden. Sie ist vermutlich distal des homologen menschlichen Chromosomensegments 15a₁ am p-Terminus (siehe Y*) lokalisiert, da diese Chromosomenregion nur auf einem Homologen von *A. infulatus* identifiziert wurde.

A



B

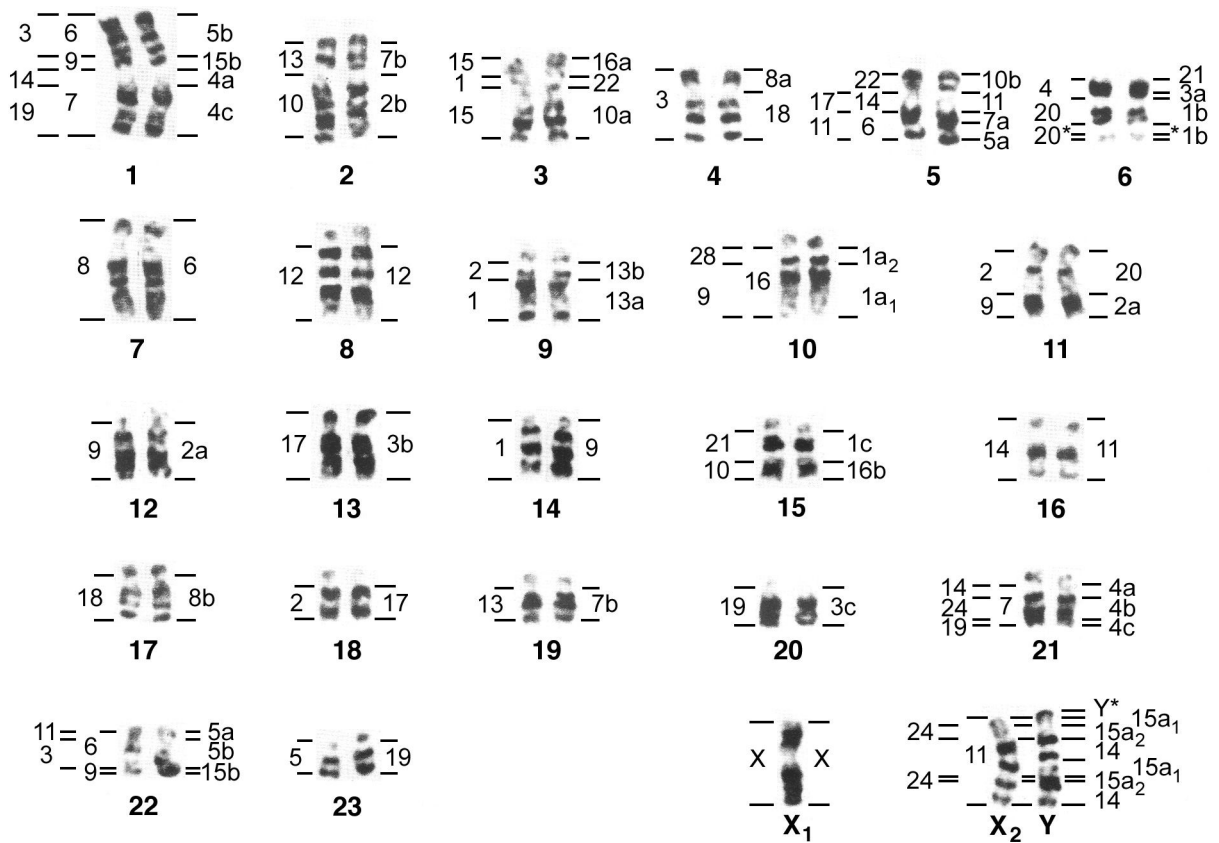


Abbildung 4.32: Karyogramm G-gebänderter Chromosomen von *Callicebus donacophilus* (A) nach der Nomenklatur von Barros et al. (2003) und von *Cacajao calvus* (B) nach der Nomenklatur von Moura-Pensin et al. (2001). Die Kartierung menschlicher DNA Sonden ist jeweils seitlich rechts, die Kartierung von *S. oedipus* DNA Sonden jeweils seitlich links eines Chromosomenpaares dargestellt. *L. lagothericha* homologe Regionen sind jeweils links außen illustriert. Chromosomenregionen, die mit keiner Sonde hybridisiert wurden und offenbar Heterochromatinblöcke darstellen, sind mit * gekennzeichnet. Die vermutlich Y Chromosom spezifische Region der Y-autosomalen Translokation bei *Cacajao calvus* ist mit Y* markiert.

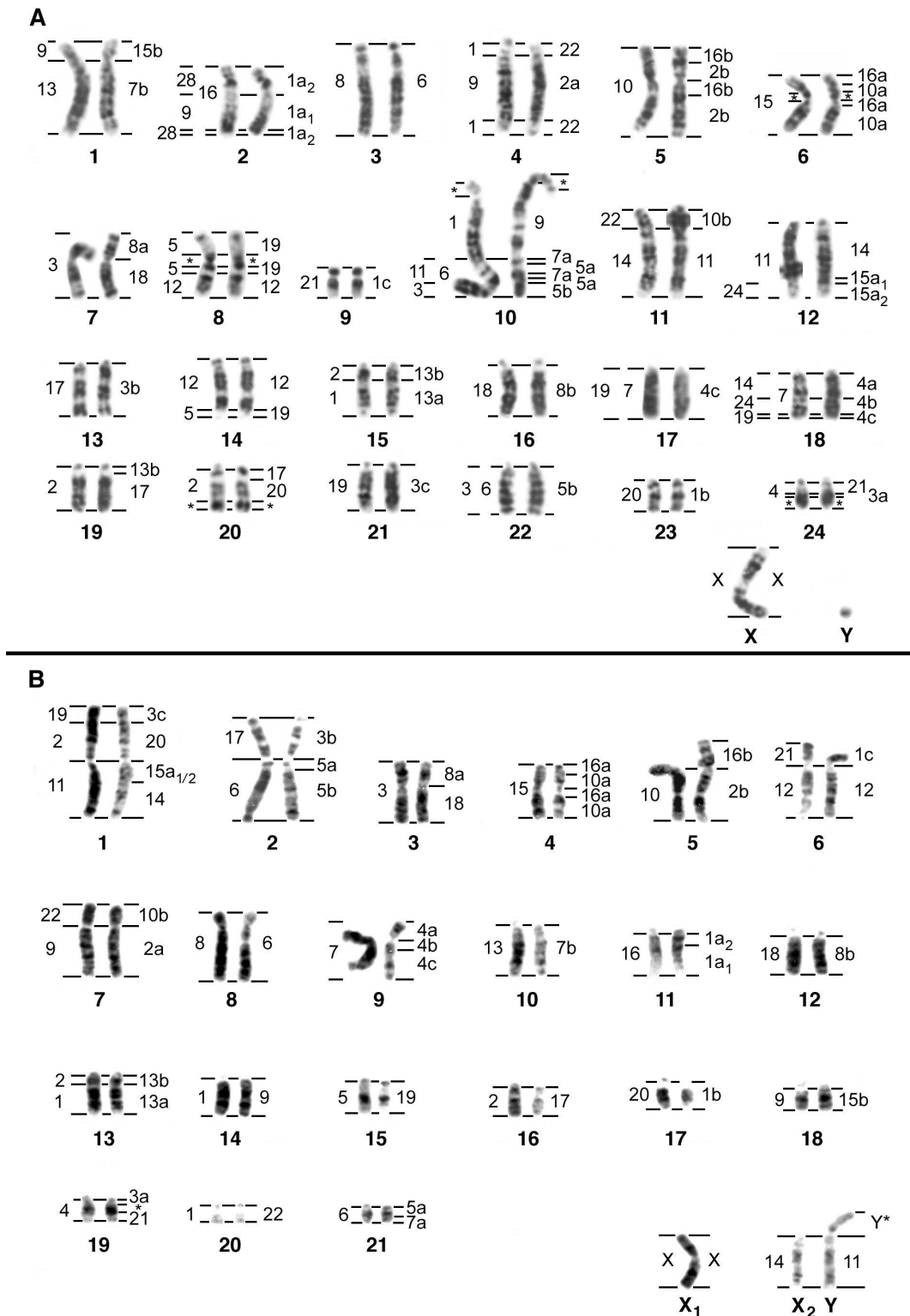


Abbildung 4.33: Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse anhand G-gebänderter Chromosomen von *Ateles belzebul marginatus* (A) und *A. paniscus paniscus* (B). Die Chromosomennomenklatur folgt Morescalchi et al. (1997). Die zum Menschen homologen Chromosomenregionen sind jeweils seitlich rechts, die zu *S. oedipus* jeweils seitlich links eines Chromosomenpaares angegeben. *L. lagotricha* homologe Regionen sind jeweils links von den *S. oedipus* homologen Regionen dargestellt.

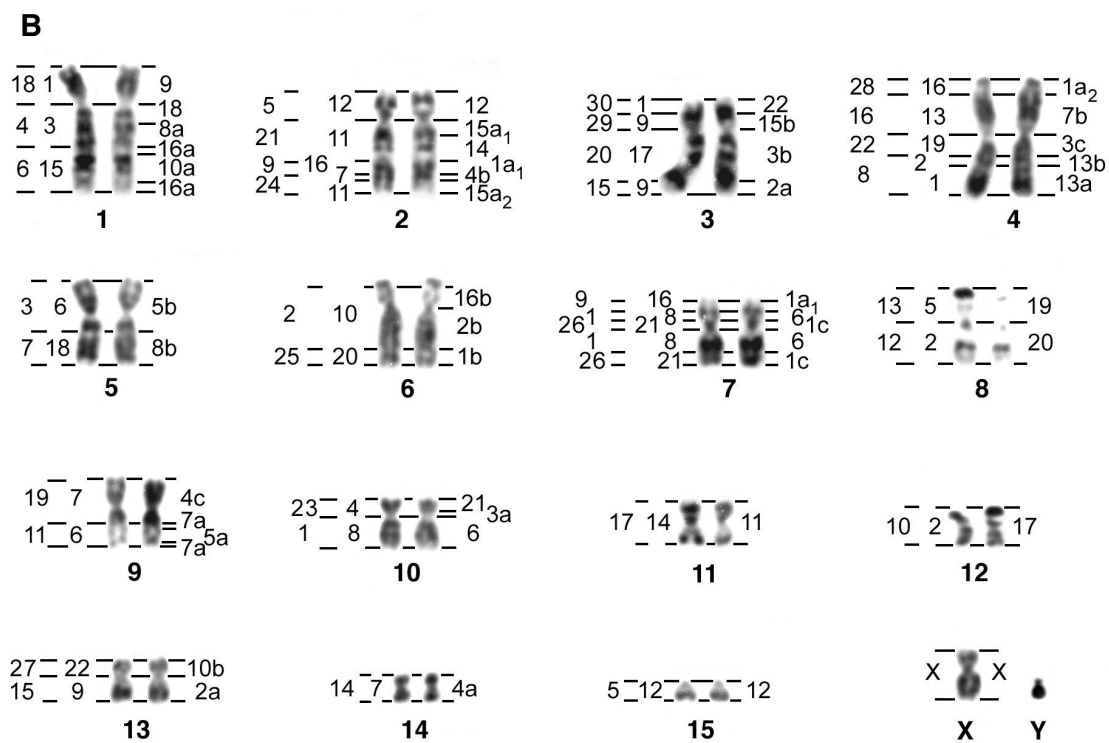
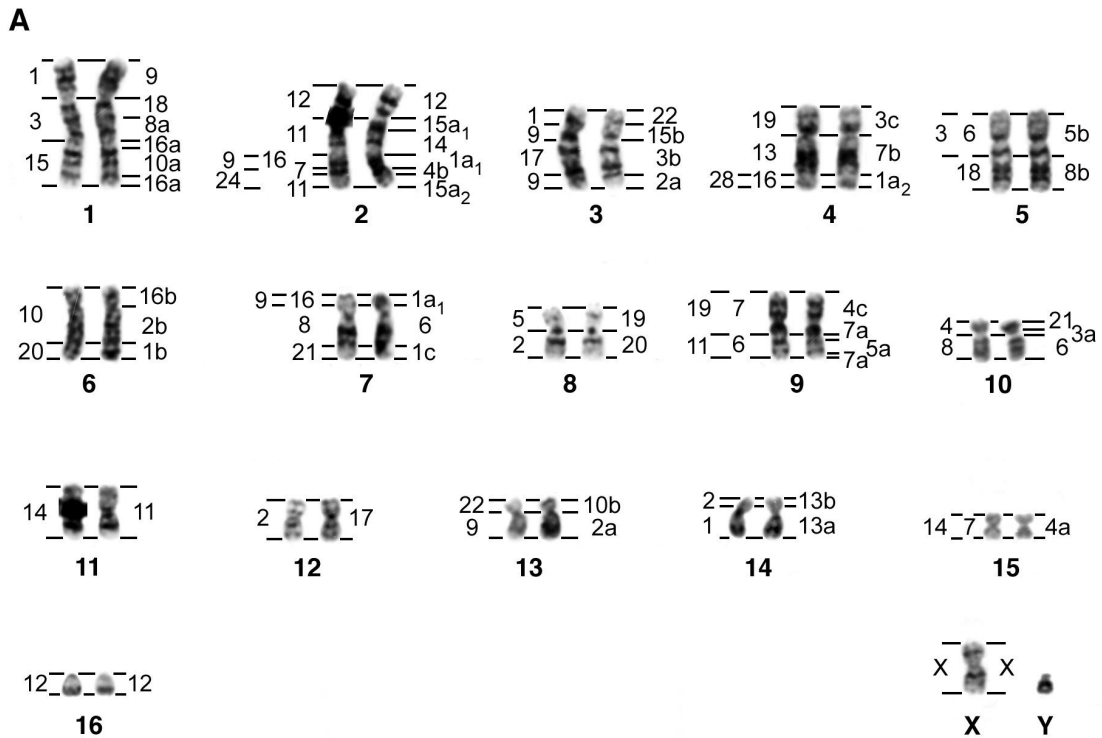


Abbildung 4.34: Karyogramm G- gebänderter Chromosomen von *Lagothricha lagothricha* (A) und *Brachyteles arachnoides* (B). Die Nomenklatur in A) folgt Stanyon et al. (2001), in B) Viegas Pequignot et al. (1985). Seitlich rechts der Chromosomen von *L. lagothricha* und *B. arachnoides* sind die zum Menschen homologen Regionen illustriert, links diejenigen zu *S. oedipus*. In B) sind *L. lagothricha* Homologe jeweils unterhalb der Chromosomen von *B. arachnoides* in Klammern angegeben. Mit * markierte Chromosomen Regionen in wurden von keiner Sonde hybridisiert und sind offenbar aus Heterochromatin zusammengesetzt.

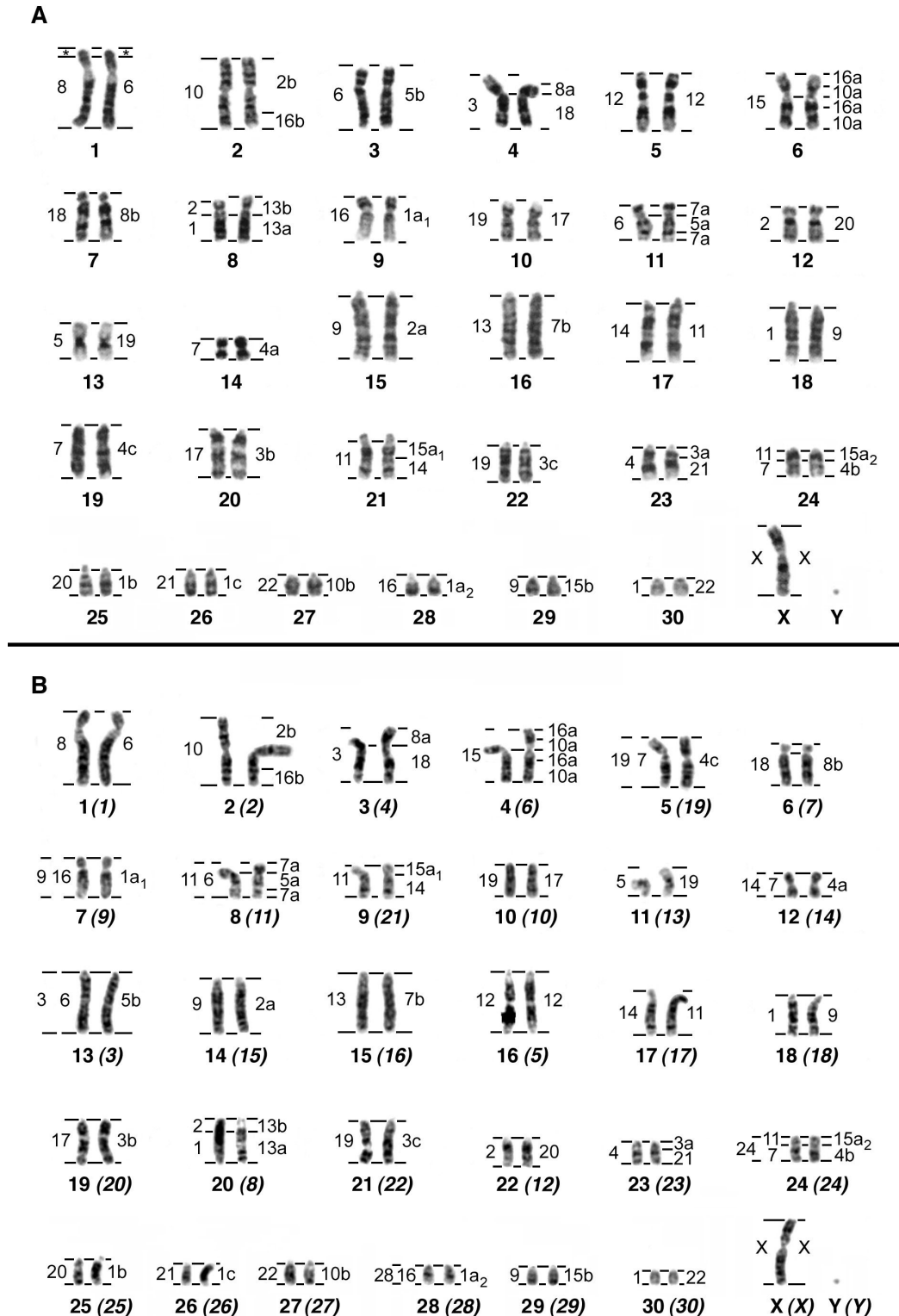
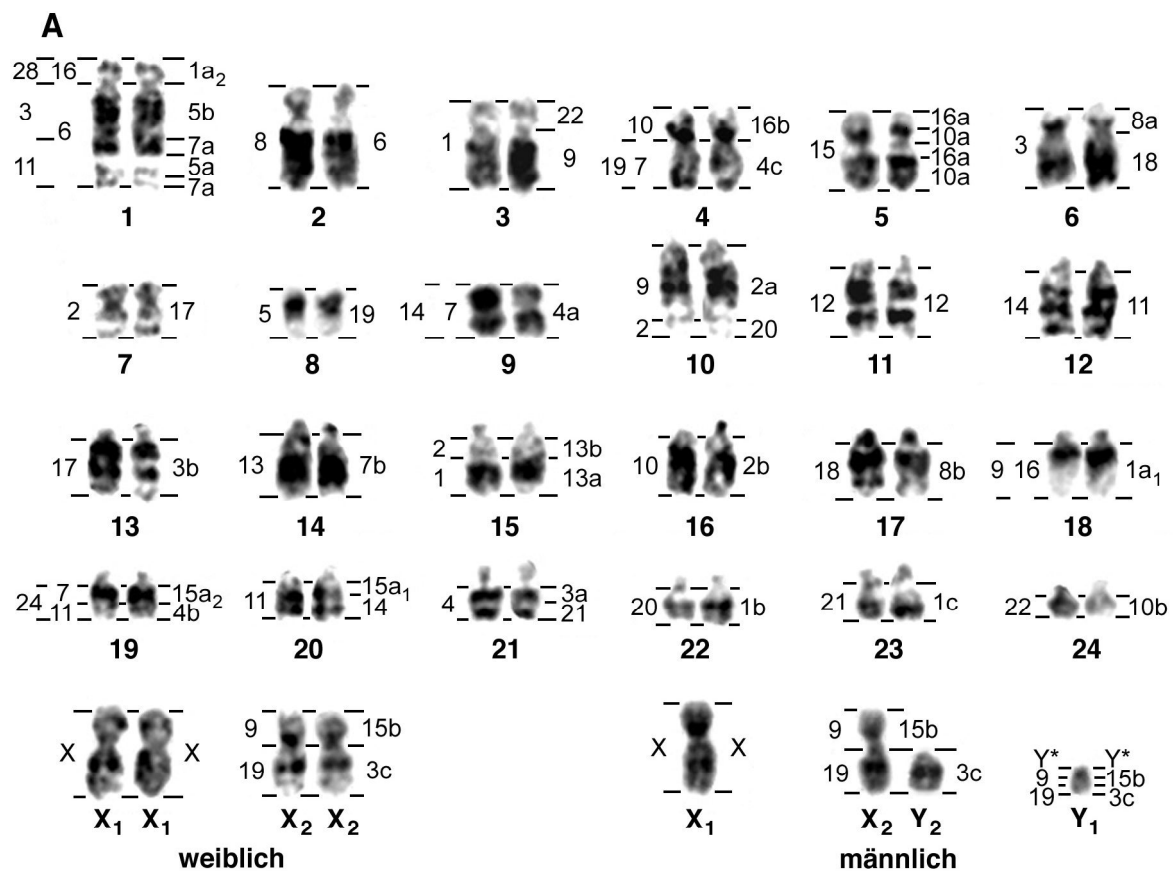


Abbildung 4.35: Karyogramm G-gebänderter Chromosomen von *Alouatta caraya* (A) und von *A. seniculus macconnelli* (B, siehe nächste Seite). Die Chromosomennomenklatur in A) folgte Mudry et al. (1998), in B) Lima et al. (1990). Die dargestellten Autosomen in B) stammten von einem Individuum aus der Region um *Uatumã River, Pará, Brasilien*. Im Unterschied zu diesem wiesen die untersuchten Individuen aus der Region um *Jari River, Pará, Brasilien*, die Chromosomenform 2p/16 und ein separates Chromosom homolog zu 2q auf. Sowohl *A. caraya*, als auch *A. s. macconnelli* wiesen ein multiples Geschlechtschromosomensystem auf, welches anhand der Geschlechteschromosomen je eines weiblichen und männlichen Individuums von *A. caraya* und *A. s. macconnelli* illustriert ist. Die in B) dargestellten Geschlechtschromosomen stammten hierbei von einem weiblichen Individuum aus der Region um *Jari River, Pará, Brasilien*, und einem männlichen Individuum aus der Region um *Uatumã River, Pará, Brasilien*. Die zum Menschen homologen Chromosomenregionen sind jeweils rechts und die zu *S. oedipus* jeweils links eines Chromosomenpaares dargestellt. DNA Sonden des *L. lagothericha* siebenfarbigen Sonden Sets kartierten bei *A. caraya* (A) auf Regionen der Chromosomen 1, 4, 9, 18 und 19 und bei *A. seniculus macconnelli* (B) auf Regionen der Chromosomen 3, 5, 10-13 und 18. Die homologen *L. lagothericha* Chromosomen sind hierbei jeweils seitlich von den *S. homologen* Chromosomen angegeben. Die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen von beiden Spezies wurden nicht angefärbt, da sie offenbar aus Heterochromatin zusammengesetzt sind, das keine Homologie zu den verwendeten Sonden zeigte. Die Chromosom Y spezifische Region wurde mit den verwendeten Sonden nicht nachgewiesen. Sie ist vermutlich am terminalen Ende des Y₁ Chromosoms lokalisiert (siehe Y*). Individuen der Spezies *A. s. macconnelli* zeigten 0-3 B-Chromosomen pro Zelle, welche von keiner DNA Sonde hybridisiert wurden.



B

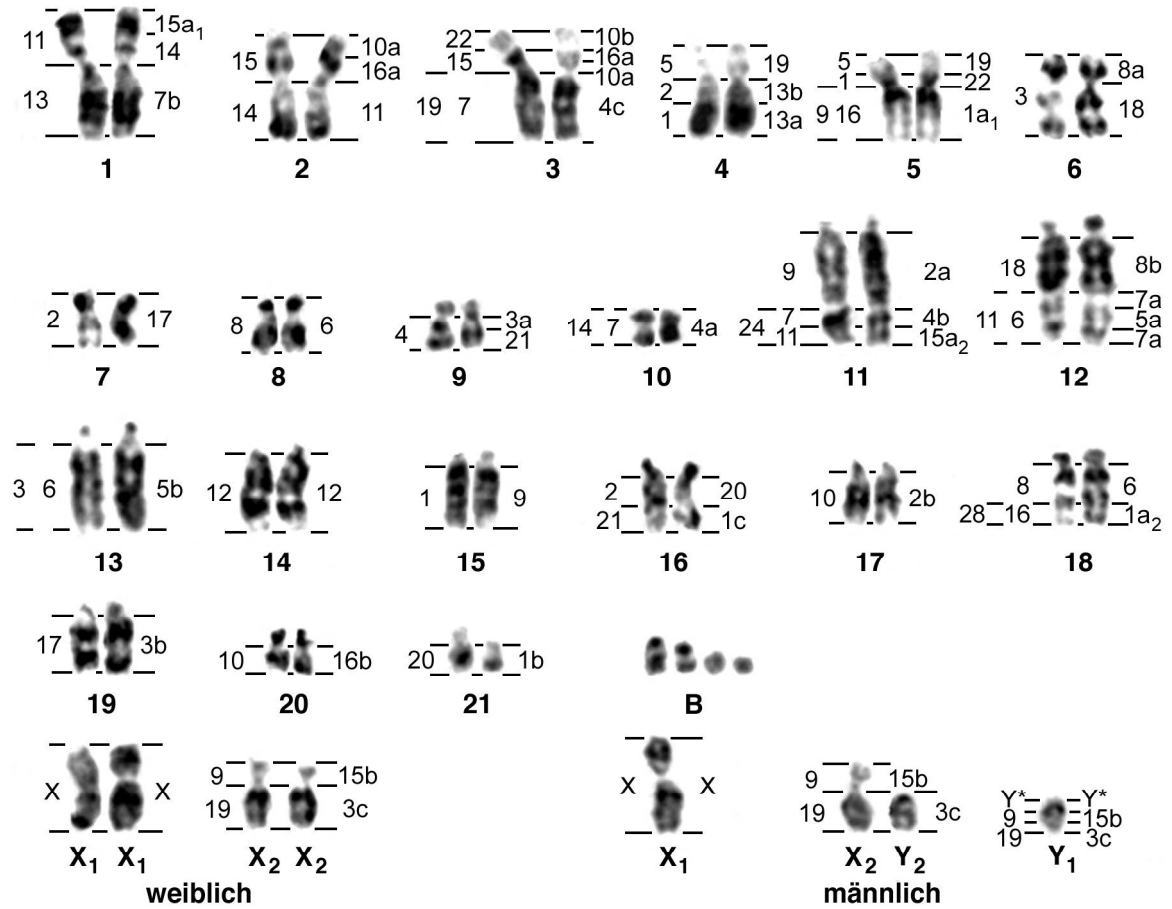
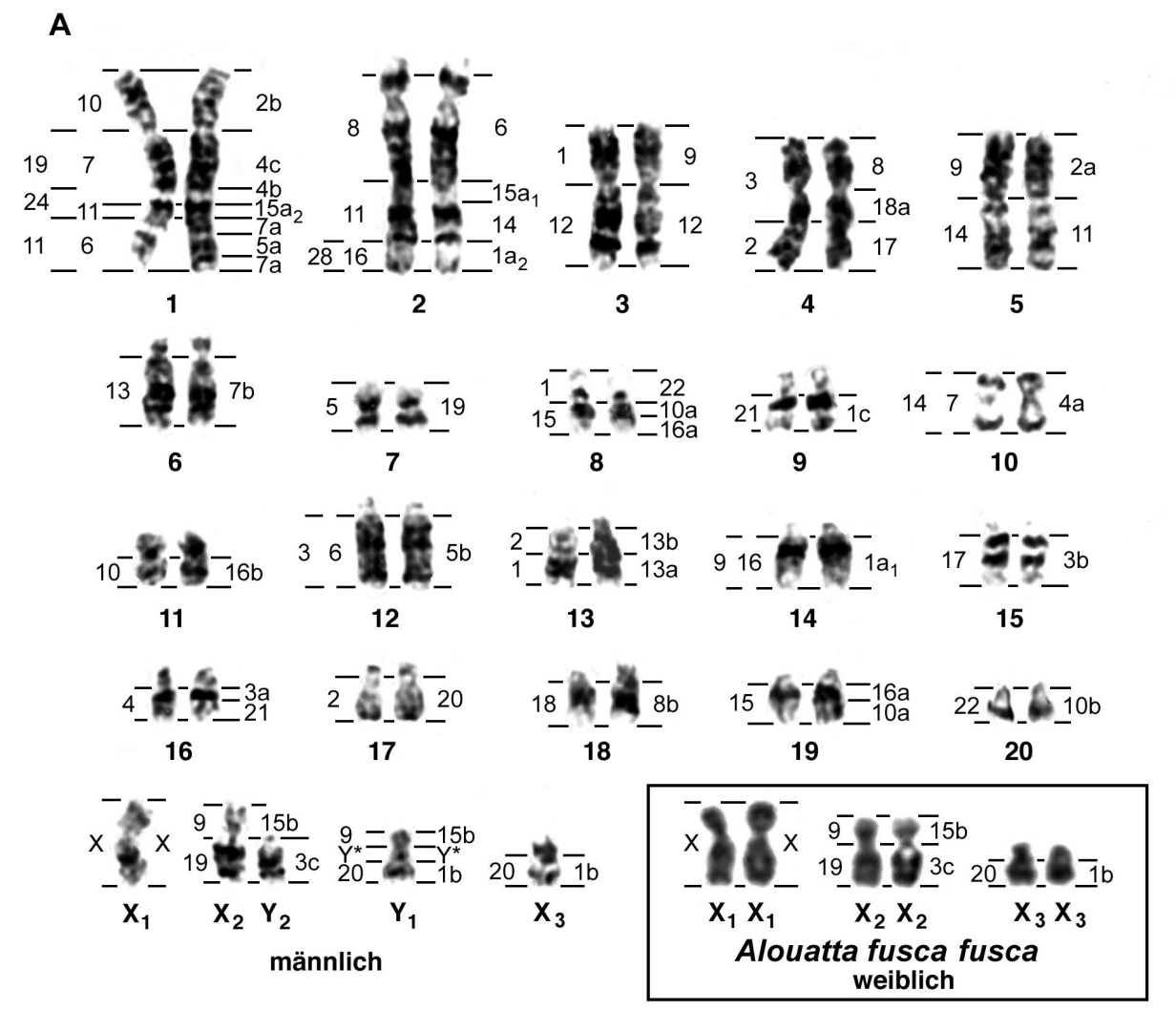


Abbildung 4.36: A) zeigt ein Karyogramm G-gebänderter Chromosomen eines männlichen Individuums von *A. fusca clamitans*. Die schwarz eingerahmten Geschlechtschromosomen stammen von einem weiblichen Individuum der Subspezies *A. f. fusca*. Die Nomenklatur folgt de Oliveira et al. (2002). B) illustriert diejenigen Chromosomen, die den Karyotypunterschied zwischen *A. f. clamitans* (AFC, 2n=45) und *A. f. fusca* (AFF, 2n=49) definieren. Die zum Menschen homologen Regionen sind jeweils rechts, die zu *S. oedipus* jeweils links eines Chromosomenpaares illustriert. DNA Sonden des *L. lagothericha* homologe Regionen auf den Chromosomen 1, 2, 10, 12 und 14 von beiden Subspezies sind jeweils links aussen angegeben. *A. fusca* wies wie *A. caraya* und *A. s. macconnelli* ein multiples Geschlechtschromosomensystem auf. Im Unterschied zu diesen Spezies ist ein weiteres Segment, homolog zum menschlichen Chromosom 1b in die Y-autosomale Translokation involviert. Die Chromosom Y spezifische Region konnte mit keiner Sonde nachgewiesen werden. Sie ist vermutlich assoziiert mit den zum Menschen homologen Chromosomensegmenten 1b und 15b (siehe Y*).



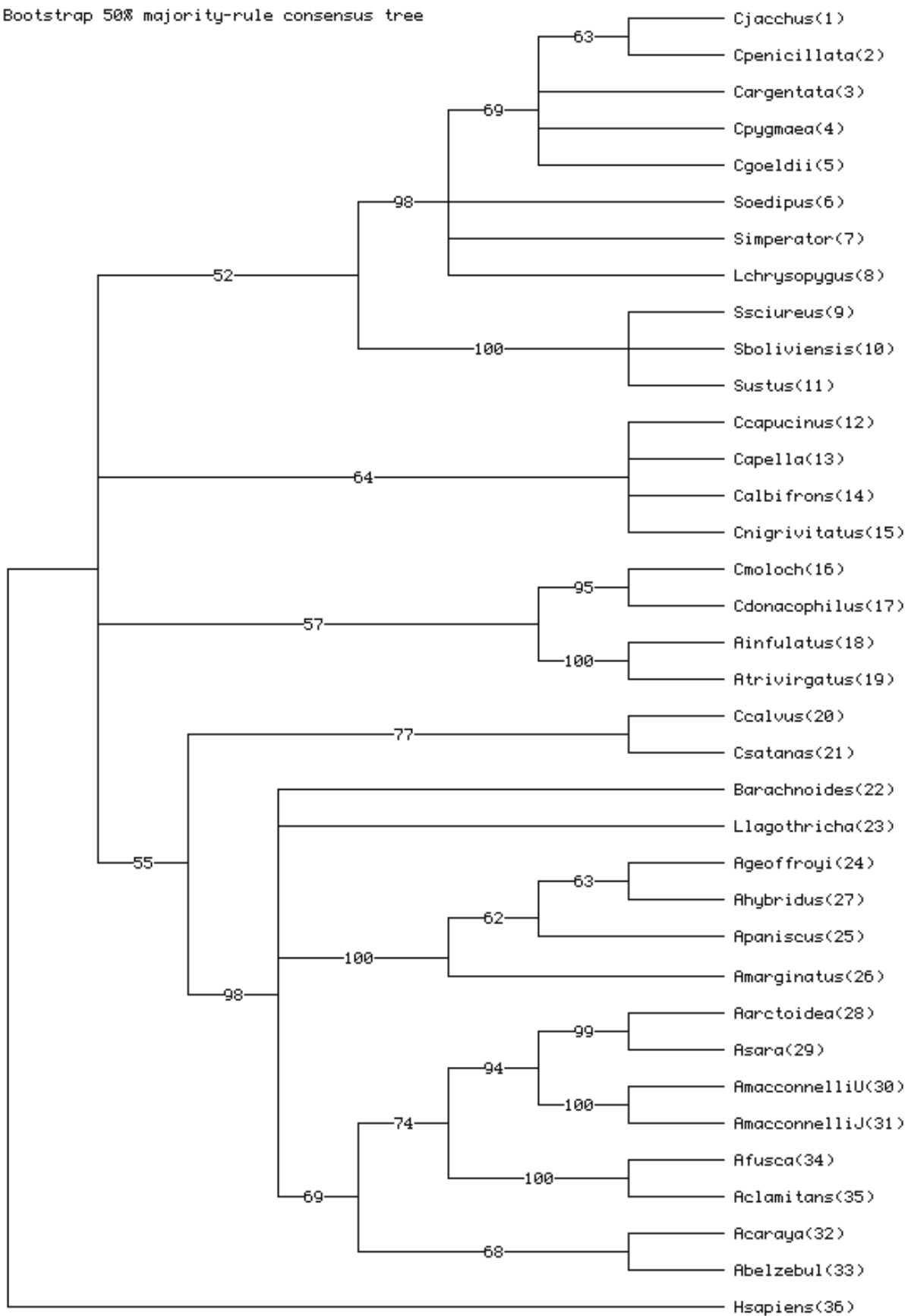
4.1.4 Phylogenetische Rekonstruktion mit Hilfe des Programms *PAUP*

In die phylogenetische Rekonstruktion mit Hilfe des Phylogenieprogramms *PAUP* (Swofford 1998, siehe 3.12) wurden die bisher mit molekular-zytogenetischen Methoden untersuchten 31 verschiedenen Spezies und vier Subspezies (siehe Tabelle 4.1) einbezogen. Basierend auf den *chromosome painting* Daten dieser Neuweltaffen wurden konservierte homologe Segmente identifiziert. Diese konservierten homologen Segmente, als auch Assoziationen von benachbarten konservierten Segmenten wurden als chromosomale Charaktere definiert (siehe hierzu 5.2). Die Nomenklatur der chromosomalen Charaktere folgte Neusser et al (2001) und de Oliveira et al (2002) und basierte auf homologen menschlichen Chromosomen (-segmenten). Insgesamt wurden 170 chromosomale Charaktere in den untersuchten Neuweltaffen, sowie dem Menschen als *outgroup* Spezies definiert. Die Tabelle 4.6 (siehe beiliegende CDROM) stellt eine Übersetzung dieser Charaktere in eine binäre Datenmatrix dar. Das Vorhandensein eines chromosomalen Charakters in einer Spezies wurde hierbei mit 1, die Abwesenheit eines Charakters mit 0 definiert. Die binäre Datenmatrix wurde anschließend mit Hilfe des Programms *PAUP* ausgewertet. Die Analyse mittels dieses Programms ergab, dass 89 Charaktere phylogenetisch informativ waren. Es resultierte ein Stammbaum (siehe Abbildung 4.37), der unter Annahme von Parsimonie die höchste Wahrscheinlichkeit zeigte (Konsistenzindex=0,89, Retentionsindex=0,94, Homoplasieindex=0,10).

Tabelle 4.6 (siehe beiliegende CD-ROM): Binäre Matrix, die für die Maximum Parsimonie Analyse mittels des Programms *PAUP* erstellt wurde. Sie beinhaltet 170 chromosomale Charaktere (1= Vorhandensein eines Charakters, 0=nicht Vorhandensein eines Charakters in einer Spezies, *inv*=Inversion, *fis*=Fission), die in 31 verschiedenen Spezies, vier Subspezies und dem Menschen mittels *chromosome painting* nachgewiesen wurden. Individuen von *A. s. macconnelli*, die verschiedenen geografischen Regionen stammten (aus den Regionen um *Uatumã River* bzw. *Jari River*, *Pará*, Brasilien) und sich karyotypisch unterschieden, wurden mit U bzw. J gekennzeichnet. Die Charaktere wurden als homologe menschliche Chromosomen (-segmente) definiert. In Klammern gesetzte und mit tief gestellten Nummern gekennzeichnete Charaktere stellen keine homologen Chromosomenformen dar, da sie vermutlich auf unterschiedlichen chromosomalen Umbauten basieren.

Abbildung 4.37: Stammbaum, der nach der phylogenetischen Rekonstruktion mit Hilfe des Programmes *PAUP* die höchste Wahrscheinlichkeit zeigte. Er basiert auf *chromosome painting* Daten aller bisher untersuchten Neuweltaffen. Nummern vor jedem Verzweigungspunkt stellen *bootstrap* Werte dar und sind ein Ausdruck für die Wahrscheinlichkeit einer Klade. Der Wert 100, beispielsweise, gibt an, dass eine Klade zu 100% unterstützt wird. In Klammern gesetzte Nummern neben den jeweiligen Speziesnamen entsprechen der Reihenfolge der in Tabelle 3.6 aufgelisteten Spezies.

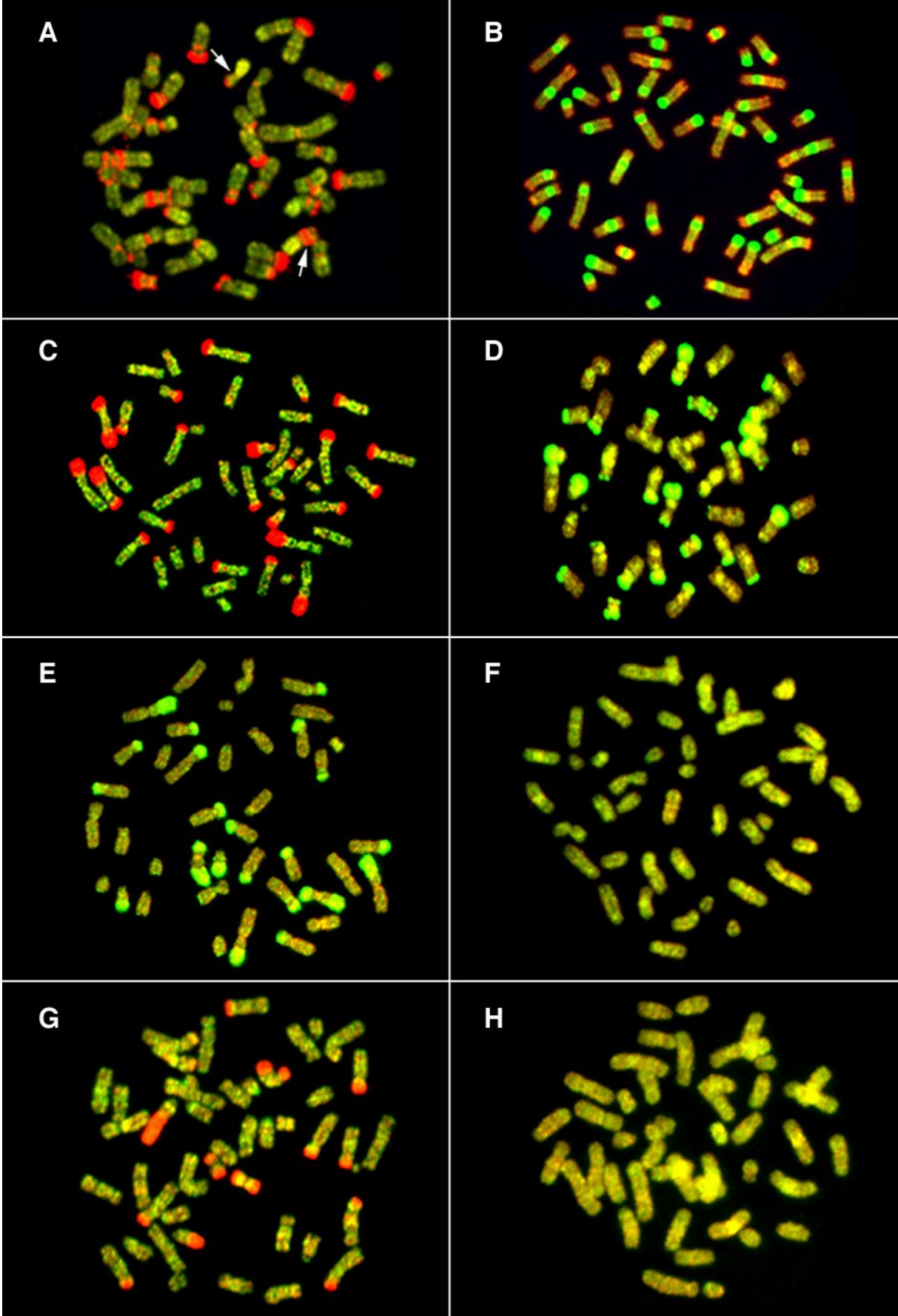
Bootstrap 50% majority-rule consensus tree

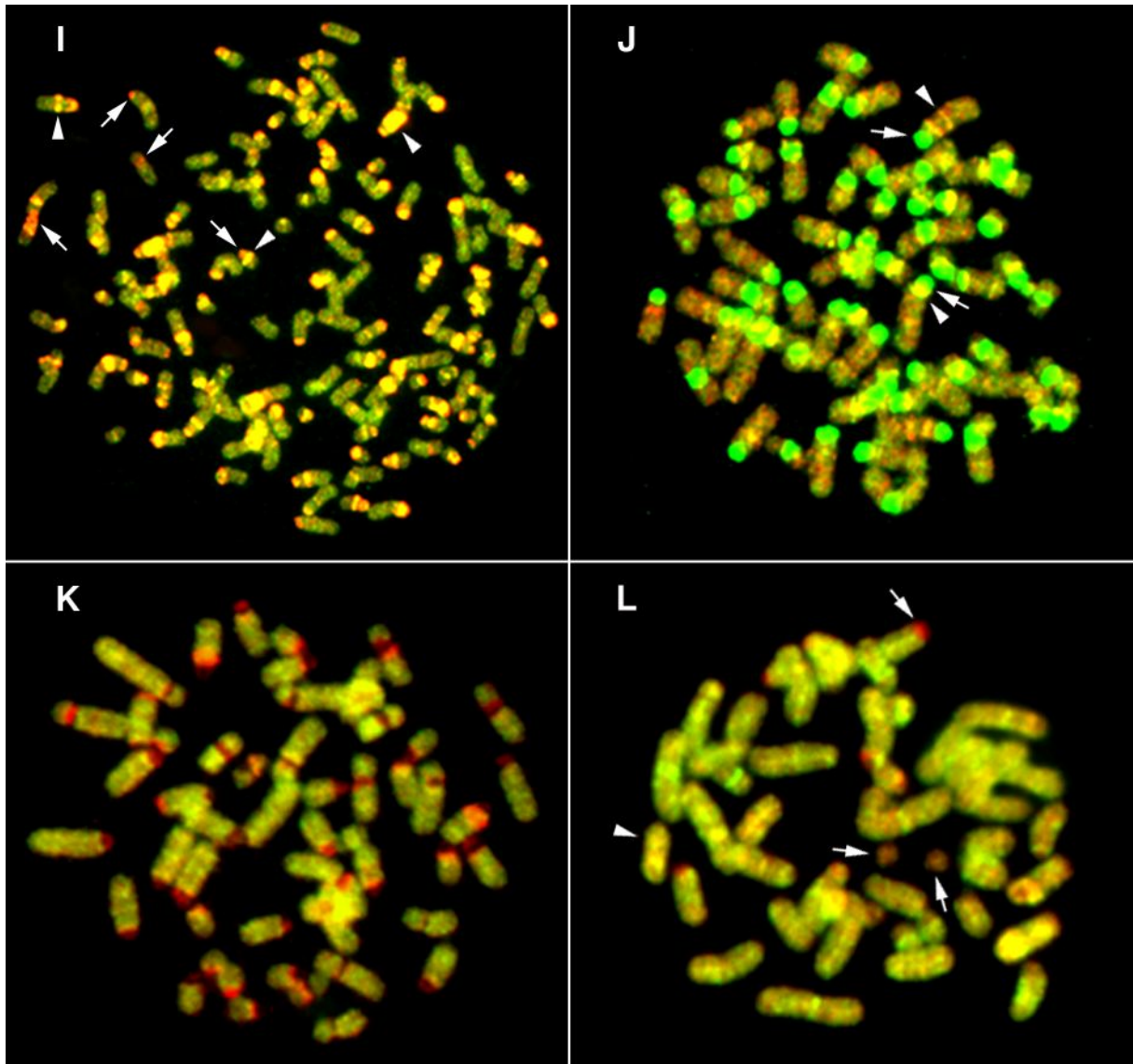


4.2 *Inter-species Comparative Genome Hybridization (iCGH)*

Die in Kapitel 4.1 beschriebene Rekonstruktion chromosomaler Umbauten bei Neuweltaffen war die Grundlage, um in weiteren Experimenten bestimmte Neuweltaffengruppen in Hinblick auf repetitive Sequenzmotive und Polymorphismen heterochromatischer Regionen des Genoms zu untersuchen. Hierzu wurde die Technik der Vergleichenden Genomhybridisierung (*Comparative Genome Hybridization*, CGH, Kallioniemi et al. 1992) zum Nachweis genomischer Imbalancen adaptiert, um in sogenannten Inter-Spezies CGH (iCGH, Toder et al. 1998) Experimenten sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über repetitive Genomelemente zu treffen. Es wurden systematisch diejenigen Neuweltaffen miteinander verglichen, die in phylogenetisch naher Beziehung zueinander stehen. Die Auswahl der zu untersuchenden Neuweltaffen wurde jedoch begrenzt durch das zur Verfügung stehende Zellmaterial. Falls möglich, wurde iCGH in einer reziproken Weise durchgeführt, indem differenziell markierte gesamt-genomische DNA von zwei miteinander zu vergleichenden Spezies auf Metaphasenpräparate beider Spezies hybridisiert wurde. Ausgewählte Beispiele von CGH Experimenten sind in den Abbildungen 4.38 und 4.39 dokumentiert und nachfolgend erläutert. Vergleichende Untersuchungen zwischen Spezies (Inter-Spezies CGH, Abb. 4.38) einerseits und solche zwischen verschiedenen Individuen einer Spezies (Intra-Spezies CGH, Abb. 4.39) andererseits werden hierbei getrennt dargestellt, um sowohl spezies-spezifische, als auch polymorphe genomische Elemente aufzuzeigen.

Abb.4.38 (siehe nachfolgende Seiten): Inter-Spezies CGH zwischen Vertretern verschiedener Gattungen und zwischen Vertretern derselben Gattung **A)–F)** *Saimiri sciureus* (rot) vs. *Saguinus oedipus* (grün) reziprok auf Chromosomen von *S. sciureus* **A)** und *S. oedipus* **B)**. Die Pfeile in **A)** deuten auf homologe Chromosomen von *S. sciureus*, die sich durch einen polymorphen interstitiellen Heterochromatinblock voneinander unterscheiden. **C)+D)** *Callithrix argentata* (rot) und *Cebuella pygmaea* (grün) reziprok auf Chromosomen von *C. argentata* **C)** und *C. pygmaea*. **D)** *C. argentata* (grün) vs. *Callithrix jacchus* (rot) auf Chromosomen von *C. argentata* **E)** und *C. jacchus* **F)**. **G)+H)** iCGH mit gesamt-genomischer DNA des Vaters (*C. pygmaea*, rot) und der Mutter (*C. jacchus*, grün) der *C. pygmaea* x *C. jacchus* Inter-Spezies Hybrid Individuen auf Chromosomen des männlichen Hybrid Individuums **G)** und der Mutter der Inter-Spezies Hybrid Individuen **H)**. **I)+J)** *Lagothrix lagothricha* (rot) vs. *Brachyteles arachnoides* (grün), reziprok auf Chromosomen von **I)** *L. lagothricha* und **J)** *B. arachnoides*. Peilköpfe deuten auf Beispiele balancierter, aber amplifizierter Chromosomenregionen hin, Pfeile auf Beispiele unbalancierter Genomelemente. **K)** *Alouatta caraya* (rot) vs *Alouatta seniculus macconnelli* (grün) auf Chromosomen von *A. caraya*. **L)** *A. s. macconnelli* (rot) vs. *Alouatta fucsa* (grün) auf Chromosomen von *A. s. macconnelli* (Pfeile deuten auf unbalancierte Chromosomen (-regionen)).





Die vergleichende Genomhybridisierung zwischen Vertretern verschiedener Spezies erlaubte eine differentielle Darstellung balancierter und unbalancierter genomischer Regionen zwischen den untersuchten Neuweltaffen. Balancierte Regionen zeigten eine gelbe Mischfarbe, die sich aus gleichen Anteilen von roter und grüner Fluoreszenz ergab, unbalancierte Regionen demgemäß ein ungleiches Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz (siehe hierzu 2.4.2, Abb. 2.7) Genomische Imbalancen waren meist in terminalen, perizentromerischen, aber auch interstitiellen Chromosomenregionen vorzufinden.

Mittels Inter-Spezies CGH zwischen *Saimri sciureus* und *Saguinus oedipus* (Abb. 4.38 A und B) wurden zahlreiche unbalancierte chromosomale Regionen bei beiden Spezies visualisiert. Deutlich überrepräsentiert für das untersuchte Individuum der Spezies *S. sciureus* erschienen insbesondere interstitielle, aber auch terminale Genomelemente. Eine polymorphe interstitielle Chromosomenregion konnte auf *S. sciureus* Chromosom 14 identifiziert werden,

für die das Individuum der Spezies *S. sciureus* heterozygot war (siehe Abb. 4.38 A). Mittels iCGH auf Metaphasen des untersuchten Individuums der Spezies *S. oedipus* wurden Imbalancen in den Zentromerregionen hervorgehoben, die deutlich überrepräsentiert für *S. oedipus* waren (siehe Abb. 3.38 B). Die Spezies *Callithrix argentata* und *Cebuella pygmaea* zeigen identische chromosomale Syntenien (Neusser et al., 2001). Mittels iCGH wurden jedoch zahlreiche unbalancierte Genomelemente erkennbar, die in der einen oder anderen Spezies deutlich überrepräsentiert erschienen (siehe Abb. 4.38 C+D). Bei beiden Spezies wurden Polymorphismen dieser überrepräsentierten Genomelemente zwischen den Homologen eines Chromosomenpaares beobachtet. In der Spezies *C. argentata* wurden, insbesondere bei den Chromosomen 3, 10 und 19, markante subtelomerische Längenvariationen zwischen den Homologen festgestellt, die quantitative Polymorphismen dieser Genomelemente darstellen. Qualitative Polymorphismen (Vorhandensein dieser Genomelemente in heterozygotem Zustand) konnten zwischen den Homologen der *C. argentata* Chromosomen 5, 7, 9 und 15 beobachtet werden. Die in dem untersuchten Individuum von *C. pygmaea* nachgewiesenen polymorphen Chromosomen werden ausführlich in Kapitel 4.3.2 dargestellt.

Das iCGH Experiment zwischen *Callithrix jacchus* und *C. argentata* (siehe Abb. 4.38 E+F) demonstriert, dass genomische Imbalancen auch in Vertretern der gleichen Gattung auftreten können. Anhand der Metaphase von *C. argentata* (Abb. 4.38 E) ist erkennbar, dass zahlreiche terminale Chromosomenregionen deutlich überrepräsentiert sind. Hingegen reflektiert die Metaphase von *C. jacchus* (Abb. 4.38 F) ein gänzlich balanciertes Genom.

Die vergleichende Genomhybridisierung mit gesamt-genomischer DNA des Vaters (*C. pygmaea*) und der Mutter (*C. jacchus*) eines *C. pygmaea* x *C. jacchus* Inter-Spezies Hybriden auf Metaphasechromosomen des Hybriden deckte zahlreiche genomische Elemente auf, die deutlich überrepräsentiert im väterlichen Genom sind (siehe Abb. 4.38 G). Diese erlaubten die Identifizierung des väterlichen Ursprungs von 13 Chromosomen des Hybriden (siehe hierzu auch 4.2.1). Die Hybridisierung derselben DNA Sondenkombination auf Metaphasechromosomen der Mutter des Inter-Spezies Hybriden (*C. jacchus*) (Abb. 4.38 H) wies indes keine genomischen Imbalancen nach.

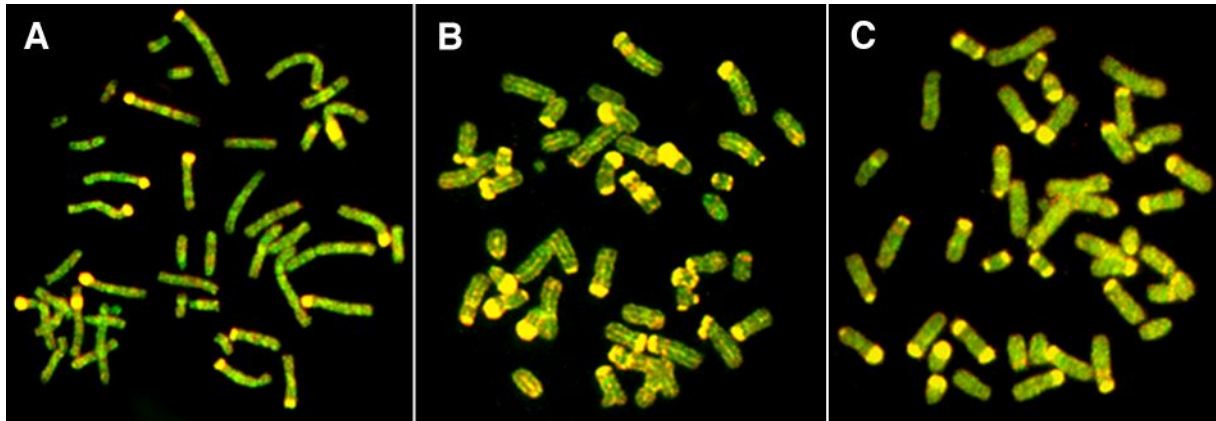
Anhand iCGH Experiments zwischen *Lagothrix lagothricha* und *Brachyteles arachnoides* (Abb. 4.38 I+J) konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der Zentromerregionen bei beiden

Spezies unbalanciert waren. Sowohl in *L. lagothericha*, als auch in *B. arachnoides* zeigten die Zentromerregionen jeweils eine Überrepräsentierung für genomische DNA von derjenigen Spezies von der auch das Metaphasepräparat stammte. Hingegen erschienen die meisten interstitiellen und perizentrischen Chromosomenregionen, die durch ihre intensive Fluoreszenz hervorgehoben wurden, balanciert zwischen beiden Spezies.

Mittels der vergleichenden Genomhybridisierung zwischen *Alouatta caraya* und *Alouatta seniculus macconnelli* auf Metaphasenchromosomen von *A. caraya* (Abb. 4.38 K) wurden deutliche Imbalancen in den Zentromerregionen von *A. caraya* erkennbar, während das übrige Genom balanciert erschien. Im Vergleich dazu demonstriert das iCGH Experiment zwischen *A. s. macconnelli* und *Alouatta fusca* auf Metaphasechromosomen von *A. s. macconnelli*, dass einige Zentromerregionen balanciert, andere hingegen überrepräsentiert für *A. seniculus* sind. Zudem konnten mit diesem Experiment Chromosomen identifiziert werden, die ausschließlich mit gesamt- genomischer DNA von *A. s. macconnelli*, nicht jedoch mit DNA der Spezies *A. fusca* hybridisierten.

Diese Experimente erlaubten, quantitative Unterschiede bestimmter Genomelemente bei verschiedenen Spezies hervorzuheben. Weiterführend wurden auch CGH Experimente zwischen verschiedenen Individuen einer Spezies durchgeführt, um polymorphe Genomelemente identifizieren zu können. Die Abbildung 4.39 illustriert ein Beispiel für ein „Intra-Spezies“ CGH Experiment zwischen einem weiblichen Individuum (1) und zwei männlichen Individuen (2 und 3) der Spezies *C. pygmaea*. Hierbei wurde gesamt-genomische DNA der männlichen Individuen 2, 3 verwendet, die unterschiedlichen Zuchtgruppen entstammten und reziprok auf Chromosomen dieser Individuen hybridisiert. Zudem wurde mit derselben gesamt-genomischen DNA Kombination das weibliche Individuum untersucht, das der gleichen Zuchtgruppe des männlichen Individuums 2 angehört.

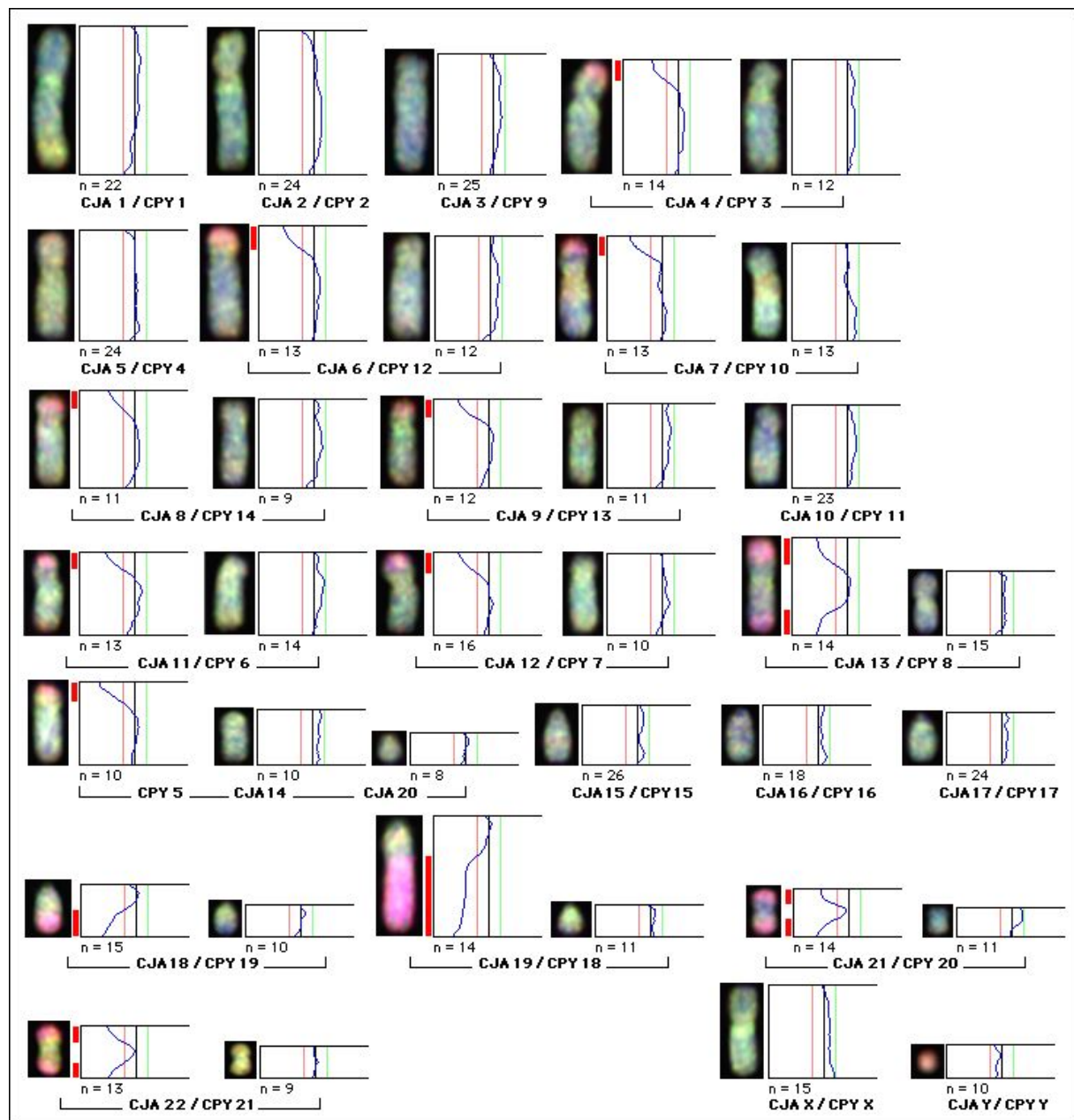
Abbildung 4.39 (siehe nächste Seite): Intra-Spezies CGH Experiment zwischen verschiedenen Vertretern der Spezies *C. pygmaea*. **A)** und **B)** Reziprokes iCGH zwischen dem männlichen Individuum 2 (rot) und dem männlichen Individuum 3 (grün). **A)** Metaphasechromosomen des Individuums 3, **B)** des Individuums 2. **C)** CGH mit der gleichen DNA Kombination wie in **A)** und **B)** auf Metaphasechromosomen des weiblichen Individuums 1 (Mutter des Individuums 2).



Wie in Abbildung 4.39 dokumentiert, zeigte die vergleichende Genomhybridisierung zwischen den untersuchten Individuen der Spezies *C. pygmaea*, dass diese ein balanciertes Genom aufweisen. Starke Fluoreszenzsignale zeigten insbesondere terminale Chromosomenregionen. Verschiedene Varianten dieser intensiv fluoreszierenden Regionen konnten zwischen den verschiedenen Individuen identifiziert werden. So zeigten die drei untersuchten Individuen der Spezies *C. pygmaea* eine quantitativ und qualitativ unterschiedliche Organisation dieser stark fluoreszierenden Genomelemente. Das Muster dieser Genomelemente zeigte hierbei eine deutlichere Übereinstimmung zwischen den Individuen 1 und 2, die dergleichen Zuchtgruppe angehören, als im Vergleich dieser Individuen zu Individuum 3. In allen drei Individuen konnten polymorphe genomische Regionen identifiziert werden. Diese sind ausführlich in Kapitel 4.3.2 beschrieben und in den Abbildung 4.45 illustriert.

Die quantitative Analyse des Hybridisierungsmusters von CGH Experimenten erfolgte mittels der Software *QuiPS CGH*, wie in 3.11.5 beschrieben. Über das Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenzintensität entlang der Chromosomenachse war es möglich, Gewinne und Verluste genomischer Elemente zwischen Spezies nachzuweisen. Ein Beispiel für die densitometrische Analyse von CGH Experimenten mittels dieses Programms ist in der Abbildung 4.40 veranschaulicht. Sie illustriert die Ergebnisse der Quantifizierung des Hybridisierungsmusters der vergleichenden Genomhybridisierung mit gesamt-genomischer DNA der parentalen Spezies eines *Callithrix jacchus* x *Cebuella pygmaea* Inter-Spezies Hybriden auf Metaphasechromosomen des Hybriden (siehe Abb. 4.38 G).

Abbildung 4.40: Quantitative Analyse des in Abb. 3.38 illustrierten CGH Experimentes. Dargestellt ist der Karyotyp des männlichen *C. jacchus* (CJA) x *C. pygmaea* (CPY) Inter-Spezies Hybrid Individuums mit den mittleren Fluoreszenzintensitätsprofilen (Schwellenwerte: 0,80 und 1,20; n=Anzahl der quantifizierten Chromosomen). Die akrozentrischen CJA Chromosomen 14 und 20 sind homolog zu dem submetazentrischen CPY Chromosom 5. Die in Klammern gesetzten Homologen zeigen Heteromorphismen terminaler Genomelemente (rot fluoreszierende Chromosomenregionen). Die roten Balken seitlich der Chromosomen kennzeichnen Chromosomenregionen, die im väterlichen Genom im Vergleich zum mütterlichen Genom überrepräsentiert sind. Jeweils unterhalb der Chromosomen ist die jeweilige Nomenklatur der parental Spezies des Hybriden angegeben (siehe Tabelle 4.1). Die Chromosomen sind nach der Nomenklatur von CJA angeordnet.

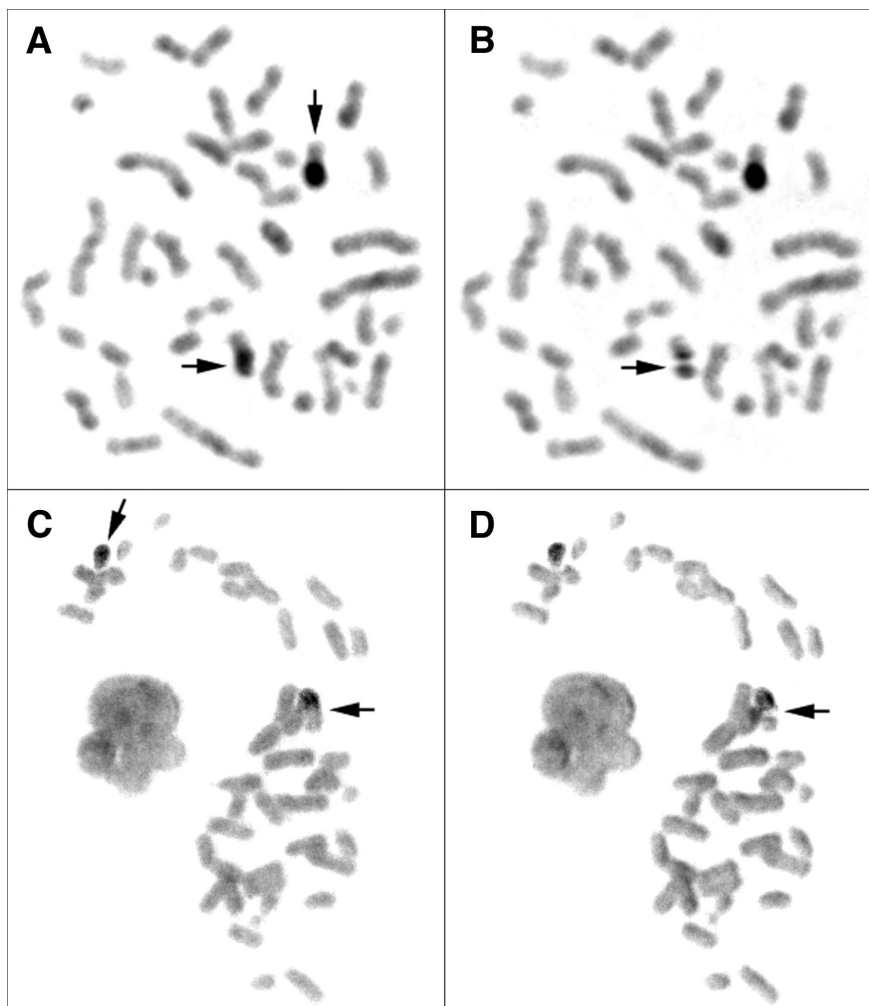


Die quantitative Analyse des in Abbildung 4.38 G dargestellten iCGH Experiments ergab, dass terminale Regionen von insgesamt 13 Chromosomen des Inter-Spezies Hybriden eine deutliche Überrepräsentierung für *C. pygmaea* Sequenzen aufwiesen (siehe Abb. 4.40). Die übrigen Chromosomenregionen erwiesen sich als balanciert zwischen *C. jacchus* und *C. pygmaea*. Auffallend sind die z.T. enormen Größenunterschiede zwischen den Homologen der heteromorphen Chromosomenpaare. Die Homologen des *C. jacchus* Chromosoms 19 (*C. pygmaea* Chromosom 18) zeichnen sich durch einen besonders markanten Größenunterschied aus. Im Unterschied dazu, ergaben die Ergebnisse derselben DNA Kombination auf Metaphasechromosomen von *C. jacchus* (Mutter des Inter-Spezies Hybriden) mit Ausnahme der Xq perizentromerischen Region keine genomischen Imbalancen.

4.3 Mikrodisektion zum Nachweis chromosomaler Polymorphismen

Die in Kapitel 3.5.3 beschriebene Methode der Glasnadel-Mikrodisektion wurde etabliert, um bei zwei verschiedenen Neuweltaffen gezielt DNA Sonden für polymorphe heterochromatische Chromosomenregionen zu generieren. Mit dieser Methode konnten spezifische DNA Sonden gewonnen werden von einer interstitiellen polymorphen Region auf Chromosom 14p der Spezies *Saimiri sciureus* (siehe Abb. 4.38 A), sowie von einer terminalen polymorphen Region auf Chromosom 18 des *Callithrix jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden (nach der Nomenklatur für *Cebuella pygmaea*). Das Homologe väterlichen Ursprungs des Chromosoms 18 wurde für die chromosomale Mikrodisektion ausgewählt, da sich dieses am deutlichsten in seiner Größe von dem mütterlichen Homologen unterschied (siehe Abbildung 4.40). Zur Identifizierung der zu mikrodisektierenden Zielchromosomen, wurde eine spezifische biotinylierte DNA Sonde hybridisiert und diese mittels der kolorimetrischen Detektion nachgewiesen wie in Kapitel 3.8.4 beschrieben. *S. sciureus* Chromosom 14p wurde über eine *Saguinus oedipus* Chromosom 20 spezifische DNA Sonde, Chromosom 18 des Hybriden über *S. oedipus* Chromosom 21 spezifische DNA Sonde identifiziert. Zur Dokumentation der chromosomalen Mikrodisektion wurden digitale Bilder vor und nach der chromosomalen Mikrodisektion mit Hilfe einer an ein Phasenkontrast-Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera (siehe 3.10.1) aufgenommen. Diese sind in Abbildung 4.41 veranschaulicht.

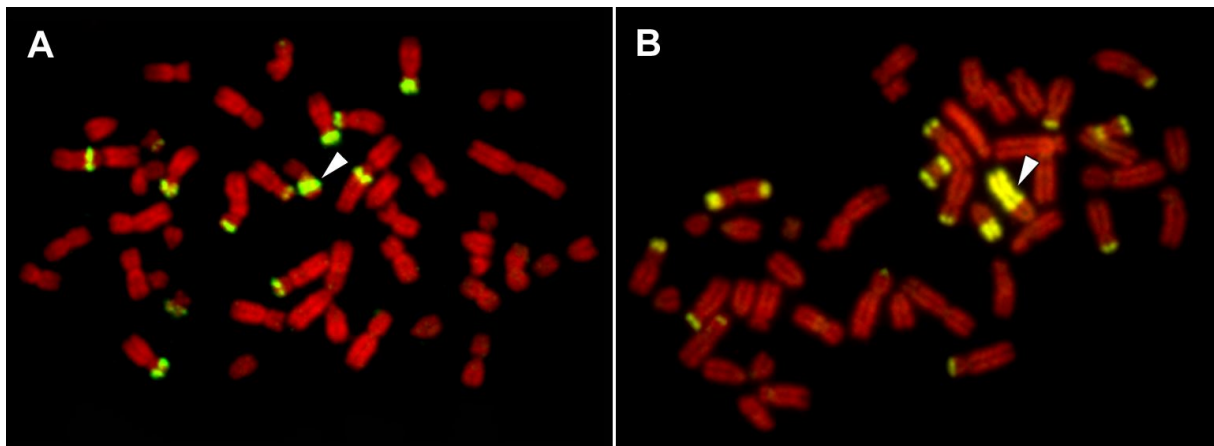
Abbildung 4.41: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Metaphasechromosomen vor (**A+C**) und nach (**B+D**) der chromosomalen Mikrodisektion. Zielchromosomen für die chromosomale Mikrodisektion sind an den dunkel gefärbten Chromosomenregionen erkennbar. **A)** Metaphasechromosomen von *S. sciureus*. Die Pfeile deuten auf die Homologen des *S. sciureus* Chromosoms 14, wovon eines eine zusätzliche polymorphe interstitielle genomische Region in dem kurzen Chromosomenarm trägt (hier nicht deutlich erkennbar). Diese Region war Ziel der chromosomalen Mikrodisektion. **B)** Die gleiche Metaphase von *S. sciureus* wie in **A)** nach der chromosomalen Mikrodisektion. Der Pfeil deutet auf die mikrodisektierte Region. **C)** Metaphasechromosomen des *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden. Ein schwarzes Farbpräzipitat ist auf den heteromorphen Homologen (ein kleines und ein großes akrozentrisches Chromosom) des Chromosoms 18 des Inter-Spezies Hybriden erkennbar (siehe Pfeile). Die nicht angefärbte Chromosomenregion des großen akrozentrischen Chromosoms repräsentierte die Zielregion für die chromosomale Mikrodisektion. **D)** Die gleiche Metaphase des Inter-Spezies Hybriden wie in **C)** nach der chromosomalen Mikrodisektion. Der Pfeil weist auf die mikrodisektierte Region hin.



Die mit chromosomaler Mikrodisektion generierten DNA Sonden wurden mittels DOP PCR amplifiziert und mit Reportermolekülen markiert wie in Kapitel 3.6.2 und 3.6.4 beschrieben. Anschließend wurde die Qualität der Sonden durch *reverse painting* (Carter et al. 1992) auf

Metaphasepräparate der gleichen Individuen, von denen die Sonde stammte, überprüft (siehe Abbildung 4.42).

Abbildung 4.42: *Reverse painting* mit Tamra-UTP markierten Mikrodissektions-Sonden auf Metaphasechromosomen von *Saimiri sciureus* **A)** und *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden **B)**. Die Mikrodissektions-Sonde ist jeweils in gelb, die chromosomale Gegenfärbung in rot dargestellt. Pfeile in **A)** und **B)** deuten auf Chromosomenregionen, die Zielregionen für die chromosomale Mikrodissektion waren. Sowohl bei *S. sciureus*, als auch bei dem Inter-Spezies Hybriden zeigten die Mikrodissektions-Sonden Sequenzhomologie zu Regionen auf weiteren Chromosomen.



Wie in Abbildung 4.42 erkennbar, resultierte mit beiden Sonden ein deutliches Signal in der mikrodissektierten Chromosomenregion. Auch wurden bei *S. sciureus*, als auch dem Inter-Spezies Hybriden zahlreiche weitere Chromosomenregionen mit der Mikrodissektions-Sonde angefärbt. Damit wurde offensichtlich, dass es sich bei den mikrodissektierten Regionen von *S. sciureus* und dem Inter-Spezies Hybriden um heterochromatische Regionen handelt, die aus repetitiven Sequenzen zusammengesetzt sind. In *S. sciureus* repräsentiert die mikrodissektierte Region in Chromosom 14p folglich einen polymorphen Heterochromatinblock, der in dem untersuchten Individuum von *S. sciureus* in heterozygotem Zustand vorliegt. Die Mikrodissektions-Sonde von *S. sciureus* identifizierte weiterhin p-terminale Heterochromatinblöcke auf den Chromosomen 5, 7, 10, 12 und 15 von *S. sciureus*, als auch einen interstitiellen Heterochromatinblock auf *S. sciureus* Chromosom 6q. Quantitative Polymorphismen, im Sinne von Längenvariationen von Heterochromatinblöcken konnten zwischen den Homologen der Chromosomen 5 und 12 nachgewiesen werden. Der Vergleich des Hybridisierungsmusters, das mit der Mikrodissektions-Sonde erhalten wurde, mit dem demjenigen des iCGH Experiments in Abbildung 4.38 A verdeutlicht, dass viele unbalancierte Chromosomenregionen, die mittels iCGH bei *S. sciureus* erkennbar wurden, denjenigen

Regionen entsprachen, die auch mit der Mikrodissektions-Sonde von *S. sciureus* nachgewiesen wurden. Die mittels iCGH nachgewiesenen unbalancierten Regionen stellen folglich heterochromatische Regionen dar. Über den Vergleich der beiden Hybridisierungsmuster konnte weiterhin festgestellt werden, dass sich nicht alle unbalancierten Genomelemente des iCGH Experiments mit dem Muster, das mit der Mikrodissektions-Sonde erhalten wurde, deckten. Stattdessen zeigte die Mikrodissektions-Sonde Homologie zu einer Subfraktion dieser Genomelemente. So wurden die Zentromerregionen, als auch ein Heterochromatinblock auf Chromosom 6q, die in dem ICGH Experiment deutlich unbalanciert erschienen, mit der Mikrodissektions-Sonde nicht angefärbt.

Die Mikrodissektions-Sonde des Inter-Spezies Hybriden repräsentiert eine heterochromatische Region des Chromosoms 18, die spezifisch für das väterliche Homologe ist (siehe Abb. 4.40). Sie kartierte auf Regionen von 15 Chromosomen des Inter-Spezies Hybriden, wobei jeweils nur ein Homologes angefärbt wurde. Die mittels iCGH nachgewiesenen genomischen Imbalancen in dem Inter-Spezies Hybriden (siehe Abb. 4.38 G und 4.40) deckten sich mit zwei Ausnahmen mit den Ergebnissen der Kartierung der Mikrodissektions-Sonde. Auf diese wird in Kapitel 4.3.2 im Zusammenhang mit der vergleichenden Kartierung der Mikrodissektions-Sonde bei verschiedenen Vertretern der Callitrichidae eingegangen. Die mit der Mikrodissektions-Sonde nachgewiesenen Polymorphismen bei dem Inter-Spezies Hybriden werden gleichfalls in Kapitel 4.3.2 beschrieben.

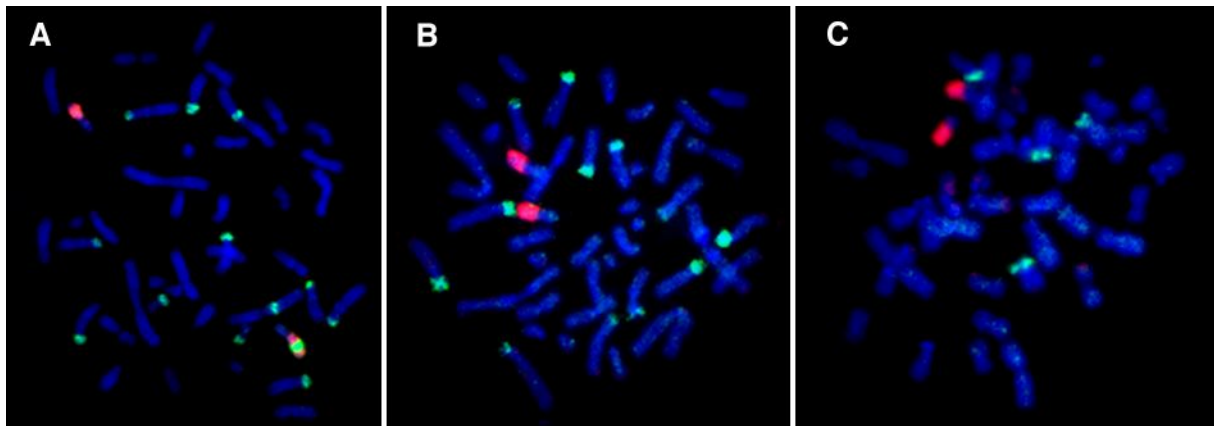
4.3.1 Vergleichende Kartierung der *S. sciureus* Mikrodissektions-Sonde

Die Mikrodissektions-Sonde von *S. sciureus* wurde mittels FISH auf Chromosomen von *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* und *Cebus apella* kartiert, um etwaige Homologien zu dieser Sonde bei Neuweltaffen verschiedener Gattungen nachweisen zu können. Diese Spezies wurden ausgewählt, da sie in naher Verwandtschaft zu *Saimiri* stehen (Rosenberger 1981). Es konnte jedoch kein Hybridisierungssignal bei diesen Spezies beobachtet werden (Abbildung hier nicht gezeigt).

Um das chromosomale Verteilungsmuster des repetitiven Sequenzmotivs der Mikrodissektions-Sonde bei Spezies innerhalb der Gattung *Saimiri* zu untersuchen, wurde sie vergleichend auf Chromosomen der Spezies *S. boliviensis* und *S. ustus* kartiert. Sie wurde jeweils co-hybridisiert mit der *Saguinus oedipus* Chromosom 20 spezifischen Sonde, als

subregionale Sonde zum Nachweis der Chromosomenregion 14p. In dem untersuchten Individuum von *S. sciureus* wies diese Chromosomenregion einen interstitiellen Heterochromatinblock in heterozygotem Zustand auf (siehe Abb. 4.38 A). Die Abbildung 4.43 illustriert die vergleichende Kartierung dieser Sonden auf Metaphasen *S. sciureus*, *S. boliviensis* und *S. ustus*.

Abbildung 4.43: Co-Hybridisierung der *S. sciureus* Mikrodisektions-Sonde (grün) und einer *S. oedipus* Chromosom 20 spezifischen Sonde (rot) bei **A**) *S. sciureus*, **B**) *S. boliviensis* und **C**) *S. ustus*.



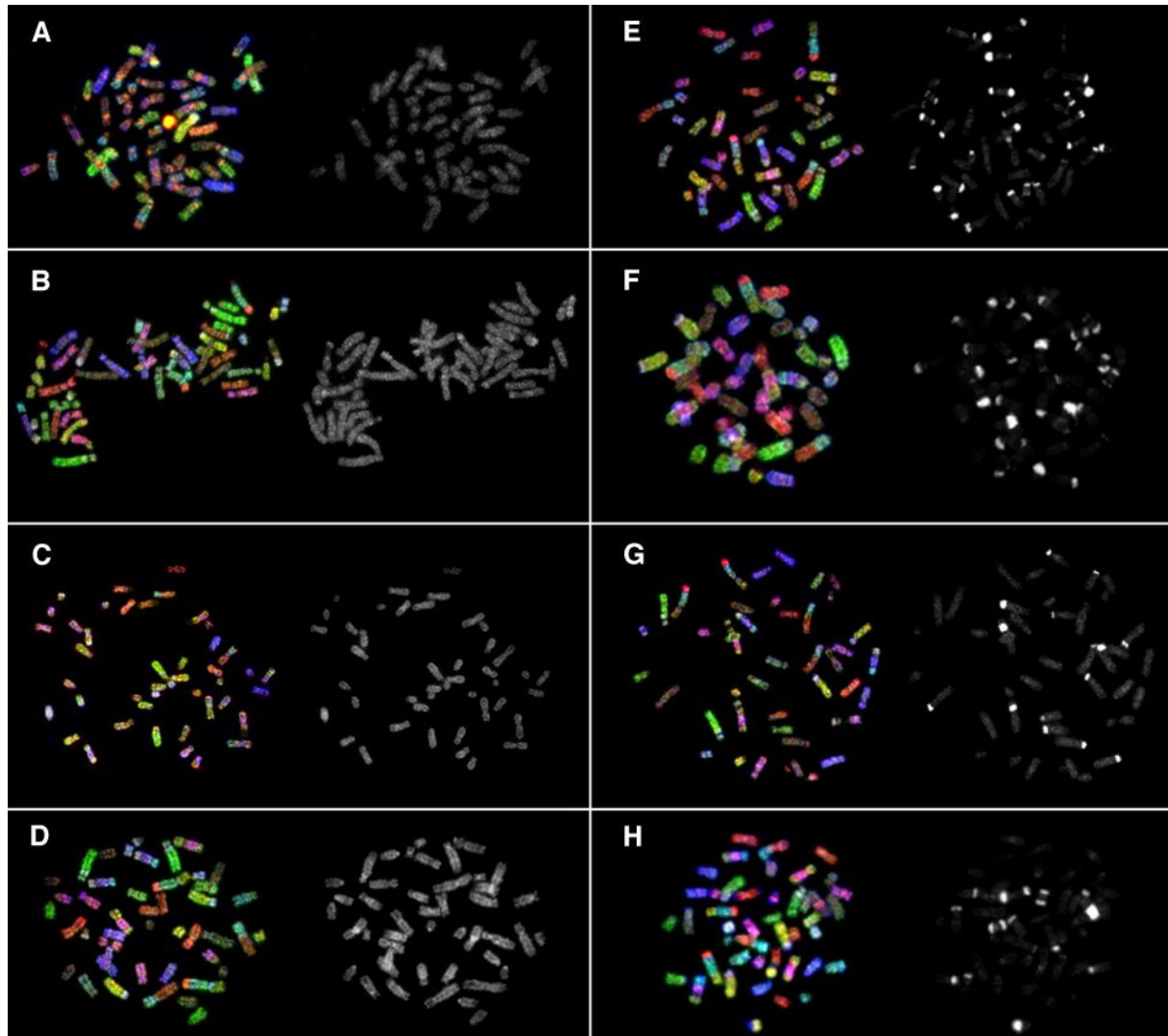
Wie in der Abbildung 4.43 erkennbar, zeigte die vergleichende Kartierung mit der Mikrodisektions-Sonde von *S. sciureus* ein unterschiedliches chromosomales Verteilungsmuster bei den untersuchten Individuen von *S. boliviensis* und *S. ustus*. Im Unterschied zu *S. sciureus* wiesen *S. boliviensis* und *S. ustus* keinen interstitiellen Heterochromatinblock in Chromosom 14p mit Sequenzhomologie zu der Mikrodisektions-Sonde auf. Auch wurden bei *S. boliviensis* und *S. ustus* Chromosomenregionen von weniger Chromosomen mit der Mikrodisektions-Sonde angefärbt. In *S. boliviensis* wurden terminale Heterochromatinblöcke auf insgesamt 6 Chromosomenpaaren (homolog zu *S. sciureus* Chromosomen 7, 9, 10, 12, 13 und 15) mit dieser Sonde identifiziert. Im Unterschied zu *S. sciureus* wies die Sonde Heterochromatinblöcke auf den *S. sciureus* 9 und 13 Homologen von *S. boliviensis* nach, jedoch nicht auf den *S. sciureus* 5, 6 und 14 Homologen. Quantitative Polymorphismen, im Sinne von Längenunterschieden terminaler Heterochromatinblöcke zwischen den Homologen eines Chromosomenpaares, konnten bei den *S. boliviensis* Chromosomen 7 und 12 beobachtet werden. Ein deutlich unterschiedliches chromosomales Verteilungsmuster repetitiver Genomelemente mit Homologie zu dem Sequenzmotiv der Mikrodisektions-Sonde war zwischen *S. sciureus* und *S. ustus* erkennbar. So wurden bei *S. ustus* Chromosomenregionen

von nur zwei Chromosomenpaaren (homolog zu *S. sciureus* Chromosom 10 und 12) mit der Mikrodissektions-Sonde identifiziert.

4.3.2 Vergleichende Kartierung der Mikrodissektions-Sonde des *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden

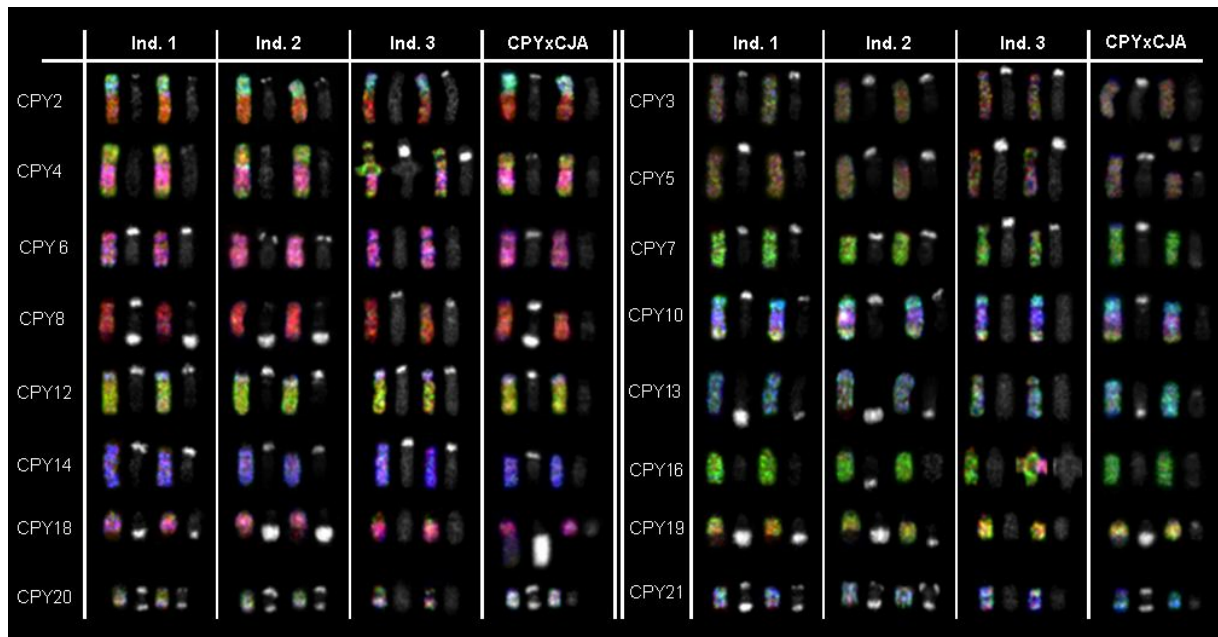
Die durch die chromosomale Mikrodissektion gewonnene repetitive Sonde des *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden wurde mittels FISH nach Vorhandensein und Verteilung der repetitiven Sequenz sowohl inter-, als auch intra-spezifisch bei verschiedenen Vertretern der Familie Callitrichidae untersucht. Hierfür wurde die DNA Sonde mit dem Subset L2 der 31-farben *L. lagothericha* multiplex Sonde (siehe 4.1.1.5, Tabelle 4.5 B) co-hybridisiert. Die *L. lagothericha* DNA Sonde diente hierbei der Chromosomenidentifizierung, um eine einfache chromosomale Lokalisation der Mikrodissektions-Sonde bei den untersuchten Spezies zu ermöglichen. Die drei Sonden Sets des *L. lagothericha* DNA Sonden Sets L2 wurden mit Digoxigenin-dUTP (blau), DNP-dUTP (grün) und Tamra-dUTP (rot) markiert und mit der Mikrodissektions-Sonde (biotinyliert, weiß dargestellt) kombiniert. Die Abbildung 4.44 veranschaulicht die Charakterisierung verschiedener Vertreter der Callitrichidae, darunter drei Individuen der Spezies *C. pygmaea* und eines der beiden *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybrid Individuen.

Abbildung 4.44 (siehe nächste Seite): Vergleichende Kartierung der Mikrodissektions-Sonde des *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden bei verschiedenen Vertretern der Familie Callitrichidae, zusammen mit dem *L. lagothericha* DNA Sonden Set L2. Zur besseren Übersicht wurde die Kartierung des *L. lagothericha* DNA Sonden Set L2 jeweils links und die der Mikrodissektions-Sonde jeweils rechts dargestellt. **A)** illustriert eine Metaphase nach FISH mit diesem Sonden Set von *Saguinus oedipus*, **B)** von *Callimico goeldii*, **C)** von *Callithrix argentata* und **D)** von *Callithrix jacchus* (Mutter des Inter-Spezies Hybriden). **(E-H)** Charakterisierung verschiedener Individuen (=Ind.) von *C. pygmaea* (Ind 1=**E**, Ind. 2=**F**, Ind 3=**G**) und eines weiblichen Individuums des *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden (**H**) mit diesem Sonden Set.



Die vergleichende Kartierung der Mikrodissektions-Sonde bei verschiedenen Vertretern der Callitrichidae (siehe Abb. 4.44) demonstriert, dass dieses repetitive Sequenzmotiv ausschließlich bei den drei Individuen der Spezies *C. pygmaea* und dem *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden nachweisbar war. In keiner anderen untersuchten Spezies konnte ein spezifisches Hybridisierungssignal über dem Hintergrundschwellenwert beobachtet werden. Es kann daher angenommen werden, dass diese mikrodissektierte heterochromatische Chromosomenregion spezies-spezifisch für *C. pygmaea* ist. Es konnten sowohl quantitative wie auch qualitative Polymorphismen zwischen den drei verschiedenen Individuen der Spezies *C. pygmaea* und dem Inter-Spezies Hybriden identifiziert werden. Die Abbildung 4.45 veranschaulicht die chromosomale Variabilität der nachgewiesenen repetitiven Genomelemente anhand einer Zusammenfassung aller Chromosomen der drei *C. pygmaea* Individuen und des weiblichen Inter-Spezies Hybrid Individuums, die mit der Sonde identifiziert wurden.

Abbildung 4.45: Chromosomale Lokalisation von Heterochromatinblöcken, die mit der Mikrodissektions-Sonde bei drei verschiedenen Individuen (=Ind. 1-3) von *C. pygmaea* (CPY) und dem weiblichen Individuum des *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden (CPY x CJA) nachgewiesen wurden. Es wurden hier nur Chromosomen des weiblichen Individuums dargestellt, da zwischen dem untersuchten männlichen und weiblichen Individuum des Inter-Spezies Hybriden kein Unterschied in dem Kartierungsmuster der Mikrodissektions-Sonde festgestellt wurde. Jeweils links dargestellt ist die Hybridisierung mit dem *L. lagothericha* Sonden Set, rechts die chromosomale Lokalisation der Mikrodissektions-Sonde (vgl. Abbildung 4.44). Die Chromosomennomenklatur folgt Canavez et al. (1996).



Wie in Abbildung 4.45 erkennbar, zeigten die verschiedenen Individuen von *C. pygmaea* und das *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybrid Individuum unterschiedliche Muster in der Verteilung des repetitiven Sequenzmotivs. Die *C. pygmaea* Individuen 1 und 2 (Mutter und Sohn) zeigten eine deutlich größere Übereinstimmung, aber kein identisches Hybridisierungsmuster, verglichen mit *C. pygmaea* Individuum 3, welches einer anderen Zuchtpopulation entstammt. Zahlreiche qualitative Polymorphismen und quantitative Polymorphismen konnten zwischen den untersuchten Individuen, wie auch zwischen homologen Chromosomen eines Individuums nachgewiesen werden. So konnten bei den *C. pygmaea* Individuen 1 und 2 und dem Inter-Spezies Hybrid Individuum terminale Heterochromatinblöcke auf den Chromosomen 6, 10, 13 und 18-21 identifiziert werden, welche auf den homologen Chromosomen von *C. pygmaea* Individuum 3 fehlten. Umgekehrt wies Individuum 3 einen großen interstitiellen Heterochromatinblock auf Chromosom 4 auf, welcher auf dem korrespondierenden Chromosom der anderen Individuen nicht nachweisbar

war. Bei Individuum 2 konnte ferner ein Heterochromatinblock auf Chromosom 16 identifiziert werden, der bei den anderen Individuen nicht vorhanden war.

Quantitative Polymorphismen, im Sinne von Längenvariationen heterochromatischer Regionen, konnten zwischen den verschiedenen Individuen, als auch zwischen homologen Chromosomen innerhalb eines Individuums vielfach beobachtet werden. Besonders ausgeprägt waren diese zwischen den Homologen der Chromosomen 5 und 8 bei Individuum 1, der Chromosomen 13 und 19 bei den Individuen 1 und 2, sowie der prominente Heterochromatinblock auf *C. pygmaea* Chromosom 18 bei dem Inter-Spezies Hybriden.

Durch den inter-und intraspezifischen Vergleich dieses repetitiven Motivs war es möglich, eindeutig die Spezies Spezifität und damit den väterlichen Ursprung der Heterochromatinblöcke bei dem *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden zu bestimmen. Die Kartierung der Mikrodisektions-Sonde erlaubte den Nachweis zweier weiterer Chromosomen (homolog zu *C. pygmaea* Chromosom 2 und 4) väterlicher Herkunft anhand feiner Heterochromatinblöcke an terminalen Chromosomenregionen, die mittels iCGH (siehe 3.2, Abb. 4.38 G und 4.40) nicht erkennbar waren. Somit konnten insgesamt 15 Chromosomen väterlicher Herkunft identifiziert werden.

4.4 Vergleichende Untersuchungen zur Zellkernarchitektur

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigten Untersuchungen zur Karyotypevolution mittels *multidirektional chromosome painting* und Inter-Spezies CGH bei Neuweltaffen. Um evolutionäre Aspekte der Zellkernarchitektur bei Neuweltaffen zu beleuchten, wurden ergänzend dazu vergleichende Untersuchungen zur radialen Anordnung von Chromosomen Territorien (CT), chromosomalen Subregionen und von Heterochromatin durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen sollte den Fragestellungen nachgegangen werden, in welchem Umfang eine evolutionäre Konservierung der radialen Organisation von CT, sowie innerhalb von CT im Zellkern existiert. In diesem Zusammenhang sollte auch untersucht werden, welchen Einfluss die Neubildung oder Amplifikation von Spezies-spezifischem Heterochromatin auf die Topologie von benachbartem Chromatin hat.

Um diese Fragenkomplexe zu erörtern, wurden eine Reihe von DNA Sonden Sets zusammengestellt und auf 3D fixierte Zellkerne hybridisiert. Je nach Fragestellung wurden

vergleichende Untersuchungen zwischen dem Menschen und den Neuweltaffen *Callithrix jacchus* und *Saimiri sciureus* durchgeführt. Um Zellkerne des gleichen Zellzyklusstadiums miteinander vergleichen zu können, wurden nur Zellkernen, die sich in der S-Phase befanden (erkennbar über den Nachweis von inkorporiertem BrdU, siehe 3.8.3) analysiert. 3D FISH Experimente zu den oben genannten Fragestellungen werden nachfolgend in den Kapiteln 4.4.1- 4.4.4 beschrieben.

4.4.1 Radiale Anordnung der menschlichen Chromosom 1 und 19 Homologen

Am Beispiel der menschlichen Chromosomen 1 und 19 und der Homologen der Neuweltaffen *S. sciureus* und *C. jacchus* sollten verschiedene Aspekte der vergleichenden Genomorganisation untersucht werden. Wie in Abbildung 4.46 schematisch dargestellt, unterscheiden sich die Homologen des menschlichen Chromosoms 1 bei Neuweltaffen durch eine Reihe von evolutionär abgeleiteten Fissionen. Zudem ist eines dieser Homologen bei *S. sciureus* in eine Translokation mit Chromosom 19 homologem Material (sehr reich) involviert und besitzt gleichzeitig einen polymorphen Heterochromatinblock für den das zu untersuchende Individuum heterozygot ist. Durch *multi-color* FISH mit ausgewählten Sonden auf 3D fixierte Zellkerne von Mensch, *S. sciureus* und *C. jacchus* sollte untersucht werden, ob mit diesen evolutionären Chromosomenfissionen auch eine Reorganisation des Chromatins im Nukleus einhergeht oder die Assoziation der (anzestralen) subchromosomalen Domänen erhalten bleibt. Ferner, ob die entsprechenden Subregionen des menschlichen Chromosoms 1 und deren Homologe Regionen bei *S. sciureus* und *C. jacchus* eine Gendichte-abhängige radiale Anordnung zeigen und diese Anordnung zwischen dem Menschen und diesen Neuweltaffen evolutionär konserviert ist. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die radiale Organisation durch Translokation mit sehr reichem Chromatin oder Amplifikation von polymorphen Heterochromatin modifiziert wird.

4.4.1.1 DNA Sonden Sets

Um die Fragestellungen in 4.4 zu erörtern, wurde ein Sonden Set zusammengestellt, das eine Auswahl chromosomen-spezifischer DNA Sonden von *Lagothrix lagotricha*, *Saguinus oedipus* und *Hylobates concolor* enthielt. Diese wurden als subregionale Sonden verwendet und deckten in ihrer Gesamtheit das menschliche Chromosom 1 ab. Ziel war hierbei die Differenzierung des menschlichen Chromosoms 1, (sowie dessen Homologe

Chromosomen bei *S. sciureus* und *C. jacchus*) in Regionen mit unterschiedlichen Gendichten. Die Gendichte der subchromosomalen Regionen wurde hierbei nach [www.ncbi.nlm.nih.gov \(build 31\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/build/31) berechnet. Die *S. oedipus* Chromosom 5 spezifische Sonde, diente zum Nachweis des menschlichen (homologen) Chromosoms 19. Zum anderen wurden spezifische repetitive DNA Sonden zum Nachweis extrem genarmer Regionen des menschlichen (homologen) Chromosoms 1 in den Sonden Set integriert: Eine durch Mikrodissektion generierte DNA Sonde spezifisch für einen polymorphen Heterochromatinblock von *S. sciureus* (siehe 4.3) - oder bei Hybridisierung auf menschliche Zellkerne - die Sonde pUC 1.77, spezifisch für den Heterochromatinblock in der Bande 1q12 des Menschen. Die Komposition des Sonden Sets ist in der Tabelle 4.7 dargestellt. Die Abbildung 4.46 illustriert schematisch die Kartierung der genannten Sonden auf (sub)chromosomale Regionen des menschlichen Chromosoms 1 und 19, sowie auf den korrespondierenden Homologen bei *S. sciureus* und *C. jacchus*.

Abbildung 4.46: Schematische Darstellung von chromosomalen Regionen unterschiedlicher Gendichte, die mit dem Sonden Set zur Untersuchung der radialen Anordnung der menschlichen (homologen) Chromosom 1 Subterritorien und 19 CT im Zellkern von Mensch, *S. sciureus* (SSC) und *C. jacchus* (CJA) differenziert werden können. Das Sonden Set setzte sich aus chromosomen-spezifischen DNA Sonden von *L. lagothericha* (LLA), *S. oedipus* (SOE) und *H. concolor* (HCO) zusammen, sowie der repetitiven Sonde pUC 1.77 oder alternativ einer Mikrodissektions-Sonde, spezifisch für den *S. sciureus* polymorphen Heterochromatinblock (siehe Pfeilkopf).

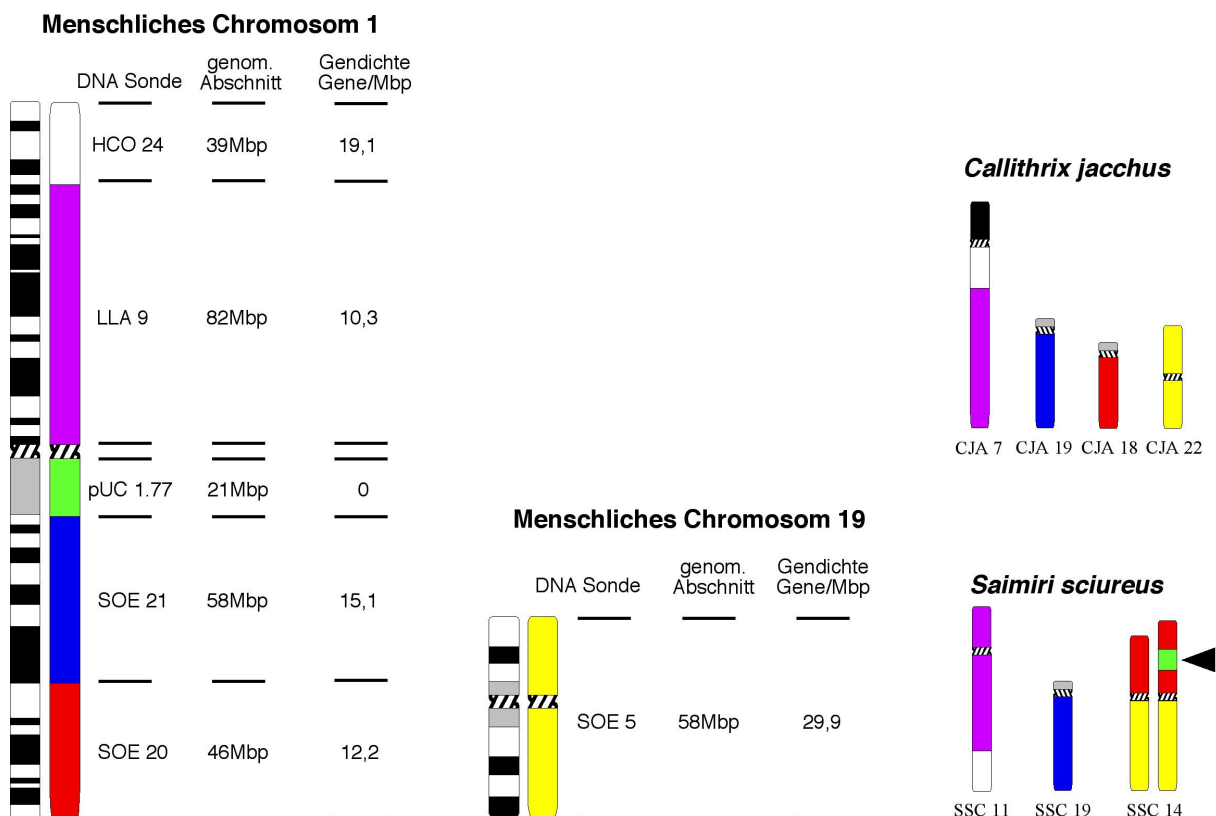


Tabelle 4.7: Markierungsschema des Sonden Sets P1, zusammengesetzt aus *L. lagothericha* (LLA), *S. oedipus* (SOE) und *H. concolor* (HCO) chromosomen-spezifischen Sonden, zur subchromosomalen Differenzierung des menschlichen Chromosoms 1 in Kombination mit Chromosom 19 bei Homologen von Mensch, *C. jacchus* und *S. sciureus*. Bei Hybridisierungen auf Neuweltaffenpräparate wurde zusätzlich eine Mikrodisektions-Sonde von *S. sciureus* (SSC md, P2) in den Sonden Set P1 integriert. Bei Hybridisierungen auf menschliche Präparate wurde stattdessen die Sonde pUC 1.77 (P3) mit dem Sonden Set P1 kombiniert. Biotin-dUTP wurde über Avidin-Cy5, Digoxigenin-dUTP über den Antikörper Schaf- α -Dig-FITC nachgewiesen.

Set	Homologe Chromosomenregionen des Menschen	Sonde	Biotin-dUTP	Dig.-dUTP	Tamra-dUTP	Falschfarbe
P1	1p34-pter	HCO 24	x	x		weiß
	1p11-1pter	LLA 9	x		x	magenta
	1q21-31	SOE 21	x			blau
	1q32-qter	SOE 20			x	rot
	19	SOE 5		x	x	gelb
P2	-	SSC md		x		grün
P3	1q12	pUC 1.77		x		grün

Das DNA Sonden Set (P1) wurde nach dem Prinzip, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, zusammengestellt und balanciert. Bei Verwendung der Sonde pUC 1.77 (P3) wurde keine menschliche C₀t-1 DNA verwendet, da die Sonde P3 aufgrund ihrer Zusammensetzung aus repetitiven Sequenzen, die in der C₀t-1 DNA ebenfalls enthalten sind, zu schnell mit der C₀t-1 DNA reassoziieren würde. Stattdessen wurde bei Hybridisierungen auf menschliche Präparate gesamt-genomische DNA des Orangutans zur Suppression repetitiver Sequenzen verwendet, da beim Orangutan kein Heterochromatin in der Bande 1q12 vorhanden ist. Die repetitiven Sonden P2 bzw. P3 wurden getrennt von dem Sonden Set P1 gefällt, in Hybridisierungspuffer resuspendiert und denaturiert und erst nach der Denaturierung zu dem Sonden Set P1 hinzugefügt, da die 30 Min. Inkubation der Sonden P2 und P3 bei 37°C zur Reassoziaton entfiel (siehe 3.7.1, 3.7.2). Abbildung 4.47 zeigt FISH mit diesem Sonden Set auf Metaphasechromosomen des Menschen und der Neuweltaffen *S. sciureus* und *C. jacchus*. Abbildung 4.48 und 4.49 illustrieren FISH Experimente mit dem gleichen Sonden Set auf 3D fixierte Zellkerne dieser Spezies.

Abbildung 4.47 (siehe nächste Seite): FISH mit den in Tabelle 4.7 beschriebenen Sonden P1+P3 auf Metaphasen des Menschen (A) und P1+P2 auf Metaphasen der Neuweltaffen *S. sciureus* (B) und *C. jacchus* (C). Die Sonde P2 (grün), spezifisch für einen polymorphen Heterochromatinblock von *S. sciureus* (siehe Pfeil in B), zeigte Sequenzhomologie zu weiteren Chromosomenregionen.

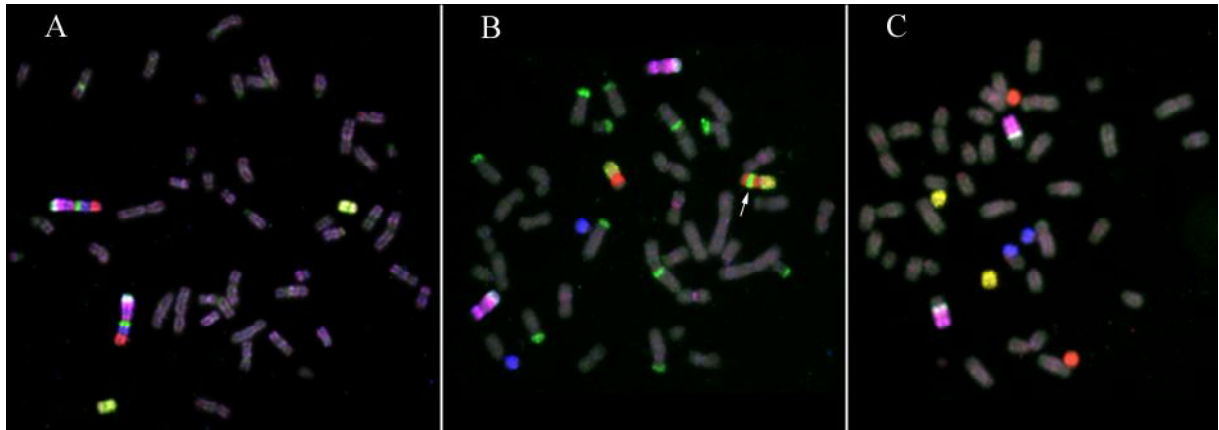


Abbildung 4.48: Dokumentation des FISH Experiments mit DNA Sonden Sets P1+P3 auf 3D fixierte Zellkerne einer menschlichen Fibroblasten-Zelllinie. Dargestellt ist eine Galerie der lichtoptischen Serienschritte 7-27 (von insgesamt 31 Schnitten) durch einen Zellkern.

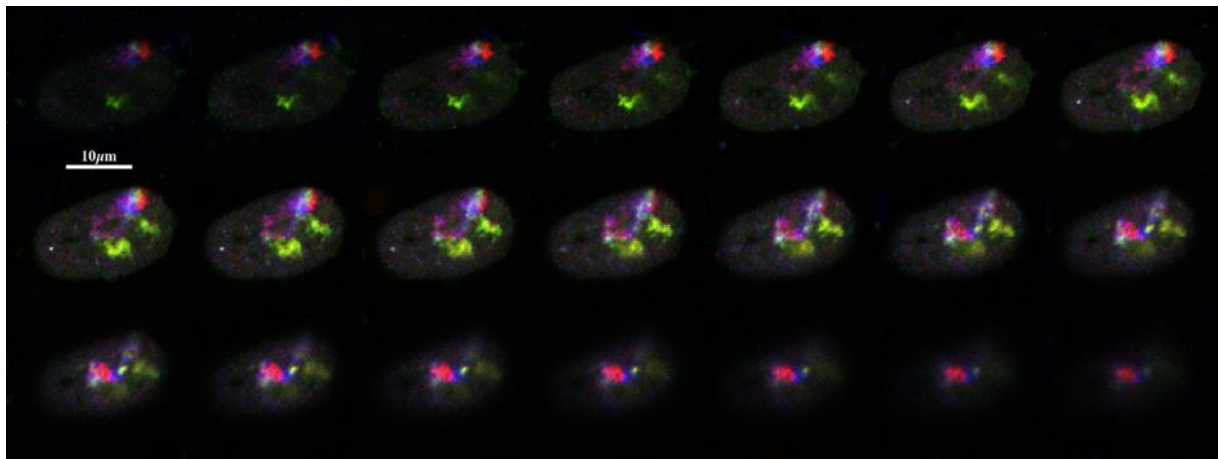
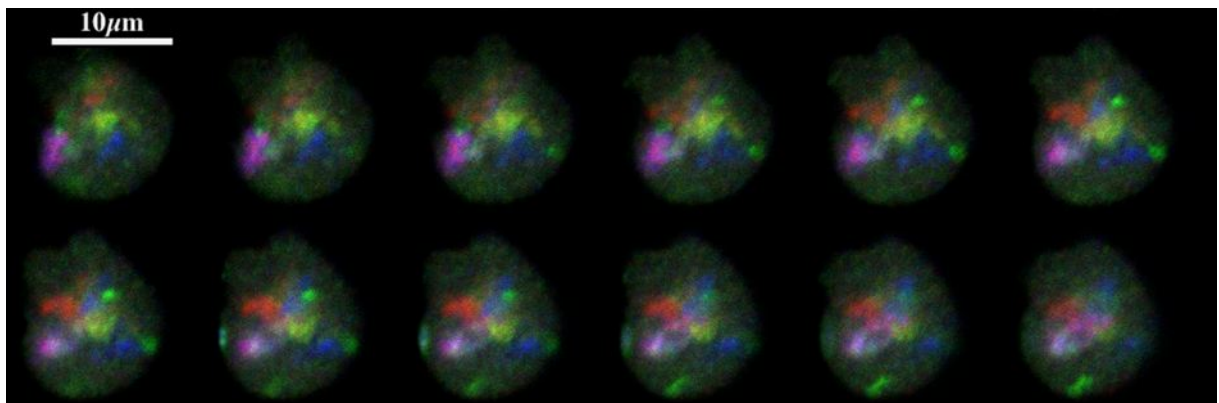


Abbildung 4.49 veranschaulicht die Hybridisierung mit DNA Sonden Sets P1+P2 anhand einer Galerie von 12 mittleren Serienschritten von insgesamt 36 Schnitten durch einen 3D fixierten Zellkern einer lymphoblastoiden Zelllinie des Totenkopffaffen *S. sciureus*.



Da die Qualität der Hybridisierung mit kombinatorisch markierten DNA Sonden (siehe Tabelle 4.7) auf 3D fixierte Kerne von lymphoblastoiden Zelllinien nicht bei einer ausreichenden Anzahl von Zellkernen zufrieden stellend war (geringes Signal/Hintergrundverhältnis, siehe 5.1.2.2), war eine quantitative Auswertung des Experiments nicht möglich. In weiteren Experimenten wurde stattdessen eine deutlich vereinfachte Sondenzusammensetzung gewählt, indem nur maximal drei DNA Sonden miteinander kombiniert wurden. Auch wurde auf eine kombinatorische Markierung der DNA Sonden verzichtet, um eine eindeutige Identifizierung der DNA Sonden gewährleisten zu können. Tabelle 4.8 illustriert die Zusammensetzung der neu zusammengestellten Sonden Sets S1 und S2.

Tabelle 4.8: Zusammensetzung der Sonden Sets S1 (A) und S2 (B). Sonden Subset P1 enthielt jeweils nur zwei chromosomen-spezifische DNA Sonden anstatt von fünf in dem ursprünglichen Sonden Subset. Die repetitive DNA Sonde P2 wurden jeweils getrennt von Sonden Subset P1 denaturiert und erst nach der Reassoziaton von Sonden Subset P1 mit diesem kombiniert. Anstatt Digoxigenin-dUTP wurde SpectrumGreen-dUTP verwendet, da mit diesem Fluorochrom reproduzierbarere Ergebnisse erzielt wurden. Biotin wurde über Avidin-Cy5 nachgewiesen. SSC md = Mikrodissektions-Sonde von *S. sciureus*, SOE = *S. oedipus*, HCO = *H. concolor*.

A)

Set	Homologie zum Menschen	Sonde	Biotin -dUTP	SpectrumGreen -dUTP	Tamra -dUTP	Falschfarbe
P1	1q32-1qter	SOE 20			x	rot
	19	SOE 5	x			blau oder grün
P2	-	SSC md		x		grün

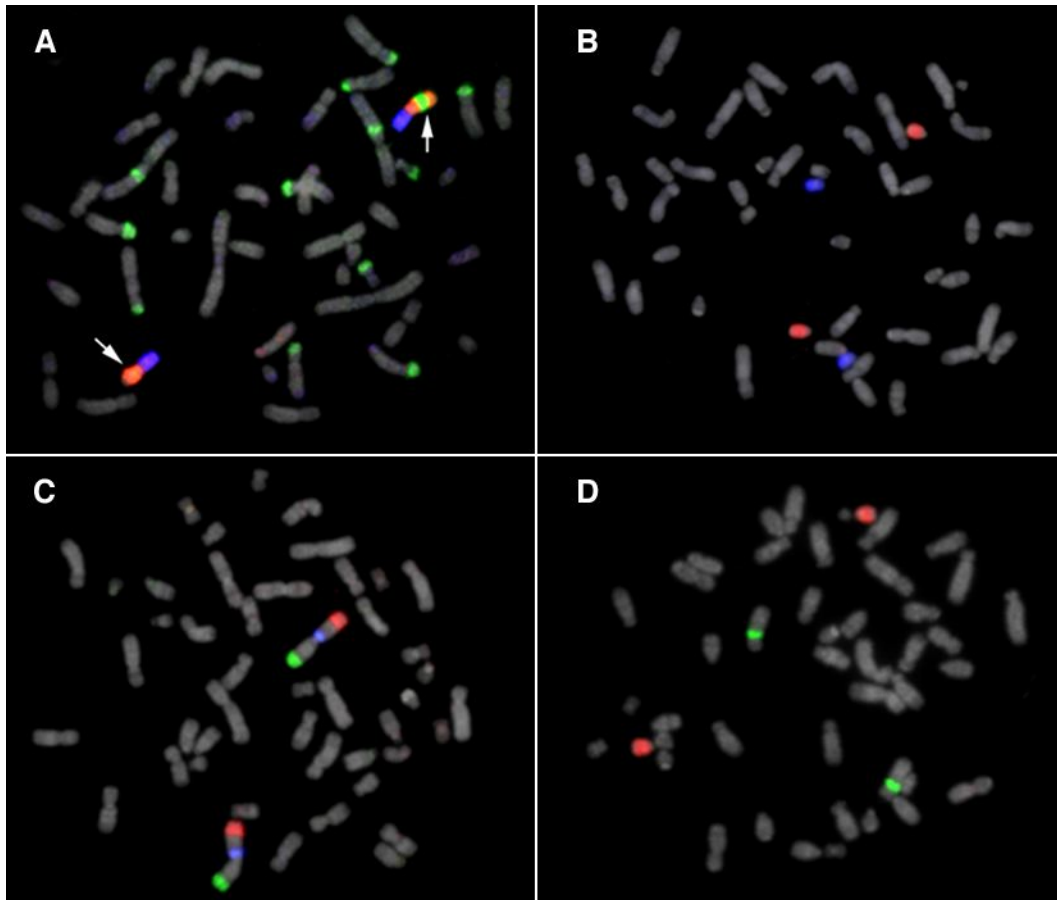
B)

Set	Homologie zum Menschen	Sonde	Biotin -dUTP	SpectrumGreen -dUTP	Tamra -dUTP	Falschfarbe
P1	1q32-1qter	SOE 20			x	rot
	1p34-pter	HCO 24		x		grün
P2	1q12	pUC 1.77	x			blau

Die Abbildung 4.51 zeigt die Hybridisierung mit Sonden Set S1 auf Metaphasechromosomen von *S. sciureus* und *C. jacchus* und die Hybridisierung mit Sonden Set S2 auf Metaphasechromosomen des Menschen und *C. jacchus*.

Abbildung 4.50 (siehe nächste Seite): FISH mit Sonden Set S1 auf Metaphasechromosomen von *S. sciureus* (A) und *C. jacchus* (B) und mit Sonden Set S2 auf Metaphasechromosomen von Mensch (C) und *C. jacchus* (D). In A)-B) sind *S. oedipus* Chromosom 20 homologe Regionen in rot, *S. oedipus* Chromosom 5 homologe Regionen in blau und Heterochromatin, spezifisch für *S. sciureus* in grün dargestellt. Pfeile in (A) markieren homologe Chromosomen, von denen eines einen interstitiellen polymorphen Heterochromatinblock aufweist. In

C)-D) sind *S. oedipus* Chromosom 20 homologe Regionen in rot, *H. concolor* Chromosom 24 homologe Regionen in grün und der Heterochromatinblock, spezifisch für die Chromosomenregion 1q12 des Menschen in blau abgebildet. Die DAPI Gegenfärbung ist in grau dargestellt.



4.4.1.2 3D FISH an Zellkernen von Mensch und Neuweltaffen

4.4.1.2.1 3D FISH mit Sonden Set S1

Das Sonden Set S1 wurde auf 3D fixierte Kerne von lymphoblastoiden Zelllinien der Neuweltaffen *C. jacchus* und *S. sciureus* hybridisiert. Wie die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit diesem Sonden Set auf Metaphasechromosomen zeigt (siehe Abb. 4.50 A, B), weist *C. jacchus* separate Chromosomen homolog zu den *S. oedipus* Chromosom 5 und 20 auf, wohingegen bei *S. sciureus* eine Translokation der korrespondierenden Homologen vorliegt. *S. sciureus* unterscheidet sich ferner von *C. jacchus* durch einen interstitiellen, polymorphen Heterochromatinblock in dem homologen *S. oedipus* 20 Chromosom. Es sollte zum einen untersucht werden, ob homologes Chromatin zu *S. oedipus* Chromosom 5 (genreich) und zu *S. oedipus* Chromosom 20 (relativ genarm) in beiden Spezies eine radiale

nukleäre Verteilung in Abhängigkeit von der Gendichte zeigen. Zum anderen, ob diese radiale Anordnung in der Spezies *S. sciureus* modifiziert wird durch Translokation von sehr genreichem Chromatin (homolog zu *S. oedipus* Chromosom 5) oder durch Amplifikation von polymorphem Heterochromatin. Abbildungen 4.51 und 4.52 illustrieren Hybridisierungen mit diesem Sonden Set auf 3D fixierten Zellkerne von *S. sciureus* und *C. jacchus*.

Abbildung 4.51: Galerie mit einer Auswahl von lichtoptischen Serienschritten durch den Zellkern einer lymphoblastoiden Zelllinie von *C. jacchus*. Gezeigt sind die Ebenen 7-24 von insgesamt 36. Die chromosomale Gegenfärbung mit TOPRO ist in blau, *S. oedipus* Chromosom 20 homologe CT sind in rot und *S. oedipus* Chromosom 5 homologe CT in grün dargestellt. Skalierungsbalken=5µm.

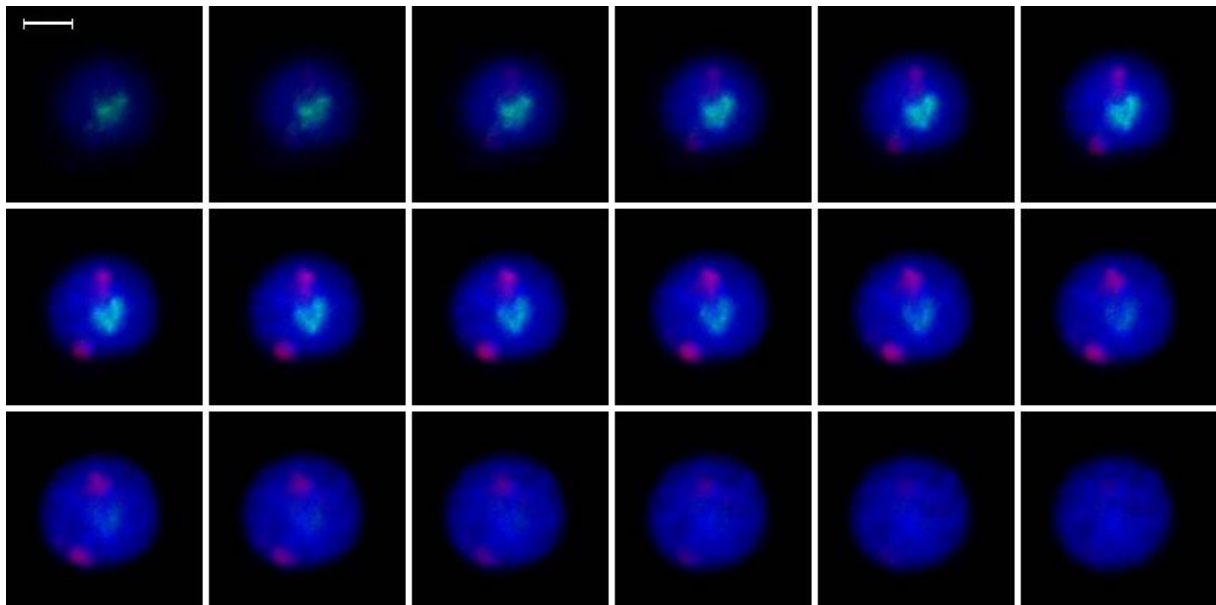
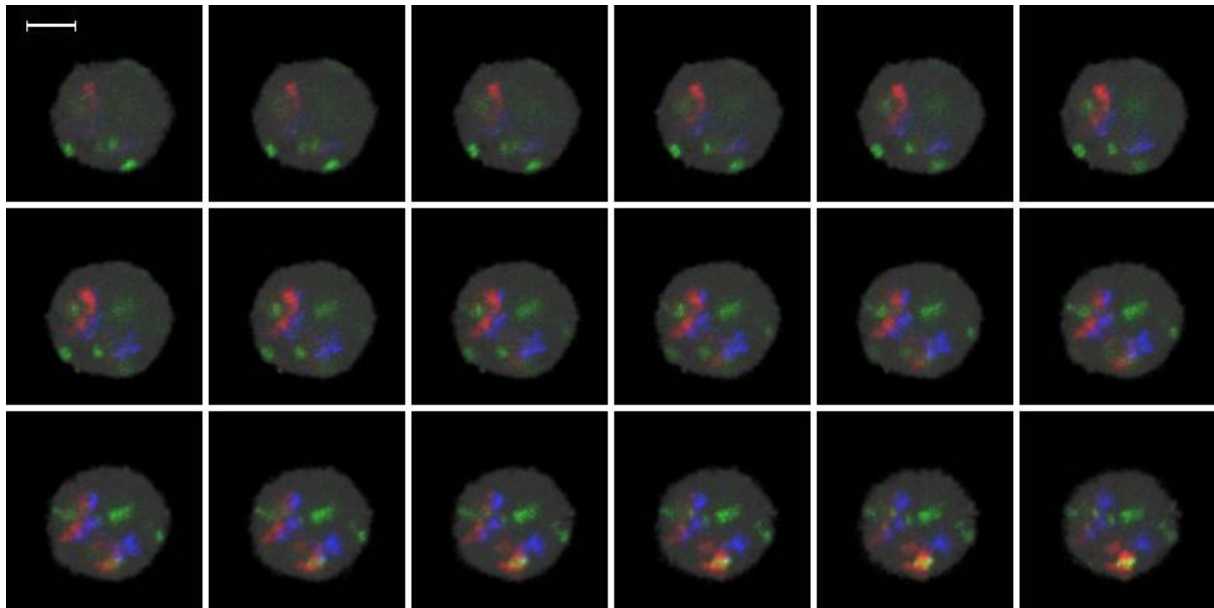


Abbildung 4.52 (siehe nächste Seite): Galerie mit einer Auswahl von lichtoptischen Serienschritten (Ebenen 13-30 von insgesamt 39) durch einen lymphoblastoiden Zellkern von *S. sciureus*. *S. oedipus* Chromosom 20 homologe Subterritorien sind in rot, *S. oedipus* Chromosom 5 homologe Subterritorien in blau und *S. sciureus* spezifisches Heterochromatin in grün dargestellt. Deutlich differenzierbar sind die Homologen väterlichen bzw. mütterlichen Ursprungs, die sich durch den interstitiellen Heterochromatinblock voneinander unterscheiden. Grau unterlegt erscheint die „künstliche Gegenfärbung“ (siehe 3.11.3). Skalierungsbalken=5µm.



4.4.1.2.2 3D FISH mit Sonden Set S2

Das Sonden Set S2 wurde auf 3D fixierte Kerne einer lymphoblastoiden Zelllinie des Menschen und *C. jacchus* und hybridisiert. Die in dem Sonden Set enthaltenen DNA Sonden wiesen zwei Chromosomenregionen unterschiedlicher Gendichte des menschlichen Chromosoms 1 und deren homologe Chromosomen (-regionen) bei *C. jacchus* nach: Die *H. concolor* Chromosom 24 spezifische Sonde zeigte Homologie zu einer relativ reichen Region (1p34-pter) und die *S. oedipus* Chromosom 20 spezifische Sonde zu einer relativ genarmen Region (1q32-qter). Beim Menschen wurde zusätzlich der Heterochromatinblock in der Bande 1q12, der keine Gene enthält, nachgewiesen (siehe Abb. 4.46). Es sollte untersucht werden, ob die menschlichen Chromosom 1 Subterritorien, wie auch die (Sub-)Territorien der entsprechenden Homologen bei *C. jacchus* eine Gendichte-korrelierte radiale Anordnung im Zellkern zeigen. Ferner, ob diese auch im Falle von zwei evolutionär abgeleiteten Fissionen bei *C. jacchus* zwischen Mensch und *C. jacchus* konserviert ist. Die Abbildungen 4.53 und 4.54 veranschaulichen Hybridisierung mit Sonden Set S2 auf 3D fixierte Zellkerne des Menschen und *C. jacchus*.

Abbildung 4.53 (siehe nächste Seite): Galerie mit einer Auswahl optischer Serienschritte (Ebenen 7-24 von insgesamt 36) durch einen lymphoblastoiden Zellkern des Menschen nach FISH mit SONDENSET S2. *H. concolor* Chromosom 24 homologe Subterritorien sind in grün und *S. oedipus* Chromosom 20 homologe Subterritorien in rot dargestellt. Heterochromatin, spezifisch für die Region 1q12 des Menschen ist in blau abgebildet. Die „künstliche Gegenfärbung“ ist in grau dargestellt. Skalierungsbalken=5µm.

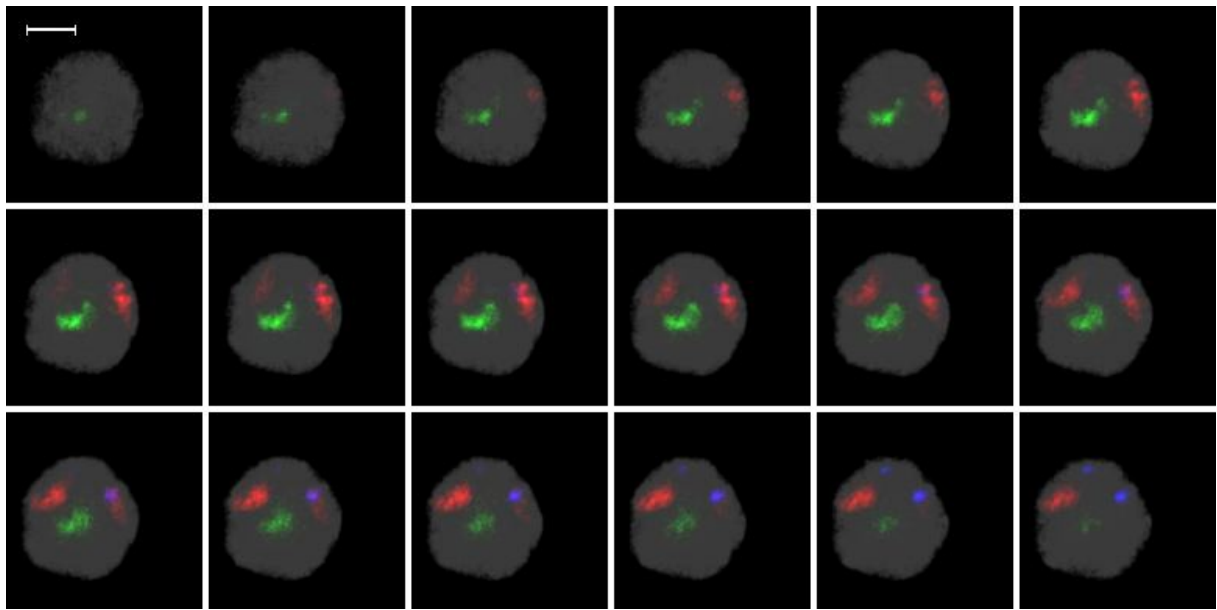
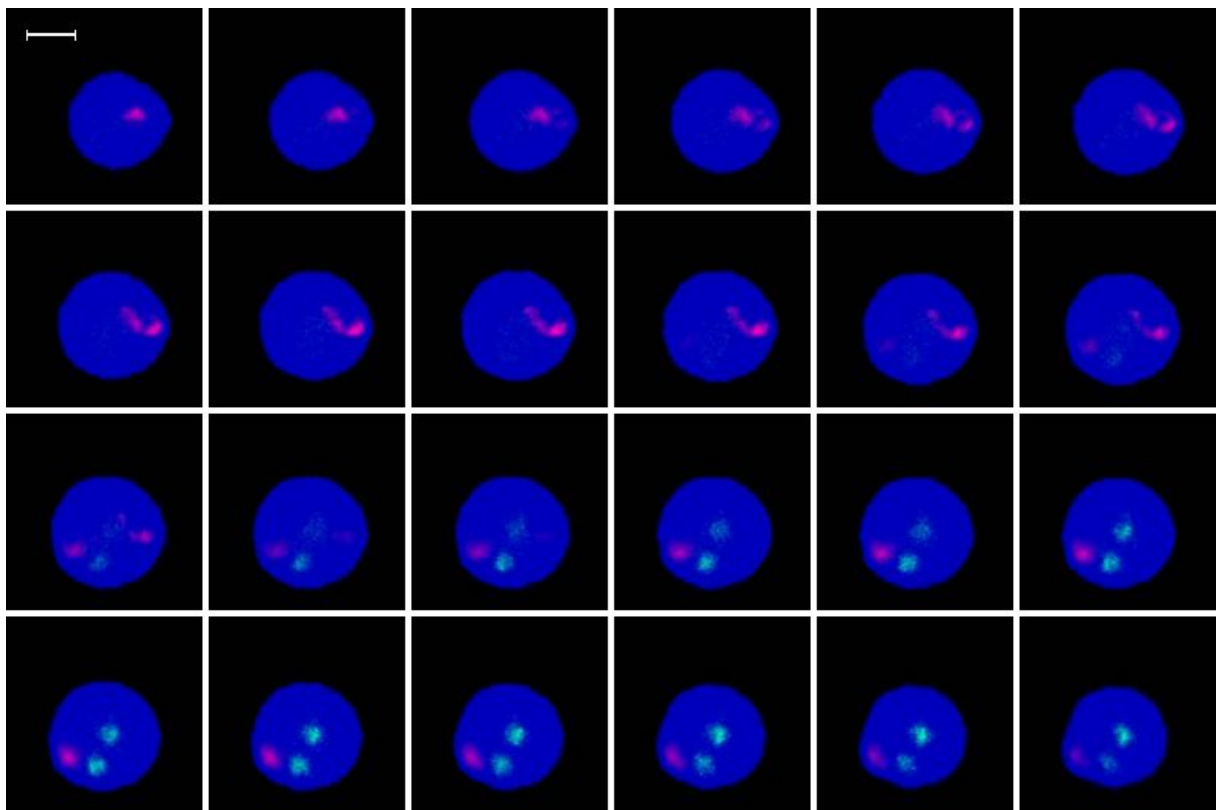


Abbildung 4.54 veranschaulicht die Hybridisierung mit Sonden Set S2 anhand einer Galerie aus lichtoptischen Serienschritten der Ebenen 13-36 von insgesamt 54 durch einen lymphoblastoiden Zellkern von *C. jacchus*. *S. oedipus* Chromosom 20 homologe CT sind in rot und *H. concolor* Chromosom 24 homologe Subterritorien in grün dargestellt. Die „künstliche Gegenfärbung“ ist in blau dargestellt. Skalierungsbalken=5 μ m.

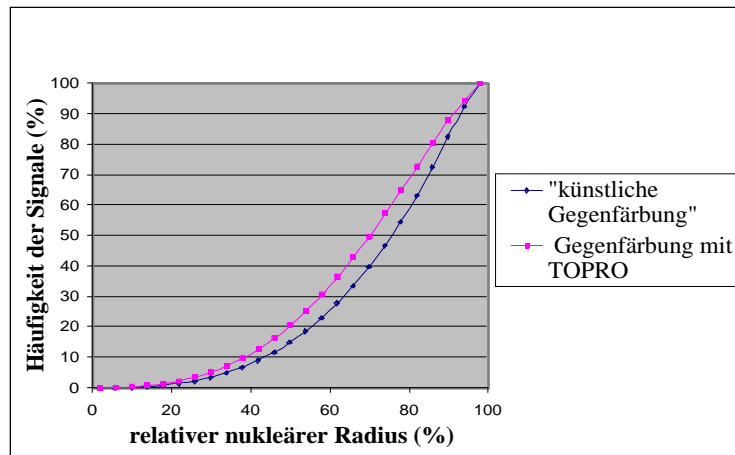


4.4.1.3 Quantitative Auswertung der 3D FISH Experimente

Die Quantitative Auswertung der am CSLM aufgenommenen Bilderserien erfolgte mit Hilfe des Programms *3D-RRD*, wie in *Material und Methoden*, Kapitel 3.11.5 beschrieben. Anhand der erhaltenen Daten wurden die Scheitelpunkte des maximalen DNA Gehaltes, sowie die Abstandsmittel von CT bestimmt. Zur Beurteilung, ob die resultierenden Kurven signifikant verschieden sind, wurden zwei statistische Tests durchgeführt - der Mann-Whitney U-Test und der stringentere Kolmogoroff-Smirnoff Test (siehe 3.11.6).

Für die quantitative Auswertung von 3D Zellkernen war für jeden Zellkern ein als Segmentierungsmaske des Zellkerns dienendes Hintergrundbild erforderlich. Bei Hybridisierungen mit DNA Sonden Sets, die aus drei differentiell markierten Sonden zusammengesetzt waren, wurde ein „künstliches“ Hintergrundbild erstellt (siehe 3.11.3), da in diesem Fall keine DNA Gegenfärbung durchgeführt wurde. Um bestimmen zu können, ob die „künstliche Gegenfärbung“ sich für die quantitative Auswertung eignet, wurde die „künstliche Gegenfärbung“ mit der DNA Gegenfärbung mit TOPRO verglichen. Hierfür dienten die Daten des 3D FISH Experimentes mit DNA Sonden Set S2 auf Zellkernen von *C. jacchus*. Für die Auswertung mittels des Programms *3D-RRD* wurden sowohl die am CLSM aufgenommenen Bilderserien der chromosomalen Gegenfärbung über TOPRO verwendet, als auch ein separates Datenset mit Bilderserien der „künstlichen Gegenfärbung“ erstellt. Die gewonnenen Daten der „künstlichen Gegenfärbung“ und der chromosomalen Gegenfärbung über TOPRO wurden zum Vergleich in kumulativen Kurven dargestellt. Wie in Abbildung 4.55 erkennbar, gleichen sich die beiden kumulativen Kurven. Mittels des Kolmogoroff-Smirnoff Tests konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Kurven keine signifikanten Unterschiede aufweisen ($P > 0,15$).

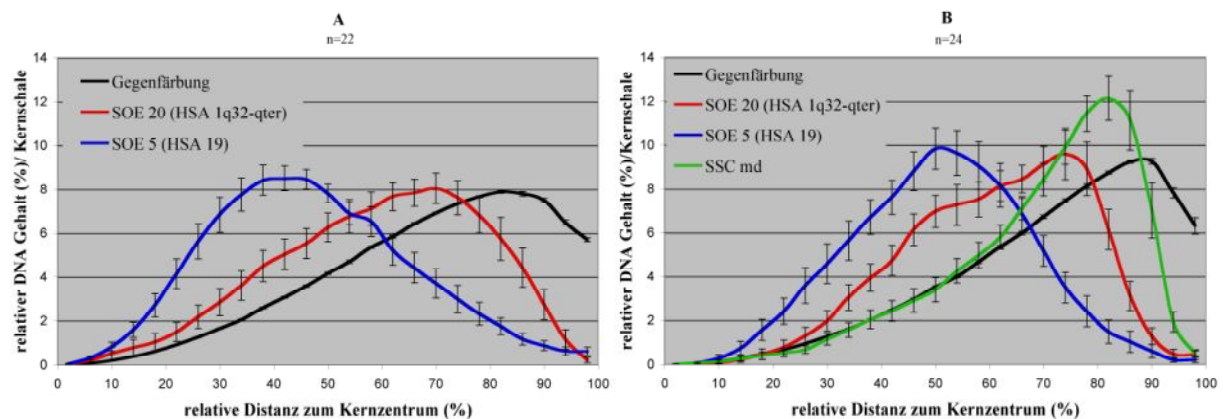
Abb 4.55: Kumulative Darstellung der Häufigkeit der Signale (%)/relativen nukleären Radius (%) zum Vergleich der „künstlichen Gegenfärbung“ mit der chromosomalen Gegenfärbung über TOPRO.



4.4.1.3.1 Quantitative Auswertung der 3D FISH mit Sonden Sets S1 und S2

Die quantitative Auswertung des 3D FISH Experiments mit Sonden Set 1 ist in der Abbildung 4.56 illustriert. Die Graphen beschreiben die radiale Verteilung von *S. oedipus* Chromosom 5 (genreich) und 20 (relativ genarm) homologen CT bzw. Subterritorien in S-Phase Kernen einer lymphoblastoiden Zelllinie von *C. jacchus* (A) und *S. sciureus* (B). Graph B zeigt zudem die radiale Verteilung von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin (genarm).

Abbildung 4.56: A) Quantitative Auswertung der radialen Verteilung von *S. oedipus* Chromosom 20 und 5 (SOE 20, SOE 5) homologen CT in Zellkernen von *C. jacchus* (A) und homologen Subterritorien in Zellkernen von *S. sciureus* (B). In B) ist zudem die radiale Verteilung von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin (DNA Sonde: SSC md) dargestellt. In Klammern ist jeweils die homologe Chromosomenregion zum Menschen (HSA) angegeben. n=Anzahl der ausgewerteten Zellkerne.



Wie an dem Verlauf der blauen Kurve in Graph A erkennbar, wiesen *S. oedipus* Chromosom 5 homologe CT in Zellkernen der Spezies *C. jacchus* eine bevorzugte radiale Positionierung zur Kernmitte auf. Diese präferentielle Orientierung zum Kernmittelpunkt wird an dem Scheitelpunkt des maximalen DNA-Gehaltes bei 42%, sowie dem Abstandsmittel bei 47,05% in relativer Distanz zum Kernzentrum besonders deutlich. Der Verlauf der roten Kurve spiegelt hingegen eine Tendenz der radialen Positionierung von *S. oedipus* Chromosom 20 homologen CT zur Kernperipherie hin. Der Scheitelpunkt des maximalen DNA-Gehaltes liegt mit 70% deutlich distaler vom Kernzentrum, als im Vergleich zu demjenigen bei *S. oedipus* Chromosom 5 homologen CT. Das Abstandsmittel ist mit knapp 60%, im Vergleich zum Scheitelpunkt, etwas weiter zum Kernzentrum verlagert.

In Zellkernen von *S. sciureus* zeigten Subterritorien mit Homologie zu *S. oedipus* Chromosom 5 gleichfalls eine klare Orientierung zum Zellkerninneren hin (siehe blaue Kurve, Graph B). Der Scheitelpunkt des maximalen DNA-Gehaltes bei 50%, sowie das Abstandsmittel bei 50,96% in relativer Distanz zum Kernzentrum liegen im Vergleich zu *C. jacchus* etwas distaler vom Kernzentrum. Der Verlauf der roten Kurve in Graph B deutet auf eine präferentielle Positionierung von Subterritorien homolog zu *S. oedipus* Chromosom 20 zur Kernperipherie hin. Der Scheitelpunkt bei 74% und das Abstandsmittel bei 61,08% in relativer Entfernung zum Kernzentrum sind vergleichbar mit den Werten, die bei *C. jacchus* resultierten. Die radiale Verteilung von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin (grüne Kurve) reflektiert eine klare Orientierung zur Kernperipherie. Dies wird auch deutlich an dem Scheitelpunkt des maximalen DNA-Gehaltes bei 82% und dem Abstandsmittel bei ca. 70% in relativer Entfernung zum Kernmittelpunkt.

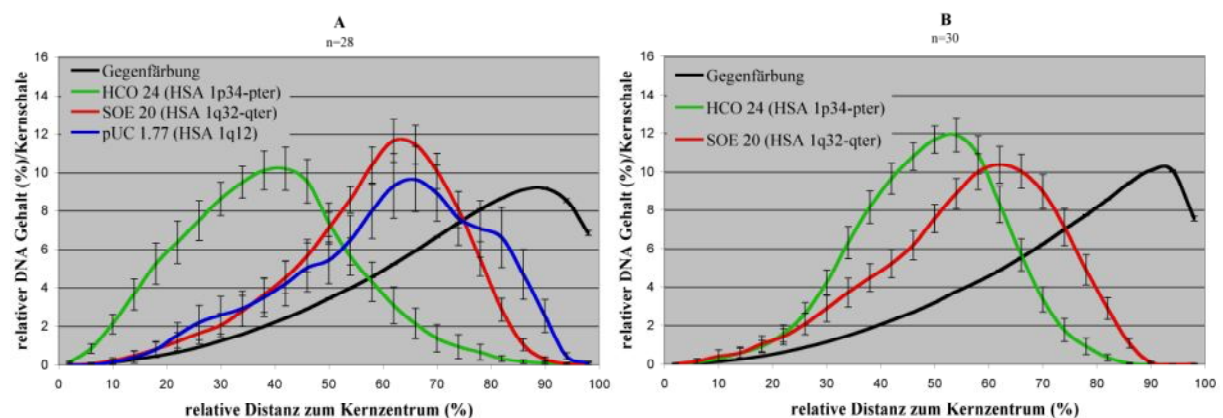
Ein signifikanter Unterschied zwischen der Kurve der radialen Verteilung von Chromatin homolog zu *S. oedipus* Chromosom 20 und derjenigen von Chromatin homolog zu *S. oedipus* Chromosom 5, konnte mit dem Komolgoroff-Smirnoff Test und U-Test bei beiden Spezies bestätigt werden. Gleichfalls wurde mit beiden Tests ein signifikanter Unterschied zwischen der Kurve der radialen Verteilung von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin und derjenigen von Chromatin homolog zu *S. oedipus* Chromosom 20 bzw. 5 Chromatin in Zellkernen von *S. sciureus* festgestellt. Die Tabelle 4.9 fasst die statistischen Testergebnisse zusammen.

Tabelle 4.9: Komolgoroff-Smirnoff (KS-Test) und U-Test zur Bestimmung von Signifikanzunterschieden zwischen den Kurven der radialen Verteilung von CT und Chromosomen-Sub-Territorien (CST) homolog zu *S. oedipus* Chromosom 20 (SOE 20), zu *S. oedipus* Chromosom 5 (SOE 5) und von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin (HC).

Untersuchte Spezies	Vergleich zwischen Kurven der CT / CST:	U-Test	KS-Test
<i>C. jacchus</i>	SOE 5 - SOE 20	P < 0,001	P < 0,01
<i>S. sciureus</i>	SOE 5 - SOE 20	P < 0,000001	P < 0,001
<i>S. sciureus</i>	SOE 20 - HC	P < 0,005	P < 0,05
<i>S. sciureus</i>	SOE 5- HC	P < 0,000001	P < 0,001

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung des 3D FISH Experiments mit Sonden Set S2 sind in der Abbildung 4.57 dargestellt. Die Graphen beschreiben die radiale Verteilung von Chromatin homolog zu *H. concolor* Chromosom 24 (genreich) und *S. oedipus* Chromosom 20 (genarm) in Zellkernen einer lymphblastoiden Zelllinie des Menschen (A) und *C. jacchus* (B). In Graph A ist zudem die radiale Verteilung von Heterochromatin, spezifisch für die Chromosomenregion 1q12 des Menschen illustriert.

Abbildung 4.57: Grafische Darstellung der Ergebnisse der quantitativen Auswertung der radialen Verteilung von Chromatin homolog zu *H. concolor* Chromosom 24 (HCO 24) und *S. oedipus* Chromosom (SOE 20) in Zellkernen des Menschen (A) und *C. jacchus* (B). Graph A zeigt zudem die radiale Verteilung von Heterochromatin, spezifisch für die Chromosomenregion 1q12 des Menschen, das mit der Sonde pUC 1.77 nachgewiesen wurde. In Klammern ist jeweils die homologe Chromosomenregion zum Menschen (HSA) angegeben. n=Anzahl der ausgewerteten Zellkerne



Die radiale Verteilung von *H. concolor* Chromosom 24 homologen Subterritorien (grüne Kurve) in Zellkernen des Menschen (Graph A) weist auf eine präferenzielle Lokalisation in der Kernmitte hin. Der Scheitelpunkt des maximalen DNA Gehaltes bei 42%, sowie das

Abstandsmittel bei 38,73% in relativer Distanz zum Kernzentrum unterstreichen diese bevorzugte Positionierung von *H. concolor* Chromosom 24 homologem Chromatin zur Kernmitte. Im Vergleich dazu zeigt der Kurvenverlauf der radialen Verteilung von relativ genarmen *S. oedipus* Chromosom 20 homologen Subterritorien (rote Kurve) eine bevorzugte Orientierung zur Kernperipherie hin. Der Scheitelpunkt liegt hier bei 62% und das Abstandsmittel bei 58,16% in relativer Distanz zum Kernzentrum. Die radiale Verteilung von 1q12 human-spezifischem Heterochromatin (blaue Kurve) reflektiert eine ähnliche Tendenz der Positionierung zur Kernperipherie wie *S. oedipus* Chromosom 20 homologes Chromatin. Der Scheitelpunkt bei 66% und das Abstandsmittel bei 60,85% in relativer Distanz zur Kernmitte liegen jedoch vergleichsweise etwas peripherer.

In Graph B spiegelt die Kurvenverlauf der grünen Kurve eine deutlich bevorzugte Orientierung von *H. concolor* Chromosom 24 homologen Subterritorien zur Kernmitte in Zellkernen der Spezies *C. jacchus* wieder. Der Scheitelpunkt des maximalen DNA Gehaltes liegt bei 54% und das Abstandsmittel bei knapp 49% in relativer Entfernung zur Kernmitte. Diese beschreiben eine im Vergleich zur radialen Verteilung beim Menschen (siehe Graph A) leicht zur Kernperipherie hin verschobene radiale Positionierung von *H. concolor* Chromosom 24 homologem Chromatin. Die radiale Verteilung von *S. oedipus* Chromosom 20 homologen CT (rote Kurve) gleicht in etwa derjenigen beim Menschen. Auch der Scheitelpunkt des maximalen DNA Gehaltes liegt, analog zum Menschen, bei 62% in relativer Entfernung zur Kernmitte. Das Abstandsmittel ist mit 56,17% in relativer Entfernung zur Kernmitte ebenfalls annähernd identisch wie beim Menschen.

Die Ergebnisse des Komolgoroff-Smirnoff und U-Tests (siehe Tabelle 4.10) ergaben hoch signifikante Unterschiede zwischen den Kurven der radialen Verteilung von *H. concolor* Chromosom 24 und *S. oedipus* homologem Chromosom 20 Chromatin in beiden Spezies, sowie zwischen der radialen Verteilung von *H. concolor* Chromosom 24 homologem Chromatin und human-spezifischem Heterochromatin. Kein signifikanter Unterschied ($P > 0,3$ bzw. $P > 0,2$) wurde zwischen der Kurve der radialen Verteilung von Chromatin homolog zu *S. oedipus* Chromosom 20 und Heterochromatin beim Menschen festgestellt.

Tabelle 4.10: Komolgoroff-Smirnoff (KS-Test) und U-Test zur Bestimmung von Signifikanzunterschieden zwischen den Kurven der radialen Verteilung von CT bzw. Chromosomen-Sub-Territorien (CST) homolog zu *S. oedipus* Chromosom 20 (SOE 20), zu *H. concolor* Chromosom 24 (HCO 24) und human-spezifischem Heterochromatin (HC).

Untersuchte Spezies	Vergleich zwischen Kurven der CT / CST:	U-Test	KS-Test
Mensch	HCO 24 - SOE 20	$P < 0,000001$	$P < 0,001$
Mensch	HCO 24 - HC	$P < 0,000001$	$P < 0,001$
Mensch	SOE 20 - HC	$P > 0,3$	$P > 0,2$
<i>C. jacchus</i>	HCO 24 - SOE 20	$P < 0,005$	$P < 0,01$

4.4.1.3.2 Quantifizierung der radialen Verteilung von Heterochromatin bei *S. sciureus*

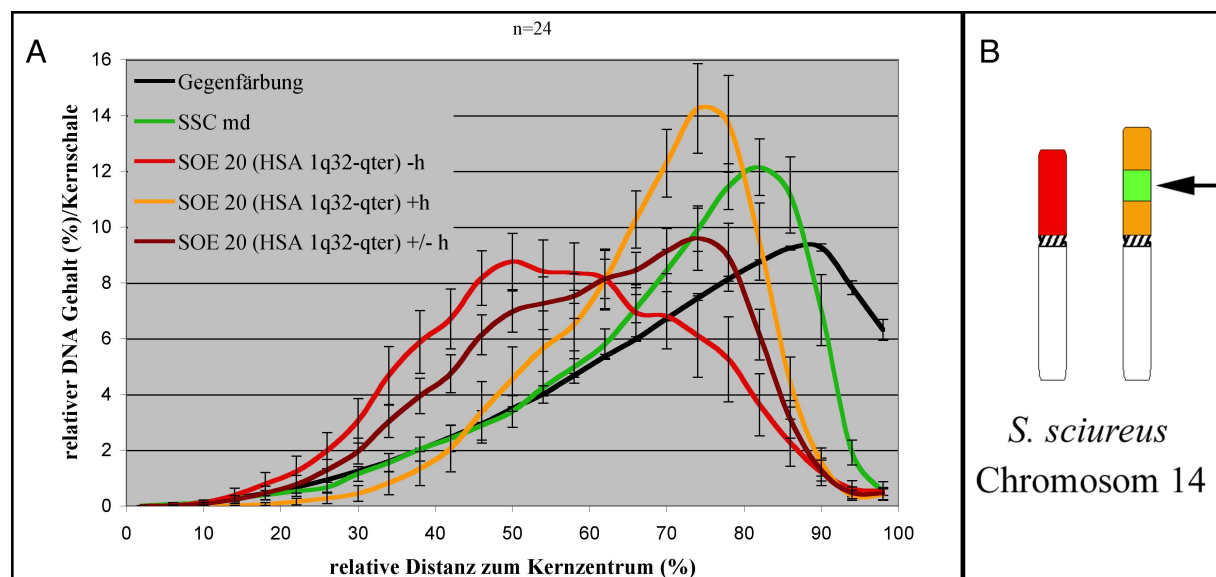
Die in dem vorangegangenen Kapitel dargestellten Ergebnisse der Quantitative Analyse des 3D FISH Experiments mit Sonden Set S1 auf 3D fixierte Zellkerne von *S. sciureus* (siehe Abb. 4.56 B) beziehen sich auf die Untersuchung der Gendichte-abhängigen radialen Anordnung von subchromosomalen Territorien homolog zur menschlichen Chromosomenregion 1q32-qter (relativ genarm), zum homologen menschlichen Chromosom 19 (genreich) und von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin (genarm) im Zellkern.

Ferner sollte mit den in Kapitel 4.4.1.2.1 dargestellten 3D FISH Experimenten untersucht werden, inwieweit das Vorhandensein eines zusätzlichen Heterochromatinblocks in ansonsten evolutionär konservierten Chromosomen Einfluss auf die radiale Anordnung von benachbartem Chromatin im Zellkern hat. Um diese Fragestellung zu erörtern, wurde in diesem Kapitel eine weitergehende Untersuchung zur radialen Chromatinanordnung am Beispiel des Chromosoms 14 des Neuweltaffen *S. sciureus* durchgeführt. Dieses Chromosom wurde für diese Untersuchung ausgewählt, da es einen polymorphen Heterochromatinblock aufweist, für den das zu untersuchende Individuum heterozygot ist (siehe 4.4.1.1, Abb. 4.47).

Um die radiale Verteilung der Homologen mit und ohne Heterochromatinblock getrennt quantitativ auswerten zu können, war eine weitere Bildbearbeitung mit Hilfe des Programms *ImageJ* (siehe 3.11.3) erforderlich. Hierbei wurde zunächst für jeden auszuwertenden Zellkern das väterliche und mütterliche subchromosomale Territorium homolog zu *S. oedipus* Chromosom 20 über den interstitiellen polymorphen Heterochromatinblock identifiziert. Getrennte Datensätze der Verteilung väterlicher und mütterlicher Territorien konnten erhalten werden, indem jeweils das eine oder andere Homologe in einem Bilderstapels entfernt und getrennt abgespeichert wurde. Die so gewonnenen Datensätze wurden anschließend mit Hilfe

des Programms *3DRRD* ausgewertet. Abbildung 4.58 illustriert die grafische Darstellung der quantitativen Auswertung.

Abbildung 4.58: **A)** Quantitative Auswertung der radialen Verteilung von *S. oedipus* Chromosom 20 (SOE 20) homologen subchromosomalen Territorien und *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin in S-Phase Zellkernen von *S. sciureus*. Die korrespondierende Chromosomenregion zum Menschen (HSA) ist in Klammern angegeben. Die radiale Anordnung väterlicher und mütterlicher Subterritorien homolog zu *S. oedipus* Chromosom 20 wurde getrennt quantifiziert. Die Bezeichnung +h kennzeichnet die radiale Verteilung von demjenigen Homologen, das einen interstitiellen Heterochromatinblock beinhaltet (orange Kurve), während sich die Bezeichnung -h auf homologes Chromatin ohne Heterochromatinblock bezieht (rote Kurve). Zum Vergleich ist die radiale Verteilung von SOE 20 homologem Chromatin ohne Differenzierung der Homologen (+/- h) dargestellt. Die grüne Kurve illustriert die radiale Anordnung von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin. n=Anzahl der ausgewerteten Zellkerne. **B)** Schematische Darstellung der beiden Homologen von *S. sciureus* Chromosom 14, mit (grüne Region, siehe Pfeil) und ohne Heterochromatinblock. Zur Unterscheidbarkeit der Homologen, wurden die entsprechenden homologen Chromosomenregionen in rot bzw. orange markiert. Sie korrespondieren mit der jeweiligen Farbzurordnung der Kurven.



Die radiale Verteilung von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin wurde bereits in Kapitel 4.4.1.3.2 dargestellt (siehe Abb. 4.56 B). Sie wurde hier nochmals graphisch illustriert, um einen Bezug zur radialen Verteilung der Homologen mit und ohne Heterochromatinblock, homolog zu *S. oedipus* Chromosom 20 zu ermöglichen. Wie schon erläutert, lässt sich eine klare präferenzielle Orientierung von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin (grüne Kurve) zur Kernperipherie erkennen. Der Kurvenverlauf der radialen Verteilung von *S. oedipus* Chromosom 20 homologem Chromatin mit Heterochromatinblock (+h, orange Kurve), sowie der Scheitelpunkt des maximalen DNA Gehaltes bei 74% weisen ebenfalls auf

eine Tendenz der Orientierung zur Kernperipherie hin. Das Abstandsmittel liegt mit knapp 68% etwas näher zur Kernmitte als der Scheitelpunkt. Im Vergleich zur radialen Verteilung des Homologen mit Heterochromatinblock, reflektiert der Kurvenverlauf der Homologen ohne Heterochromatinblock, (-h, rote Kurve) eine variabelere Verteilung in Zellkernen von *S. sciureus*. Der Scheitelpunkt des maximalen DNA Gehalt liegt hier bei 50% in relativer Entfernung zur Kernmitte, jedoch ist diese Angabe als Scheitelpunkt wenig aussagekräftig, da der Kurvenverlauf in Bereich zwischen 50% und 62% sehr flach ist. Das Abstandsmittel des Homologen ohne Heterochromatinblock liegt bei 56,19% in relativer Entfernung zur Kernmitte. Der Unterschied zwischen den ermittelten Abstandsmitteln der beiden Homologen, der über 11% beträgt, demonstriert eine stärker zur Kernmitte hin orientierte radiale Verteilung des -h Homologen, verglichen mit dem +h Homologen. Die braune Kurve, die zum Vergleich die radiale Verteilung beider Homologen repräsentiert, verläuft zwischen der roten und orangefarbenen Kurve. Sie spiegelt einen intermediären Status in der radialen Verteilung von Chromatin mit und ohne Heterochromatinblock wider.

Sowohl mit dem U-Test, als auch mit dem Kolmogoroff-Smirnoff Test konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Kurve der radialen Verteilung des *S. oedipus* Chromosom 20 Homologen mit Heterochromatinblock und derjenigen des Homologen ohne Heterochromatinblock nachgewiesen werden. Gleichfalls ergaben beide statistischen Tests einen signifikanten Unterschied zwischen der Kurve der radialen Verteilung von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin und derjenigen des *S. oedipus* Chromosom 20 Homologen ohne Heterochromatinblock. Kein signifikanter Unterschied resultierte mit beiden Tests ($P=0,1$ bzw. $P>0,2$) zwischen den Kurven der radialen Verteilung von Chromatin des Homologen mit Heterochromatinblock und *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin. Die statistischen Testergebnisse sind in der Tabelle 4.11 zusammengefasst.

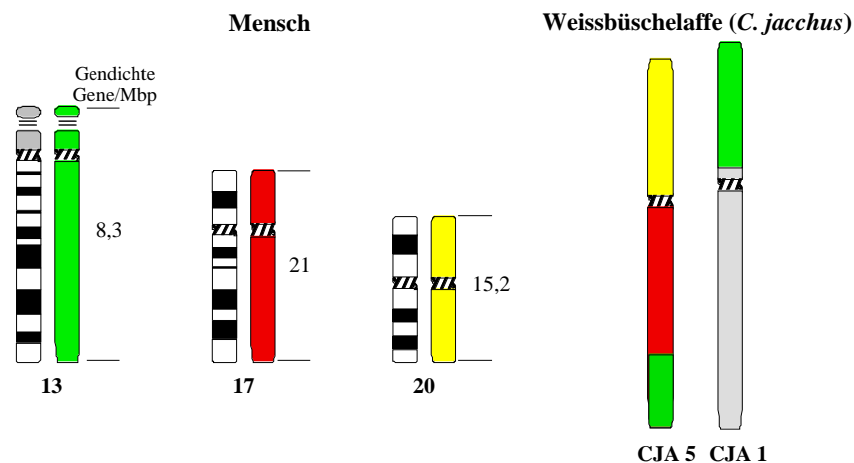
Tabelle 4.11: Komolgoroff-Smirnoff (KS-Test) und U-Test zur Bestimmung von Signifikanzunterschieden zwischen den Kurven der radialen Verteilung von *S. oedipus* Chromosom 20 (SOE 20) homologen Chromosomen-Sub-Territorien (CST) des Homologen mit Heterochromatinblock (+h) und desjenigen Homologen ohne Heterochromatinblock (-h), sowie von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin.

Untersuchte Spezies	Vergleich zwischen Kurven der CST:	U-Test	KS-Test
<i>S. sciureus</i>	SOE 20 (-h) - SOE 20 (+h)	$P < 0,005$	$P < 0,01$
<i>S. sciureus</i>	SOE 20 (-h) - HC	$P < 0,001$	$P < 0,01$
<i>S. sciureus</i>	SOE 20 (+h)- HC	$P = 0,1$	$P > 0,2$

4.4.2 Radiale Anordnung der menschlichen Chromosom 13, 17 und 20 Homologen

Anhand der menschlichen Chromosomen 13, 17 und 20 und deren Homologen bei der Neuweltaffenspezies *Callithrix jacchus* wurden weitere vergleichende Untersuchungen durchgeführt, um die radiale Anordnung der einzelnen Chromosomenterritorien in Abhängigkeit von der Gendichte im Interphasekern zu bestimmen. Chromosom 13 stellt mit einer Gendichte von 8,3 Genen/Mbp ein relativ genarmes Chromosom, Chromosom 17 mit 21 Genen/Mbp ein relativ reiches Chromosom und Chromosom 20 mit 15,2 Genen/Mbp ein Chromosom mittlerer Gendichte dar. Die Chromosomen 13, 17 und 20 wurden auch deshalb ausgewählt, da sich deren Homologe bei *C. jacchus* durch chromosomale Umbauten unterscheiden. Wie in Abbildung 4.59 schematisch dargestellt, liegen die Homologen dieser Chromosomen als Assoziation 13/17/20 in der Spezies *C. jacchus* vor. Ferner leitet sich das Homologe des menschlichen Chromosoms 13 in *C. jacchus* durch eine weitere Translokation ab. Die resultierenden Chromosomen stellen einen abgeleiteten Status im Vergleich zum Menschen dar. Mit einem Sonden Set aus Chromosom 13, 17 und 20 spezifischen DNA Sonden des Menschen, sowie der homologen Sonden von *L. lagothericha* sollte untersucht werden, ob die radiale Anordnung der menschlichen Chromosomen 13, 17 und 20 in Abhängigkeit von der Gendichte zwischen Mensch und *C. jacchus* konserviert ist oder ob mit evolutionären Rearrangements eine Reorganisation des Chromatins im Zellkern einhergeht.

Abbildung 4.59 illustriert die Chromosomen 13, 17 und 20 des Menschen mit den entsprechenden Gendichten (berechnet nach www.ncbi.nlm.nih.gov, build 31) und deren homologe Regionen bei dem Neuweltaffen *C. jacchus*. Die menschlichen Chromosomen stellen hierbei den ancestralen Status dieser Chromosomen dar, von dem die Homologen von *C. jacchus* durch evolutionäre Translokationen abgeleitet sind.



4.4.2.1 DNA Sonden Sets

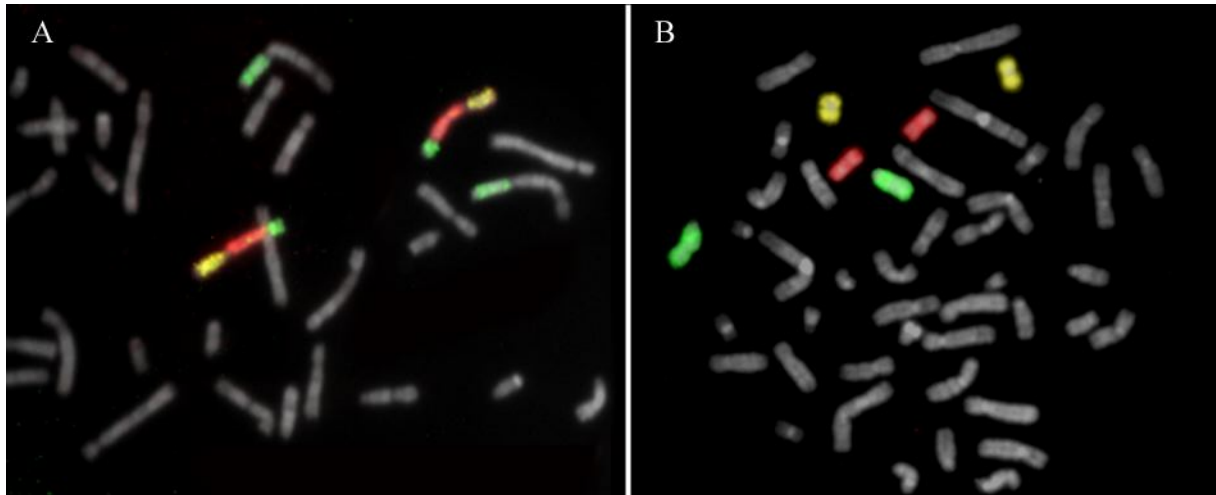
Für die vergleichende Untersuchung der radialen Anordnung der menschlichen Chromosom 13, 17 und 20 Territorien und deren Homologe in *C. jacchus* wurde ein Sonden Set aus menschlichen Chromosom 13, 17 und 20 spezifischen DNA Sonden zusammengestellt, wie auch ein zweites mit den korrespondierenden chromosomen-spezifischen DNA Sonden von *Lagothrix lagothericha*. Letzteres wurde für die Hybridisierung auf Zellkerne von *C. jacchus* verwendet, da die evolutionäre Distanz zwischen *L. lagothericha* und *C. jacchus* geringer ist, als im Vergleich zum Menschen und daher ein besseres Hybridisierungsergebnis mit diesem Sonden Set zu erwarten war. Tabelle 4.12 dokumentiert die Zusammensetzung und das Markierungsschema der Sonden Sets.

Tabelle 4.12: Markierungsschema der Sonden Sets S3 und S4, zusammen mit der jeweiligen Falschfarbenzuordnung. Sonden Set S3 enthielt chromosomen-spezifische DNA Sonden des Menschen (HSA), S4 diejenigen von *L. lagothericha* (LLA), deren entsprechende menschliche Homologe jeweils in Klammern angegeben sind.

Sonden Set	Sonde	Biotin -dUTP	SpectrumGreen -dUTP	Tamra -dUTP	Falschfarbe
S3	HSA 13	x			grün
	HSA 17		x		rot
	HSA 20			x	gelb
S4	LLA 8 (HSA13)	x			grün
	LLA 10 (HSA17)		x		rot
	LLA 12 (HSA 20)			x	gelb

Die Sonden Sets S3 und S4 wurden zur Überprüfung der Qualität auf Metaphasepräparate des Menschen und *C. jacchus* hybridisiert, bevor sie in 3D FISH Experimenten eingesetzt wurden. Abbildung 4.60 veranschaulicht die Hybridisierung auf Metaphasechromosomen des Neuweltaffen *C. jacchus* (A) und des Menschen (B).

Abbildung 4.60 (siehe nächste Seite): FISH mit Sonden Set S4 auf Metaphasechromosomen von *C. jacchus* (A, partielle Metaphase) und mit Sonden Set S3 auf diejenigen des Menschen (B). Das menschliche Chromosom 20 ist in gelb, Chromosom 17 in rot und Chromosom 13 in grün dargestellt. Entsprechende homologe Regionen bei *C. jacchus* sind in der gleichen Farbe illustriert. Die DAPI-Gegenfärbung (grau) wurde mit dem RGB Bild überlagert.



4.4.2.2 3D FISH an Zellkernen von Mensch und *C. jacchus*

Die in Kapitel 4.4.2.1 beschriebenen Sonden Sets S3 und S4 wurden auf 3D fixierte Zellkerne lymphoblastoider Zelllinien des Neuweltaffen *C. jacchus* und des Menschen hybridisiert. Abbildungen 4.61 und 4.62 dokumentieren *in situ* Hybridisierungen mit diesen Sonden Sets.

Abbildung 4.61: Auswahl lichtoptischer Serienschritte (Ebenen 13-36 von 38) durch einen Zellkern von *C. jacchus*. Chromosomen-Subterritorien homolog zu *L. lagotricha* Chromosom 8 sind grün, zu Chromosom 10 rot und zu Chromosom 12 gelb dargestellt. Die „Gegenfärbung“ ist grau illustriert. Skalierungsbalken = 5µm.

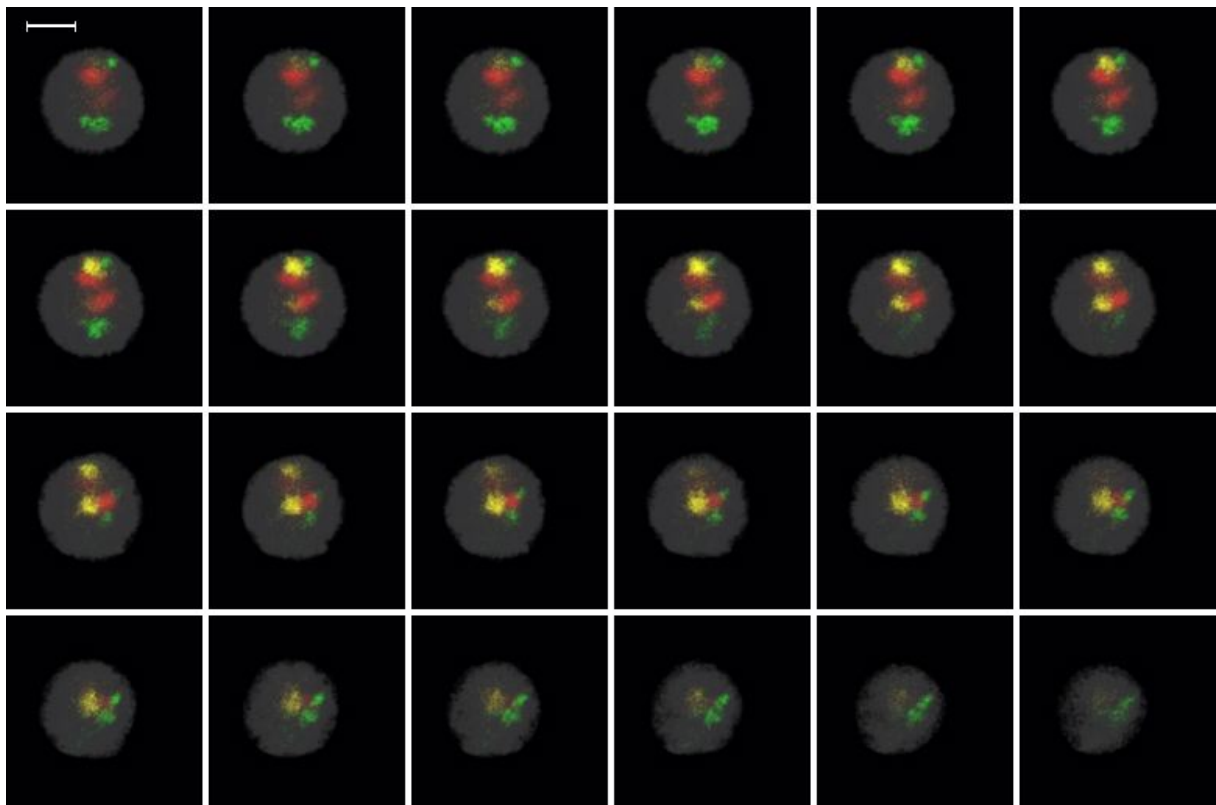
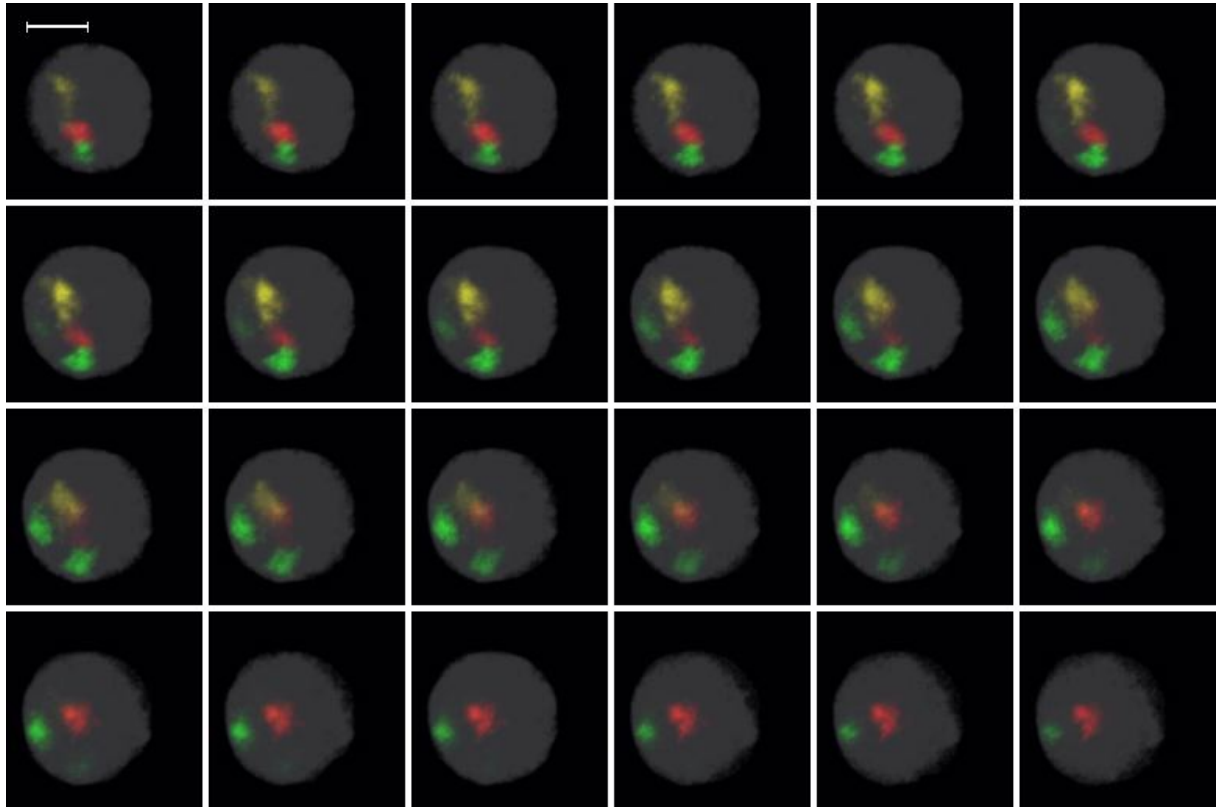


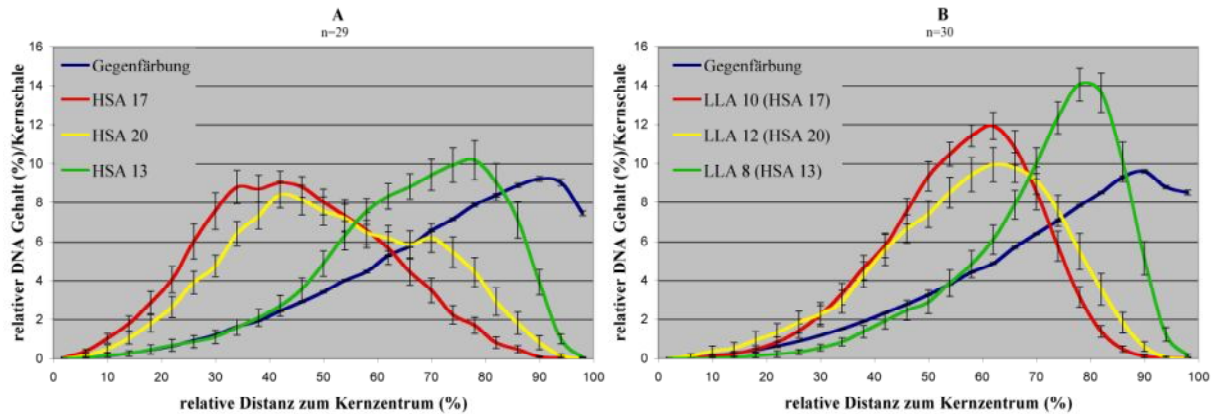
Abbildung 4.62 zeigt eine Auswahl lichtoptischer Serienschritte (Ebenen 13-36 von 46) durch einen menschlichen 3D fixierten Zellkern. Chromosom 13 Territorien sind in grün, Chromosom 17 Territorien in rot und Chromosom 20 Territorien in gelb abgebildet. Die „künstliche Gegenfärbung“ ist in grau dargestellt. Skalierungsbalken=5µm.



4.4.2.3 Quantitative Auswertung der 3D FISH Experimente

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der in Kapitel 4.4.2.2 dargestellten 3D FISH Experimente sind in der Abbildung 4.63 dargestellt. Die resultierenden Graphen zeigen die radiale Verteilung der menschlichen 13, 17 und 20 CT in S-Phase Zellkernen des Menschen (A) und zu diesen Chromosomen homologe Subterritorien in S-Phase Zellkernen von *C. jacchus* (B).

Abbildung 4.63: Quantitative Auswertung der radialen Anordnung von 13, 17 und 20 CT in Zellkernen des Menschen (A) und Chromosomen-Subterritorien homolog zu *L. lagothericha* (LLA) Chromosom 8, 10 bzw. 12 in Zellkernen der Spezies *C. jacchus*. Zum Vergleich ist das entsprechende Homologe zum Menschen (HSA) jeweils in Klammern angegeben (B). n=Anzahl der ausgewerteten Zellkerne.



In Graph A spiegelt der Verlauf der grünen Kurve eine tendenzielle Positionierung von Chromosom 13 Territorien zur Peripherie in Zellkernen des Menschen wieder. Der Unterschied zwischen der Position des Scheitelpunkts des maximalen DNA Gehaltes bei 78% und dem Abstandmittel bei 66% in relativer Entfernung zum Kernmittelpunkt sind Ausdruck einer relativ breiten radialen Verteilung von Chromosom 13 Territorien in den untersuchten Zellkernen des Menschen. Dies wird insbesondere an dem Kurvenverlauf zwischen 60% und etwa 80% in relativer Entfernung zur Kernmitte deutlich. Der Verlauf der roten Kurve beschreibt eine klare präferentielle Orientierung von Chromosom 17 Territorien zum Zellkerninneren. Der Scheitelpunkt des maximale DNA Gehaltes bei 42%, wie auch das Abstandsmittel bei 44,65% in relativer Entfernung zur Kernmitte unterstreichen die bevorzugte Lokalisation von Chromosom 17 Territorien in der Kernmitte. Die radiale Verteilung von Chromosom 20 Territorien (gelbe Kurve) lässt gleichfalls eine bevorzugte Positionierung von Chromosom 20 Chromatin zum Zellkerninneren erkennen. Der Scheitelpunkt des maximalen DNA Gehaltes entspricht hierbei demjenigen von Chromosom 17 Territorien. Im Vergleich zu Chromosom 17 Territorien, zeigt der Kurvenverlauf der radialen Verteilung Chromosom 20 Territorien eine leicht zur Kernperipherie hin verschobene Positionierung. Dies wird auch an dem Abstandsmittel bei 51,49% in relativer Entfernung zur Kernmitte deutlich, das etwas distaler vom Kernmittelpunkt liegt, als im Vergleich zu Chromosom 17 Territorien.

Wie an der grünen Kurve in Graph B erkennbar, zeigen zum menschlichen Chromosom 13 homologe Subterritorien in Zellkernen von *C. jacchus* eine klare präferentielle Orientierung zur Kernperipherie. Der Scheitelpunkt des maximalen DNA Gehaltes liegt bei 78% in relativer Entfernung zur Kernmitte und entspricht dem Scheitelpunkt des homologen Chromatins in menschlichen Zellkernen (siehe Graph A). Das Abstandsmittel liegt mit 71,2% in relativer Entfernung zum Kernmittelpunkt nahe dem Scheitelpunkt des maximalen DNA Gehaltes. Im Vergleich zu dem korrespondierenden Abstandsmittel beim Menschen, liegt das Abstandsmittel bei *C. jacchus* etwas distaler von der Kernmitte und betont damit eine noch deutlichere Präferenz der Positionierung von Chromosom 13 homologem Chromatin zur Kernperipherie, als beim Menschen. Die Kurve der radialen Verteilung von Subterritorien homolog zum menschlichen Chromosom 17 (rote Kurve) gleicht derjenigen von Subterritorien homolog zum Chromosom 20 (gelbe Kurve). Auch weisen beide Kurven die gleichen Scheitelpunkte des maximalen DNA Gehalts bei 62% in relativer Distanz zur Kernmitte auf. Das ermittelte Abstandsmittel der radialen Verteilung von Chromatin homolog zum menschlichen Chromosom 20 liegt mit 57,42% etwas entfernter in Relation zur Kernmitte, als im Vergleich zu Chromosom 17 homologen Chromatin (55%). Gegenüber Chromosom 13 homologen Subterritorien bei *C. jacchus*, zeigen Chromosom 17 und 20 homologe Subterritorien eine zur Kernmitte hin orientierte Positionierung. Die Kurven dieser subchromosomalen Territorien sind jedoch deutlicher zur Kernperipherie hin verschoben, als im Vergleich zu den entsprechenden Kurven beim Menschen.

Die Resultate des Komolgoroff-Smirnoff und U-Tests ergaben hoch signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1% bei dem stringenteren KS Test) zwischen den Kurven der radialen Verteilung von Chromosom 13 und 17 Territorien und zwischen denjenigen von Chromosom 13 und 20 Territorien beim Menschen. Die gleichen Ergebnisse resultierten zwischen den Kurven der radialen Verteilung von Subterritorien homolog zu den menschlichen Chromosomen 13 und 17 bzw. 13 und 20 bei *C. jacchus*. Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen den Kurven der radialen Verteilung von Chromom 17 und 20 homologem Chromatin mit beiden Statistik Tests bei *C. jacchus* nachgewiesen werden ($P > 0,4$ bzw. $> 0,2$). Während mit dem U-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen 2 und 2,5% noch ein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven der radialen Verteilung von Chromosom 17 und 20 Territorien beim Menschen festgestellt werden konnte, ergab der stringente Kolmogoroff-Smirnoff Test keinen signifikanten Unterschied mehr. Die Tabelle 4.13 fasst die statistischen Testergebnisse zusammen.

Tabelle 4.13: Kolmogoroff-Smirnoff (KS-Test) und U-Test zur statistischen Bestimmung von Signifikanz-Unterschieden zwischen den Kurven der radialen Verteilung von menschlichen 13, 17 und 20 CT und zwischen denjenigen von Chromosomen-Sub-Territorien (CST) homolog zu den menschlichen Chromsomen 13, 17 und 20 bei *C. jacchus*.

Untersuchte Spezies	Vergleich zwischen Kurven der CT / CST:	U-Test	KS-Test
Mensch	17 - 20	$0,02 < P < 0,025$	$P > 0,1$
Mensch	13 - 17	$P < 0,000001$	$P < 0,001$
Mensch	13 - 20	$P < 0,000001$	$P < 0,001$
<i>C. jacchus</i>	17 - 20	$P > 0,4$	$P > 0,2$
<i>C. jacchus</i>	13 - 17	$P < 0,000001$	$P < 0,001$
<i>C. jacchus</i>	13 - 20	$P < 0,000001$	$P < 0,001$

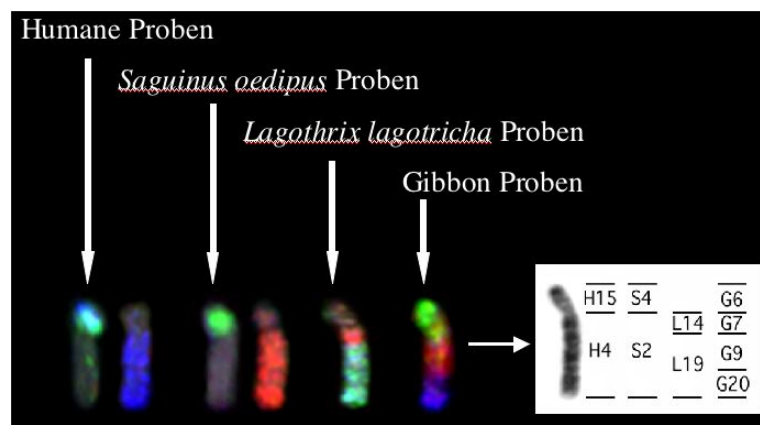
5 Diskussion

5.1 Aspekte zur Methodik

5.1.1 *Multidirectional chromosome painting*

Für die Erstellung vergleichender Genomkarten der in dieser Dissertation untersuchten Neuweltaffen wurde die Technik des *multidirectional chromosome painting* angewandt. Diese Strategie stellt im Prinzip eine Erweiterung des *reciprocal chromosome painting* (Arnold et al. 1996, Goureau et al. 1996, Wienberg et al. 1997) dar, mit dem Unterschied, dass ein größeres Spektrum an DNA Sonden eingesetzt wird. Das Repertoire in dieser Arbeit eingesetzter DNA Sonden umfasste chromosomen-spezifische DNA Sonden des Menschen, des Tamarins *Saguinus oedipus*, des Wollaffen *Lagothrix lagothricha* und des Gibbons *Hylobates concolor* (siehe 4.1.1.1- 4.1.1.3). Die Charakterisierung von Neuweltaffen mit einer Auswahl von DNA Sonden unterschiedlicher Herkunft und Komplexität erlaubte eine Überprüfung individueller Experimente. Dies ermöglichte den Nachweis von homologen Chromosomenregionen verschiedener Spezies mit weit größerer Präzision als durch unidirektionales *chromosome painting* (Wienberg et al. 1990). Ferner kann mit dieser Technik eine subchromosomale Definition in höherer Auflösung erzielt werden kann, als mit unidirektionalem *chromosome painting*. Abbildung 5.1 illustriert die Strategie des *multidirectional chromosome painting* mit in dieser Dissertation eingesetzten DNA Sonden verschiedener Spezies.

Abbildung 5.1: Strategie des *multidirectional chromosome painting* unter Einsatz chromosomenspezifischer DNA Sonden des Menschen (H), der Neuweltaffen *Saguinus oedipus* (S) und *Lagothrix lagothricha* (L) und des Gibbons (*Hylobates concolor*, G). Mit DNA Sonden des Neuweltaffen *L. lagothricha* und des Gibbons konnte eine höhere subchromosomale Auflösung erzielt werden, als mit menschlichen und *S. oedipus* DNA Sonden.



Das Repertoire der im Rahmen dieser Arbeit zu charakterisierenden Neuweltaffen umfing 28 Individuen aus 20 verschiedenen Neuweltaffenarten (siehe 4.1, Tabelle 4.1). Diese Anzahl machte effiziente *screening* Werkzeuge notwendig, um chromosomale Homologien zwischen diesen Neuweltaffen schnell und zuverlässig nachweisen zu können. Die Anwendung chromosomen-spezifischer DNA Sonden im *multi-color* Format stellte sich hierbei als geeignete Methode für die vergleichende Karyotypanalyse dieser Neuweltaffen heraus.

5.1.1.1 Sechs- und siebenfarben DNA Sonden Sets

Multi-color FISH mit einem Satz von vier DNA Sonden Sets zu je 6-7 kombinatorisch markierten chromosomen-spezifischen DNA Sonden des Menschen, als auch der Zelllinie B95-8 des Neuweltaffen *S. oedipus* (Müller et al. 2001, Neusser et al. 2001, siehe auch 4.1.1.1, 4.1.1.2) erlaubten eine Darstellung chromosomaler Homologien zu allen menschlichen und *S. oedipus* Chromosomen in den untersuchten Neuweltaffen in nur je 4 Experimenten. Die menschlichen *multiplex* Sonden Sets ergaben reproduzierbare Ergebnisse, trotz einer evolutionären Distanz von 30-40 Millionen Jahren zwischen Mensch und Neuweltaffen. Mittels *multi-color* FISH war es möglich, Sonden Sets gezielt so zusammenzustellen, dass bereits bekannte charakteristische Merkmale in Neuweltaffen simultan dargestellt werden konnten. So ermöglichte beispielsweise der menschliche Sonden Set 1 die simultane Darstellung der homologen menschlichen Chromosomen 3 und 21, die den Nachweis der Assoziation 3/21 erlaubte, die in Neuweltaffen ein charakteristisches ancestrales Merkmal repräsentiert (Stanyon et al. 2000).

Ergänzend zu diesen Sonden Sets wurde ein siebenfarben Sonden Set mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden des Wollaffen *L. lagothericha* etabliert (siehe 4.1.1.3). In diesem Sonden Set waren all diejenigen Sonden zusammengefasst, die im Vergleich zu chromosomen-spezifischen DNA Sonden von *S. oedipus* und des Menschen eine höhere sub-chromosomale Auflösung erzielten. Dadurch konnte präziser definiert werden, ob durch evolutionäre Umbauten neu entstandene Chromosomenformen bei verschiedenen Spezies auf Homologie basieren oder nicht. Beispielsweise konnte deutlich gezeigt werden, dass die Fissionsprodukte des homologen menschlichen Chromosoms 5 in *C. satanas* und *L. lagothericha* das Ergebnis von unabhängigen chromosomalen Umbauten sind. So konnten in *C. satatas* die Chromosomenformen 5a/7a und 5a/5b nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.19,

Kapitel 4.1.2.4) - im Unterschied zu *L. lagothericha* der die Chromosomenformen 5a/7a und 5b aufweist.

Exemplarisch wurden auch chromosomen-spezifische DNA Sonden des Gibbons *H. concolor* eingesetzt, die in vier Sonden Sets zu je sechs Farben zusammenfasst waren und in ihrer Gesamtheit alle Chromosomen von *Hylobates concolor* repräsentieren (siehe Müller et al. 2003 und 4.1.1.4). Die Karyotypen von Gibbons unterscheiden sich durch multiple chromosomale Umbauten von dem des Menschen, weshalb eine Reihe von chromosomen-spezifischen DNA Sonden des Gibbons eine hohe subchromosomale Differenzierung bei Spezies mit weniger rearrangierten Karyotypen erlauben (Arnold et al. 1996, Müller et al. 2003). So konnten bei der Spezies *C. jacchus* zusätzliche Informationen über intra-chromosomale Umbauten gewonnen werden. Für eine breite Anwendung bei Neuweltaffen waren die sechsfarben Sonden Sets des Gibbons jedoch zu komplex. Hierbei spielte weniger die Sequenzdivergenz zwischen Gibbons und Neuweltaffen eine Rolle, da ein deutliches Signal/Hintergrundverhältnis erhalten wurde. Vielmehr wurde mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden Sets von *Hylobates concolor* ein so komplexes Hybridisierungsmuster bei Neuweltaffen erhalten, für dessen Interpretation exzellente Chromosomenpräparate erforderlich gewesen wären, die von einigen Spezies nicht zur Verfügung standen.

5.1.1.2 Massgeschneiderte DNA Sonden Sets

Zur Überprüfung chromosomaler Homologien, sowie zur subregionalen Differenzierung bestimmter Chromosomen in höherer Auflösung, als mit den erwähnten sechs und siebenfarben Sonden Sets des Menschen, *S. oedipus*, *L. lagothericha* und *Hylobates concolor* wurden verschiedene massgeschneiderte DNA Sonden Sets zusammengestellt und in zwei bis vierfarben FISH Experimenten eingesetzt. So wurden zur subregionalen Differenzierung des menschlichen Chromosom 11 Homologen in *Callicebus donacophilus* und *Aotus trivirgatus* ausgewählte chromosomen-spezifische DNA Sonden von *H. concolor* in Kombination mit arm-spezifischen menschlichen DNA Sonden verwendet (siehe 4.1.2.3). Diese erlaubten die in diesen Spezies gemeinsam abgeleitete Assoziation der homologen menschlichen Chromosomen 10/11 mit hoher Sicherheit nachzuweisen. Dies war von besonderer Bedeutung, da die Assoziation 10/11 das einzige synapomorphe Merkmal darstellt, das die Gattungen *Aotus* und *Callicebus* phylogenetisch verbindet. Mit ausgewählten *L. lagothericha* chromosomen-spezifischen Sonden, die in zwei und dreifarben FISH Experimenten eingesetzt

wurden, konnte ferner eine höhere subregionale Auflösung erreicht werden, die die Orientierung von Chromosomensegmenten zum Zentromer aufdeckte, wie beispielsweise von Segmenten homolog zum menschlichen Chromosomenarm 1p. Durch den Vergleich der Orientierung dieser Segmente in verschiedenen Vertretern der Callitrichinae und *C. apella* als *outgroup* (siehe 4.1.2.1, Abb. 4.3 E-H), konnte ein Anhaltspunkt über den ursprünglichen und abgeleiteten Status der Chromosomenregion 1p gewonnen werden. Dieser Marker repräsentierte einen Angelpunkt in der phylogenetischen Rekonstruktion der Callitrichinae (siehe 5.2.4).

5.1.1.3 M-FISH Karyotypierung mittels sequentieller Hybridisierung (*ReFISH*)

Die Technik *ReFISH* (Müller et al. 2002) wurde in dieser Arbeit zur vergleichenden M-FISH Karyotypierung (siehe 4.1.1.5) angewandt. Es konnte gezeigt werden, dass durch sequentielle Hybridisierung eine simultane Differenzierung aller homologen Chromosomen (-regionen) eines Karyotyps mit nur drei kombinatorisch markierten Reportermolekülen erzielt werden kann. Das hierzu entwickelte Zell-Fixierungsprotokoll (siehe 3.9) erlaubte die vollständige Entfernung der zuvor hybridisierten DNA Sonde und ermöglichte gleichzeitig, dass die Chromosomenmorphologie nicht beeinträchtigt wurde.

ReFISH beinhaltet gegenüber M-FISH und SKY (Speicher et al. 1996, Schröck et al. 1996) den Vorzug, dass komplexe DNA Sonden dargestellt werden können, ohne auf hoch spezialisierte Mikroskop-Technologie, Filtersysteme und Bildverarbeitungssoftware angewiesen zu sein. Da bei *ReFISH* weniger Fluorochrome eingesetzt werden müssen, kann auf robuste und kostengünstige Hapten- und Fluorochromsysteme zurückgegriffen werden. Ferner wird mit dieser Methode das Spektrum differentiell darstellbarer DNA Sonden gegenüber konventionellem M-FISH/SKY von $2^N - 1$ auf $2^{N \times M} - 1$ (N =Anzahl der Fluorochrome und M =Anzahl der sequentiellen Hybridisierungen) erweitert. Ein weiterer Vorzug ist, dass bereits hybridisierte und archivierte Metaphasepräparate wiederholt verwendet werden können. Angesichts des raren und kostbaren Zellmaterials der meisten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Neuweltaffen, erwies sich die „Re-Hybridisierung“ von Präparaten als besonders vorteilhaft.

Die vergleichende M-FISH Karyotypierung von Neuweltaffen mittels *ReFISH* gelang zum einen mit einem Set kombinatorisch markierter menschlicher DNA Sonden im 24 Farben

Format, zum anderen mit Sonden des Neuweltaffen *Lagothrix lagothricha* in 31 unterschiedlichen Farbkombinationen (siehe 4.1.1.5). Hybridisierungen mit diesen *multiplex* Sonden erlaubten eine effiziente Charakterisierung von Karyotypen. Jedoch konnte die M-FISH Karyotypierung, insbesondere bei Anwendung der menschlichen *multiplex* Sonde, nur durchgeführt werden, falls die Qualität des Präparates optimal war.

Zusammenfassend zeigten die hier durchgeführten *ReFISH* Experimente, dass es prinzipiell möglich ist, eine *multiplex* Sonde des Menschen im 24 Farben Format bei Neuweltaffen anzuwenden. Jedoch kommt angesichts der höheren Komplexität dieser Sonde auch die Sequenzdivergenz zwischen Mensch und Neuweltaffe deutlicher zum tragen. Hiermit wird offensichtlich, dass den vielen Vorzügen von M-FISH Experimenten auch nachteilige Aspekte zugrunde liegen. Das Potential simultan darstellbarer Chromosomen (-regionen) wird erheblich limitiert durch die Komplexität und Anzahl der verwendeten Sonden. So sinkt zum Beispiel die statistische Wahrscheinlichkeit mit jeder zu einem Sonden Set hinzukommenden Sonde, dass Signale von allen Sonden erhalten werden können. Zudem sinkt die Farbauflösung (*color discrimination efficiency*, Saracoglu et al. 2001) bei der kombinatorischen Markierung mit jedem hinzukommenden Fluorochrom, mit der eine Sonde mehrfach markiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit stellten Hybridisierungen im sechs und sieben Farben Format bei den hier verwendeten DNA Sonden und untersuchten Spezies einen optimalen Kompromiss zwischen Effizienz und Zuverlässigkeit in der Identifizierung chromosomaler Homologien dar. Sie erlaubten chromosomale Umbauten mit höherer Sicherheit zu bestimmen, als mittels der M-FISH Karyotypierung im 24 und 31 Farben Format und waren gleichzeitig effizient genug, um eine große Anzahl von Spezies zu untersuchen.

5.1.2 3D Zoo-FISH in Studien zur Zellkernarchitektur

5.1.2.1 Zellpräparation für die 3D *in situ* Hybridisierung

Das Gelingen eines 3D FISH Experimentes ist in hohem Masse abhängig von der Qualität der Zellkernpräparation. Zwei Kriterien sind hierbei maßgeblich: Zum einen sollte die Zellkernmorphologie erhalten werden, um möglichst native Chromatinanordnungen in fixierten Zellnuklei zu bewahren. Zum anderen sollte die Kernmembran ausreichend durchlässig für die zu hybridisierenden DNA Sonden sein (siehe Solovei et al. 2002b). Da die Behandlungsschritte zur Erfüllung dieser Kriterien einander entgegengesetzt wirken, ist bei

der Zellfixierung und Postfixierung ein Kompromiss zwischen den beiden Kriterien notwendig. Zudem spielen Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen, als auch zwischen gleichen Zelltypen verschiedener Spezies eine Rolle, da die Anforderungen an die Fixierung variieren können. In dieser Dissertation wurde nach dem Fixierungsprotokoll von Solovei et al. (2002b) verfahren, mit Modifikationen der Inkubationsdauer einiger Postfixierungsschritte.

Um eine möglichst intakte Kernmorphologie zu erhalten, wurde für die Zellfixierung Paraformaldehyd verwendet (siehe 3.4.1.2). Die Fixierungsmethode mit Methanol/Eisessig, die häufig für 3D Analysen verwendet wird (Bickmore et al. 2001, Boyle et al. 2001 u.a.) hat den Nachteil, dass die Zellen dehydrieren, abgeflacht werden und Komponenten verlieren, die für die strukturelle Integrität des Zellkerns notwendig sein könnten (Bridger und Lichter 1999). Zur Erhaltung der 3D Struktur von Zellen und Zellnuklei ist die Fixierungsmethode mit Paraformaldehyd daher derjenigen mit Methanol/Eisessig vorzuziehen. Jedoch ergibt sich hierbei gleichzeitig das Problem, dass die durch Paraformaldehyd verursachte Quervernetzung das Eindringen von DNA Sonden in den Zellkern behindert. Nach dem hier verwendeten Protokoll folgten daher nach der Fixierung Postfixierungsschritte (Behandlung der Zellkernpräparate mit Detergenzien, wie Triton-x-100 und mehrmaliges Eintauchen in flüssigen Stickstoff) zur Permeabilisierung der Zell- und Kernmembran und Entfernung von Zytoplasma. In Abhängigkeit von dem verwendeten Zellmaterial wurde die Inkubationsdauer dieser Postfixierungsschritte variiert. Bei Hybridisierungen mit DNA Sonden, die *single copy* Sequenzen enthielten, wie *chromosome painting* Sonden, konnte eine effiziente Durchlässigkeit der Kernmembran häufig nur durch eine nachfolgende enzymatische Behandlung mit Pepsin in Kombination mit 0,01 N Salzsäure zur Entfernung von Zytoplasmaresten erreicht werden. Die Behandlung mit Pepsin stellt einen kritischen Schritt bei der Zellpräparation dar, da die Kernmorphologie durch diese Behandlung erheblich beeinträchtigt werden kann. Daher wurde die Inkubation in Pepsin-Lösung so kurz wie möglich gehalten.

5.1.2.2 DNA Sonden für 3D Zoo-FISH Experimente

Bei den hier durchgeführten FISH Experimenten stellte sich heraus, dass das Zusammenspiel der Kriterien, wie die Wahl geeigneter Reportermoleküle für den Nachweis von DNA Sonden, die Konzentration und Komplexizität einer Sonde, sowie die evolutionäre

Sequenzdivergenz zwischen DNA Sonde und Ziel-DNA, Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz hatte. Diese Kriterien spielen bei 3D FISH offenbar eine noch tragendere Rolle, als bei Hybridisierungen auf Metaphasepräparate, da die Zugänglichkeit der DNA Sonden in den Zellkern erschwert ist.

Um eine möglichst optimale Hybridisierungseffizienz zu erhalten, wurden, falls möglich, jeweils diejenigen DNA Sonden mit der geringsten Sequenzdivergenz zu der Ziel-DNA ausgewählt. So wurden z.B. menschliche chromosomen-spezifische 13, 17 und 20 Sonden für die Hybridisierung auf menschliche Zellkernpräparate und die korrespondierenden *L. lagothericha* Sonden für solche auf Präparate von *C. jacchus* verwendet. Bei der Markierung und dem Nachweis von Sonden wurden Reportermoleküle gewählt, die ein optimales Signal zu Hintergrund Verhältnis und insbesondere eine gute Lichtstabilität zeigten, wie Tamra-dUTP und Biotin-dUTP, das über Avidin-Cy5 oder Avidin-Alexa 488 nachgewiesen wurde. Bei dreifarben Hybridisierungen wurde als drittes Fluorochrom SpektrumGreen-dUTP angewandt, anstatt des bei Hybridisierung auf Metaphasepräparate FISH verwendeten Haptens Digoxigenin, da die gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper (α Dig-FITC oder -Cy5) offenbar nicht effizient in den Zellkern gelangten. Ferner wurde, je nach Komplexizität der DNA Sonde, eine mindestens Doppelte bis Vierfache DNA Konzentration eingesetzt, im Vergleich zu Hybridisierungen auf Metaphasepräparate.

Schließlich zeigte sich, dass die Zusammensetzung eines *multi-color* DNA Sonden Sets ein entscheidender Faktor für das Gelingen von 3D FISH Experimenten war. So wurde z.B. ein DNA Sonden Set zur subregionalen Differenzierung des menschlichen Chromosoms 1 zusammengestellt, das chromosomen-spezifische DNA Sonden unterschiedlicher Spezies, wie auch DNA Sonden, die aus repetitiven Sequenzen zusammengesetzt sind, enthielt (siehe 4.4.1.1, Tabelle 4.7). Gleichmäßige Signalintensitäten konnten mit diesem DNA Sonden Set zwar bei Hybridisierungen auf Metaphasepräparaten erzielt werden (siehe 4.4.1.1, Abb. 4.47). Bei Hybridisierungen auf 3D fixierte Kerne der hier verwendeten lymphoblastoiden Zelllinien stellte sich jedoch heraus, dass die kombinatorische Markierung subregionaler DNA Sonden unterschiedlicher Herkunft zu komplex war, um ausgeglichene Mischfarben und Signalintensitäten zu erhalten. Auch war das Signal/Hintergrund Verhältnis nicht ausreichend, um eine zuverlässige Identifizierung von CT bei einer genügenden Anzahl von Zellkernen zu ermöglichen. Daher wurde die Sonden Komposition zur Analyse der radialen Verteilung von Chromatin homolog zum menschlichen Chromosom 1 und 19 wesentlich vereinfacht und eine

nicht kombinatorische Markierung gewählt (siehe 4.4.1.2). Eine Erweiterung des Spektrums darstellbarer Fluoreszenzen für die konfokale Mikroskopie würde den Vorteil bieten, dass mehr DNA Sonden simultan dargestellt werden könnten, ohne eine kombinatorische Markierung verwenden zu müssen. Dadurch könnte die Aussagekraft von 3D Experimenten erhöht werden, da relative radiale Chromatinanordnungen in einem Experiment besser beurteilt werden können, als im Vergleich zu mehreren unabhängigen Experimenten.

5.1.2.3 Quantitative Auswertung von 3D FISH Experimenten

Das Programm *ImageJ* (siehe 3.11.3) diene in erster Linie zur Hervorhebung spezifischer Signale im Vergleich zu unspezifischem Hintergrund. Diese Bearbeitung unterlag der subjektiven Beurteilung der Grenzen von CT und subchromosomalen Territorien. Die quantitative Auswertung der radialen Verteilung von CT mittels des Programms *3D-RRD* machte das Setzen eines subjektiven Schwellenwertes notwendig, um definieren zu können, welche Signale zu einem CT zugehörig sind. Als mögliche Fehlerquelle ist dieser Arbeitsschritt jedoch nicht gravierend, da in diesem Fall Schwerpunkte und nicht Oberflächen von CT bestimmt werden. Für die quantitative Auswertung der radialen Verteilung von CT und subchromosomalen Territorien im Zellkern mit Hilfe des Programms *3D-RRD* war eine Segmentierungsmaske notwendig, die über die chromosomale Gegenfärbung des Zellkerns erstellt wurde. Wurden jedoch für die Darstellung von CT alle drei Fluoreszenzspektren belegt, die mit dem zur Verfügung stehenden konfokalen Mikroskop angeregt werden konnten, wurde anstatt der chromosomalen Gegenfärbung mit Hilfe von *ImageJ* eine „künstliche Gegenfärbung“ erstellt (siehe 3.11.3, Abb. 3.2). Der Vergleich der kumulativen Kurve der „künstlichen Gegenfärbung“ mit derjenigen der chromosomalen Gegenfärbung mittels TOPRO (siehe 4.4.1.3, Abb. 4.55) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kurven im Kolmogoroff-Smirnoff Test. Die Verwendung einer „künstlichen Gegenfärbung“ stellte daher für die quantitative Auswertung eine geeignete Alternative zur chromosomalen Gegenfärbung dar.

5.1.3 *Inter-species Comparative Genome Hybridization (iCGH)*

Die in dieser Dissertation durchgeführten CGH Experimente dienten als komplementäres Werkzeug zu *chromosome painting*, um insbesondere genomische Imbalancen zwischen verschiedenen Spezies zu visualisieren, die mittels herkömmlichen molekular zytogenetischen

Ansätzen wie *chromosome painting* nicht zugänglich waren. Es wurden zwei Varianten der CGH durchgeführt: Zum einen *inter-species Comparative Genome Hybridization* (iCGH), zum anderen konventionelle CGH. Beide hatten zum Ziel, Gewinne und Verluste repetitiver Elemente sowohl zwischen verschiedenen Spezies, als auch zwischen Individuen einer Spezies nachzuweisen. Der prinzipielle Unterschied beider Ansätze liegt darin, dass bei iCGH Test-DNA und Referenz-DNA unterschiedlichen Speziesursprungs sind, während sie bei konventioneller CGH von verschiedenen Individuen derselben Spezies herrühren. *Inter-species* CGH wurde nach der Methode von Toder et al. (1998) durchgeführt, für die das Standard CGH Protokoll von Kallioniemi et al. (1992) adaptiert wurde.

Mittels CGH war es möglich, die Organisation und den Evolutionsmodus von repetitiven Elementen zu untersuchen, sowie deren inter- und intraspezifische Variabilität. Repetitive Elemente des konstitutiven Heterochromatins sind mittels C-Bänderung ebenfalls nachweisbar, jedoch ist deren zugrunde liegender molekularer Mechanismus nicht vollständig geklärt. Im Unterschied dazu erlauben iCGH Experimente repetitive Genomelemente direkt auf der DNA Ebene nachzuweisen. Mittels geeigneter Computerprogramme, wie z.B. das in dieser Arbeit verwendete Programm *Quips CGH/Karyotyper* (siehe 3.11.2) können Gewinne und Verluste genomischer Imbalancen quantitativ ausgewertet werden. Ferner, wenn iCGH Experimente in einer reziproken Weise auf Metaphasen von Test und Referenz Spezies durchgeführt werden, kann das Vorhandensein oder die Abwesenheit, als auch der Grad der Sequenzdivergenz von repetitiven Elementen zwischen zwei Spezies bestimmt werden. So können Schlussfolgerungen gezogen werden über deren Spezies-Spezifität im Rahmen der Auflösung von CGH.

In einigen der in dieser Dissertation durchgeführten CGH Experimente ergab sich die Schwierigkeit balancierte Fluoreszenzintensitäten von euchromatischen Chromosomenregionen zu erhalten. Dies war dann der Fall, wenn repetitive genomische Elemente aufgrund ihrer hohen Kopienanzahl so stark fluoreszierten, dass die Signalintensität von geringer fluoreszierenden Chromosomenregionen während der mikroskopischen Aufnahme unterbelichtet wurden. Für die quantitative Auswertung mittels *Quips CGH/Karyotyper* war es jedoch notwendig die auszuwertenden Chromosomen so zu balancieren, dass realistische Ergebnisse, sprich balancierte euchromatische Regionen resultierten. Daher wurde die Belichtungszeit während der mikroskopischen Aufnahme verlängert, um auch weniger stark fluoreszierende Signale zu erfassen, mit der Konsequenz, dass repetitive Chromosomenregionen häufig überbelichtet wurden.

5.1.4 Generierung von DNA Sonden mit Hilfe der Mikrodisektion

Die Mikrodisektion von Chromosomen und Chromosomen-Subregionen ist eine geeignete Methode für die Etablierung von regionalen "painting" Sonden. Publierte Protokolle erlauben die Generierung entsprechender Sonden von weniger als 10 Chromosomen (Guan et al. 1993, Weimer et al. 1999) mit relativ geringem technischem Aufwand. Darüber hinaus entwickelten Weimer et al. 2000 eine elegante Methode, die eine Kombination aus *multi-color* FISH und chromosomaler Mikrodisektion (*FISH-MD*) in einem Experiment darstellt. Die zu mikrodisektierenden Chromosomen werden hierbei über *multi-color* FISH identifiziert und anschließend über die chromosomale Mikrodisektion isoliert. Da im Rahmen dieser Arbeit keine solche mikroskopische Ausrüstung zur Verfügung stand, wurde die Methode von Weimer et al. 2000 modifiziert, indem die chromosomale Zielregion für die Mikrodisektion mittels Kolorimetrischer Detektion (siehe 3.8.4) identifiziert wurde.

Die Methode der chromosomalen Glasnadelmikrodisektion diente in dieser Arbeit zur gezielten Generierung von DNA Sonden für polymorphe heterochromatische Chromosomenregionen. Die Hybridisierung dieser Sonden bot im Vergleich zu iCGH den Vorteil, dass repetitive Genomelemente nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ beurteilt werden konnten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die mit einer spezifischen repetitiven Mikrodisektions-Sonde von *S. sciureus* identifizierten Genomelemente in *S. sciureus* nur eine Subfraktion von den mittels iCGH nachgewiesenen repetitiven Genomelemente darstellten. Gegenüber der C-Bänderung hat FISH mit Mikrodisektions-Sonden den Vorteil, dass direkt Sequenzhomologien nachgewiesen werden können.

5.2 Rekonstruktion chromosomaler Phylogenen der Neuweltaffen

Die Rekonstruktion chromosomaler Umbauten der hier untersuchten Neuweltaffen hatte zum Ziel, einen Stammbaum aller Neuweltaffen, die mittels *chromosome painting* untersucht wurden, zu erstellen. Die Daten der bisher publizierten Neuweltaffenarten, wurden hierbei in die phylogenetische Analyse miteinbezogen. Es wurden zwei Ansätze der phylogenetischen Rekonstruktion vorgenommen: Ein kladistischer Ansatz, bei dem zwischen ursprünglichen und abgeleiteten Chromosomenformen in Neuweltaffen unterschieden wurde und eine schrittweise Rekonstruktion chromosomaler Umbauten, ausgehend von dem hypothetischen ancestralen Karyotyp aller Neuweltaffen (Neusser et al. 2001) durchgeführt wurde. Im Detail

wurde wie folgt vorgegangen: Chromosomale Homologien zwischen Spezies einer bestimmten Speziesgruppe wurden nachgewiesen und vergleichende Genomkarten erstellt. Über den Vergleich mit geeigneten phylogenetischen *outgroup* Spezies wurden symplesiomorphe Charaktere (gemeinsame ancestrale Chromosomenformen), die von der *outgroup* und den meisten Neuweltaffen geteilt wurden und synapomorphe Charaktere (gemeinsam abgeleitete Chromosomenformen), die ausschließlich von den meisten Neuweltaffen geteilt wurden, identifiziert. Basierend auf dem Vergleich mit *outgroup* Spezies wurde der hypothetische ancestrale Stammbaum aller Neuweltaffen rekonstruiert. Synapomorphe Charaktere von Spezies Subgruppen wurden identifiziert und die Abfolge chromosomaler Umbauten, die innerhalb dieser Spezies Subgruppen aufgetreten sind, rekonstruiert. Hierbei wurde nach dem Prinzip der Parsimonie vorgegangen.

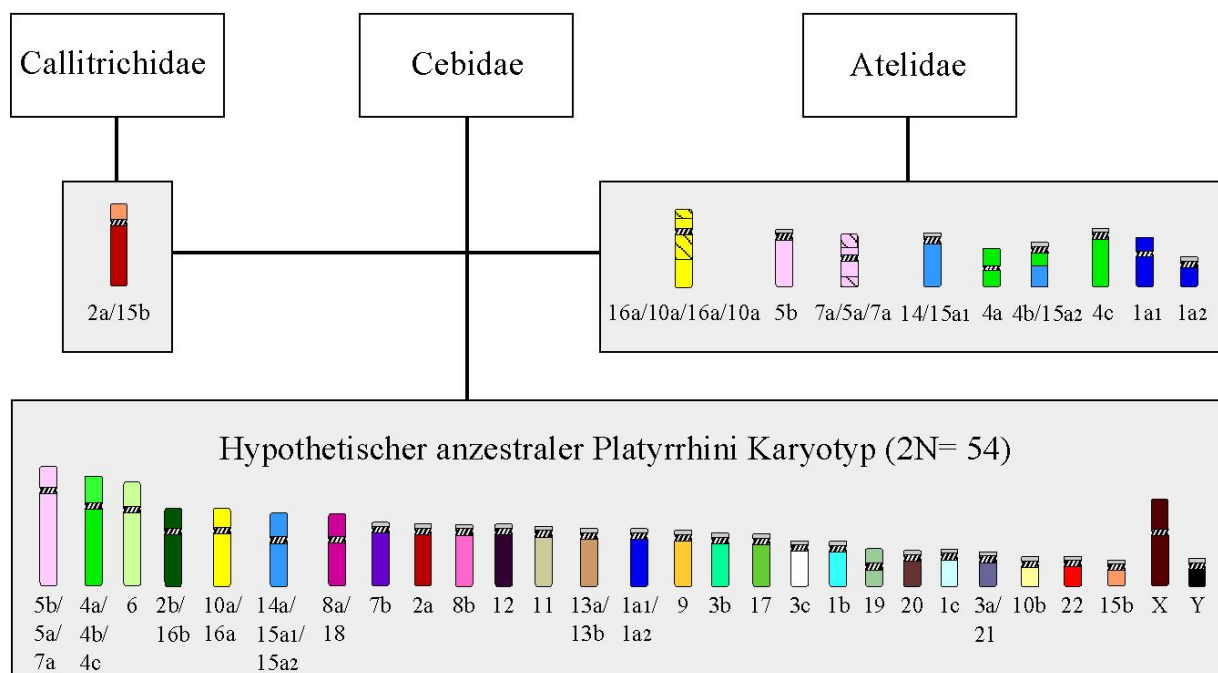
Der zweite Ansatz bestand in einer phylogenetischen Rekonstruktion mit Hilfe des Phylogenieprogramms *PAUP* (Swofford 1998). Dieser basierte auf der Definition von diskreten chromosomalen Charakteren, die in eine binäre Datenmatrix übersetzt wurden, welche anschließend mittels *PAUP* ausgewertet wurde (siehe 3.12). Hierfür wurden zunächst konservierte homologe Segmente definiert, die zwischen dem Menschen und den bisher mittels *chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen nachgewiesen wurden. Konservierte homologe Segmente stellten all diejenigen homologen Chromosomenregionen dar, die mit menschlichen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* chromosomen-spezifischen DNA Sonden bei den untersuchten Neuweltaffen als kleinste auflösbare Einheit nachgewiesen wurden. Diese konservierten homologen Segmente, als auch Assoziationen zwischen zwei benachbarten homologen Chromosomensegmenten, die durch Translokation oder intra-chromosomale Umbauten zusammengeführt wurden, wurden als diskrete chromosomale Charaktere definiert.

5.2.1 Der hypothetische ancestrale Karyotyp aller Neuweltaffen

Vergleichende Genomkarten von insgesamt 31 verschiedenen Neuweltaffenspezies und 4 Subspezies, einschließlich der bereits publizierten Neuweltaffen, konnten bisher mittels *chromosome painting* gesammelt werden; davon 21 im Rahmen dieser Arbeit. Mit Hilfe dieser vergleichenden Genomkarten konnte ein breites Spektrum an chromosomalen Daten gewonnen werden, die eine Rekonstruktion der Phylogenie dieser Neuweltaffen erlaubte. Über den Vergleich mit geeigneten phylogenetischen *outgroup* Spezies konnte ein hypothetischer ancestraler Karyotyp aller Neuweltaffen formuliert werden. Als

phylogenetische *outgroup* diene der hypothetische ancestrale Karyotyp aller Primaten (siehe 2.4.3, Abb. 2.8). Der ancestrale Karyotyp aller Neuweltaffen beinhaltet Chromosomenformen, die sowohl von der *outgroup*, als auch den meisten Neuweltaffen geteilt werden und gemeinsam abgeleitete Chromosomenformen, die ausschließlich von den meisten Neuweltaffen geteilt werden. Ein hypothetischer ancestraler Karyotyp aller Neuweltaffen wurde bereits von Stanyon et al. (2000) vorgeschlagen. Die Analyse weiterer Neuweltaffenspezies, sowie die Verwendung von *chromosome painting* Sonden des Menschen, wie auch der Neuweltaffen *S. oedipus* und *L. lagothericha* im Rahmen dieser Arbeit, erlaubten eine detaillierte Darstellung chromosomaler Homologien. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Revision des ursprünglich von Stanyon et al. (2000) postulierten ancestralen Karyotyps aller Neuweltaffen vorgeschlagen. Im Unterschied zu Stanyon et al. (2000) würde der hier vorgeschlagene ancestrale Karyotyp aller Neuweltaffen einen Chromosomensatz von $2n=54$ anstatt $2n=56$ besitzen und die in Abbildung 5.2 schematisch darstellten Chromosomenformen aufweisen.

Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des hypothetischen ancestralen Karyotyps aller Neuweltaffen (Platyrrhini), zusammen mit phylogenetischen Verzweigungslinien zu den Neuweltaffenfamilien Callitrichidae, Cebidae und Atelidae. Synapomorphe Charaktere an den Verzweigungspunkten zu den Callitrichidae und Atelidae repräsentieren phylogenetische „Landmarken“. Der ancestrale Karyotyp aller Neuweltaffen weist einen Chromosomensatz von 54 Chromosomen auf und setzt sich aus symplesiomorphen und synapomorphen Charakteren zusammen. Die Nomenklatur bezieht sich auf homologe menschliche Chromosomen (-segmente) (Neusser et al. 2001 und de Oliveira et al. 2002).



Der Vergleich mit dem postulierten ancestralen Karyotyp aller Primaten (siehe 2.4.3, Fröncke et al. 2003) erlaubte die Identifizierung der homologen menschlichen Chromosomen 4, 6, 9, 11, 13, 17, 20, X und Y als symplesiomorphe Charaktere bei Neuweltaffen. Diese Chromosomen sind zwar in einigen Neuweltaffenspezies in chromosomale Umbauten involviert, jedoch mit verschiedenen Translokationspartnern. Daher ist anzunehmen, dass die nicht translozierte Chromosomenform den ancestralen Zustand dieser Chromosomen repräsentiert. Weitere wichtige symplesiomorphe Charaktere stellen die Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomen 3a/21 und 14/15 dar. Diese Assoziationen konnten bei bisher allen untersuchten Neuweltaffen nachgewiesen werden, mit Ausnahme von *Alouatta sara* und *Alouatta seniculus arctoidea* (Consiglière et al. 1996). Sie wurden auch bei Prosimii (Müller et al. 1997a, Stanyon et al. 2002) und zahlreichen Säugetieren, die nicht der Primatenordnung angehören, identifiziert (O'Brien et al. 1999, Hayes 1995, Rettenberger et al. 1995a, 1995b, Solinas-Toldo et al. 1995, Yang et al. 2003, Yang et al. 1995, Wienberg et al. 1997, Müller et al. 1999, Fröncke et al. 2003). Folglich können die Assoziationen 3a/21 und 14/15 als ancestrale Merkmale für alle Säugetiere angesehen werden, einschließlich der Primaten (siehe Übersichtsartikel von Fröncke 2004, im Druck). Die Assoziation 3a/21 wurde in der Spezies *Alouatta seniculus macconnelli* nachgewiesen, jedoch nicht in den beiden oben genannten Spezies der Gattung *Alouatta*. Da es sich um ein sehr kleines Segment des homologen menschlichen Chromosoms 3 handelt, das auf das homologe menschliche Chromosom 21 transloziert wurde, kann angenommen werden, dass es bei der Detektion übersehen wurde. Das Fehlen der Assoziation 14/15 in diesen beiden *Alouatta* Spezies kann als abgeleitetes Merkmal für diese Spezies interpretiert werden. Die Assoziation 3/21 wurde im Unterschied zu der Assoziation 14/15 bisher in keiner Altweltaffenspezies identifiziert (Wienberg et al. 1992, Bigoni et al. 1997a, 1997b, Finelli et al. 1999, siehe Übersichtsartikel von Wienberg und Stanyon 1998). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich die Neuweltaffen vom Stamm der Primaten abgespalten haben, bevor die Fission der Assoziation 3/21 erfolgte, die zu separaten Chromosomen der menschlichen Homologen 3 und 21 bei den rezenten Altweltaffen und Menschenaffen führte. Die nachgewiesene Assoziationen 3/21 in Neuweltaffen gibt demnach einen Hinweis darauf, dass Neuweltaffen einen älteren phylogenetischen Zweig der Primaten repräsentieren als Altweltaffen.

Charakteristische Merkmale des hypothetischen ancestralen Karyotyps der Primaten sind zwei Homologe zum menschlichen Chromosom 19, sowie die Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomen 7/16 und 12/22 (auf zwei heterologen Chromosomenpaaren).

Bei den Anthropeida (höhere Affen), zu denen auch die Neuweltaffen klassifiziert werden, finden sich diese Chromosomenformen nicht mehr. Der ancestrale Karyotyp der Anthropeida kann folglich durch eine reziproke Translokation der homologen menschlichen Chromosomen 12 und 22, durch eine Fission der Assoziation 7/16 und durch eine Fusion der zwei homologen menschlichen Chromosomen 19 zu einem Homologen Chromosom 19 abgeleitet werden.

Der vorgeschlagene ancestrale Karyotyp aller Neuweltaffen leitet sich von diesem durch weitere chromosomale Umbauten ab. Die resultierenden Chromosomenformen repräsentieren synapomorphe Charaktere für alle Neuweltaffen. So stellen die homologen menschlichen Chromosomensegmente 1a, 1b und 1c, als auch 3a/21, 3b und 3c, die durch je zwei Fissionen der homologen menschlichen Chromosomen 1 und 3 von dem hypothetischen ancestralen Karyotyp der Anthropeida abgeleitet werden können, gemeinsam abgeleitete Merkmale dar, die ausschließlich von den meisten Neuweltaffen geteilt werden. Weiterhin leitet sich der ancestrale Karyotyp der Neuweltaffen durch je eine Fission der homologen menschlichen Chromosomen 8, 10, 15 und 16 von dem ancestralen Karyotyp der Anthropeida ab. Diese Chromosomen sind gleichzeitig in Translokationen involviert, die zu Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomensegmente 2b/16b, 5a/7a, 8a/18 und 10a/16a führten. Die genannten Assoziationen wurden in der Mehrzahl der mit *chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen nachgewiesen, während sie in anderen Primatengruppen nicht identifiziert werden konnten.

Die Assoziation 5a/7a wurde bisher in allen untersuchten Neuweltaffen identifiziert, mit Ausnahme der publizierten Spezies *A. sara* und *A. s. arctoidea* (Consiglière et al. 1996). Sie wurde daher, im Unterschied zu Stanyon et al. (2000) als synapomorphes Merkmal in den hypothetischen ancestralen Karyotyp aller Neuweltaffen miteinbezogen. Die Assoziation 5a/7a wurde auch in der hier untersuchten Subspezies *A. s. macconnelli* nachgewiesen. Es kann daher spekuliert werden, ob die Assoziation in *A. sara* und *A. s. arctoidea* von Consiglière et al. (1996) übersehen wurde, zumal nur ein relativ kleines Fragment von ca. 30 Mbp mit Homologie zum menschlichen Chromosom 7 assoziiert mit dem homologen menschlichen Chromosom 5 ist. Ferner wurden diese Spezies nur mit menschlichen chromosomen-spezifischen DNA Sonden charakterisiert, die aufgrund der höheren Sequenzdivergenz zwischen Mensch und Neuweltaffe, eine geringere Hybridisierungseffizienz zeigen, als DNA Sonden von Neuweltaffen. Eine Überprüfung dieser Assoziation in

den oben genannten Spezies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da kein Zellmaterial von diesen Spezies zur Verfügung stand.

Die Karyotypen von allen mit *chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen, mit Ausnahme der Spezies *Aotus trivirgatus* und *A. s. arctoidea* wiesen eine Assoziation der homologen menschlichen Chromosomen (regionen) 8a/18 auf. Die Spezies *A. trivirgatus* und *A. s. arctoidea* gehören unterschiedlichen phylogenetischen Linien der Neuweltaffen an. Es kann daher angenommen werden, dass das Fehlen dieser Assoziation ein abgeleitetes Merkmal dieser Spezies repräsentiert und unabhängig in diesen Spezies entstanden ist.

Die Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 10a/16a wird gleichfalls von nahezu allen Neuweltaffenspezies geteilt. In der Neuweltaffenspezies *Aotus infulatus* wurde keine unmittelbare Assoziation 10a/16a nachgewiesen, sondern eine Assoziation 10a/22/16a. Nach dem Prinzip der Parsimonie ist es jedoch wahrscheinlicher anzunehmen, dass eine sekundäre Insertion des homologen menschlichen Chromosoms 22 in das ancestrale homologe Chromosom 10a/16a, stattgefunden hat, als eine alternative evolutionäre Abfolge chromosomaler Umbauten, die zu der Assoziation 10a/22/16a in *A. infulatus* führte. In *A. trivirgatus* konnte keine Assoziation 10a/16a identifiziert werden. Stattdessen liegen die homologen Chromosomen als separate Chromosomen 16a/22 und 10a in dieser Spezies vor. Die Assoziation 10a/22/16a in *A. infulatus* könnte daher als eine „Übergangsform“ betrachtet werden, von der sich die Homologen in *A. trivirgatus* ableiten lassen.

In geringerer Häufigkeit war die Assoziation der homologen menschlichen Chromosomenregionen 2b/16b in den bisher untersuchten Neuweltaffen nachweisbar. Sie konnte nur in 22 von 31 verschiedenen Spezies identifiziert werden. Die 22 Neuweltaffenarten gehören Gattungen unterschiedlicher phylogenetischer Linien an. Daher kann die Assoziationen 2b/16b ebenfalls als synapomorphes Merkmal für alle Neuweltaffen interpretiert werden. Die Integration der Assoziation 2b/16b in dem hier vorgeschlagenen ancestralen Karyotyp aller Neuweltaffen, führte zu einer Reduzierung des Chromosomensatzes auf $2n=54$, anstatt der von Stanyon et al. (2000) vorgeschlagenen $2n=56$ Chromosomen. In den Spezies *Callithrix jacchus*, *Chiropotes satanas*, *Aotus trivirgatus*, *Aotus infulatus* sowie allen untersuchten Spezies der Gattung *Alouatta* liegen die Homologen als separate homologe menschliche Chromosomen 2b und 16b vor. Da die Assoziation 2b/16b

in verschiedenen phylogenetischen Linien der Neuweltaffen vorkommt, erscheint eine evolutionär abgeleitete Fission der Assoziation 2b/16b in *C. jacchus*, *C. satanas* und den untersuchten Spezies der Gattungen *Alouatta* und *Aotus* unter Annahme von Parsimonie, wahrscheinlicher, als eine unabhängige Fusion der Chromosomen 2b und 16b in allen anderen Neuweltaffenspezies. Demnach wären die separaten homologen menschlichen Chromosomen 2b und 16b abgeleitete Merkmale dieser Spezies, die sekundär entstanden sind, also konvergente Merkmale. Gleichzeitig kann die Fission der Assoziation 2b/16b als gemeinsam abgeleitetes Merkmal der untersuchten Spezies innerhalb der Gattung *Alouatta* (gleiches trifft für die Gattung *Aotus* zu) interpretiert werden, da es nach dem Prinzip der Parsimonie wahrscheinlicher ist, dass die Fission einmalig in einem Ancestor der Gattung *Alouatta* bzw. *Aotus* entstanden ist, als unabhängig voneinander in sechs verschiedenen Spezies der Gattung *Alouatta* und zwei verschiedenen Spezies der Gattung *Aotus*. Da durch die Fission der Assoziation 2b/16b die ancestrale Chromosomenform der Anthropeida wieder hergestellt wurde, kann sie als evolutionär abgeleitete Reversion betrachtet werden.

Zusammenfassend können die Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomen (-segmente) 2b/16b, 5a/7a, 8a/18 und 10a/16a als charakteristische cladistische Merkmale für Neuweltaffen verstanden werden, die deutliche Anhaltspunkte für einen monophyletischen Ursprung von Neuweltaffen geben. Der hypothetische ancestrale Karyotyp aller Neuweltaffen diene weiterhin als Grundlage für die Rekonstruktion chromosomaler Phylogenien innerhalb der Neuweltaffenfamilien Callitrichidae, Cebidae und Atelidae, die in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben wird.

5.2.2 Chromosomale Umbauten bei Cebidae

Mittels *chromosome painting* wurden bisher die Karyotypen der Spezies *Cebus capucinus* (Richard et al. 1996), *Cebus apella* (Garcia et al. 2000), *Cebus nigrivittatus* (Garcia et al. 2002), *Callicebus moloch* (Stanyon et al. 2000) *Saimiri sciureus* (Stanyon et al. 2000 und im Rahmen dieser Arbeit), *Saimiri boliviensis*, *Saimiri ustus*, *Cebus apella paraguayanus*, *Cebus albifrons*, *Aotus trivirgatus*, *Aotus infulatus* (im Rahmen dieser Arbeit) und *Callicebus donacophilus* (im Rahmen dieser Arbeit, Barros et al. 2003) untersucht. Ausgehend von dem hypothetischen ancestralen Karyotyp aller Neuweltaffen (siehe Abb. 5.2) wurde die Abfolge chromosomer Umbauten in den 11 bisher charakterisierten Spezies der Familie Cebidae rekonstruiert (siehe Abb. 5.3). Die untersuchten Vertreter der Gattung *Saimiri* werden in

Zusammenhang mit der Familie Callitrichidae diskutiert (siehe 5.2.4). Die untersuchten Vertreter *Chiropotes satanas* und *Cacajao calvus* der Unterfamilie Pitheciinae wurden nach Ford 1986 der Familie Atelidae zugeordnet. Sie wurden hier zusammen mit den Cebidae in der Abbildung 5.3 dargestellt, da die zweite Unterfamilie der Atelidae, die Atelinae, eine distinkte Gruppe innerhalb der Neuweltaffen repräsentiert und daher in einem eigenen Kapitel (siehe 5.2.3) diskutiert wird.

Die vergleichende Karyotypanalyse der Cebidae zeigte, dass der ancestrale Karyotyp aller Neuweltaffen in der Gattung *Cebus* nahezu vollständig konserviert ist. Alle vier untersuchten Spezies dieser Gattung leiten sich vom ancestralen Karyotyp der Neuweltaffen durch eine synapomorphe Inversion ab, welche die homologen menschlichen Chromosomen 14 und 15 involvierte und zu der Chromosomenform 14/15a₂/15a₁/14 führte. Die Spezies *Cebus nigrivittatus* leitet sich zusätzlich durch eine Fusion der homologen menschlichen Chromosomen 12 und 15b vom ancestralen Karyotyp aller Neuweltaffen ab. Bei *Cebus albifrons* wurde eine zusätzliche Inversion des Chromosoms 6 nachgewiesen, welche zu einer abgeleiteten Chromosomenform 14/15a₂/15a₁/14 führte. Ferner wurde in *C. albifrons* eine Insertion des homologen menschlichen Segments 15b in das menschliche Homologe 8 identifiziert. Da diese zusätzlichen chromosomalen Umbauten ausschließlich in *C. nigrivittatus* bzw. *C. albifrons* nachgewiesen wurden, kann angenommen werden, dass sie autapomorphe Merkmale darstellen.

Die untersuchten Vertreter der Gattungen *Callicebus* und *Aotus* teilen eine Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 10b/11. Diese Assoziation kann als synapomorphes Charakter interpretiert werden, das diese beiden Gattungen phylogenetisch verbindet und repräsentiert gleichzeitig das einzige mittels *chromosome painting* nachgewiesene synapomorphe Merkmal innerhalb der Familie Cebidae. Um fundierter nachweisen zu können, dass es sich bei der Assoziation 10b/11 um ein synapomorphes Merkmal der Gattungen *Callicebus* und *Aotus* handelt, wurde eine vergleichende Kartierung mittels chromosomen-spezifischer DNA Sonden des Gibbons und Chromosomenarm-spezifischen Sonden des Menschen zur subregionalen Differenzierung der menschlichen Chromosom 11 Homologen durchgeführt. Im Rahmen der erzielten Auflösung konnte gezeigt werden, dass die gleichen Segmente bei *Callicebus* und *Aotus* in die Assoziation 10b/11 involviert waren (siehe hierzu Abb. 4.17 G). Demnach kann ein gemeinsam abgeleiteter Ursprung dieser Assoziation angenommen werden.

Innerhalb der Gattung *Aotus* wurden 11 abgeleitete Chromosomenformen nachgewiesen, die von den Spezies *A. trivirgatus* und *A. infulatus* geteilt werden und daher synapomorphe Charaktere darstellen (siehe Abb. 5.3). Sie leiten sich vom ancestralen Karotyp durch 6 Translokationen und 2 Fissionen ab, die zu Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomensegmente 5a/7a/11/10b, 1b/3a/21, 2a/20, 4a/15b, 1c/16b und 16a/22 auf je einem Chromosomenpaar führten. Ferner wurde eine Fission des homologen menschlichen Chromosomensegments 7b und eine Inversion, die die homologen menschlichen Chromosomen (-segmente) 15a₁, 15a₂ und 14 involviert, nachgewiesen. *A. trivirgatus* leitet sich weiterhin durch eine Fusion und 2 Fissionen und *A. infulatus* durch eine Fusion, Inversion und eine Translokation vom hypothetischen ancestralen Karyotyp der Neuweltaffen ab. Die Chromosomenformen 5b/15b/4a/4c und 5a/5b/15b in *A. infulatus* (siehe Abb. 4.31 B) sind vermutlich das Resultat einer reziproken Translokation zwischen den für Aotinae angenommenen ancestralen Chromosomenformen 5a/5b und 15b/4a/4c. Der Unterschied in der Chromosomenanzahl zwischen den beiden Spezies ($2n=54$ in *A. trivirgatus*, $2n=49$ in *A. infulatus*) liegt zum einen darin begründet, dass in *A. trivirgatus* eine Fission des für Neuweltaffen ancestralen Charakters 8a/18 stattgefunden hat, die zu separaten Chromosomen, homolog zu den menschlichen Chromosomen(segmenten) 8a und 18 führte. Die Fission dieses für Neuweltaffen ancestralen Merkmals repräsentiert somit eine Reversion zur ancestralen Chromosomenform der Primaten. Zum anderen wurde eine Fission in *A. trivirgatus* Chromosom 5 beobachtet, die zu den Chromosomenformen 16a/22 und 10a führte. Die ungerade Chromosomenzahl des untersuchten männlichen Individuums von *A. infulatus*, sowie das Fehlen eines separaten Y Chromosoms, weist auf eine Y autosomale Translokation hin. Mit den hier verwendeten DNA Sonden konnte keine Homologie zum Y Chromosom in *A. infulatus* nachgewiesen werden. Eines der Homologen (homolog zu *A. trivirgatus* Chromosom 9) wies eine zusätzliche nicht hybridisierte Region am distalen Ende des kurzen Chromosomenarms auf, welche vermutlich die Y Chromosom spezifische Region enthält (siehe Abb. 4.31 B).

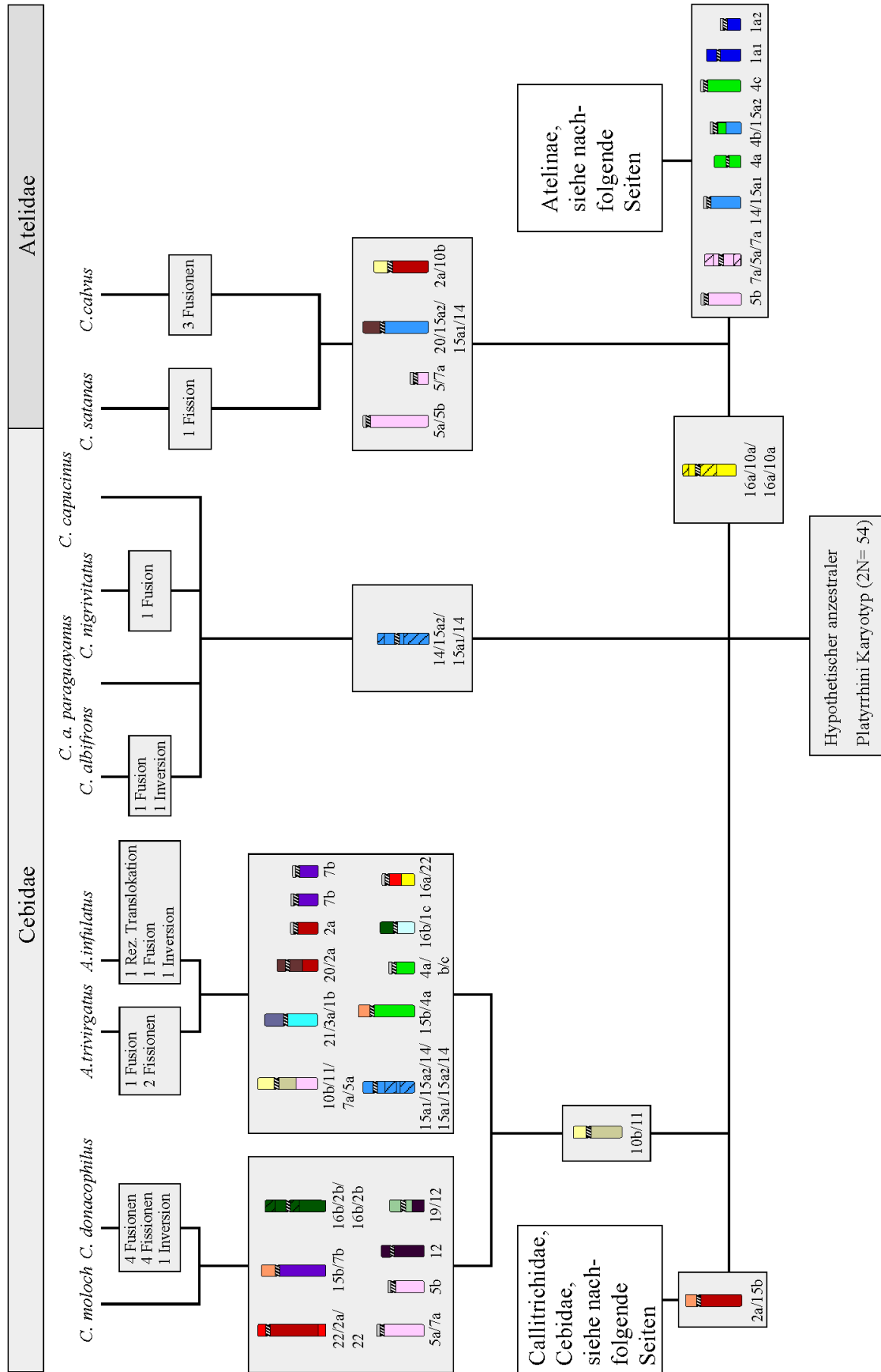
Die Spezies *Callicebus moloch* und *Callicebus donacophilus* teilen sieben synapomorphe Merkmale: Die Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomensegmente 2b/16b/2b/16b, 7b/15b, 5a/7a, 12, 12/19 und 22/2a/22 und ein separates Chromosom, homolog zum menschlichen Chromosomensegment 5b. Sie sind das Produkt von insgesamt drei Translokationen, zwei Inversionen und einer Fission, ausgehend vom hypothetischen

anzestralen Karyotyp der Neuweltaffen. Während in der Spezies *C. moloch* keine weiteren chromosomalen Umbauten nachgewiesen wurden, konnten in der Spezies *C. donacophilus* vier weitere autapomorphe Fusionen, vier Fissionen und eine Inversion identifiziert werden. Im Vergleich zu *C. moloch* weist die Spezies *C. donacophilus* deshalb einen wesentlich abgeleiteteren Karyotyp auf.

Chromosomale Charaktere der Unterfamilie Pitheciinae (nach Ford 1986 in die Familie Atelidae klassifiziert) werden hier in Zusammenhang mit den untersuchten Spezies der Cebidae beschrieben. Mittels *chromosome painting* wurden bisher die Spezies *Chiropotes satanas* und *Cacajao calvus* untersucht, die Vertreter von zwei der drei Gattungen der Unterfamilie Pitheciinae repräsentieren. Einzig Spezies der Gattung *Pithecia* wurden bislang nicht mittels *chromosome painting* untersucht.

Innerhalb der Gattung Pitheciinae konnten vier abgeleitete Chromosomenformen identifiziert werden, die von den Spezies *C. satanas* und *C. calvus* als synapomorphe Merkmale geteilt werden: Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomensegmente 2a/10b und 14/15a₁/15a₂/20, sowie eine Fission, die zu separaten Chromosomen homolog zu den menschlichen Chromosomensegmenten 5a/7a und 5a/5b führte. Die Spezies *C. satanas* leitet sich weiterhin durch eine Fission der ancestralen Chromosomenform 2b/16b ab, wodurch die separaten Chromosomen 2b und 16b entstanden. Insgesamt besitzt die Spezies *C. satanas* im Vergleich zu *C. calvus* den ursprünglicheren Karyotyp, da in *C. calvus* drei weitere abgeleitete Assoziationen (3c/20, 1c/12 und 3b/5a) identifiziert wurden. Zudem wurde aufgrund des beobachteten asymmetrischen Hybridisierungsmusters, der ungeraden Chromosomenzahl und das Fehlen eines separaten Y-Chromosoms eine Y-autosomale Translokation in *C. calvus* angenommen.

Abbildung 5.3 (siehe nachfolgende Seite): Rekonstruktion chromosomaler Umbauten innerhalb der Familie Cebidae mit Verzweigungspunkten zu der Familie Callitrichidae und der Unterfamilie Atelinae. Die Farbkodierung bezieht sich auf den hypothetischen ancestralen Neuweltaffen Karyotyp (siehe Abb.5.2). Schraffierte Regionen repräsentieren invertierte Chromosomensegmente. *C. moloch* und *C. donacophilus* gehören der *Callicebus* an, *A. trivirgatus* und *A. infulatus* der Gattung *Aotus* und *C. albifrons*, *C. a. paraguayanus*, *C. nitrivigatus* und *C. capucinus* der Gattung *Cebus*. Die untersuchten Spezies *Chiropotes satanas* und *Cacajao calvus* der Unterfamilie Pitheciinae werden nach Ford (1986) zu der Familie Atelidae klassifiziert.



Die vergleichende Karyotypanalyse der bisher untersuchten Neuweltaffen ergab keine chromosomale Evidenz für eine phylogenetische Verbindung der Pitheciinae mit den Cebidae. Es konnte ferner nur ein einziges chromosomales Merkmal identifiziert werden, das die Pitheciinae phylogenetisch mit den übrigen Spezies der Atelidae verbinden würde. Dieses stellt eine gemeinsam angeleitete Inversion dar, die zu der Chromosomenform 16a/10a/16/10a führte. Da jedoch bei der vorliegenden Auflösung von FISH mit den verwendeten DNA Sonden nicht exakt nachgewiesen werden konnte, ob die in Pitheciinae und Atelinae nachgewiesene Inversion auf einem homologen Ursprung basiert, stellt diese Chromosomenform ein relativ schwaches synapomorphes Merkmal dar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die untersuchten Spezies der Familie Cebidae eine heterogene Gruppe mit divergenten Karyotypen darstellen. Die Gattung *Cebus* weist innerhalb der Cebidae weit gehend konservierte Karyotypen auf. Hingegen konnten in den untersuchten Spezies der Gattung *Callicebus* und *Aotus* zahlreiche abgeleitete Charaktere identifiziert werden. Die Rekonstruktion der Abfolge chromosomaler Umbauten erlaubte die Identifizierung nur eines synapomorphen Merkmals zwischen den Gattungen *Callicebus* und *Aotus* innerhalb der Familie Cebidae. Bislang konnte keine chromosomale Evidenz dafür gefunden werden, dass die Cebidae eine monophyletische Gruppe darstellt. Gleichfalls wurde bisher kein synapomorphes Merkmal identifiziert, welches die Cebidae mit den Atelidae, phylogenetisch verbinden würde. Die untersuchten Pitheciinae (Familie Atelidae) besitzen weit gehend konservierte Karyotypen, mit einer moderaten Anzahl an chromosomalen Umbauten. Sie teilen möglicherweise eine abgeleitete Inversion als synapomorphes Merkmal mit der Unterfamilie Atelinae.

5.2.3 Chromosomale Umbauten bei Atelinae (Familie Atelidae)

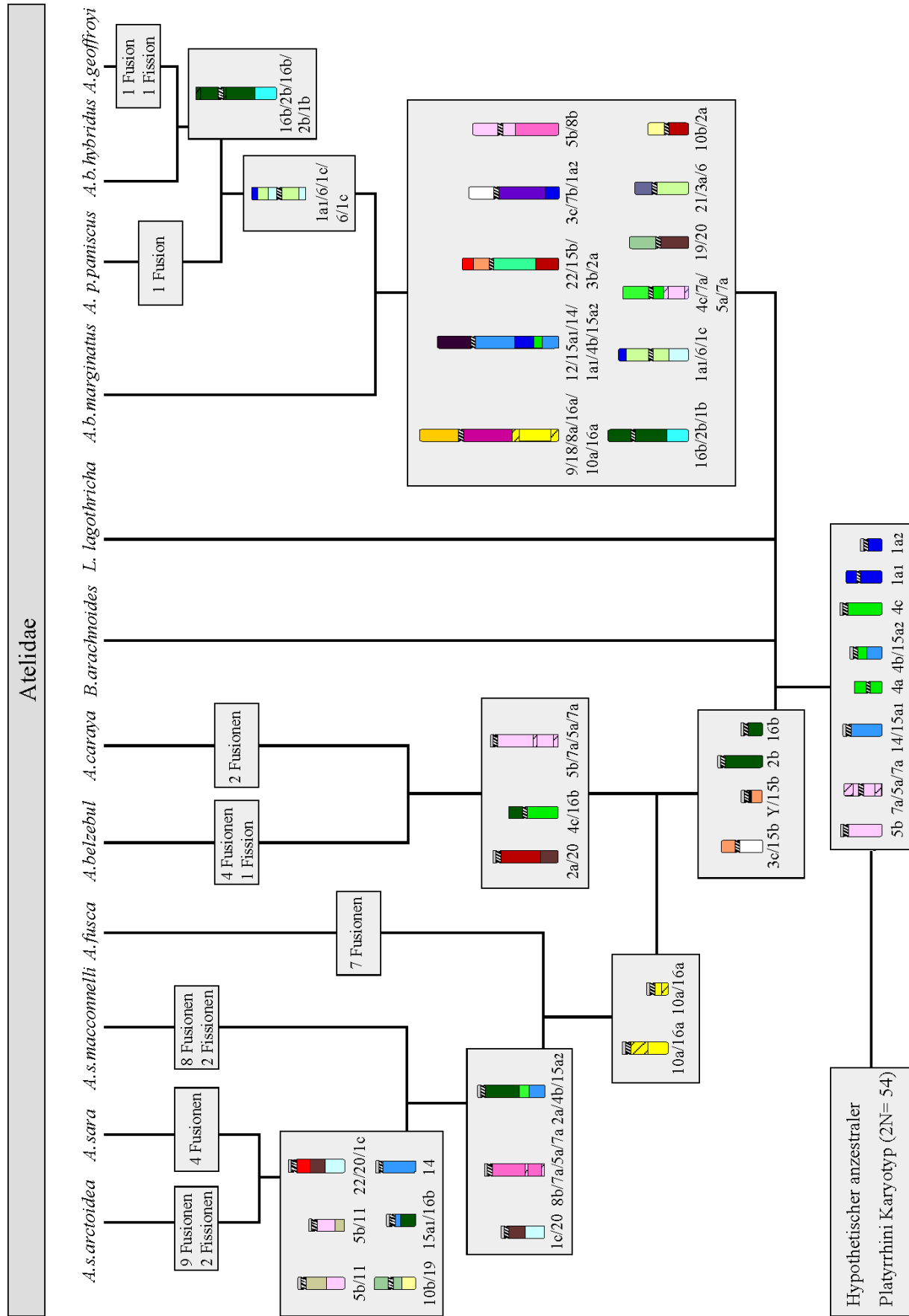
Die Unterfamilie Atelinae wird von vielen Autoren als eine monophyletische Gruppe erkannt, repräsentiert durch die Gattungen *Ateles*, *Alouatta*, *Brachyteles* und *Lagothrix* (Ford 1986, Rosenberger 1981, Schneider 2000, de Oliveira et al. 2002 und andere). Bisher wurden mittels *chromosome painting* die folgenden Spezies und Subspezies der Atelinae untersucht: *Alouatta seniculus arctoidea*, *Alouatta sara* (Consiglière et al. 1996), *Alouatta belzebul* (Consiglière et al. 1998), *Alouatta seniculus macconnelli*, *Alouatta caraya*, *Alouatta fusca fusca*, *Alouatta fusca clamitans* (im Rahmen dieser Arbeit, de Oliveira et al. 2002), *Ateles belzebul hybridus* (Garcia et al. 2000), *Ateles belzebul marginatus* (Morescalchi et al. 1997), *Ateles paniscus*

paniscus, *Ateles belzebul marginatus* (im Rahmen dieser Arbeit, de Oliveira et al. im Druck), *Lagothrix lagothricha* (Stanyon et al. 2001 und im Rahmen dieser Arbeit) und *Brachyteles arachnoides* (im Rahmen dieser Arbeit, de Oliveira et al. im Druck). Mittels der vergleichenden Karyotypanalyse konnte die Abfolge chromosomaler Umbauten, die im Laufe der Evolution dieser Neuweltaffen stattgefunden haben, rekonstruiert werden. Der resultierende chromosomale Stammbaum der Atelinae ist in Abbildung 5.4 illustriert.

Ausgehend von dem hypothetischen anzestralen Karyotyp aller Neuweltaffen kann der hypothetische anzestrale Karyotyp der Atelinae ($2n=62$) durch fünf Fissionen, die in separaten Chromosomen, homolog zu den menschlichen Chromosomensegmenten 5b, 1a₁, 1a₂, 4a, 4b, 4c resultierten, eine Fission mit anschließender Translokation, die zu den Chromosomenformen 4b/15a₂ und 14/15a₁, wie auch eine Inversion, die zu einer Abfolge der homologen menschlichen Chromosomensegmente 7a/5a/7a führte, abgeleitet werden. Diese Chromosomenformen können als synapomorphe Charaktere für alle Atelinae verstanden werden, die deutliche Anhaltspunkte für einen monophyletischen Ursprung der Atelinae geben.

Innerhalb der Atelinae, lassen die *chromosome painting* Daten schlussfolgern, dass die untersuchten Spezies der Gattung *Alouatta* eine distinkte Gruppe darstellen. Die untersuchten Spezies der Gattung *Ateles* bilden aufgrund der chromosomalen Evidenz gleichfalls einen monophyletischen Zweig der Atelinae. Ferner lässt sich anhand der *chromosome painting* Daten ableiten, dass der anzestrale Karyotyp der Atelinae in den Spezies *B. arachnoides* und *L. lagothricha* konserviert ist.

Abbildung 5.4 (siehe nachfolgende Seite): Stammbaum aller bisher untersuchten Spezies der Atelinae (Familie Atelidae), basierend auf molekular zytogenetischen Daten. Die Spezies *A. s. arctoidea*, *A.sara*, *A. s. macconnelli*, *A. fusca*, *A.belzebul* und *A. caraya* gehören der Gattung *Alouatta* an, die Spezies *B. arachnoides* der Gattung *Brachyteles*, *L. lagothricha* der Gattung *Lagothrix* und die Spezies *A. b. marginatus*, *A. p. paniscus*, *A. b. hybridus* und *A. geoffroyi* der Gattung *Ateles*. Von der Spezies *A. s. macconnelli* wurden zwei Individuen und von der Spezies *A. fusca* zwei verschiedene Subspezies untersucht. Der Stammbaum beinhaltet der besseren Übersichtlichkeit wegen, nur Chromosomenformen des Individuums aus der Region um *Uatumã river* von *A. s. macconnelli* und der Subspezies *A. fusca fusca*. Die Farbzunordnung leitet sich von dem hypothetischen anzestralen Neuweltaffen Karyotyp ab (siehe Abb. 5.2). Schraffiert dargestellte Chromosomenregionen markieren Inversionen. Der hypothetische anzestrale Karyotyp der Atelinae weist einen Chromosomensatz von 62 Chromosomen auf und kann durch fünf Fissionen, eine Fusion und eine Inversion von dem anzestralen Karyotyp der Neuweltaffen abgeleitet werden.



5.2.3.1 Gattung *Alouatta*

Innerhalb der Gattung *Alouatta* wurden vier abgeleitete Merkmale identifiziert, die ausschließlich von den sechs untersuchten Vertretern dieser Gattung geteilt werden und daher synapomorphe Charaktere darstellen. Diese leiten sich vom ancestralen Atelinae Karyotyp durch eine Fission der assoziierten homologen menschlichen Chromosomensegmente 2b/16b ab, die zu separaten Chromosomen 2b und 16b führte, sowie durch eine Translokation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 3c und 15b. Ferner wurde eine Fusion des Y Chromosoms mit dem homologen menschlichen Chromosomensegment 15b als ancestrales Charakter der Gattung *Alouatta* angenommen. Demnach würde der hypothetische ancestrale Karyotyp der Gattung *Alouatta* ebenfalls einen Chromosomensatz von $2n=62$ aufweisen.

Die Spezies *A. belzebul* und *C. caraya* teilen drei Synapomorphismen: die Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomensegmente 2a/20, 4c/16b, sowie die Assoziation, 5b/7a/5a/7a, die durch Fusion der Homologen 5b und 7a/5a/7a entstanden ist. Diese Charaktere geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Spezies *A. belzebul* und *A. caraya* einen letzten gemeinsamen Vorfahren teilen. *A. caraya* leitet sich vom hypothetischen ancestralen Karyotyp der Gattung *Alouatta* zudem durch eine Fusion der homologen menschlichen Chromosomensegmente 1a₂ und 5b, sowie der homologen menschlichen Chromosomen 9 und 22 ab. Während die Fusion 1a₂/5b ein autapomorphes Merkmal darstellt, wurde eine Assoziation 9/22 ebenfalls in allen untersuchten Spezies der Callitrichinae nachgewiesen. Jedoch liegt in den Callitrichinae eine Assoziation der homologen menschlichen Chromosomen 13/9/22 vor, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf anderen Fusionspunkten basiert, als in *A. caraya*, bei der eine schlichte zentrische Fusion dieser Chromosomen nachgewiesen wurde. Die Spezies *A. belzebul* wies außerdem vier Fusionen und eine Fission auf. Die Fission der Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 3c/15b, die als ancestrales Charakters für *Alouatta* angenommen wurde, führte zu separaten Chromosomen 3c und 15b. Sie repräsentiert demnach eine Reversion, da die für Atelinae ursprüngliche Chromosomenform wieder hergestellt wurde.

Während in *A. belzebul* die Fusionen der homologen menschlichen Chromosomensegmente 1a₁ mit 2b, sowie 15a₁ mit 22 ausschließlich in *A. belzebul* identifiziert wurden und daher vermutlich autapomorphe Charaktere darstellen, wurde eine zentrische Fusion der homologen menschlichen Chromosomen sowohl in *A. belzebul*, wie auch in *Alouatta fusca clamitans* detektiert. Sie wurde jedoch nicht in der untersuchten Subspezies *A. fusca fusca* identifiziert.

Daher muss angenommen werden, dass diese Fusion auf konvergenten chromosomalen Umbauten beruht. Demgegenüber ist die Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 5b/11 in *A. belzebul*, wie auch in den Spezies *Alouatta seniculus arctoidea* und *Alouatta sara* mit großer Wahrscheinlichkeit das Ergebnis von unterschiedlichen evolutionären Umbauten: Eine zentrische Fusion in *A. belzebul* und eine vermutlich reziproke Translokation, die von *A. sara* und *Alouatta s. arctoidea* geteilt wird.

Die zweite phylogenetische Linie der Gattung *Alouatta* vereint eine abgeleitete Fission der homologen menschlichen Chromosomensegmente 10a/16a/10a/16a. Die resultierenden separaten Chromosomen, die jeweils eine Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 10a/16a tragen, verbinden phylogenetisch die *Alouatta seniculus* Gruppe, einschließlich *A. sara* (früher *A. seniculus sara*) mit den beiden untersuchten Subspezies von *Alouatta fusca*.

A. s. arctoidea, *A. s. macconnelli* und *A. sara* teilen die drei abgeleiteten Chromosomenformen 1c/20, 7a/5a/7a/5a/8b und 2a/4b/15a₂, als synapomorphe Merkmale dieser Speziesgruppe. *A. s. arctoidea* und *A. sara* zeigen sechs gemeinsam abgeleitete Charaktere, die nicht in *A. s. macconnelli* nachgewiesen wurden und *A. s. arctoidea* und *A. sara* daher phylogentisch näher stellen, als eine dieser beiden Spezies mit *A. s. macconnelli*. Diese leiten sich vom letzten gemeinsamen Vorfahren der *A. seniculus* Gruppe durch eine Translokation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 5b und 11 ab; ferner durch drei abgeleitete Fusionen und eine Fission. *A. s. arctoidea* unterscheidet sich durch neun weitere Fusionen und zwei Fissionen, *A. sara* durch vier weitere Fusionen und *A. s. macconnelli* durch weitere acht Fusionen und zwei Fissionen vom letzten gemeinsamen Vorfahren. Innerhalb der bisher untersuchten Neweltaffen repräsentieren diese autapomorphe (spezies-spezifische) chromosomale Umbauten. Von der Spezies *A. s. macconnelli* wurden zwei Individuen aus verschiedenen geografischen Regionen untersucht. Die bisher dargestellten chromosomalen Umbauten beziehen sich auf das Individuum aus der Region um *Uatumã river*. Dieses wies die Chromosomenformen 10a/16a/11 und 1c/20 auf. Das Individuum aus der Region um *Jari river* unterscheidet sich von diesem durch eine zentrische Fission und Fusion, die zu separaten Chromosomen, homolog zum menschlichen Chromosom 11 und der Chromosomenform 10a/16a/20/1c führte.

Der Karyotyp von *Alouatta fusca fusca* (Chromosomensatz: $2n=49$) leitet sich vom letzten gemeinsamen Vorfahren von *A. fusca* und der *Alouatta seniculus* Gruppe durch sieben Fusionen ab. Die resultierenden Chromosomenformen repräsentieren autapomorphe Merkmale der Spezies *Alouatta fusca*. Die Subspezies *Alouatta f. calmitans* ($2n=45$) unterscheidet sich von *A. f. fusca* durch eine Fusion der homologen menschlichen Chromosomen 9 und 12 und eine Fusion der homologen menschlichen Chromosomen (segmente) 2a und 11.

Zusammenfassend resultierte die Rekonstruktion chromosomaler Umbauten innerhalb der Gattung *Alouatta* in einem Stammbaum mit folgenden phylogenetischen Verzweigungslinien: *A. belzebul* und *A. caraya* bilden die erste Klade innerhalb der Gattung *Alouatta*. Sie beinhalten die ursprünglichsten Karyotypen innerhalb dieser Gattung. Die zweite Linie wird repräsentiert durch die *A. seniculus* Gruppe und die Subspezies von *A. fusca*. Innerhalb dieser Linie bildet die *A. seniculus* Gruppe eine distinkte phylogenetische Einheit. Die Spezies *A. s. arcoidea* und *A. sara* teilen sechs abgeleitete chromosomale Charaktere, exklusiv und repräsentieren daher die Krone dieses Stammbaums, von der die Linie zu *A. s. macconnelli* abzweigt. Die chromosomale Phylogenie der Gattung *Alouatta* unter Einbeziehung der hier untersuchten Spezies, wie auch der bereits publizierten Spezies *Alouatta seniculus arcoidea*, *Alouatta sara* (Consiglière et al. 1996), *Alouatta belzebul* (Consiglière et al. 1998) sind in de Oliveira et al. (2002) zusammengefasst.

Ein multiples Geschlechtschromosomensystem infolge einer Y-autosomalen Translokation konnte in bislang allen mittels *chromosome painting* untersuchten Spezies der Gattung *Alouatta* beobachtet werden. Da ein weibliches Individuum von *A. belzebul* mittels *chromosome painting* untersucht wurde, konnte eine Y-autosomale Translokation in dieser Spezies jedoch nicht direkt nachgewiesen werden. Allerdings geben klassische Bänderungsanalysen Anhaltspunkte dafür, dass die Spezies *A. belzebul* gleichfalls eine Y-autosomale Translokation aufweist (Armada et al. 1987, Lima und Seuánez 1989). Mittels G-Bänderung wurde eine Y-autosomale Translokation auch in der Spezies *A. palliata* (Ma et al. 1975), *A. fusca calmitans* (Koiffmann 1977), *A. caraya* (Rahn et al. 1996, Mudry et al. 1998), *A. s. macconnelli*, *A. sara* und *A. s. arcoidea* (Yunis et al. 1976, Minezawa et al. 1985, Lima et al. 1990) beobachtet.

Consiglière et al. (1996) zeigten auf der Basis menschlicher chromosomen-spezifischer DNA Sonden, dass die Spezies *A. sara* und *A. s. arcoidea* ein Geschlechtschromosomen System

mit $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$ aufweisen. Ein asymmetrisches Hybridisierungsmuster konnte in beiden Spezies mit menschlichen Chromosom 3 und 15 spezifischen DNA Sonden nachgewiesen werden. Consiglière et al. (1996) nahmen eine Y-autosomale Translokation zwischen dem Y-Chromosom und einer Region des menschlichen Chromosom 15 Homologen an. Die Y chromosomen-spezifische Region selbst konnte mit menschlichen DNA Sonden nicht nachgewiesen werden. Bei den in dieser Dissertation untersuchten Spezies konnte gleichfalls ein asymmetrisches Hybridisierungsmuster mit den genannten menschlichen DNA Sonden, sowie mit den *S. oedipus* Chromom 9 und 19 spezifischen DNA Sonden beobachtet werden. Die Y-spezifische Region selbst konnte wieder nicht identifiziert werden, auch nicht mit der Y chromosomen-spezifischen DNA Sonde des Neuweltaffen *S. oedipus*, da offenbar die Sequenzdivergenz zwischen *S. oedipus* und den untersuchten Spezies der Gattung *Alouatta* zu hoch war, um sie in der vorliegenden Auflösung nachweisen zu können. Dies spiegelt die Genarmut, wie auch die höhere Evolutionsrate von Y chromosomen-spezifischen Sequenzen wieder. Das asymmetrische Hybridisierungsmuster, das Fehlen eines separaten Y-Chromosoms, sowie das Vorliegen einer Chromosomenregion, die von keiner *painting* Sonde hybridisiert wurde, gaben jedoch deutliche Hinweise darauf, dass die untersuchten Spezies ein multiples Geschlechtschromosomen-System aufweisen. Dieses beruht wahrscheinlich auf einer Y-autosomalen Translokation zwischen dem Y-Chromosom und dem homologen menschlichen Chromosomensegment 15b.

Durch *chromosome painting* konnte demonstriert werden, dass die Spezies *A. caraya* und *A. s. macconnelli* ein identisches Geschlechtschromosomen-System aufweisen. Dieses wurde definiert als $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$, wobei X_1 dem menschlichen X Chromosom entspricht, X_2 der Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 3c/15b, Y_2 dem homologen menschlichen Segment 3c und Y_1 der Chromosomenform 3c/15b/Y. In den beiden untersuchten Subspezies von *A. fusca* konnte ein zusätzlicher chromosomaler Umbau beobachtet werden, der das homologe menschliche Chromosomensegment 1b involviert. Dieser führte zu einer weiteren Modifikation des Geschlechtschromosomen-Systems und wurde definiert als $X_1X_1X_2X_2X_3X_3/X_1X_1X_3Y_1Y_2$. Das Chromosom Y_1 weist im Unterschied zu *A. caraya* und *A. s. macconnelli* eine Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 15b/Y/1b und X_3 entspricht dem homologen menschlichen Chromosomensegment 1b.

Für eine umfassende Rekonstruktion der Abfolge von Y-autosomalen Umbauten, die in der Gattung *Alouatta* aufgetreten sind, wäre eine detaillierte Untersuchung unter Verwendung von subregionalen DNA Sonden, sowie einer DNA Sonde mit Homologie zur Y chromosomen-spezifischen Region, erforderlich.

5.2.3.2 Gattung *Ateles*

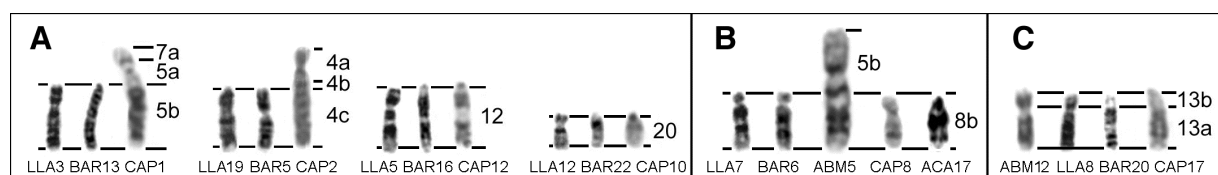
Die vergleichende Karyotypanalyse der bisher mittels *chromosome painting* untersuchten Vertreter *Ateles belzebuth marginatus*, *A. paniscus paniscus* (diese Studie), *A. belzebuth hybridus* (Garcia et al. 2002) und *A. geoffroyi* (Morescalchi et al. 1997) zeigte, dass innerhalb der Gattung *Ateles* eine drastische Reduktion der Chromosomenzahl von dem hypothetischen ancestralen Karyotyp der Atelinae mit $2n=62$ auf bis zu $2n=32$ Chromosomen in der Spezies *A. p. paniscus* zu beobachten war. Insgesamt sind mindestens 17 Robertson- und Tandem Fusionen und drei Fissionen notwendig, um den hypothetischen ancestralen Karotyp der Gattung *Ateles* mit $2n=34$ Chromosomen vom ancestralen Karyotyp der Atelinae abzuleiten. Die untersuchten Vertreter der Gattung *Ateles* teilen 11 synapomorphe Chromosomenformen. Der hypothetische ancestrale Karyotyp der Gattung *Ateles* ist in der Spezies *A. b. marginatus* konserviert. Im Vergleich zum hypothetischen ancestralen Karyotyp der Atelidae liegen nur die *A. b. marginatus* Chromosomen 11, 12, 14, und 15 vollständig konserviert vor. *A. p. paniscus* teilt mit *A. b. hybridus* und *A. geoffroyi* vermutlich einen letzten gemeinsamen Vorfahren, da sie eine abgeleitete Inversion teilen, die zu einer Abfolge der homologen menschlichen Chromosomensegmente 1a1/6/1c/6/1c führte. Nach dem Prinzip der Parsimonie ist es wahrscheinlicher, dass diese Inversion einmalig in einem Ancestor dieser Spezies stattfand, als unabhängig in drei verschiedenen Spezies. Die Spezies *A. b. hybridus* und *A. geoffroyi* teilen darüber hinaus eine weitere abgeleitete Inversion mit der resultierenden Chromosomenform 1b/2b/16b/2b/16b, die diese phylogenetisch näher verbindet, als eine der beiden Spezies mit *A. p. paniscus*. In der Spezies *A. p. paniscus* wurde weiterhin eine Fusion zwischen den homologen menschlichen Chromosomen (-segmenten) 3c und 13 nachgewiesen, die als autapomorphes Merkmal betrachtet werden kann. Chromosom 5 der Spezies *A. geoffroyi* leitet sich vom Homologen der Spezies *A. b. hybridus* durch eine Insertion von menschlichem Chromosom 12 homologem Material ab. Diese stellt vermutlich ebenfalls ein autapomorphes Rearrangement dar. Die Ergebnisse der phylogenetischen Rekonstruktion der Gattung *Ateles* sind in der Abbildung 5.4 illustriert.

5.2.3.3 Chromosomale Phylogenien der vier Gattungen der Atelinae

Der Vergleich zwischen den bisher untersuchten Spezies der Gattungen *Ateles* und *Alouatta* ließ kein gemeinsam abgeleitetes Charakter, das beide Gattungen ausschließlich teilen würden, erkennen. Der Versuch, anhand von molekular-zytogenetischen Daten Phylogenien zwischen den vier Gattungen zu erstellen, scheiterte weiterhin daran, dass der ancestrale Karyotyp der Atelinae in *B. arachnoides* und *L. lagothricha* konserviert ist. Somit wurde die Grenze der Auflösung der verwendeten *chromosome painting* Sonden offensichtlich.

Die Polytomie der vier Gattungen *Ateles*, *Alouatta*, *Lagothrix* und *Brachyteles* konnte jedoch aufgelöst werden, indem zusätzliche Charaktere eingeführt wurden, die mit Hilfe der vergleichenden G-Banden Analyse identifiziert wurden. Die Analyse zeigte, dass sich die Spezies *B. arachnoides* und *L. lagothricha* durch fünf intra-chromosomale Umbauten unterscheiden, die mittels *chromosome painting* nicht detektiert werden konnten. Indem zusätzlich die Spezies *Alouatta caraya*, *Ateles b. marginatus*, *A. b. hybridus*, *A. geoffroyi*, *A. paniscus paniscus*, sowie *Cebus apella* als *outgroup* in diese Untersuchungen einbezogen wurden, konnte die evolutionäre Richtung dieser intra-chromosomalen Umbauten rekonstruiert werden. Die Abbildung 5.5 bietet eine Übersicht über all diejenigen G-gebänderten Chromosomen, welche für die Auflösung der Polytomie relevant waren. Hierbei wurden jeweils homologe Chromosomen der Spezies *A. caraya*, *Ateles b. marginatus*, *B. arachnoides* und *L. lagothricha*, als geeignete Repräsentanten der vier Gattungen der Atelinae, und von *Cebus apella* als *outgroup* Spezies, dargestellt.

Abbildung 5.5: A)-C) Chromosomale Unterschiede zwischen *Brachyteles arachnoides* (BAR), *Lagothrix lagothricha* (LLA), *Ateles belzebuth marginatus* (ABM), *Alouatta caraya* (ACA) und *Cebus apella* (CAP), die mittels der vergleichenden G-Banden Analyse nachgewiesen wurden und informativ für die Rekonstruktion der Phylogenie innerhalb der Unterfamilie Atelinae waren (aus de Oliveira et al. im Druck). **A)** zeigt einen Vergleich derjenigen Chromosomen, die in BAR oder in LLA, sowie in der phylogenetischen outgroup CAP konserviert sind, **B)** das zum menschlichen Chromosom 8b Homologe, dessen Bänderungsmuster von BAR; LLA und ABM geteilt wird und **C)** Chromosomenform des zum menschlichen Chromosom 13 Homologen, welche von BAR und CAP geteilt wird (nähere Erläuterungen hierzu, siehe nachfolgenden Text).



Der Vergleich G-gebänderter Chromosomen der genannten Atelinae Spezies mit den Homologen von *C. apella* ließ schlussfolgern, dass die akrozentrische Form und das Bänderungsmuster der Chromosomen 13, 16 und 22 von *B. arachnoides* ancestrale Chromosomenformen für Atelinae repräsentieren, von welchen sich die Homologen der Spezies *L. lagotracha* durch je eine perizentrische Inversion ableiten lassen. Umgekehrt, stellt *B. arachnoides* Chromosom 5 vermutlich die abgeleitete Chromosomenform dar (siehe Abb. 5.5 A). Weiterhin konnte nach dem Muster der G-Banden angenommen werden, dass Chromosom 6 von *B. arachnoides* und dessen Homologes in *L. lagotracha* eine Inversion mit *A. b. marginatus* Chromosom 5 teilen, die in *C. apella* oder *A. caraya* nicht beobachtet wurde (siehe Abbildung 5.5 B). Diese Inversion kann als synapomorphes Merkmal von *B. arachnoides*, *L. lagotracha* und *A. b. marginatus* interpretiert werden, welche die drei Gattungen *Ateles*, *Brachyteles* und *Lagothrix*, nicht jedoch die Gattung *Alouatta* phylogenetisch verknüpft. Schließlich teilt *B. arachnoides* Chromosom 20 und dessen Homologes in der *outgroup* *C. apella* eine akrozentrische Chromosomenform, von welcher die submetazentrische Chromosomenform der Homologen in *L. lagotracha* und *A. b. marginatus* durch eine Inversion abgeleitet werden kann (siehe Abb. 5.5 C). Diese Interpretation führt zu dem Schluss, dass diese Inversion einen Synapomorphismus von *L. lagotracha* und *A. b. marginatus* darstellt, und somit die Gattungen *Ateles* und *Lagothrix* einen letzten gemeinsamen Vorfahren teilen.

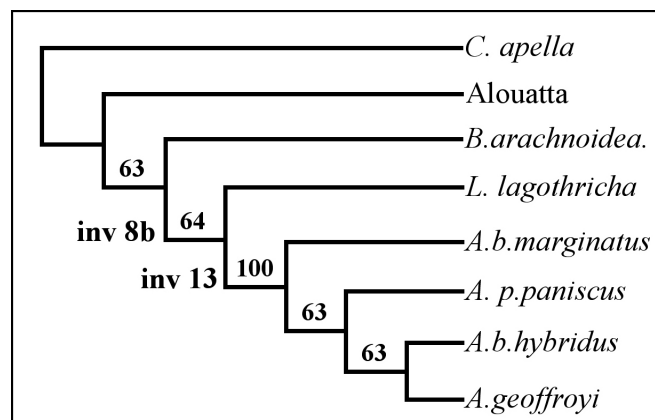
Die zusätzliche G-Banden Information über Inversionen wurde in eine phylogenetische Rekonstruktion mittels des Programms *PAUP* (Swofford 1998) einbezogen. Dazu wurde die in Tabelle 4.6 beschriebene Datenmatrix, basierend auf Charakteren des multi-direktionalen *chromosome painting*, für Atelinae um die in Abbildung 5.5 dokumentierten Charaktere der vergleichenden G-Banden Analyse erweitert. Die Tabelle 5.1 fasst diejenigen Charaktere in einer binären Matrix zusammen, die mittels der vergleichenden G-Banden Analyse erhalten wurden.

Tabelle 5.1 (siehe nachfolgende Seite): Binäre Matrix aus Charakteren, die mittels der vergleichenden G-Banden Analyse bei sieben Vertretern der Atelinae identifiziert wurden. Diese stellen Inversionen (0= nicht vorhanden, 1= vorhanden) von zum Menschen homologen Chromosomen (-segmenten) dar und wurden zusätzlich zu den mittels *chromosome painting* erhaltenen Charakteren in die Parsimonie Analyse mittels des Programms *PAUP* einbezogen. Die Spezies *C. apella* diente hierbei als *outgroup* Spezies.

Charakter	4c	5b	8b	12	13	20
<i>Cebus apella</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Brachyteles arachnoides</i>	1	0	1	0	0	0
<i>Lagothrix lagothricha</i>	0	1	1	1	1	1
<i>Ateles geoffroyi</i>	0	0	1	0	1	0
<i>Ateles paniscus paniscus</i>	0	0	1	0	1	0
<i>Ateles belzebuth marginatus</i>	0	0	1	0	1	0
<i>Ateles belzebuth hybridus</i>	0	0	1	0	1	0
<i>Alouatta caraya</i>	0	0	0	0	0	0

Der Stammbaum, der aus der Parsimonie Analyse der Datenmatrix basierend auf *chromosome painting* und G-Banden Daten resultierte (siehe Abb. 5.6), zeigt eine Verzweigungssequenz mit der Gattung *Alouatta* als basale Linie innerhalb der Atelinae, gefolgt von Repräsentanten der Gattung *Brachyteles*, *Lagothrix* und schließlich *Ateles*. Demnach würde die Gattung *Lagothrix* im Vergleich zu *Brachyteles* einen abgeleiteten Karyotyp aufweisen und phylogenetisch näher zu Spezies der Gattung *Ateles* stehen, als *Brachyteles*.

Abbildung 5.6: Stammbaum der Atelinae nach Maximum Parsimonie Analyse mittels *PAUP* (aus de Oliveira et al. im Druck). Die Polytomie der Gattungen *Ateles*, *Brachyteles*, *Lagothrix* und *Alouatta*, die bei der alleinigen Berücksichtigung von *chromosome painting* Daten resultierte, konnte durch die Einbeziehung von Daten der vergleichenden G-Banden Analyse aufgelöst werden. Die Inversionen der menschlichen Chromosomen 8b und 13 Homologen stellten hierbei Schlüsselrearrangements dar. Die Zahlen an den Knotenpunkten geben *bootstrap* Werte an. *A. p. paniscus*, *A. b. hybridus*, *A. b. marginatus*, *A. geoffroyi* = Gattung *Ateles*, *B. archnoides* = Gattung *Brachyteles*, *L. lagothricha* = Gattung *Lagothrix*, *C. apella* = Gattung *Cebus*.



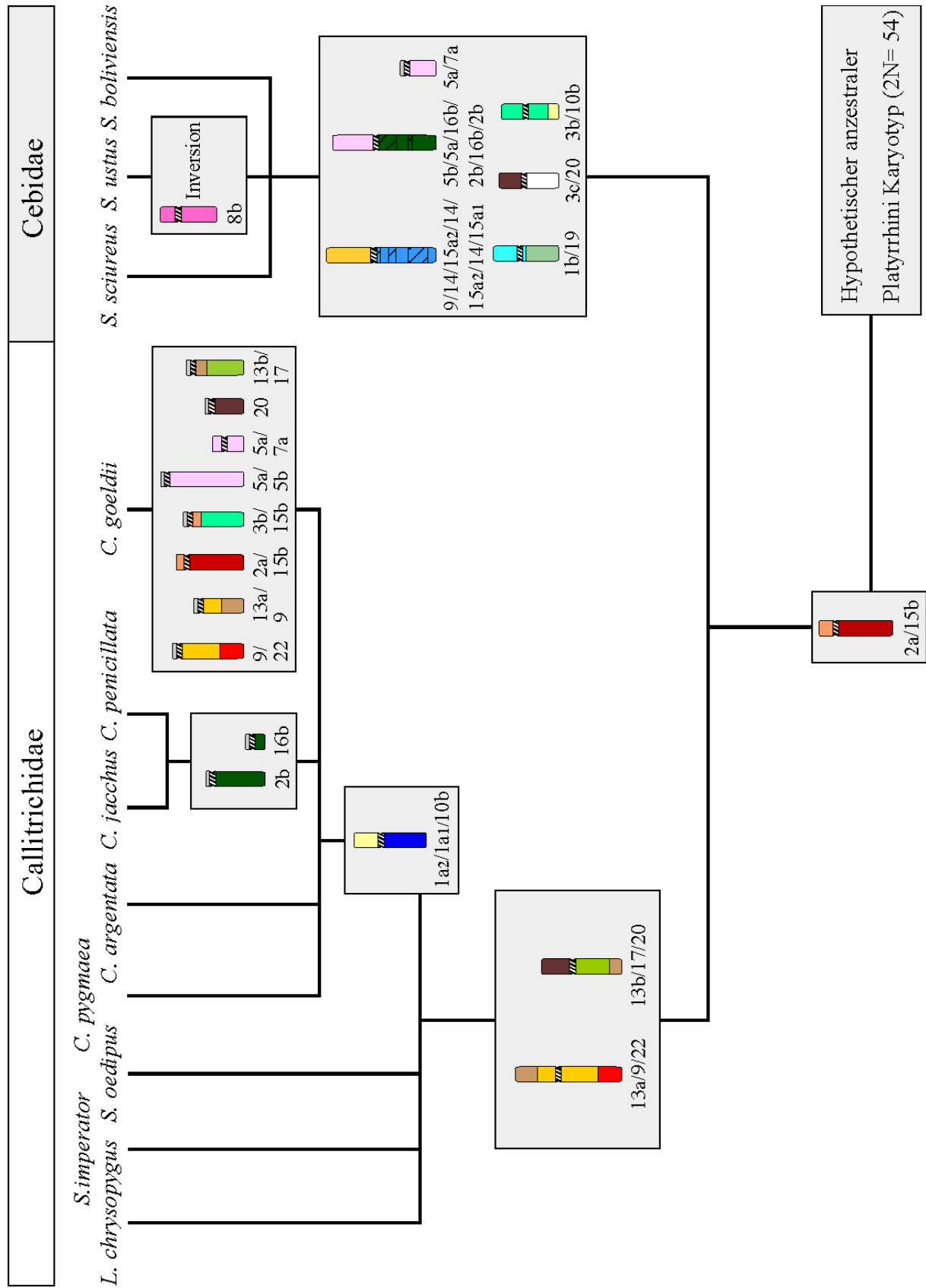
5.2.4 Chromosomale Umbauten bei Callitrichidae

Die Familie Callitrichidae stellt innerhalb der Platyrrhini eine distinkte Gruppe dar und ihr monophyletischer Ursprung gilt als unbestritten. Innerhalb der Familie Callitrichidae wurden bisher acht Spezies mittels *multi-directional chromosome painting* untersucht. Die vergleichende zytogenetische Analyse der Spezies *Callithrix jacchus*, *Callithrix argentata*,

Cebuella pygmaea, *Saguinus oedipus* und *Callimico goeldii* ist in Neusser et al. (2001) beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden darüber hinaus die Karyotypen der Tamarine *Leontopithecus chrysopygus* und *Saguinus imperator*, sowie der Marmosette *Callithrix penicillata* mittels *multi-directional chromosome painting* charakterisiert. Die ebenfalls in dieser Dissertation untersuchten Spezies der Gattung *Saimiri* (Familie Cebidae), *S. ustus* und *S. boliviensis*, sowie die bereits publizierte Spezies *Saimiri sciureus* (Stanyon et al. 2000) werden hier im Zusammenhang mit den Callitrichidae diskutiert, da sie phylogenetisch in Beziehung zu den Callitrichidae gesetzt werden konnten. Die Rekonstruktion chromosomaler Umbauten der untersuchten Spezies der Familie Callitrichidae und der Gattung *Saimiri* resultierte in zwei am meisten parsimonen Stammbäumen. Die Abbildung 5.7 veranschaulicht eine der möglichen phylogenetischen Rekonstruktionen chromosomaler Veränderungen, die im Laufe der Evolution dieser Spezies aufgetreten sind.

Die vergleichende Karyotypanalyse zeigte, dass alle Vertreter der Callitrichidae eine Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 2a/15b teilen. Diese Assoziation wurde ebenfalls bei den drei untersuchten Vertretern der Gattung *Saimiri* nachgewiesen, jedoch bisher in keiner weiteren Neuweltaffenspezies und repräsentiert daher vermutlich ein gemeinsam abgeleitetes Merkmal dieser Spezies. Dieses synapomorphe Merkmal kennzeichnet die Callitrichidae als distinkte Gruppe innerhalb der Neuweltaffen und weist zugleich auf eine nahe phylogenetische Beziehung zur Gattung *Saimiri* hin. Die drei untersuchten Spezies der Gattung *Saimiri* zeigten sechs synapomorphe Merkmale, die durch insgesamt fünf Fusionen, eine Fission und mindestens drei überlappende Inversionen der homologen menschlichen Chromosomen 14 und 15, vom ancestralen Karyotyp der Neuweltaffen abgeleitet werden können (siehe Abb. 5.7). Der Karyotyp der Spezies *Saimiri ustus* leitet sich weiterhin von demjenigen der Spezies *S. sciureus* und *S. boliviensis* durch eine Inversion des homologen menschlichen Chromosomensegments 8b ab.

Abbildung 5.7 (siehe nachfolgende Seite): Rekonstruktion chromosomaler Umbauten innerhalb der Familie Callitrichidae, ausgehend vom hypothetischen ancestralen Karyotyp aller Neuweltaffen (siehe Abb. 5.2). Die untersuchten Spezies *S. sciureus*, *S. boliviensis*, *S. ustus* der Gattung *Saimiri* (Familie Cebidae), teilen die abgeleitete Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 2a/15b mit den untersuchten Spezies der Callitrichidae (*L. chrysopygus* (Gattung *Leontopithecus*), *S. imperator*, *S. oedipus* (Gattung *Saguinus*), *C. argentata*, *C. jacchus*, *C. penicillata* (Gattung *Callithrix*), *C. goeldii* (Gattung *Callimico*)). Die Farbkodierung bezieht sich auf den hypothetischen ancestralen Neuweltaffen Karyotyp. Schraffiert dargestellte Regionen heben invertierte Chromosomensegmente hervor.



In allen bisher untersuchten Spezies der Callitrichidae wurden die abgeleiteten Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomen (-segmente) 9/13a, 9/22 und 13b/17 identifiziert. Eine Assoziation 13b/17 konnte zwar gleichfalls in der Spezies *Callicebus donacophilus* nachgewiesen werden, jedoch beruht diese mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einem unterschiedlichen chromosomalen Rearrangement. Die genannten Assoziationen können daher als phylogenetische Landmarken betrachtet werden, die eine klare Aufspaltung zwischen den Callitrichidae und den Cebidae kennzeichnen. Zugleich unterstützen diese Merkmale eine taxonomische Klassifikation der kontrovers diskutierten Spezies *Callimico goeldii* innerhalb der Callitrichidae. Die genannten Assoziationen lagen als dreifache Assoziationen 13a/9/22 und 13b/17/20 in allen untersuchten Spezies der Callitrichidae vor, mit Ausnahme von *C. goeldii*. Weiterhin teilen alle untersuchten Marmosetten (*Callithrix argentata*, *C. jacchus*, *C. penicillata*, *C. pygmaea*) und die Spezies *C. goeldii* eine Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 1a/10b, während die untersuchten Tamarine *Leontopithecus chrysopygus*, *Saguinus oedipus* und *S. imperator*, die identische chromosomale Syntenien zeigten, separate Chromosomen, homolog zu den menschlichen Segmenten 1a und 10b aufwiesen. Innerhalb der Gattung *Callithrix* leiten sich die Spezies *C. jacchus* und *C. penicillata* von der Spezies *C. argentata* durch eine zentrische Fission der synapomorphen Assoziation 2b/16b ab, wodurch separate Chromosomenformen 2b und 16b resultierten. Diese Fission repräsentiert vermutlich eine Reversion, da die Chromosomenform des postulierten ancestralen Karyotyps der Primaten wiederhergestellt wurde (siehe hierzu auch 5.2.1).

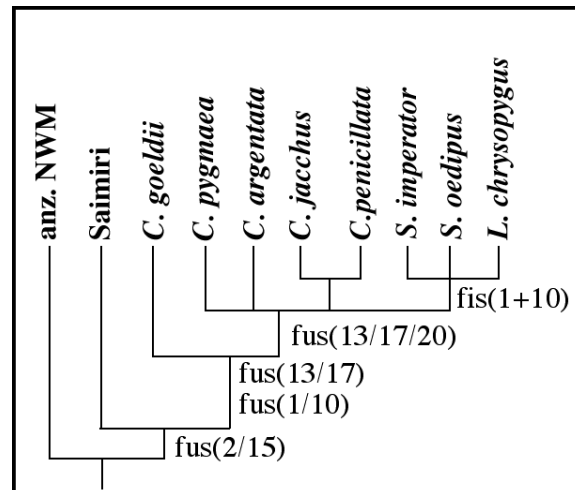
C. goeldii zeichnet sich im Vergleich zu den übrigen Spezies der Callitrichidae durch eine Reihe spezies-spezifischer Merkmale aus. Einige dieser Merkmale schienen auf den ersten Blick synapomorphe Charaktere zwischen *C. goeldii* und anderen Spezies, die nicht der Familie Callitrichidae angehören, darzustellen. So zeigten sowohl *C. goeldii*, als auch Vertreter der Gattung *Alouatta* eine Assoziation der homologen menschlichen Chromosomen 3/15. Jedoch konnte mittels *multi-directional chromosome painting* deutlich erwiesen werden, dass in *C. goeldii* die Chromosomensegmente 3b und 15b in die Assoziation involviert waren, während die untersuchten *Alouatta* Spezies eine Assoziation 3c/15b aufwiesen. Ferner stellt die Assoziation 3b/15b in *C. goeldii* vermutlich ein sekundäres Translokationsprodukt dar, dass von der Assoziation 2a/15b abgeleitet werden kann, während es sich in den untersuchten Spezies der Gattung *Alouatta* vermutlich um eine zentrische Fusion der Chromosomensegmente 3c und 15b handelt. Weiterhin konnte bei *C. goeldii*, im Unterschied zu den übrigen

Spezies der Callitrichidae, eine Fission des menschlichen Chromosom 5 Homologen nachgewiesen werden. Eine Fission, die zu den Chromosomenformen 5a/7a und 5b führte, wurde auch in allen untersuchten Spezies der Atelinae identifiziert. Die Hybridisierung mit entsprechenden chromosomen-spezifischen DNA Sonden von *L. lagothericha* (Mitglied der Atelinae) auf Metaphasen von *C. goeldii* zeigte jedoch deutlich, dass die beobachteten Fissionen in *C. goeldii* und *L. lagothericha* auf unterschiedlichen Bruchpunkten basieren und daher evolutionär unabhängig entstanden sind (siehe hierzu Abb. 4.3 D). Folglich können die beobachteten Chromosomenformen in *C. goeldii*, die sich von allen übrigen Callitrichidae Spezies ableiten, als autapomorphe Charaktere interpretiert werden.

In dem in Abbildung 5.7 illustrierten Stammbaum würden die Chromosomenformen 2a/15b, 9/22/13a, 13b/17/20 gemeinsam abgeleitete Merkmale aller Callitrichidae darstellen. Diese können durch 5 Fusionen und eine Translokation vom hypothetischen ancestralen Neuweltaffen Karyotyp abgeleitet werden. Die abgeleitete Assoziation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 1a/10 würde ein synapomorphes Merkmal von allen untersuchten Marmosetten und *C. goeldii* repräsentieren, während Tamarine die ancestralen separaten Chromosomenformen 1a und 10b konserviert hätten. Demnach würde die Spezies *C. goeldii* phylogenetisch näher mit den Marmosetten assoziiert sein als mit den Tamarinen. Unter dieser Annahme würden die abgeleiteten Chromosomenformen 9/22, 9/13a, 13b/17 und ein separates homologes Chromosom 20 in *C. goeldii* sekundäre Fissionsprodukte von ursprünglich assoziierten Chromosomenformen der Callitrichidae darstellen.

Der zweite rekonstruierte Stammbaum (siehe Abb. 5.8) war insofern äqui-parsimon zu dem in Abbildung 5.7 dargestellten Stammbaum, als das er die gleiche Anzahl an abgeleiteten chromosomalen Umbauten benötigte. Er unterschied sich von diesem in den Verzweigungspositionen der Tamarine und der Spezies *C. goeldii*. Bei diesem wurde impliziert, dass die Assoziation 1a/10b ein ancestrales Charakter für alle Callitrichidae repräsentiert und die Fusion des homologen menschlichen Chromosoms 20 mit der Chromosomenform 13/17 ein synapomorphes Merkmal der untersuchten Tamarine und Marmosetten darstellt, während die Spezies *C. goeldii* die ancestralen separaten Charaktere 13/17 und 20 konserviert hat.

Abbildung 5.8: Alternative phylogenetische Verzweigungssequenz innerhalb der Familie Callitrichidae (fis=Fission, fus=Fusion, anz. NWM=anzestraler Neuweltaffe, *C. goeldii* = Gattung *Callimico*, *C. pygmaea* = Gattung *Cebuella*, *C. argentata*, *C. jacchus* und *C. penicillata* = Gattung *Callithrix*, *S. oedipus*, *S. imperator* = Gattung *Saguinus*, *L. chrysopygus* = Gattung *Leontopithecus*). Im Vergleich zu dem in Abbildung 5.7 dargestellten Stammbaum, zeigt dieser eine unterschiedliche phylogenetische Position der Tamarine und der Spezies *C. goeldii*.



Beide Stammbäume erfordern die Annahme von homoplastischen Charakteren. Diese stellen Reversionen dar, durch die abgeleitete Merkmale durch konvergente Ereignisse in die ancestrale Chromosomenform zurückgeführt werden. In dem in Abbildung 5.7 illustrierten Stammbaum stellt die Fission der Assoziation 13b/17/20 in *C. goeldii*, die zu einem separaten homologen menschlichen Chromosomen 20 und 13b/17 führte, ein homoplastisches Rearrangement dar. In dem Stammbaum in Abbildung 5.8 repräsentiert hingegen die Fission der Assoziation 1a/10b in den Tamarinen (*Saguinus* und *Leontopithecus*) ein homoplastisches Ereignis. Beide Stammbäume erscheinen nach dem Prinzip der Parsimonie zunächst gleich wahrscheinlich. Unter Berücksichtigung subchromosomaler Homologien kann jedoch der Stammbaum in Abbildung 5.7 favorisiert werden. Mit Hilfe der Chromosom 9 und 28 spezifischen DNA Sonden von *L. lagothericha* konnte eine subregionale Differenzierung des homologen menschlichen Chromosomensegments 1a erzielt werden (siehe 4.1.2.1, Abb. 4.3 E-H). Die Ergebnisse zeigten, dass die Spezies *S. oedipus* und die *outgroup* Spezies *C. apella* eine identische subchromosomale Orientierung der als 1a₁ und 1a₂ definierten Segmente in Relation zum Zentromer aufwiesen, während in *C. jacchus* eine umgekehrte Orientierung dieser Segmente beobachtet wurde. Auch konnte mit diesem Experiment demonstriert werden, dass die Fusion der homologen menschlichen Chromosomensegmente 1a und 10b in *C. jacchus* nicht das Ergebnis einer Robertson'schen, sondern offenbar einer Tandemfusion unter Verlust der Zentromerfunktion in dem Chromosomensegment 1a war.

Unwahrscheinlich erscheint dagegen, dass zwei seltene Ereignisse, eine Fission und die Generierung eines neuen Zentromers in der gleichen Position wie in der *outgroup* Spezies *C. apella* unabhängig in der Spezies *S. oedipus* entstanden ist, welche angenommen werden müssen, um den in Abbildung 5.8 illustrierten Stammbaum zu befürworten. Vielmehr erscheint die Annahme wahrscheinlich, dass separate Chromosomenformen 1a und 10b die ancestrale Kondition darstellen und in *S. oedipus* und *C. apella* konserviert wurden. Demnach würden die Tamarine im Vergleich zu den Marmosetten eine basale Klade darstellen und *C. goeldii* eine Schwesterlinie zu den Marmosetten repräsentieren, wie in dem Stammbaum in Abbildung 5.7 illustriert.

5.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der phylogenetischen Rekonstruktion

Mit einem kladistischen Ansatz war es möglich, die Abfolge chromosomaler Umbauten in den bisher mit *chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen ausgehend von dem hypothetischen ancestralen Stammbaum aller Neuweltaffen zu rekonstruieren und einen Stammbaum dieser Neuweltaffen zu erstellen. Als Schlussfolgerung lässt sich sagen, dass Neuweltaffen mit hoher Wahrscheinlichkeit monophyletischen Ursprungs sind, da die Assoziationen der homologen menschlichen Chromosomen (-segmente) 5a/7a, 8a/18, 10a/16a und 2b/16b von den meisten Neuweltaffen geteilt werden und ausschließlich in dieser Gruppe der Primaten vorkommen. Vertreter der Unterfamilien Callitrichinae und Atelinae stellen distinkte Gruppen innerhalb der Neuweltaffen dar. Die Atelinae besitzen Karyotypen mit dem höchsten Grad an abgeleiteten Charakteren innerhalb der Neuweltaffen. Vertreter der Unterfamilien Pitheciinae und die meisten Cebinae wiesen Karyotypen auf, die ähnlich dem hypothetischen ancestralen Karyotyp der Neuweltaffen sind. Die Unterfamilie Aotinae (*Callicebus* und *Aotus*) stellte innerhalb der Familie Cebidae eine weitere Gruppe mit abgeleiteten Karyotypen dar.

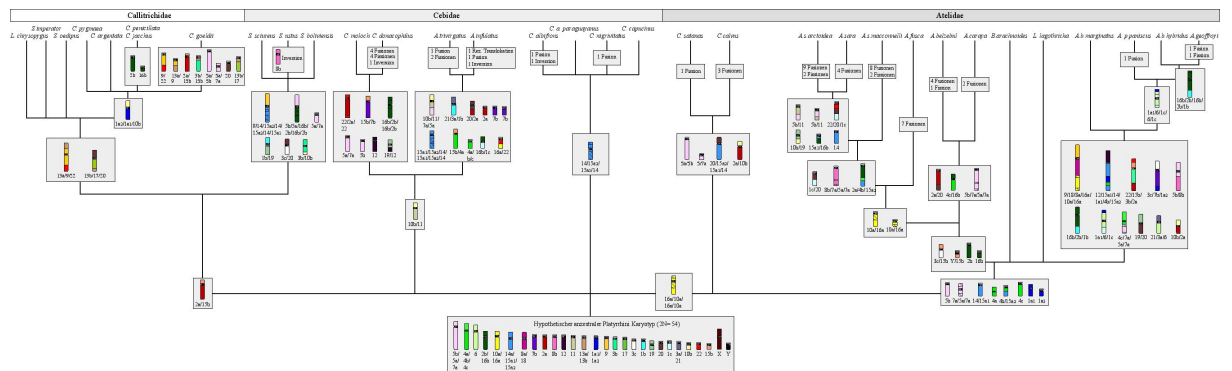
Wichtige kladistische Landmarken innerhalb der Neuweltaffen stellen die Assoziation der menschlichen Homologen 13a/9/22, 13b/17 und 2a/15b bei den Callitrichidae und die gemeinsam abgeleitete Assoziation 4b/15a₂, sowie die Fission der homologen menschlichen Chromosomen 1, 4 und 5 bei den Atelinae dar. Diese geben deutliche Anhaltspunkte dafür, dass die Familie Callitrichidae und die Unterfamilie Atelinae monophyletischen Ursprungs sind. Die Atelinae teilen mit den Pitheciinae eine abgeleitete Inversion, die auf eine phylogenetische Verknüpfung zwischen diesen beiden Familien hinweist und gleichzeitig auf

einen monophyletischen Ursprung der gesamten Familie Atelidae hindeutet. Dagegen scheint die Monophylie der Cebidae nicht gesichert. Zwischen verschiedenen Gattungen innerhalb der Cebidae, konnte nur dasjenige synapomorphe Merkmal zwischen den Gattungen *Aotus* und *Callicebus* nachgewiesen werden.

Eine phylogenetische Veknüpung zwischen verschiedenen Familien innerhalb der Neuweltaffen konnte bisher nur für die Familien Callitrichidae und Cebidae gefunden werden. So teilen alle Vertreter der Callitrichidae eine gemeinsam abgeleitete Assoziation 2a/15b mit den Vertretern der Gattung *Saimiri*. Die Charakterisierung der Karyotypen von weiteren Neuweltaffen, sowie die Verwendung hoch auflösender region-spezifischer DNA Sonden, die eine detaillierte Analyse einzelner Chromosomen erlauben würde, versprechen die phylogenetische Beziehung zwischen den drei Neuweltaffenfamilien weiter aufzuklären.

Die in dieser Arbeit rekonstruierte Phylogenie basierend auf *chromosome painting* Daten ist in der Abbildung 5.9 anhand eines Stammbaum aller bisher untersuchten Neuweltaffen zusammengefasst.

Abbildung 5.9 (Eine vergrößerte Darstellung dieser Abbildung findet sich auf der beiliegenden CD-ROM): Zusammenfassung der Abbildungen 5.2-5.4 und 5.7 zu einem Stammbaum aller bisher mittels *chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen.



Die Maximum Parsimonie Analyse mit Hilfe des Programms *PAUP* stellte einen zweiten Ansatz der Rekonstruktion von Phylogenien der Neuweltaffen dar und wurde unter anderem durchgeführt, um einen Eindruck über die Stabilität der Verzweigungspunkte zu einer Klade zu gewinnen. Der am meisten parsimone Stammbaum ist in der Abbildung 4.37 (Kapitel 4.1.4) dargestellt. Er beinhaltet dieselbe Verzweigungssequenz wie der Stammbaum der aus

dem kladistischen Ansatz resultierte. Die an den jeweiligen Verzweigungspunkten des Stammbaums angegebenen *bootstrap* Werte lassen folgende Interpretation zu:

Die Monophylie der Atelinae wurde durch einen hohen *bootstrap* Wert unterstützt. Innerhalb der Atelinae resultierten für die Verzweigungssequenz von Spezies der Gattung *Alouatta* ebenfalls hohe *bootstrap* Werte. Mit geringeren *bootstrap* Werten wurde die Verzweigung innerhalb der Gattung *Ateles* unterstützt, da die Karyotypen dieser Spezies nahezu identisch sind und daher nur wenige synapomorphe Merkmale zur Verfügung standen. Eine phylogenetische Verzweigungssequenz der Gattung *Lagothrix* und *Brachyteles* innerhalb der Atelinae konnte in diesem, ausschließlich auf *chromosome painting* Daten basierenden Stammbaum nicht erzielt werden, da die beiden Spezies identische Syntenien aufwiesen. Mit einem *bootstrap* Wert von nur 55 wurde die gemeinsam abgeleitete Inversion zwischen den Pitheciinae und den Atelinae befürwortet. Innerhalb der Cebidae wurde die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Gattungen *Callicebus* und *Aotus* mit einem *bootstrap* Wert von nur 57 unterstützt. Die Verwandtschaft innerhalb der Gattung *Cebus* wurde gleichfalls mit einem *bootstrap* Wert von nur 64 bestätigt. Dies liegt vermutlich in beiden Fällen daran, dass diese Speziesgruppen jeweils nur ein synapomorphes Merkmal teilen. Ferner zeigten die untersuchten Vertreter der Gattung *Aotus* insgesamt drei Reversionen, wodurch die phylogenetische Verknüpfung der Gattungen *Callicebus* und *Aotus* vermutlich zusätzlich abgeschwächt wurde. Die Verknüpfung zwischen der Gattung *Saimiri* und den Callitrichidae mit einem einzigen gemeinsam abgeleiteten Charakter wurde mit einem *bootstrap* Wert von 52 befürwortet. Der hohe *bootstrap* Wert an der Verzweigung zu den Callitrichidae unterstreicht, dass diese Klade monophyletischen Ursprungs ist. Innerhalb der Callitrichidae reflektieren die *bootstrap* Werte, dass die Tamarine eindeutig eine basale Klade darstellen, während die Spezies *C. goeldii* zu den Marmosetten klassifiziert wurde.

Der Homoplasie Index von 10% impliziert nur auf den ersten Blick einen relativ hohen Grad an Konvergenz. Bei genauerer Betrachtung wurden dagegen nur sehr wenige Charaktere identifiziert, die eindeutig auf konvergenten Ereignissen beruhen. Mit Sicherheit konvergente Gewinne abgeleiteter Chromosomenformen sind die Assoziation 9/12 bei *Alouatta belzebul* und *Alouatta fusca clamitans*, sowie die Assoziation 2a/10b der Gattung *Ateles* und der untersuchten Pitheciinae. Die Assoziationen 5b/11 in *Alouatta belzebul* und *Alouatta sara/Alouatta s. arcoidea* ist möglicherweise konvergent, entstand jedoch wahrscheinlicher durch unterschiedliche chromosomale Umbauten.

Vier weitere homoplastische Charaktere entstanden durch Reversionen, wodurch die ursprüngliche Chromosomenform von abgeleiteten Merkmalen, wiederhergestellt wurde. So kann die Fission 2b/16b zu 2b und 16b in *Callithrix jacchus*, *Chiropotes satanas* und in den untersuchten Spezies der Gattung *Aotus* und *Alouatta* als Reversion betrachtet werden. Gleichzeitig repräsentiert diese Fission jedoch ein gemeinsam abgeleitetes Merkmal innerhalb der untersuchten Spezies der Gattung *Alouatta*, als auch derjenigen der Gattung *Aotus*. Weiterhin stellen die Fission der Chromosomenformen 17/20, 10a/16a und 8a/18 bei verschiedenen Spezies meist spezies-spezifische Ereignisse dar. Durch Fissionen sind separate Chromosomensegmente entstanden, die dem ancestralen Zustand für Primaten entsprechen. Daher stellen diese homoplastische Charaktere dar.

Zusammenfassend hat die Rekonstruktion mittels *PAUP* nur eine begrenzte Aussagekraft für die chromosomale Phylogenie der Neuweltaffen. Für sich allein stehend, erlaubt sie keine ausreichend differenzierte Betrachtung der Güte einer Verzweigung, da jeder Charakter gleich gewichtet wurde. So resultierten bei einigen Verzweigungsknoten, die auf nur einem synapomorphen Merkmal basieren, wie die Assoziation 2a/15b zwischen *Saimiri* und Callitrichidae in sehr niedrigen *bootstrap* Werten. Chromosomale Umbauten stellen jedoch seltene genomische Ereignisse dar, die im Gegensatz zur evolutionären DNA Sequenz Divergenz punktuellen und nicht graduellen Veränderungen unterliegen. Aufgrund der Algorithmen, die der *PAUP* Software zugrunde liegen, werden seltene genomische Ereignisse vermutlich nicht in entsprechendem Maße gewichtet. Der erhaltene Homoplasie Index von 10% lässt sich zu einem großen Anteil auf Reversionen abgeleiteter Merkmale zurückführen, die mit einer höheren statistischen Wahrscheinlichkeit entstehen, als der unabhängige Gewinn eines abgeleiteten Merkmals. Daher wäre eine geringere Gewichtung dieser Reversionen durch eine verfeinerte Kodierung angemessener. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen notwendig, um schließlich einen Gewichtungskoeffizienten für Reversionen bestimmen zu können. Weiterhin erscheint es notwendig, möglicherweise konvergente Charaktere detailliert mittels Region-spezifischen DNA Sonden zu analysieren. Dadurch könnte ausgeschlossen werden, dass evolutionär unabhängig voneinander entstandene „ähnliche“ Merkmale fälschlich als „gleiche“ und damit konvergente Merkmale klassifiziert werden. Schlussfolgernd stellt die *PAUP* Analyse keine Alternative zur kladistischen Herangehensweise dar, bei welcher eine schrittweise Rekonstruktion der Abfolge

chromosomaler Umbauten zu chromosomalen Stammbäumen führt. Sie kann jedoch als hilfreiche Ergänzung dazu eingesetzt werden.

5.2.6 Mechanismen der Chromosomenevolution bei Neuweltaffen

Die vergleichende Karyotypanalyse mittels *chromosome painting* zeigte, dass Neuweltaffen innerhalb der Primaten sehr divergente Karyotypen aufweisen. Diese Divergenz spiegelt sich in der enormen Variabilität der diploiden Chromosomenzahlen, die von 16 in *Callicebus lugens* bis zu 62 in den Gattungen *Brachyteles* und *Lagothrix* reicht. Insgesamt wurden 149 chromosomale Umbauten in den 31 verschiedenen Spezies, vier Subspezies, sowie den zwei untersuchten Individuen von *Alouatta seniculus macconnelli* nachgewiesen, ausgehend von dem hypothetischen ancestralen Karyotyp der Neuweltaffen. Es konnte festgestellt werden, dass sich Neuweltaffen durch einen hohen Grad an spezies-spezifischen Merkmalen (zwischen 40-50%) auszeichnen. Robertson- und Tandemfusionen, wurden zu etwa 64% und Fissionen zu etwa 24% beobachtet. Sie scheinen daher prädominante Mechanismen der Genomreorganisation bei dieser Primatengruppe darzustellen. Inversionen traten zu einem Anteil von etwa 10% aller beobachteten chromosomalen Umbauten auf. Es wurden nur zwei Chromosomenumbauten identifiziert, die vermutlich reziproke Translokationen darstellen. So sind die nachgewiesenen Chromosomenformen 5b/15b/4a/4c und 5a/5b/15b in *A. infulatus* (siehe 5.2.2), als auch die Assoziation 5b/11 auf zwei Chromosomen in den Spezies *Alouatta seniculus arctoidea* und *Alouatta sara* (siehe 5.2.3.1) vermutlich das Resultat reziproker Translokationen. Knapp 60% aller nachgewiesenen chromosomalen Umbauten wurden in der Familie Atelidae identifiziert, etwa 32% in der Familie Cebidae und nur etwa 9% in der Familie Callitrichidae.

Hinsichtlich der zugrunde liegenden Mechanismen der Chromosomenevolution kann folgendes ausgesagt werden: Die Bruchpunkte liegen hauptsächlich in den Zentromer- und Telomerregionen der Chromosomen und werden möglicherweise durch repetitive Sequenzen vermittelt, in Kombination mit dem Gewinn oder Verlust von Telomer- und Zentromerfunktion. Angesichts der Tatsache, dass innerhalb der Neuweltaffen eine Bandbreite von einem bis zu 31 chromosomalen Umbauten, ausgehend vom ancestralen Neuweltaffenkaryotyp, bei den rezenten Spezies beobachtet werden konnte, kann eine "Uhr" für diese chromosomalen Umbauten nicht angenommen werden. Auch wurden keine *hotspots* für diese Umbauten festgestellt. Vielmehr scheinen das Auftreten und die Anzahl

chromosomaler Veränderungen, sowie die Richtung und die darin involvierten Bruchpunkte zufällig zu sein.

Homoplasie wurde zu etwa 10% festgestellt. Jedoch wurden nur wenige Charaktere identifiziert, die wirklich auf konvergenten Ereignissen zu beruhen scheinen. Die Mehrzahl homoplastischer Charaktere repräsentieren Reversionen durch Robertson'sche Fissionen (siehe 5.2.5.1). Homoplasien, die durch Robertson'sche Translokationen entstanden sind, wurden innerhalb der Säugetiere mehrfach beschrieben (Nash et al. 1998, Yang et al. 2000). Hingegen wurden für andere chromosomale Umbauten wie Tandem-Translokationen, reziproke Translokationen und Inversionen sehr selten Homoplasien beobachtet (Wienberg et al. 2000). Auch in Neuweltaffen wurden keine homoplastischen Charakteren nachgewiesen, die auf konvergenten Ereignissen dieser chromosomalen Umbauten basieren. Dies verdeutlicht, dass sich die Analyse chromosomaler Veränderungen als Methode eignet, um die phylogenetischen Beziehungen zwischen Neuweltaffen zu studieren. Chromosomalen Veränderungen kann eine kladistische Bedeutung beigemessen werden, da sie als seltene genomische Veränderungen betrachtet werden können (*rare genomic changes*, siehe Rokas und Holland 2000).

5.3 Vergleich chromosomaler, molekularer und morphologischer Stammbäume

Vergleichende molekular -genetische, -zytogenetische und morphologische Studien zeigen weit gehend Übereinstimmung in der Klassifizierung der rezenten Neuweltaffen in 16 Gattungen. Von vielen Autoren wurden zwei bis drei monophyletische Gruppen der Neuweltaffen erkannt. Jedoch spiegelt die Vielfalt der vorgeschlagenen Familien und Unterfamilien keine Konkordanz in der taxonomischen Klassifizierung von Neuweltaffen wieder. Die Bandbreite erstreckt sich von einer Gruppierung der Neuweltaffen in die Familien Callitrichidae und Cebidae (Napier 1967, Fleagle 1988), in die Cebidae und Atelidae (Rosenberger 1981), in die Cebidae, Atelidae und Callitrichidae (Ford 1986), hin zu einer taxonomischen Klassifikation der Neuweltaffen in fünf Familien (Cebidae, Atelidae, Pitheciidae, Aotidae und Callitrichidae, Rylands et al. 2000). Die Tendenz von kürzlich publizierten Studien weist auf eine Klassifikation der Neuweltaffen in die Familien Cebidae, Pitheciidae und Atelidae hin (Schneider et al. 2001, Singer et al. 2003, Seuánez im Druck). Ebenso resultierten mit den verschiedenen methodischen Ansätzen diskrepante Ergebnisse hinsichtlich der phylogenetischen Verzweigungssequenz von Neuweltaffen. Insbesondere die

phylogenetische Verknüpfung zwischen den Unterfamilien ist derzeit noch nicht geklärt. Eine auffallend kontroverse Klassifizierung wurde besonders bei den Gattungen *Callimico*, *Callicebus*, *Aotus* und *Leontopithecus* beobachtet. Da die Klassifizierung der Neuweltaffen nur auf der Ebene der Unterfamilien vergleichsweise gesichert ist, wird nachfolgend Bezug genommen auf die Phylogenie innerhalb und zwischen Unterfamilien der Neuweltaffen.

5.3.1 Callitrichinae

Ein Aspekt kontroverser Diskussion bezüglich der Phylogenie der Callitrichinae liegt in der Platzierung der Spezies *Callimico goeldii* begründet (siehe auch 2.3.2). Während nach jüngeren Ergebnissen vergleichender Studien eine taxonomische Klassifikation der Spezies *Callimico goeldii* zu den Callitrichinae zunehmend befürwortet wird, werden unterschiedliche Standpunkte bezüglich ihrer taxonomischen Position innerhalb der Callitrichinae vertreten. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über chromosomale Veränderungen innerhalb der Callitrichinae und *C. goeldii* geben deutliche Hinweise für eine phylogenetische Zugehörigkeit der Spezies der *C. goeldii* zu den Callitrichinae. Innerhalb der Callitrichinae zeigte sie eine nähere phylogenetische Beziehung zu den Marmosetten, als zu den Tamarinen. Letztere bildeten die erste phylogenetische Verzweigungslinie. Diese Verzweigungssequenz (siehe Abb. 5.7) stimmt mit einer Vielzahl der Ergebnisse molekular-genetischer Analysen (Horovitz und Horovitz and Meyer 1995, Porter et al. 1997, von Dornum und Ruvolo 1999, Canavez et al. 1999, Schneider et al., 2001, Singer et al., 2003) überein. In Kontrast dazu ergaben vergleichende Studien basierend auf morphologischen Charakteristiken eine Positionierung von *Callimico* an der Basis des Stammbaums der Callitrichinae und betonen eine nähere Verwandtschaft von *Callimico* mit den Tamarinen, als mit den Marmosetten (Rosenberger 1981, 1984, Ford 1986, Kay 1990).

Vergleichende Studien basierend auf morphologischen, molekular -genetischen und -zytogenetischen Daten spiegeln gleichfalls eine uneinheitliche taxonomische Positionierung der Gattungen *Leontopithecus* und *Saguinus* wieder. Die Ergebnisse von Rosenberger (1981, 1984) und Ford (1986), von Dornum und Ruvolo (1999) und Schneider et al. (2001) weisen auf eine nähere Verwandtschaft von *Leontopithecus*, als *Saguinus* zu den Marmosetten hin. Hingegen schlugen Kay (1990), Horovitz und Meyer (1995), Singer et al. (2003) die umgekehrte Variante der Positionierung der beiden Gattungen vor.

Gegensätzliche Standpunkte werden auch bezüglich der taxonomischen Klassifikation der Gattung *Cebuella* (ausführlich diskutiert in Rylands et al. 2000) vertreten. Basierend auf morphologischen Studien, argumentierten Rosenberger (1984) und Natori (1994) zugunsten von einer Einbeziehung der Gattung *Cebuella* in die Gattung *Callithrix*. Diese Ansicht wurde von Barroso et al. (1997), Porter et al. (1997), Canavez et al. (1996) geteilt, basierend auf den Ergebnissen molekular genetischer Studien. Rylands et al. (2000) schlugen hingegen vor, dass *Cebuella* eine eigene Gattung darstellen sollte, um die Unterschiedlichkeit dieses Taxons hervorzuheben. Die Existenz der hier untersuchten *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybrid Individuen (siehe 4.1.2.1 und 4.2, Neusser et al. im Druck), die einen balancierten Karyotyp aufweisen und morphologisch gesund sind, bietet Argumente für eine Befürwortung der taxonomischen Klassifikation von *Cebuella* in die Gattung *Callithrix*. Untersuchungen zur Fertilität und Meiose der *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden würden weitere Anhaltspunkte bieten, die für die taxonomische Klassifikation der Gattungen *Callithrix* und *Cebuella* informativ sein könnten.

5.3.2 Atelinae

Die Ergebnisse vergleichender molekular-zytogenetischer Studien von Consiglière et al. (1996, 1998), Garcia et al. (2000), Morescalchi et al. (1997), Stanyon et al. (2001), zusammen mit den im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnissen (siehe de Oliveira et al. 2002, de Oliveira et al. im Druck), geben deutliche Hinweise auf einen monophyletischen Ursprung der Atelinae, da zahlreiche synapomorphe Charaktere identifiziert wurden, die von allen vier Gattungen (*Lagothrix*, *Brachyteles*, *Ateles* und *Alouatta*) geteilt werden. Dies steht in Einklang mit der Mehrzahl der Befunde anderer Studien (siehe Übersichtsartikel von Schneider 2000). Die phylogenetische Verzweigungssequenz der vier Gattungen innerhalb der Atelinae wird jedoch kontrovers diskutiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, klassifizierten viele Autoren die Gattung *Alouatta* innerhalb der Atelinae als basale Klade (Rosenberger 1981; Ford 1986; Kay 1990; Harada et al. 1995; Schneider et al. 2001; Meireles et al. 1999). Die Gattung *Brachyteles* wurde basierend auf den Ergebnissen molekular-genetischer Studien als Schwestergattung der Gattung *Lagothrix* erkannt (Schneider et al. 2001, Canavez et al. 1999, Meireles et al. 1999, von Dornum und Ruvolo 1999). Anhand dieser Studien leitete sich eine phylogenetische Verzweigungssequenz von $\{Ateles \{Lagothrix \text{ und } Brachyteles\}\}$ ab. Demgegenüber deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine nähere verwandtschaftliche Beziehung zwischen *Ateles* und *Lagothrix*, als

Ateles und *Brachyteles* hin, aus der sich eine Sequenz von $\{Brachyteles \{Lagothrix \text{ und } Ateles\}\}$ ableitet. Auf der Basis morphologischer Vergleiche schlug Kay (1990) ebenfalls eine nähere Verwandtschaft zwischen *Lagothrix* und *Ateles*, als *Brachyteles* und *Ateles* vor. Rosenberger (1981, 1984) hingegen, gruppierten *Brachyteles* und *Ateles* am nächsten zueinander und die Gattung *Lagothrix* als Schwestergruppe. Die Ergebnisse von Ford (1986) resultierten in einer Trichotomie der Gattungen *Brachyteles*, *Lagothrix* und *Ateles*.

Der Vergleich des im Rahmen dieser Studie erstellten Stammbaums von Spezies der Gattung *Alouatta* (siehe Abb. 5.4 und de Oliveira et al., 2002) mit Stammbäumen, die auf molekular-genetischen (Meireles et al. 1999; Bonvicino et al. 2001), morphologischen und biogeografischen (Mittermeier und Coimbra-Filho 1981, Gregorin 1996) Daten fundieren, zeigte Übereinstimmung in der Positionierung der Spezies *Alouatta caraya* an der Basis der Gattung *Alouatta*. Im Unterschied zu der hier abgeleiteten phylogenetischen Verzweigungssequenz $\{(A. caraya \text{ und } A. belzebul)\}\{A. fusca \{A. seniculus macconnelli (A. sara \text{ und } A. seniculus arctoidea)\}\}$, bei der die Spezies *A. caraya* und *A. belzebul* eine Linie repräsentieren und *A. fusca* zusammen mit der *Alouatta seniculus* Gruppe eine zweite phylogenetische Linie bilden, klassifizierten Bonvicino et al. (2001) *A. fusca* zusammen mit *A. belzebul*. Die Spezies *A. seniculus* stellte hierbei eine Schwesterklade dar. Gregorin (1996) hingegen, gruppierte *A. belzebul* und *A. seniculus* in eine Klade und *A. fusca* repräsentierte eine Schwestergruppe.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten Spezies der Gattung *Alouatta*, geben Anhaltspunkte, die für eine taxonomische Neubewertung einiger Spezies sprechen würde. So zeigte die vergleichende Karyotypanalyse der zwei untersuchten Subspezies von *A. f. fusca* und *A. f. clamitans*, dass sich die beiden Subspezies durch zwei Robertson'sche Translokationen voneinander unterscheiden. Ein Hybrid der entsprechenden Karyotypen mit $2n=49/50$ und $2n=45/46$ würde die Bildung von zwei Trivalenten in der Meiose erfordern, welche eine fehlerhafte Segregation der Trivalente in der Meiose zur Folge haben könnte und zur Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit und/oder Fertilität führen könnte. Es kann daher spekuliert werden, dass eine taxonomische Klassifikation der untersuchten Subspezies als Spezies gerechtfertigt wäre. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die zwei untersuchten Individuen der Spezies *Alouatta seniculus macconnelli* aus der Region um *Uatumã river* bzw. *Jari river* verschiedene Karyotypen aufweisen. Sie unterscheiden sich voneinander durch eine zentrische Fission und Fusion. Ob dieser Karyotypunterschied

ausreicht um eine wirksame Reproduktionsbarriere darzustellen, ist allerdings unklar. Ferner zeigte die vergleichende Charakterisierung der Subspezies *A. s. macconnelli* und *A. s. arctoidea*, dass sich die Karyotypen dieser Subspezies durch multiple Translokationen voneinander unterscheiden, welche eine wirksame Reproduktionsbarriere darstellen könnten (siehe Nevo 2000). Die Ergebnisse weisen auf eine nähere verwandtschaftliche Beziehung zwischen *A. seniculus arctoidea* und *A. sara* zueinander als zu *A. seniculus macconnelli* hin. Da die Spezies "*A. seniculus sara*" von der mehrheitlichen Anzahl der Autoren als eigene Spezies, *A. sara* deklariert wurde (siehe Groves 1993, Rylands et al. 2000) wäre gemäß den chromosomalen Daten dieser Arbeit eine Neubewertung des taxonomischen Status der Subspezies *A. s. macconnelli* und *A. s. arctoidea* ebenfalls in Erwägung zu ziehen.

Die Rekonstruktion chromosomaler Phylogenien innerhalb der Gattung *Ateles* (de Oliveira et al. im Druck), bezog die Spezies *Ateles geoffroyi* (Morescalchi et al. 1997), *Ateles belzebuth hybridus* (Garcia et al. 2002), wie auch die Spezies *Ateles paniscus paniscus* und *Ateles belzebuth marginatus*, die im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurden, mit ein. Es resultierte eine Verzweigungssequenz mit *A. b. marginatus* an der Basis, gefolgt von *A. p. paniscus*. Die Spezies *A. b. hybridus* und *A. geoffroyi* bildeten eine Schwesterklade zu *A. p. paniscus* (siehe Abb. 5.6). Die Sequenzanalyse mitochondrialer DNA von Collins und Dubach (2001) ergab hingegen, dass die Spezies *A. p. paniscus* die ursprünglichste Klade im Vergleich zu *A. b. marginatus* und *A. geoffroyi* darstellt. Eine solche phylogenetische Konstellation würde konvergente chromosomale Umbauten erfordern. So müsste angenommen werden, dass die Chromosomenform 1a1/6/1c/6/1c durch konvergente Ereignisse in *A. p. paniscus*, *A. b. hybridus* und *A. geoffroyi* entstanden ist. Die hier rekonstruierte chromosomale Phylogenie bietet überdies deutliche Anhaltspunkte, die für eine Re-Klassifikation der Spezies *A. b. hybridus* sprechen würden, da diese mit der Spezies *A. geoffroyi* wesentlich mehr synapomorphe Charaktere, als mit *A. b. marginatus* teilt.

5.3.3 Aotinae, Cebinae und Pitheciinae

Vergleichende molekular-genetische, -zytogenetische und morphologische Studien lieferten ein breites Spektrum an verschiedenen Vorschlägen zur Phylogenie der Aotinae, Cebinae und Pitheciinae. Viele Autoren molekular-genetischer Studien (Harada et al. 1995, Schneider et al. 2001, Porter et al. 1997, Canavez et al. 1999) klassifizierten die Pitheciinae, die sich aus den drei Gattungen *Pithecia*, *Chiropotes* und *Cacajao* zusammensetzt, als Schwesterklade der

Atelinae, in Übereinstimmung mit Ford (1986) und Rosenberger (1981, 1984), basierend auf morphologischen Daten und den Ergebnissen dieser Arbeit. Kay (1990) hingegen betrachtete die Pitheciinae als ursprünglichere Klade und platzierte diese als abzweigende Linie vor der Aufspaltung zu den Atelinae, Callitrichinae und *Aotus*.

Eine kontroverse Klassifizierung spiegeln die Publikationen vergleichender Studien bezüglich der Gattungen *Callicebus* und *Aotus* wieder. Ford (1986) und Rosenberger (1981, 1984) und Sorci et al. (1997) postulierten, dass die Gattungen *Aotus* und *Callicebus* einen nächsten gemeinsamen Vorfahren teilen. Die phylogenetische Verknüpfung dieser Gattungen steht in Einklang mit den Befunden dieser Arbeit. Harada et al. (1995), von Dornum und Ruvolo (1999), Porter et al. (1997), Canavez et al. (1999) und Schneider et al. (2001), kontrastieren diese Erkenntnisse, indem sie die Gattung *Callicebus* mit den Pitheciinae und die Gattung *Aotus* mit den Callitrichinae gruppierten. Horowitz und Meyer (1995) klassifizierten *Aotus* als nächstverwandte Gattung zu *Cebus* und *Pithecia* und *Callicebus* als ursprünglichste Klade nach *Alouatta*. Kay (1990) stellte eine weitere Variante in der Klassifizierung von *Aotus* und *Callicebus* vor, indem er *Callicebus* als ursprünglichste Linie der Neuweltaffen und *Aotus* als Schwesterlinie der Callitrichinae und Ateline betrachtete.

Die hier vorgeschlagene phylogenetische Verknüpfung der Gattung *Samiri* mit den *Callitrichinae*, die eine gemeinsam abgeleitete Assoziation teilen, korreliert mit den Befunden vieler Autoren basierend auf molekular-genetischen und morphologischen Daten (Rosenberger 1981, 1984 und Kay 1990, Sorci et al. 1997, Schneider et al. 2001, Harada et al. 1995, Porter et al. 1997). Die Gattung *Cebus* wurde von diesen Autoren, mit Ausnahme von Kay (1990), als Schwestergattung von *Saimiri* klassifiziert. Die vergleichende Karyotypanalyse deckte jedoch kein synapomorphes Merkmal auf, das ausschließlich von der Gattung *Saimiri* und *Cebus* geteilt wird und Rückschlüsse auf einen nächsten gemeinsamen Vorfahren dieser beiden Gattungen geben würde. Hingegen wurde festgestellt, dass der hypothetische ancestrale Karyotyp der Neuweltaffen nahezu vollständig in den untersuchten Spezies der Gattung *Cebus* konserviert ist (siehe 5.2.2). Die Ansicht, dass die Gattung *Cebus* einen „primitiven“ Karyotyp innerhalb der Neuweltaffen aufweist, wurde von Garcia et al. (2000, 2002) und Richard et al. (1996) auf der Basis von Bänderungsanalysen und *chromosome painting* ebenfalls vertreten.

Zusammenfassend demonstriert die Bandbreite verschiedener Vorstellungen die bezüglich der Phylogenie und Taxonomie von Neuweltaffen formuliert wurden, dass phylogenetische Zusammenhänge nur interdisziplinär aufgedeckt werden können. So sind jedem methodischen Ansatz Limitierungen in Bezug auf die Auflösung gesetzt. Eine phylogenetische Rekonstruktion mittels der vergleichende DNA Sequenzanalyse wird beispielsweise erschwert, wenn die DNA Sequenz zwischen zwei Spezies stark konserviert ist. Umgekehrt können molekular-genetische Ansätze eine bessere Auflösung erzielen bei Vorliegen von Karyotypen mit identischen chromosomalen Syntenien zwischen zwei Spezies.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass mit der vergleichende Karyotypanalyse unter Verwendung der Methode des *multidirectional chromosome painting* ein Einblick in die chromosomale Phylogenie von Neuweltaffen gewonnen werden konnte. Es konnte demonstriert werden, dass mit molekular-zytogenetischen Analysen auch komplexe chromosomale Veränderungen, die in der Evolution von Neuweltaffen stattgefunden haben, nachgewiesen werden können. Jedoch wurden auch Limitierungen in der Auflösung von FISH offensichtlich. So konnte eine phylogenetische Verzweigungssequenz der vier Gattungen innerhalb der Atelinae nur mittels ergänzender Bänderungsanalysen von Chromosomen, die zusätzliche intra-chromosomale Veränderungen aufdeckten, abgeleitet werden. Eine hoch auflösende Charakterisierung mit Hilfe von BAC Klonen verspricht hierbei eine weitaus präzisere intra-chromosomale Definition, als im Vergleich zu Bänderungsanalysen. Diese wäre insbesondere zur Überprüfung der Homologie von bestimmten chromosomalen Charakteren informativ, die Schlüsselrearrangements darstellen. So könnte beispielsweise mit Hilfe der vergleichenden Kartierung von BAC-Contigs definiert werden, ob die in Platyrrhini und Atelinae nachgewiesene Inversion der homologen menschlichen Chromosomensegmente 10a/16a/10/16 identisch ist.

5.4 Organisation und Evolution repetitiver Sequenzmotive

Die Ergebnisse der vergleichenden Karyotypanalyse der bisher mittels *chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen ergaben, dass Neuweltaffen eine hohe Anzahl spezies-spezifischer Umbauten zeigten. Robertson'sche und Tandem Fusionen, sowie Fissionen stellten prädominante Rearrangements dar (siehe 5.2.6). Diese involvierten zentromerische und (sub-)telomerische repetitive Genomelemente. Der gewonnene Überblick über die Verwandtschafts-

verhältnisse der mittels *chromosome painting* untersuchten Neuweltaffen (siehe 5.2) diente als Basis für detailliertere Untersuchungen zur Evolution repetitiver Genomelemente.

Mittels iCGH (siehe 4.2) war es möglich, sowohl spezies-spezifische Merkmale, wie auch Gemeinsamkeiten zwischen Spezies nachzuweisen, die mit *chromosome painting* verdeckt blieben. Es konnte demonstriert werden, dass heterochromatische Bereiche (Zentromer-, aber auch interstitielle und terminale Regionen) häufig ein unbalanciertes Fluoreszenzintensitätsverhältnis zeigten, während euchromatische genomische Regionen balanciert zwischen den untersuchten Neuweltaffen waren. Im Rahmen der Auflösung von FISH zeigten viele dieser heterochromatischen Bereiche sowohl qualitativ als auch quantitativ Spezies spezifische Eigenschaften.

So erlaubte reziprokes iCGH zwischen *Saimri sciureus* und *Saguinus oedipus* (siehe Abb. 4.38 A) den Nachweis interstitieller, als auch terminaler repetitiver Genomelemente in *S. sciureus*, die spezifisch für das untersuchte Individuum von *S. sciureus* waren. Bei *S. oedipus* zeigten nur die Zentromerregionen signifikante Unterschiede in dem Fluoreszenzintensitätsverhältnis. Durch die reziproke Hybridisierung auf Metaphasen von *S. sciureus* und *S. oedipus* wurde offensichtlich, dass die Unterschiede in dem Fluoreszenzintensitätsverhältnis nicht durch eine unterschiedliche Kopienanzahl zentromerischer Sequenzen zwischen beiden Spezies verursacht wurden. Wäre dies der Fall, würde genomische DNA von derselben Spezies auf Metaphasepräparaten von sowohl *S. oedipus*, als auch *S. sciureus* eine Überrepräsentierung in den Zentromerregionen zeigen. Stattdessen dokumentiert dieses iCGH Experiment die Sequenzdivergenz von zentromerischem Heterochromatin zwischen beiden Spezies. Dadurch wird offensichtlich, dass die Evolutionsrate repetitiver Chromosomenregionen wesentlich höher ist als im Vergleich zu euchromatischen Regionen. Eine hohe Evolutionsrate repetitiver Sequenzen von zentromerischem Heterochromatin konnte bereits innerhalb einer Gattung beobachtet werden. So zeigte das iCGH Experiment zwischen *Alouatta caraya* und *Alouatta seniculus* auf Metaphasechromosomen von *A. caraya* (siehe Abb. 4.38 K), dass die Zentromerregionen von *A. caraya* ausschließlich mit genomischer DNA von *A. caraya* hybridisierten. Die vergleichende Genomhybridisierung zwischen *Lagothrix lagothricha* und *Brachyteles arachnoides* zeigte, dass die Mehrzahl der Zentromerregionen eine spezies-spezifische Überrepräsentierung aufwiesen, während die meisten perizentromerischer Regionen balanciert zwischen beiden Spezies waren (siehe Abb. 4.38 I, J). Damit demonstriert dieses iCGH Experiment, dass verschiedene repetitive

Genomelemente unterschiedlich schnell evolvieren können. Dass auch funktionell ähnliche oder gleiche Sequenzen eine unterschiedlich schnelle Evolutionsrate zeigen können, dokumentiert das iCGH Experiment zwischen *A. seniculus* und *Alouatta fusca* auf Metaphasechromosomen von *A. seniculus* (siehe Abb. 4.38 L). Dieses Experiment ließ erkennen, dass einige Sequenzen von zentromerischem Heterochromatin von beiden Spezies geteilt wurden, andere dagegen divergent waren. Ferner konnten zwei Chromosomen von *A. seniculus* identifiziert werden, die ausschließlich mit genomischer DNA von *A. seniculus* hybridisierten. Diese Chromosomen repräsentieren vermutlich B-Chromosomen, die bekanntlich mit einer Anzahl zwischen null und drei pro Zelle in dieser Spezies vorkommen (de Oliveira et al., 2002, Lima und Seuánez et al., 1991).

Mit diesen iCGH Experimenten konnte demonstriert werden, dass heterochromatische und euchromatische chromosomale Regionen differenziert dargestellt werden können. Insbesondere zentromerische, aber auch interstitielle und subtelomerische heterochromatische Regionen zeigten häufig sowohl qualitativ als auch quantitativ Spezies spezifische Eigenschaften. Es wurde auch erkennbar, dass verschiedene Klassen repetitiver Sequenzmotive unterschiedlich schnell evolvieren können. Diese Resultate heben die enorme Plastizität repetitiver Genomelemente im Vergleich zu euchromatischen Regionen hervor, die in allen untersuchten Spezies balanciert erschienen. Hiermit wird deutlich, dass in der Evolution repetitiver Genomelemente bei verschiedenen Spezies unterschiedliche chromosomale Verteilungsmuster und Mutationsraten vorherrschen.

Als molekulare Mechanismen, die dazu führen, dass repetitive Genomelemente eine Amplifikation, im Sinne einer Expansion von Tandemwiederholungen eines Sequenzmotivs, als auch eine intra- und inter-chromosomale Verteilung eines repetitiven Sequenzmotivs, erfahren, können z.B. ungleiches *crossing-over*, Transposition, Konversion oder DNA *slippage* genannt werden. Diese molekularen Mechanismen werden als Ursache für den *Molecular Drive* diskutiert (siehe Übersicht bei Dover 2002). Gemäß diesem Autor kann *Molecular Drive* als Zweistufen Prozess verstanden werden, bei welchem zunächst eine graduelle Verteilung eines Sequenzmotivs über ein Genom und anschließend eine Weitergabe dieses Sequenzmotivs an nachfolgende Generationen stattfindet. Dies kann zur Folge haben, dass das betreffende Sequenzmotiv innerhalb einer Population verteilt wird. Das Vorliegen spezies-spezifischer repetitiver Genomelemente, die auf mannigfachen Chromosomen verstreut sind, kann über solche evolutionären Prozesse erklärt werden.

5.4.1 Genomische Imbalancen und chromosomale Polymorphismen bei Callitrichinae

Mittels iCGH konnten genomische Imbalancen zwischen verschiedenen Spezies der Callitrichinae und dem *Callithrix jacchus* x *Cebuella pygmaea* Inter-Spezies Hybriden visualisiert werden (siehe 4.2, Abb. 4.38 C-H und 4.40). Diese waren auf Chromosomenregionen beschränkt, die von keiner der verwendeten *painting* Sonden hybridisiert wurden (Neusser et al. 2001, Neusser et al. im Druck). Euchromatische Regionen erschienen hingegen balanciert zwischen allen untersuchten Spezies. Ferner zeigten nur solche Chromosomenregionen genomische Imbalancen, die als C-Banden positives Heterochromatin identifiziert wurden (Nagamachi et al. 1992).

Die vergleichende Genomhybridisierung zwischen *C. jacchus* und *Saguinus oedipus* (Abbildungen hierzu wurden nicht illustriert) zeigte, dass ausschließlich die Zentromerregionen aufgrund der Sequenzdivergenz von zentromerischem Heterochromatin unbalanciert zwischen diesen beiden Spezies waren. Wurden hingegen die Spezies, *Callithrix argentata*, *C. jacchus* und *C. pygmaea* miteinander verglichen, erschienen die Zentromerregionen balanciert zwischen allen drei Spezies (siehe Abb. 4.38 C-F). Dies weist auf eine geringere Sequenzdivergenz von zentromerischem Heterochromatin zwischen diesen Spezies hin.

Die Spezies *C. argentata* und *C. pygmaea* weisen identische chromosomale Syntenien euchromatischer Regionen auf (Neusser et al. 2001). Im Unterschied dazu konnte mittels iCGH ein spezies-spezifisches Muster repetitiver Sequenzen beobachtet werden (siehe Abb. 4.38 C+D). *C. argentata* und *C. pygmaea* zeigten eine Amplifikation repetitiver Sequenzen in zahlreichen subtelomerischen Regionen. Diese Regionen korrespondierten mit denjenigen Chromosomensegmenten, die mit keiner der verwendeten *chromosome painting* Sonde des Menschen, *Lagothrix lagothericha* und *S. oedipus* hybridisierten. Sie sind vermutlich aus konstitutivem Heterochromatin zusammengesetzt sind, das im Genom des Menschen, *S. oedipus* und *L. lagothericha* nicht vorkommt. Ferner konnte durch die reziproke Hybridisierung genomischer DNA der beiden Spezies nachgewiesen werden, dass subtelomerisches Heterochromatin keine Homologie zwischen den beiden Spezies zeigte. So hybridisierten repetitive Sequenzen von *C. argentata* ausschließlich auf Chromosomen von *C. argentata* und umgekehrt. Im Rahmen der Auflösung von FISH repräsentieren diese Heterochromatinblöcke in beiden Spezies daher spezies-spezifische Sequenzen. Qualitative,

als auch quantitative Polymorphismen repetitiver Sequenzen konnten in beiden Individuen dieser Spezies identifiziert werden. Durch die Signatur dieser repetitiven Genomelemente können die beiden karyologisch sonst identischen Spezies *C. pygmaea* und *C. argentata* unterscheidbar gemacht werden können. Im Vergleich dazu konnte mittels iCGH zwischen den Spezies *C. jacchus* und *C. argentata*, gezeigt werden, dass der Karyotyp von *C. jacchus* gänzlich balanciert war, während in der Spezies *C. argentata* eine deutliche Amplifikation subtelomerischer repetitiver Sequenzen feststellbar war. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Alves et al. (1995), die Satelliten DNA Sequenzen bestehend aus Tandemwiederholungen eines 1528bp Monomers aus *C. argentata* isolierten und zeigen konnten, dass diese in subtelomerischen Regionen in verschiedenen Vertretern der „argentata Gruppe“ der Gattung *Callithrix*, wie *C. argentata*, *C. humeralifer* und *C. emiliae* hoch amplifiziert vorlagen. Die Amplifikation dieses Satelliten hat vermutlich erst relativ kürzlich stattgefunden, da sie in anderen nahe verwandten Spezies, wie *C. jacchus* oder *C. penicillata* nicht nachweisbar war. Diese für *C. argentata*, *C. humeralifer* und *C. emiliae* charakteristische Amplifikation repetitiver Satelliten DNA Sequenzen bietet nach Alves et al. (1995) Anhaltspunkte, die eine Klassifizierung der Gattung *Callithrix* in eine „argentata Gruppe“ und eine „jacchus Gruppe“ befürworten würde, wie sie bereits von Mittermeier et al. (1988) vorgeschlagen wurde.

Die Untersuchung des *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden durch CGH mit gesamt-genomischer DNA der parentalen Spezies (siehe Abb. 4.38 G) visualisierte unbalancierte Regionen auf nur einem Homologen von zahlreicher Chromosomenpaaren. Die Untersuchung der mütterlichen Chromosomen mit der gleichen Sonde ergab hingegen durchweg balancierte Fluoreszenzintensitätsverhältnisse (siehe Abb. 4.38 H). Die quantitative Analyse des Hybridisierungsmusters des Inter-Spezies Hybriden zeigte, dass offensichtlich repetitive Genomelemente in hohem Maße überrepräsentiert in einigen Homologen väterlicher Herkunft waren (siehe Abb. 4.40). Euchromatische Regionen erschienen hingegen balanciert. Das Vorkommen von *C. pygmaea* spezifischen Heterochromatinblöcken erlaubte so eine Identifizierung der paternalen Herkunft von 13 Chromosomen des Inter-Spezies Hybriden.

Die Analyse verschiedener Individuen der Spezies *Cebuella pygmaea* mittels CGH machte erkennbar, dass unterschiedliche Verteilungsmuster von *C. pygmaea* spezifischen Heterochromatinblöcken in dieser Spezies vorliegen können. So zeigten die drei untersuchten

Individuen von *C. pygmaea* eine quantitativ und qualitativ unterschiedliche Organisation dieser heterochromatischen Genomelemente (siehe Abb. 4.39).

Die Ergebnisse dieser ICGH Experimente dienten als Basis für die Generierung einer DNA Sonde mittels Mikrodisektion, die spezifisch für eine repetitive Region des homologen *C. pygmaea* Chromosoms 18 des Inter-Spezies Hybriden ist (siehe 4.3, Abb. 4.41). Die inter-, als auch intraspezifische Charakterisierung verschiedener Vertreter der Familie Callitrichinae (*C. jacchus*, *C. argentata*, *S. oedipus*, *C. goeldii*, *C. pygmaea* und der Inter-Spezies Hybriden, siehe Abb. 4.44) mit dieser Mikrodisektionss-Sonde bestätigte, dass die mikrodisektierte heterochromatische Region spezies-spezifisch für *C. pygmaea* ist. Die Cohybridisierung der Mikrodisektionss-Sonde mit dem *L. lagotricha* multi-color Sonden Subset L2 ermöglichte hierbei eine einfache und zuverlässige Identifizierung homologer Chromosomen. Erwähnenswert ist insbesondere, dass die Mikrodisektions-Sonde nicht auf Chromosomen der Spezies *C. argentata* kartierte. Dies deutet darauf hin, dass die nachgewiesenen heterochromatischen Regionen in *C. pygmaea* und *C. argentata* (siehe 4.2, Abb. 4.38 C, D) einen unterschiedlichen evolutionären Ursprung haben.

Die drei Individuen von *C. pygmaea* und die *C. jacchus* x *C. pygmaea* Inter-Spezies Hybriden zeigten qualitative und quantitative Polymorphismen in der Verteilung dieses repetitiven Sequenzmotivs (siehe 4.3.2, Abb. 4.45). Insgesamt wiesen die nahe miteinander verwandten Individuen 1 und 2 ein sehr ähnliches Hybridisierungsmuster auf, im Vergleich zu Individuum 3, welches einer anderen Zuchtpopulation entstammt. Diese Polymorphismen repräsentieren potenziell wertvolle Marker für zukünftige Populationsstudien.

Das Vorliegen von heterochromatischen Chromosomenregionen, die nur in der paternalen Spezies der Inter-Spezies Hybriden vorkommen und die an die Hybriden in haploidem Status vererbt wurden, wirft eine weitere Frage auf: Welche Rolle spielt Heterochromatin bei der Speziation? Die Ergebnisse dieser Studie weisen zumindest darauf hin, dass auch signifikante Mengen an Heterochromatin keinen nachteiligen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Inter-Spezies Hybrid Individuen haben. Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen von King (1993), der verschiedene Evidenzen zusammengetragen hat, wonach Heterochromatin nicht notwendigerweise Speziationsprozesse in Gang setzt, da es keine ausreichende reproduktive Barriere darstellt. Nevo (2000) argumentierte, dass zusätzliches Heterochromatin eher in Adaptation-, als in Speziationsprozessen involviert zu sein scheint.

5.4.2 Chromosomale Polymorphismen in der Gattung *Saimiri*

Die vergleichende Genomhybridisierung zwischen *Saguinus oedipus* und *Saimiri sciureus* (siehe 4.2, Abb. 4.38 A) erlaubte den Nachweis eines polymorphen interstitiellen Heterochromatinblocks auf Chromosom 14p von *S. sciureus*, der in dem untersuchten Individuum in heterozygotem Zustand vorlag. Mit Hilfe der chromosomalen Mikrodisektion war es möglich, eine spezifische DNA Sonde für diese Chromosomenregion zu etablieren (siehe 4.3, Abb. 4.41). Diese wurde anschließend zusammen mit einer subregionalen *painting* Sonde (homolog zu *S. sciureus* Chromosom 14p) vergleichend auf Metaphasechromosomen von Individuen der Spezies *Saimiri boliviensis* und *Saimiri ustus* kartiert. Die untersuchten Individuen zeigten ein spezifisches chromosomales Verteilungsmuster dieses repetitiven Sequenzmotivs (siehe Abb. 4.43). In *S. boliviensis* und *S. sciureus* konnten quantitative Polymorphismen heterochromatischer Regionen zwischen den Homologen eines Chromosomenpaares mit der Mikrodisektions-Sonde nachgewiesen werden. Die untersuchten Individuen der Spezies *S. boliviensis* und *S. ustus* wiesen im Unterschied zu dem untersuchten Individuum von *S. sciureus* keinen polymorphen Heterochromatinblock auf dem Homologen zu *S. sciureus* Chromosom 14p auf.

Das unterschiedliche chromosomale Verteilungsmuster dieses repetitiven Sequenzmotivs in den untersuchten Individuen der Gattung *Saimiri*, sowie das Vorliegen polymorpher Chromosomenregionen verdeutlicht wiederum die enorme Plastizität repetitiver Genomelemente im Vergleich zu euchromatischen Chromosomenregionen. Über das unterschiedliche Verteilungsmuster dieser Genomelemente war es möglich, die Karyotypen der untersuchten Spezies zu unterscheiden, die ansonsten identisch sind.

Innerhalb der Gattung *Saimiri* wurden jedoch nicht nur Polymorphismen heterochromatischer Regionen beobachtet. Ferner sind auch strukturelle Polymorphismen beschrieben worden. So demonstrierten Moore et al. (1990), dass die in unterschiedlichen geografischen Regionen beheimateten (Sub-) spezies *S. sciureus sciureus*, *S. boliviensis boliviensis* und *S. boliviensis peruviansis*, Inversionspolymorphismen der *S. sciureus* homologen Chromosomen 15 und 16 zeigten, die zu einem unterschiedlichen Verhältnis akrozentrischer zu submetazentrischer Chromosomen in den verschiedenen Subspezies führten. Scammell et al. (2001) charakterisierten kürzlich die Karyotypen verschiedener Zelllinien dieser Subspezies und bestätigten die Beobachtungen von Moore et al. (1990). Gemäß diesen Autoren würde es sich demnach bei

dem hier untersuchten Individuum nicht um *S. sciureus* handeln, sondern um *Saimiri boliviensis boliviensis*. Weiterhin würde die einzige bisher publizierte Spezies der Gattung *Saimiri*, die mittels *chromosome painting* charakterisiert wurde (Stanyon et al. 2000), nicht *S. sciureus*, sondern *S. boliviensis peruviensis* darstellen. Diese kontroversen Klassifikationen reflektieren, dass über die systematische Zuordnung von Spezies und Subspezies noch Unklarheit besteht. Die enorme Wichtigkeit der genauen Identifizierung von Spezies und Subspezies, sowie deren geografische Ursprungsregion und Populationszugehörigkeit, wird insbesondere dann offensichtlich, wenn Spezies Gegenstand von Artenschutzmassnahmen und konzertierten Zuchtprogrammen von Primatenzentren sind. In dieser Hinsicht ist erwähnenswert, dass die Untersuchung einer *Saimiri* Kolonie zu der Vermutung führte, dass die polymorphe Region in *S. sciureus* Chromosom 14p (die über C-Bänderung identifiziert wurde) einen möglichen Einfluss auf den Reproduktionserfolg in weiblichen Individuen ausüben könnte (Moore et al. 1990).

Die Relevanz einer korrekten Identifizierung von Spezies und Subspezies und deren Herkunft kommt auch im Bereich der angewandten Forschung zum tragen; insbesondere bei Totenkopffaffen, wie *S. sciureus* und *S. boliviensis*, die als Modellorganismen in der biomedizinischen Forschung von Bedeutung sind (siehe Moore et al. 1990). So sind verschiedene Spezies und Subspezies aufgrund ihrer Suszeptibilität häufig unterschiedlich gut als Modellorganismus für bestimmte Fragestellungen geeignet. So wurde berichtet, dass die Spezies *S. sciureus* eine Prädisposition zeigt, Gallensteine zu entwickeln, wenn sie unter Diet gesetzt wird. *S. boliviensis* scheint hingegen in dieser Hinsicht resistent zu sein (Portman et al 1980, Moore et al., 1990).

Die Identifizierung distinkter chromosomaler Marker wie z.B. auch chromosomale Polymorphismen könnten bei der Unterscheidung von Spezies und Subspezies hilfreich sein. Diese könnten auch für die biomedizinische Forschung relevant sein, um diejenigen (Sub-)spezies als Modellorganismen auswählen zu können, die sich am besten für bestimmte Fragestellungen eignen.

5.5 Evolutionäre Aspekte der Zellkernarchitektur

Mit den hier durchgeführten Hybridisierungen auf 3D fixierte S-Phase Zellkerne des Menschen und Neuweltaffen sollten Auswirkungen evolutionärer Rearrangements auf die Anordnung des Chromatins beleuchtet werden. Dazu wurden Experimente zu radialen Anordnung von Chromosomenterritorien (CT) und von chromosomalen Subregionen durchgeführt, die Aufschluss geben sollten, inwieweit radiale Arrangements von Chromatin evolutionär konserviert bleiben und ob diese eine Korrelation zur Gendichte zeigen. Ein weiterer Aspekt dieser Experimente beinhaltet die Fragestellung, ob konstitutives Heterochromatin einen Einfluss auf die radiale Position von benachbartem Chromatin zeigt.

5.5.1 Vergleichende Untersuchungen zur radialen Chromatin Anordnung

5.5.1.1 Radiale Anordnung der menschlichen Chromosom 13, 17 und 20 Homologen

Die menschlichen Chromosomen 13, 17, 20 repräsentieren als separate Chromosomen den evolutionär ancestralen Zustand nicht nur für Primaten, sondern für alle Säugetiere (siehe 2.4.3, Fröncke et al. 2003), während die in *C. jacchus* vorliegende Assoziation 13/17/20 einen abgeleiteten Status dieser Chromosomen darstellt (siehe hierzu 4.4.2, Abb. 4.59). Anhand der menschlichen Chromosomen 13, 17 und 20 und deren homologe Chromosomenformen in *C. jacchus* sollte untersucht werden, ob die radiale Organisation der menschlichen Chromosomen 13, 17 und 20 in Interphasenuklei des Menschen, als auch die entsprechenden subchromosomalen Regionen des Translokationsproduktes 13/17/20 in Interphasezellkernen der Spezies *C. jacchus* eine Korrelation zur Gendichte zeigen und inwieweit diese auch im Falle der evolutionär abgeleiteten Translokationen konserviert ist.

Die Quantitative Auswertung der radialen Verteilung der menschlichen Chromosom 13, 17 und 20 Territorien und deren Homologe subchromosomale Territorien in der Spezies *C. jacchus* in Interphasezellkernen dieser Spezies (siehe 4.4.2.3, Abb. 4.63) zeigte folgende Tendenzen auf: In Zellkernen des Menschen, als auch der Spezies *C. jacchus* wurde eine Gendichte-korrelierte radiale Verteilung der Chromosom 13, 17 und 20 Territorien beobachtet. Relativ genarmes Chromosom 13 Chromatin war in Zellkernen beider Spezies präferentiell zur Kernperipherie orientiert, während Chromatin des genreichen Chromosoms 17 eine Positionierung zur Kernmitte zeigte. Signifikante Unterschiede zwischen den Kurven der radialen Verteilung von Chromosom 13 und 17 (Sub-) Territorien und zwischen den von

Chromosom 13 und 20 (Sub-) Territorien konnten in Zellkernen des Menschen und *C. jacchus* mit statistischen Tests bestätigt werden (siehe 4.4.2.3, Tabelle 4.13). Keine signifikanten Unterschiede wurden zwischen den Kurven der radialen Verteilung der homologen 17 und 20 sub-chromosomalen Territorien in *C. jacchus* festgestellt. Beim Menschen konnte mit dem U-Test noch ein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven der radialen Verteilung von Chromosom 17 und 20 Territorien nachgewiesen werden, während der stringendere Kolmogoroff-Smirnoff Test keinen signifikanten Unterschied mehr ergab. Dennoch kann an dem Kurvenverlauf der radialen Verteilung von Chromosom 20 CT beim Menschen, wie auch an der Verteilung der Homologen in *C. jacchus* in bestimmten Kurvenabschnitten eine stärker ausgeprägte Tendenz der Positionierung zum Kernäußeren von Chromosom 20 Chromatin als Chromosom 17 Chromatin beobachtet werden. Diese könnte ein Ausdruck für die geringere Gendichte von Chromosom 20, verglichen mit Chromosom 17 sein. Obwohl die ähnliche radiale Verteilung zwischen Chromosom 17 und 20 Chromatin zwischen Mensch und *C. jacchus* konserviert ist, zeichnet sich gleichzeitig ein Unterschied in der Positionierung von Chromosom 17 und 20 Chromatin in Zellkernen des Menschen im Vergleich zu *C. jacchus* ab. Im Vergleich zum Menschen erscheint die Positionierung von Chromosom 17 und 20 homologem Chromatin in Zellkernen von *C. jacchus* deutlich zur Kernperipherie verlagert. Dieser Unterschied zwischen Mensch und *C. jacchus* wird an den Abstandsmitteln, insbesondere aber an den unterschiedlichen Scheitelpunkten (20% Unterschied) des maximalen DNA Gehaltes von Chromosom 17 und 20 CT zwischen Mensch und *C. jacchus* deutlich. Die 3D Lokalisation der Chromosom 13 CT bzw. der homologen subchromosomalen Territorien von *C. jacchus* ist hingegen in Zellkernen beider Spezies sehr ähnlich.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der quantitativen Auswertung eine Tendenz der radialen Anordnung von Chromatin der menschlichen Chromosomen 13, 17 und 20 in Korrelation zur Gendichte. Diese Tendenz bleibt auch im Falle evolutionär abgeleiteter Umbauten, die zu dem Translokationsprodukt 13/17/20 in der Spezies *C. jacchus* führten erhalten. Somit konnte demonstriert werden, dass sich nicht nur die separat vorliegenden Chromosomen 13, 17 und 20 des Menschen nach ihrer Gendichte im Zellkern ausrichten, sondern auch deren homologe sub-chromosomale Territorien in *C. jacchus*. Die Positionierung dieser CT und homologen sub-chromosomalen Territorien scheint jedoch nicht strikt einer bestimmten Kernregion zugeordnet. Vielmehr könnte der beobachtete Unterschied zwischen Mensch und *C. jacchus* in der Lokalisation der Chromosom 17 und 20 CT eine

Konsequenz der Translokation der homologen menschlichen Chromosomen 13, 17 und 20 in *C. jacchus* sein. So ist vorstellbar, dass genarmes Chromatin homolog zum menschlichen Chromosom 13 Einfluss auf benachbartes Chromatin ausgeübt hat, welcher zu einer Verlagerung von benachbartem Chromosom 17 und 20 homologem Chromatin in Richtung Kernperipherie in *C. jacchus* geführt hat.

5.5.1.2 Radiale Anordnung der menschlichen Chromosom 1 und 19 Homologen

Mit den in Kapitel 4.4.1.2 beschriebenen Experimenten auf 3D fixierte Zellkerne des Menschen und der Neuweltaffen *Callithrix jacchus* und *Saimiri sciureus* sollte untersucht werden, ob auch sub-chromosomale Territorien, wofür ausgewählte Subregionen des menschlichen Chromosoms 1 als Beispiel dienen, eine radiale Verteilung in Abhängigkeit von der Gendichte zeigen. Über den Vergleich mit der radialen Anordnung von (Sub-) Territorien bei *C. jacchus* und *S. sciureus* sollte ein Eindruck gewonnen werden, inwieweit die radiale Verteilung auch im Falle von evolutionär abgeleiteten Umbauten, die in diesen Spezies im menschlichen Chromosom 1 Homologen stattgefunden haben, konserviert ist. Das menschliche Chromosom 19 wurde in diese Untersuchung mit einbezogen, da es in eine Translokation mit menschlichen Chromosom 1 homologem Material in *S. sciureus* involviert ist.

Die vergleichende Karyotypanalyse zwischen dem Menschen und verschiedenen Vertretern der Säugetiere gibt deutliche Anhaltspunkte dafür, dass ein ganzes Homologes des menschlichen Chromosoms 1 den ancestralen Zustand für alle Säugetiere repräsentiert (Fröncke et al. 2003). Der Heterochromatinblock in der Bande 1q12 stellt dagegen ein abgeleitetes und für den Menschen spezifisches Merkmal dar. Im ancestralen Karotyp der Neuweltaffen leitet sich das menschliche Chromosom 1 durch zwei evolutionäre Fissionen ab. Bei den beiden Neuweltaffen, die in die vergleichende Untersuchung zur radialen Chromatin Anordnung der menschlichen Chromosomen 1 und 19 einbezogen wurden, konnten folgende chromosomale Umbauten des menschlichen Chromosoms 1 im Vergleich zum ancestralen Neuweltaffenkaryotyp nachgewiesen werden: *C. jacchus* leitet sich durch eine Translokation der homologen menschlichen Chromosomensegmente 1p/10p ab. Die Spezies *S. sciureus* weist im Vergleich zum ancestralen Neuweltaffen eine Translokation des menschlichen Chromosom 19 Homologen mit dem Chromosomensegment 1b (1q32-qter) auf (siehe 4.4.1.1, Abb. 4.46).

Für diese Experimente wurden zwei DNA Sonden Sets zusammengestellt (siehe 4.4.1.1, Tabelle 4.8). Die Zusammensetzung des Sonden Sets S1 war so konzipiert, dass in *S. sciureus* sowohl die homologe menschliche Chromosomenregion 1q32-qter nachgewiesen werden konnte, als auch die, auf diese Chromosomenregion translozierte Chromosomenregion homolog zum menschlichen Chromosom 19. Im Vergleich dazu liegt das homologe menschliche Chromosom 19 im Karyotyp der Spezies *C. jacchus* als separates Chromosom vor. Das menschliche Chromosom 19 weist eine nahezu 2,5 fach höhere Gendichte auf, als im Vergleich zur menschlichen Chromosomenregion 1q32-qter. Das zweite Sonden Set S2 identifizierte die terminalen Chromosom 1 Regionen 1p34-pter (Gendichte: ca. 19/Mbp) und 1q32-qter (Gendichte: ca. 12/ Mbp), als auch den Heterochromatinblock in der Bande 1q12 des Menschen. Die 1p34-pter homologe Region findet sich in der Spezies *C. jacchus* transloziert auf genarmes, zum menschlichen Chromosom 10p (5,2 Gene/Mbp) homologes Material. Die 1q32-qter homologe Region entspricht dem gesamten *C. jacchus* Chromosom 18 (siehe 4.4.1.1, Abb. 4.47 C).

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Hybridisierung des DNA Sonden Set S1 auf 3D fixierte Kerne lymphoblastoider Zelllinien der Neuweltaffen *C. jacchus* und *S. sciureus* (siehe 4.4.1.3.2, Abb. 4.56) lassen folgende Schlussfolgerungen zu: In Zellkernen von beiden Neuweltaffen wurde eine Gendichte-abhängige Verteilung von Chromatin beobachtet. Genreiches Chromatin homolog zum menschlichen Chromosom 19 zeigte eine präferentielle Orientierung zum Kernzentrum, während vergleichsweise genarmes Chromatin der homologen menschlichen Chromosomenregion 1q32-qter eine tendenzielle Positionierung zur Kernperipherie zeigte. Signifikante Unterschiede zwischen der radialen Verteilung von Chromatin, homolog zum menschlichen Chromosom 19 und der menschlichen Chromosomenregion 1q32-qter konnten in Zellkernen von beiden Spezies nachgewiesen werden. Diese Gendichte-abhängige radiale Organisation von Chromatin im Interphasekern ist zwischen *C. jacchus* und *S. sciureus* konserviert, obwohl die Spezies *S. sciureus* eine evolutionär abgeleitete Translokation der entsprechenden homologen Chromosomensegmente aufweist.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Hybridisierung des DNA Sonden Set S2 auf 3D fixierte Kerne lymphoblastoider Zelllinien des Neuweltaffen *C. jacchus* und des Menschen (siehe 4.4.1.3.2, Abb. 4.57) zeigten, dass genreiches Chromatin homolog zur menschlichen Chromosomenregionen 1p34-pter in Zellkernen des Menschen, wie auch *C. jacchus* deutlich zum Kernmittelpunkt positioniert war. Genarmes Chromatin homolog zur menschlichen

Chromosomenregionen 1q32-qter zeigte hingegen eine präferentielle Orientierung zur Kernperipherie in Zellkernen von beiden Spezies. Die radiale Verteilung von genreichem 1p34-pter und genarmen 1q32-qter (homologem) Chromatin in menschlichen Zellkernen, als und in Zellkernen von *C. jacchus* stellte sich als signifikant unterschiedlich heraus, wie mit statistischen Tests festgestellt werden konnte. Anhand dieser Beobachtungen lässt sich folgern, dass die Positionierung von Chromatin homolog zu den menschlichen Chromosomenregionen 1p34-pter und 1q32-qter in Abhängigkeit von der Gendichte zwischen Mensch und *C. jacchus* konserviert ist. Dennoch ist zu bemerken, dass die präferentielle Lokalisation von Chromatin homolog zur menschlichen Chromosomenregion 1p34-pter in *C. jacchus* im Vergleich zum Menschen etwas in Richtung zur Kernperipherie verlagert war. Dieser Unterschied ist möglicherweise das Resultat der Translokation auf das sehr genarme (~5 Gene/Mbp) menschliche Chromosom 10p Homologe in *C. jacchus*. Zudem ist in der Spezies *C. jacchus* die homologe menschliche Chromosomenregion 1p34-pter unmittelbar assoziiert mit dem Zentromer, während diese Region im menschlichen Chromosom 1 weiter distal vom Zentromer lokalisiert ist. Weierich et al. (2003) zeigten in einer detaillierten Studie zur radialen Verteilung der Zentromere in G₀ Interphasenuklei von Mensch und Maus, dass Zentromere tendenziell zur Kernperipherie hin orientiert sind. Diese Positionierung von Zentromeren könnte möglicherweise auch einen Einfluss auf unmittelbar benachbartes Chromatin ausüben. So könnte die an das Zentromer benachbarte homologe menschliche Chromosomenregion 1p34-pter in *C. jacchus* unter Einfluss des Zentromers geraten sein, der zu einem positionellen Shift in Richtung Kernperipherie, im Vergleich zum Menschen, führte.

Die radiale Verteilung von menschlichem Heterochromatin der Bande 1q12 (0 Gene/Mbp) zeigte eine tendenzielle Orientierung zur Kernperipherie. Obwohl keine signifikanten Unterschiede zwischen der radialen Verteilung der genarmen Chromosomenregion 1q32-qter und Heterochromatin der Region 1q12 festgestellt wurden, spiegelt der Kurvenverlauf eine deutlichere Orientierung zum Kernäußeren, als im Vergleich zu Chromatin der Chromosomenregion 1q32-qter. Der Unterschied zu den Ergebnissen von Weierich et al. (2003), die eine deutlich periphere Lokalisation von 1q12 Heterochromatin in menschlichen Lymphozyten in der G₀ Phase feststellten, könnte möglicherweise durch das Zellzyklusstadium bedingt sein, da in der vorliegenden Untersuchung im Unterschied zu Weierich et al. (2003) Zellen in der S-Phase ausgewertet wurden.

5.5.1.3 Einfluss von Heterochromatin auf die radiale Verteilung von Chromatin

Die bisher erläuterten Experimente zur radialen Anordnung von Chromatin in Zellkernen lymphoblastoider Zelllinien des Menschen und der Neuweltaffen spiegeln eine Gendichte-abhängige Verteilung wider. Diese lässt sich auch auf subchromosomaler Ebene erkennen. Strukturelle Eigenschaften von Chromosomensegmenten spielen möglicherweise eine Rolle für die räumliche Organisation von Chromatin innerhalb des Zellkerns. In diesem Zusammenhang war es auch interessant der Frage nachzugehen, ob zusätzliche genomische Faktoren existieren, die einen Einfluss auf die radiale Organisation von benachbartem Chromatin haben könnten. So ist vorstellbar, dass Translokationen von Euchromatin in die Nachbarschaft von genarmen Heterochromatin die radiale Positionierung beeinflussen.

Um zu erörtern, ob das Vorhandensein eines Heterochromatinblocks die radiale Verteilung von Chromatin modifiziert, wurden Untersuchungen zur radialen Chromatinanordnung am Beispiel des Chromosoms 14 von *Saimri sciureus* durchgeführt (siehe 4.4.1.3.3). Chromosom 14 von *S. sciureus* erschien hierfür als geeignetes Modell, da es zu einem evolutionär abgeleitete Translokation von relativ genarmen Chromatin homolog zur menschlichen Chromosomenregion 1q32-qter mit menschlichem homologem Chromosom 19 (sehr genreich) aufweist, zu anderem einen polymorphen interstitiellen Heterochromatinblock beinhaltet, für den das untersuchte Individuum heterozygot ist (siehe 4.4.1.1, Abb. 4.47 B). Über das Vorhandensein des polymorphen interstitiellen Heterochromatinblocks in einem der Homologen von *S. sciureus* Chromosom 14p (homolog zur menschlichen Chromosomenregion 1q32-qter), konnte das väterliche vom mütterlichen Homologen unterschieden werden. Getrennte Datensätze der Verteilung väterlicher und mütterlicher Chromosomenterritorien homolog zur menschlichen Chromosomenregion 1q32-qter wurden erhalten wie in Kapitel 4.4.1.3.3 beschrieben und quantitativ ausgewertet (siehe hierzu Abb. 4.58). Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung ließen erkennen, dass *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin eine klare präferentielle Positionierung zur Kernperipherie zeigte. Die radiale Verteilung Das Homologe, das einen interstitiellen Heterochromatinblock aufweist, zeigte gleichfalls eine präferentielle Lokalisation in der Kernperipherie, die jedoch etwas weiter zum Kerninneren verlagert war, als im Vergleich zur radialen Verteilung von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin. Die radiale Verteilung des Homologen ohne Heterochromatinblock spiegelt eine, im Vergleich zu dem Homologen mit Heterochromatinblock, wesentlich breitere Verteilung im Zellkern wieder, mit einer tendenziellen Orientierung

zur Kernmitte. Die quantitative Auswertung ergab deutliche Unterschiede in den Scheitelpunkten des maximalen DNA Gehaltes, wie auch in den Abstandsmitteln zwischen den beiden Homologen. Auch ergaben die statistischen Testergebnisse signifikante Unterschiede zwischen der radialen Verteilung des Homologen mit bzw. ohne Heterochromatinblock (siehe Tabelle 4.11). Dieser Unterschied könnte auf das Vorliegen des interstitiellen Heterochromatinblocks zurückgeführt werden. Die distinkte Verteilung der beiden Homologen in Zellkernen der Spezies *S. sciureus* wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven der radialen Verteilung von *S. sciureus* spezifischem Heterochromatin und dem Heterochromatin positiven 1q32-qter Homologen nachgewiesen wurde. Es könnte daher angenommen werden, dass ein zusätzlicher Heterochromatinblock in ansonsten konservierten Chromosomensegmenten die Positionierung von benachbartem Chromatin beeinflusst hat. Dieser Einfluss könnte einen positionellen Shift von Chromatin des Homologen mit Heterochromatinblock zur Kernperipherie verursacht haben.

5.5.1.4 Schlussfolgerungen zur vergleichenden Zellkernarchitektur

Die Ergebnisse der in dieser Dissertation durchgeführten Experimente zur vergleichenden Zellkernarchitektur beim Menschen und der zwei Neuweltaffen *S. sciureus* und *C. jacchus* weisen auf eine distinkte Anordnung von Chromatin in Abhängigkeit von der Gendichte in den untersuchten lymphoblastoiden Zellkernen hin. Dies steht in Einklang mit den Befunden verschiedener Autoren, die eine Gendichte-abhängige radiale Anordnung von CT in Zellkernen menschlicher Lymphozyten (Croft et al. 1999, Cremer et al. 2001), wie auch verschiedener Tumorzelllinien (Cremer et al. 2003) und lymphoblastoiden Zelllinien beobachteten (Boyle et al. 2001). Am Beispiel der menschlichen subchromosomalen Regionen 1q32-qter und 1p34-pter (siehe 4.4.1.2.2), sowie der menschlichen Chromosom 13, 17 und 20 Homologen in *C. jacchus* (siehe 4.4.2.3) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich nicht nur ganze CT entsprechend ihrer Gendichte im Zellkern anordnen, sondern auch subchromosomale Territorien. Diese distinkte radiale Verteilung der genannten Chromosomenregionen war zwischen Mensch und dem Neuweltaffen *C. jacchus* konserviert. Auch anhand der vergleichenden Untersuchungen der radialen Anordnung der homologen menschlichen Chromosomen (-regionen) 1q32-qter und 19 zwischen *C. jacchus* und *S. sciureus* (siehe 4.4.1.2.1) konnte eine bevorzugte Anordnung von Chromatin in Abhängigkeit

von der Gendichte beobachtet werden. Diese war evolutionär konserviert, obwohl in diesen Spezies evolutionäre Umbauten der homologen Chromosomen stattgefunden haben.

Die Betrachtung weiterer Chromosomen, als der bisher untersuchten homologen menschlichen Chromosomen 18 und 19 in Primaten (Tanabe et al. 2002, Tanabe et al., im Druck), bietet einen zusätzlichen Anhaltspunkt dafür, dass in Nuklei von lymphoblastoiden Zellen generell eine evolutionäre Konservierung der Gendichte-abhängigen radialen Organisation von Chromosomen in höheren Primaten bestehen könnte. Die Konservierung der nukleären Topologie von CT in verschiedenen Spezies mit divergenten Karyotypen würde für eine funktionell signifikante Rolle von distinkten radialen Chromatin Arrangements sprechen. Welche Bedeutung diese haben könnte und welche zugrunde liegenden molekularen Mechanismen für die Etablierung und Erhaltung dieser höheren Ordnung der Chromatin Anordnung verantwortlich sind, ist noch unbekannt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln dennoch keine strikte Konservierung der radialen Anordnung von Chromosomenterritorien wieder. Beispielsweise zeigte *C. jacchus*, im Vergleich zum Menschen eine leicht zur Kernperipherie hin verschobene Positionierung der homologen menschlichen 17 und 20 CT. Es scheint daher vielmehr die Tendenz der Positionierung im Zellkern in Abhängigkeit von der Gendichte evolutionär konserviert zu sein. Die Verteilung individueller CT in verschiedenen Zellkernen reflektiert hingegen eine gewisse Variabilität, welche die Annahme einer starren Chrominanordnung im Zellkern ausschließt. Dass die radiale Anordnung von CT nicht einem deterministischen Muster folgt, sondern gewisse Freiheitsgrade zulässt, die für die Hypothese einer probabilistischen Anordnung von CT (Bolzer et al. zur Publikation eingereicht) spricht, wurde am deutlichsten an der Untersuchung zur radialen Verteilung von polymorphen Heterochromatin erkennbar (siehe 4.4.1.3.3). Hierbei zeigte sich, dass die väterlichen und mütterlichen Homologen des Chromosoms 14 von *S. sciureus*, die sich durch einen polymorphen interstitiellen Heterochromatinblock voneinander unterscheiden, einen signifikanten Unterschied in der radialen Verteilung aufwiesen. *S. sciureus* spezifisches Heterochromatin zeigte eine bevorzugte Lokalisierung zur Kernperipherie, in Einklang mit der geringen Gendichte bzw. das Fehlen von Genen in diesem Heterochromatin. Der signifikante Unterschied in der radialen Verteilung der homologen CT mit und ohne Heterochromatinblock, lässt die Folgerung zu, dass ein zusätzlicher Heterochromatinblock in einem ansonsten konservierten Chromosom

Einfluss auf die radiale Verteilung von benachbartem Chromatin ausüben kann, der zu einem positionellen Shift des Homologen mit Heterochromatin zur Kernperipherie führt.

Einen möglichen Einfluss von Heterochromatin auf benachbartes Chromatin nahmen auch Tanabe et al., 2002 an, aufgrund der Beobachtung, dass bei Schimpanse und Gorilla eine deutlich mehr periphere Lokalisation der Chromosom 19 Homologen als bei Mensch und Orangutan mit dem Vorkommen von subtelomerischen Heterochromatinblöcken bei Schimpanse und Gorilla korreliert werden kann.

Viele Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Positionierung von Genen in Nachbarschaft zu heterochromatischen Regionen die Genexpression vermindern oder zur Geninaktivierung führen kann. Die nukleäre Positionierung von Genen in Nachbarschaft zu Heterochromatinblöcken, könnte daher bedeutend für die Inaktivierung von Genen sein. Umgekehrt reicht eine von Heterochromatinblöcken entfernte Positionierung von Genen nicht aus, um sie zu aktivieren (siehe Übersichtsartikel von Dundr und Mistelli, 2001). So ist auch vorstellbar, dass die Amplifikation schnell evolvierender repetitiver DNA in Verbindung mit der Relokalisation von Chromatin hin zur nukleären Peripherie zu einer veränderten Genexpression in den genannten Primaten Spezies führen kann. Weiterhin kann spekuliert werden, dass dieser Mechanismus der Genregulation eine mögliche Rolle in der Artbildung spielt.

6 **Ausblick**

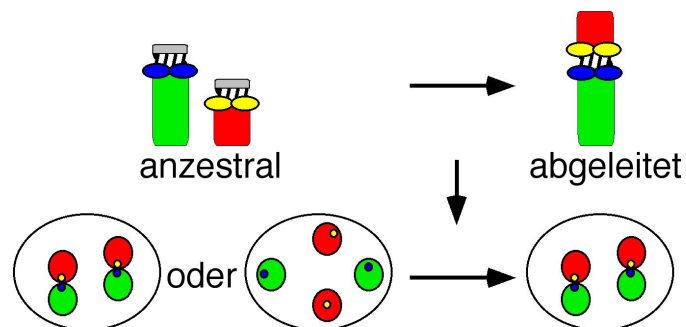
Die hier durchgeführten Studien zur chromosomalen Phylogenie und Genomorganisation der Neuweltaffen erlaubten einen Überblick über die Karyotypevolution dieser Primatengruppe, zu gewinnen. Die Kenntnis über Vorkommen und Abfolge struktureller chromosomaler Umbauten, sowie über evolutionäre Veränderungen repetitiver Genomelemente stellte einen hervorragenden Ausgangspunkt dar, um deren Auswirkungen auf die nukleäre Topologie zu untersuchen. Die in dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen zur radialen Chromatinanordnung bei Neuweltaffen dienen gleichzeitig als Modellexperimente für weiterführende Studien zur vergleichenden Zellkernarchitektur bei Primaten insgesamt. Die Analyse der radialen Anordnung von Chromosomen, die durch komplexe evolutionäre Umbauten wie multiple Translokationen, Inversionen und reziproke Translokation rearrangiert wurden, mit dem Resultat das Chromosomensegmente unterschiedlicher Gendichte zusammengeführt wurden, verspricht einen Eindruck über den Grad der Konservierung der Chromosomenanordnung zu erhalten. Aufbauend auf diesen Experimenten versprechen detaillierte Studien mit BAC Klonen, in hoher Auflösung Aufschluss darüber zu geben, inwieweit eine evolutionäre Konservierung auch auf der Ebene subchromosomaler Regionen besteht. Relevante genomische Regionen wären einerseits molekular charakterisierte Bruchpunkt Regionen, sowie Regionen, die von segmentellen Duplikationen flankiert werden, als auch subtelomerische und Heterochromatin assoziierte Regionen. Eine evolutionäre Konservierung der nukleären Topologie von Chromosomen Territorien in verschiedenen Spezies mit divergenten Karyotypen würden weitere Anhaltspunkte für eine funktionell signifikante Rolle der höheren Ordnung von distinkten radialen Chromatin Arrangements geben.

Weiterhin versprechen Untersuchungen von zufälligen bzw. nicht-zufälligen Nachbarschaftsanordnungen von Chromosomen der Primaten, welche in evolutionäre Umbauten involviert sind, Aussagen darüber zu erhalten, in welchem Umfang eine evolutionäre Konservierung der nachbarschaftlichen Organisation von CT, sowie innerhalb von CT im Zellkern existiert. In diesem Zusammenhang könnte z.B. untersucht werden, ob Chromosomen bereits im evolutionär ursprünglichen Zustand eine bevorzugte nachbarschaftliche Anordnung ihrer Territorien im Zellkern zeigen. Sollte dies der Fall sein, könnte dies ein für evolutionäre Umbauten prädisponierender Faktor sein. Eine nicht zufällige

nachbarschaftliche Anordnung von CT könnte so die Art und Richtung der Chromosomen-evolution beeinflussen.

Erste Experimente hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel der menschlichen 13, 17 und 20 Territorien durchgeführt. Diese sollten Aufschluss geben, ob getrennte ancestrale Chromosomenformen, wie die menschlichen Chromosomen 13, 17 und 20 eine bevorzugte nachbarschaftliche Anordnung zeigen. Mittels visueller Inspektion wurde bei einem hohen Anteil der ausgewerteten Zellkerne eine enge nachbarschaftliche Anordnung von jeweils zwei heterologen CT festgestellt. Jedoch konnten mit den bestehenden Auswertungsmethoden keine objektiven Schlussfolgerungen getroffen werden. Durch die Analyse derartiger Nachbarschaftsanordnungen unter Verwendung von *chromosome painting* Sonden in Kombination mit Bruchpunkt flankierenden BAC Klonen könnten detaillierte Aussagen über die Zufälligkeit nachbarschaftlicher Anordnungen erhalten werden (siehe hierzu Abb. 6.1).

Abbildung 6.1: Illustration zufälliger und nicht-zufälliger nachbarschaftlicher Anordnungen von getrennten ancestralen Chromosomenformen im Zellkern, die in einer abgeleiteten Spezies transloziert sind. Durch Co-Hybridisierung Bruchpunkt flankierender BAC Klone zusammen mit *chromosome painting* Sonden könnte die Orientierung von CT festgestellt werden. Distanzmessungen zwischen diesen BAC Klonen würden Aussagen über die Zufälligkeit nachbarschaftlicher Anordnungen erlauben.



Mit der Untersuchung verschiedener Zelltypen einer Reihe von Spezies könnte die nukleäre Topologie von Genen untersucht werden, die einem zelltyp-spezifischen Expressionsmuster unterliegen. Mögliche Auswirkungen einer Zelltyp-spezifischen Genexpression wären wiederum mit der nukleären Organisation betroffener genomischer Regionen, sowie deren evolutionären Veränderungen zu korrelieren, mit dem Ziel schließlich einen Beitrag zum Verständnis der funktionellen Zellkernarchitektur wie auch der Genomevolution der Primaten zu leisten.

7 Literaturverzeichnis

- Alves G, Canavez F, Seuánez H, Fanning T (1995) Recently amplified satellite DNA in *Callithrix argentata* (primates, Platyrrhini). *Chromosome Res* 3: 207-13
- Armada JL, Barroso CM, Lima MM, Muniz JA, Seuánez HN (1987) Chromosome studies in *Alouatta belzebul*. *Am J Primatol* 13: 283-296
- Arnold N, Stanyon R, Jauch A, O'Brien P, Wienberg J (1996) Identification of complex chromosome rearrangements in the gibbon by fluorescent in situ hybridization (FISH) of a human chromosome 2q specific microlibrary, yeast artificial chromosomes, and reciprocal chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 74: 80-5
- Arrighi FE, Hsu TC (1971) Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-6
- Baldini A, Miller DA, Miller OJ, Ryder OA, Mitchell AR (1991a) A chimpanzee-derived chromosome-specific alpha satellite DNA sequence conserved between chimpanzee and human. *Chromosoma* 100: 156-61
- Baldini A, Miller DA, Shridhar V, Rocchi M, Miller OJ, Ward DC (1991b) Comparative mapping of a gorilla-derived alpha satellite DNA clone on great ape and human chromosomes. *Chromosoma* 101: 109-14
- Barros RM, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Rodrigues LR, Neusser M, de Oliveira EH, Wienberg J, Muniz JA, Rissino JD, Müller S (2003) Chromosomal studies in *Callicebus donacophilus pallelescens*, with classic and molecular cytogenetic approaches: multicolour FISH using human and *Saguinus oedipus* painting probes. *Chromosome Res* 11: 327-34
- Barroso CM, Schneider H, Schneider MP, Sampaio I, Harada H, Czelusniak J, Goodman M (1997) Update on the phylogenetic systematics of New World monkeys: Further evidence for placing the pygmy marmoset (*Cebuella*) within genus *Callithrix*. *Int J Primatology* 18: 651-674
- Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P (1998) Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 172-5
- Best RG, Diamond D, Crawford E, Grass FS, Janish C, Lear TL, Soenksen D, Szalay AA, Moore CM (1998) Baboon/human homologies examined by spectral karyotyping (SKY): a visual comparison. *Cytogenet Cell Genet* 82: 83-7
- Bickmore WA, Teague P (2002) Influences of chromosome size, gene density and nuclear position on the frequency of constitutional translocations in the human population. *Chromosome Res* 10: 707-15
- Bigoni F, Koehler U, Stanyon R, Ishida T, Wienberg J (1997a) Fluorescence in situ hybridization establishes homology between human and silvered leaf monkey chromosomes, reveals reciprocal translocations between chromosomes homologous to human Y/5, 1/9, and 6/16, and delineates an X1X2Y1Y2/X1X1X2X2 sex-chromosome system. *Am J Phys Anthropol* 102: 315-27
- Bigoni F, Stanyon R, Koehler U, Morescalchi AM, Wienberg J (1997b) Mapping homology between human and black and white colobine monkey chromosomes by fluorescent in situ hybridization. *Am J Primatol* 42: 289-98

- Bigoni F, Stanyon R, Wimmer R, Schempp W (2003) Chromosome painting shows that the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) has a derived karyotype and is phylogenetically nested within Asian Colobines. *Am J Primatol* 60: 85-93
- Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Saracoglu K, Fauth C, Müller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR, Cremer T (zur Publikation eingereicht) Complete 3D-maps of chromosome positions in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes demonstrate a chromosome size dependent, probabilistic arrangement
- Bonvicino CR, Lemos B, Seuánez HN (2001) Molecular phylogenetics of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini). A comparison with karyotypic data. *Chromosoma* 110: 241-6
- Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* 10: 211-9
- Bridger JM, Lichter P (1999) Analysis of mammalian interphase chromosomes by FISH and immunofluorescence. *Chromosome Structural Analysis*, ed. Bickmore WA: 103-123
- Bridger JM, Boyle S, Kill IR, Bickmore WA (2000) Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr Biol* 10: 149-52
- Brown KE, Baxter J, Graf D, Merckenschlager M, Fisher AG (1999) Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell* 3: 207-17
- Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J Mol Evol* 18: 225-39
- Brown SW (1966) Heterochromatin. *Science* 151: 417-25
- Canavez F, Alves G, Fanning TG, Seuánez HN (1996) Comparative karyology and evolution of the Amazonian *Callithrix* (Platyrrhini, Primates). *Chromosoma* 104: 348-57
- Canavez FC, Moreira MA, Ladasky JJ, Pissinatti A, Parham P, Seuánez HN (1999) Molecular phylogeny of new world primates (Platyrrhini) based on beta2-microglobulin DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 12: 74-82
- Cardone MF, Ventura M, Tempesta S, Rocchi M, Archidiacono N (2002) Analysis of chromosome conservation in *Lemur catta* studied by chromosome paints and BAC/PAC probes. *Chromosoma* 111: 348-56
- Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT, Telenius H, Pelmeur AH, Leversha MA, Glancy MT, Wood SL, Cook K, Dyson HM, et al. (1992) Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 29: 299-307
- Carter NP (1994) Cytogenetic analysis by chromosome painting. *Cytometry* 18: 2-10.
- Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L (1968) Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49: 219-22
- Cavalli G, Orlando V, Paro R (1999) Mapping DNA target sites of chromatin-associated proteins by formaldehyde cross-linking in *Drosophila* embryos. *Chromosome Structural Analysis*, ed. Bickmore, W. A.: 21-37
- Chaves R, Sampaio I, Schneider MP, Schneider H, Page SL, Goodman M (1999) The place of *Callimico goeldii* in the Callitrichine phylogenetic tree: evidence from von Willebrand factor gene intron II sequences. *Mol Phylogenet Evol* 13: 392-404

- Chevret E, Volpi EV, Sheer D (2000) Mini review: form and function in the human interphase chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 90: 13-21
- Chudoba I, Plesch A, Lorch T, Lemke J, Claussen U, Senger G (1999) High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84: 156-60
- Clemente IC, Ponsa M, Garcia M, Egozcue J (1990) Evolution of the Simiiformes and the phylogeny of human chromosomes. *Hum Genet* 84: 493-506
- Collins AC, Dubach JM (2001) Nuclear DNA variation in spider monkeys (*Ateles*). *Mol Phylogenet Evol* 19: 67-75
- Consiglière S, Stanyon R, Koehler U, Agoramorthy G, Wienberg J (1996) Chromosome painting defines genomic rearrangements between red howler monkey subspecies. *Chromosome Res* 4: 264-70.
- Consiglière S, Stanyon R, Koehler U, Arnold N, Wienberg J (1998) In situ hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between *Alouatta belzebul* (Platyrrhini, Cebidae) and other primates and reveals extensive interchromosomal rearrangements between howler monkey genomes. *Am J Primatol* 46: 119-33
- Cowell IG, Aucott R, Mahadevaiah SK, Burgoyne PS, Huskisson N, Bongiorno S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Wu R, Gilbert DM, Shi W, Fundele R, Morrison H, Jeppesen P, Singh PB (2002) Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma* 111: 22-36
- Cremer T, Landegent J, Bruckner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M (1986) Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 74: 346-52
- Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 80: 235-46
- Cremer T, Kreth G, Koester H, Fink RH, Heintzmann R, Cremer M, Solovei I, Zink D, Cremer C (2000) Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10: 179-212
- Cremer T und Cremer C (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2: 292-301
- Cremer M, von Hase J, Volm T, Brero A, Kreth G, Walter J, Fischer C, Solovei I, Cremer C, Cremer T (2001) Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res* 9: 541-67
- Cremer M, Kupper K, Wagler B, Wizelman L, von Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T (2003) Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 162: 809-20
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* 145: 1119-31

- Dauwerse JG, Wiegant J, Raap AK, Breuning MH, van Ommen GJ (1992) Multiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum Mol Genet* 1: 593-8
- de Oliveira EH, Neusser M, Figueiredo WB, Nagamachi C, Pieczarka JC, Sbalqueiro IJ, Wienberg J, Müller S (2002) The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, *Platyrrhini*): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. *Chromosome Res* 10: 669-83
- de Oliveira EH, Neusser M, Pieczarka JC, Nagamachi C, Sbalqueiro IJ, Müller S (im Druck) Phylogenetic inferences of Atelinae (*Platyrrhini*) based on multi-directional chromosome painting in *Brachyteles arachnoides*, *Ateles paniscus paniscus* and *Ateles b. marginatus*. *Cytogenet Genome Res*
- Dixkens C, Klett C, Bruch J, Kollak A, Serov OL, Zhdanova N, Vogel W, Hameister H (1998) ZOO-FISH analysis in insectivores: "Evolution extols the virtue of the status quo". *Cytogenet Cell Genet* 80: 61-7
- Dover G (2002) Molecular drive. *Trends Genet* 18: 587-9
- Dundr M, Misteli T (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356: 297-310
- Dutrillaux B, Lejeune J (1971) [A new technic of analysis of the human karyotype]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 272: 2638-40
- Dutrillaux B (1979) Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from *Microcebus murinus* (Prosimian) to man. *Hum Genet* 48: 251-314
- Dutrillaux B, Couturier J (1981) The ancestral karyotype of platyrrhine monkeys. *Cytogenet Cell Genet* 30: 232-42
- Fauth C, Zhang H, Harabacz S, Brown J, Saracoglu K, Lederer G, Rittinger O, Rost I, Eils R, Kearney L, Speicher MR (2001) A new strategy for the detection of subtelomeric rearrangements. *Hum Genet* 109: 576-83
- Ferguson-Smith MA (1997) Genetic analysis by chromosome sorting and painting: phylogenetic and diagnostic applications. *Eur J Hum Genet* 5: 253-65.
- Finelli P, Stanyon R, Plesker R, Ferguson-Smith MA, O'Brien PC, Wienberg J (1999) Reciprocal chromosome painting shows that the great difference in diploid number between human and African green monkey is mostly due to non-Robertsonian fissions. *Mamm Genome* 10: 713-8.
- Fleagle GF (1988) Primate adaptation and evolution. Academic Press, Inc. San Diego
- Ford SM (1986) Systematics of the New World monkeys. Alan R. Liss, New York
- Fröncke L, Chowdhary BP, Scherthan H, Gustavsson I (1996) A comparative map of the porcine and human genomes demonstrates ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. *Mamm Genome* 7: 285-90
- Fröncke L, Müller-Navia J, Romanakis K, Scherthan H (1997) Chromosomal homeologies between human, harbor seal (*Phoca vitulina*) and the putative ancestral carnivore karyotype revealed by Zoo-FISH. *Chromosoma* 106: 108-13
- Fröncke L, Wienberg J, Stone G, Adams L, Stanyon R (2003) Towards the delineation of the ancestral eutherian genome organization: comparative genome maps of human and the African elephant (*Loxodonta africana*) generated by chromosome painting. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 1331-40

- Fröncke L (2004, im Druck) Origins of Primate Chromosomes-as delineated by Zoo-FISH and Alignments of Human and Mouse Draft Genome Sequences. *Cytogenet Genome Res*
- Gallimore PH, Richardson CR (1973) An improved banding technique exemplified in the karyotype analysis of two strains of rat. *Chromosoma* 41: 259-63
- Garcia F, Nogues C, Ponsa M, Ruiz-Herrera A, Egozcue J, Garcia Caldes M (2000) Chromosomal homologies between humans and *Cebus apella* (Primates) revealed by ZOO-FISH. *Mamm Genome* 11: 399-401
- Garcia F, Ruiz-Herrera A, Egozcue J, Ponsa M, Garcia M (2002) Chromosomal homologies between *Cebus* and *Ateles* (primates) based on ZOO-FISH and G-banding comparisons. *Am J Primatol* 57: 177-88
- Gerlich D, Beaudouin J, Kalbfuss B, Daigle N, Eils R, Ellenberg J (2003) Global chromosome positions are transmitted through mitosis in mammalian cells. *Cell* 112: 751-64
- Gilbert N, Boyle S, Sutherland H, de Las Heras J, Allan J, Jenuwein T, Bickmore WA (2003) Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *Embo J* 22: 5540-50
- Gonzalez IL, Sylvester JE, Smith TF, Stambolian D, Schmickel RD (1990) Ribosomal RNA gene sequences and hominoid phylogeny. *Mol Biol Evol* 7: 203-19
- Goodman M (1962) Evolution of the immunologic species specificity of human serum proteins. *Hum Biol* 34: 101-105
- Goodman M, Porter CA, Czelusniak J, Page SL, Schneider H, Shoshani J, Gunnell G, Groves CP (1998) Toward a phylogenetic classification of Primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. *Mol Phylogenet Evol* 9: 585-98
- Goureau A, Yerle M, Schmitz A, Riquet J, Milan D, Pinton P, Frelat G, Gellin J (1996) Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. *Genomics* 36: 252-62
- Gray JW, Langlois G, Carrano AV, Burkhart-Schulz K, van Dilla MA (1979) High resolution chromosome analysis: one or two parameter flow cytometry. *Chromosoma* 73: 9-27
- Gregorin R (1996) *Variação Geográfica e Taxonomia das Espécies Brasileiras do gênero Alouatta Lacépède 1799 (Primates, Atelidae)*. Universidade de São Paulo, SP, Brazil.
- Grewal SI, Elgin SC (2002) Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev* 12: 178-87
- Groves CP (1993) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC
- Guan XY, Trent JM, Meltzer PS (1993) Generation of band-specific painting probes from a single microdissected chromosome. *Hum Mol Genet* 2: 1117-21
- Habermann FA, Cremer M, Walter J, Kreth G, von Hase J, Bauer K, Wienberg J, Cremer C, Cremer T, Solovei I (2001) Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome Res* 9: 569-84
- Hameister H, Klett C, Bruch J, Dixkens C, Vogel W, Christensen K (1997) Zoo-FISH analysis: the American mink (*Mustela vison*) closely resembles the cat karyotype. *Chromosome Res* 5: 5-11
- Harada ML, Schneider H, Schneider MP, Sampaio I, Czelusniak J, Goodman M (1995) DNA evidence on the phylogenetic systematics of New World monkeys: support for the

- sister-grouping of *Cebus* and *Saimiri* from two unlinked nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol* 4: 331-49
- Hayasaka K, Gojobori T, Horai S (1988) Molecular phylogeny and evolution of primate mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 5: 626-44
- Hayes H (1995) Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 71: 168-74
- Henegariu O, Heerema NA, Bray-Ward P, Ward DC (1999) Colour-changing karyotyping: an alternative to M-FISH/SKY. *Nat Genet* 23: 263-4
- Henegariu O, Bray-Ward P, Ward DC (2000) Custom fluorescent-nucleotide synthesis as an alternative method for nucleic acid labeling. *Nat Biotechnol* 18: 345-8
- Hennig W (1999) Heterochromatin. *Chromosoma* 108: 1-9
- Hershkovitz P (1977) Living New World monkeys (Platyrrhini). The University of Chicago Press, Chicago
- Hershkovitz P (1990) Titis, New World monkeys of the genus *Callicebus* (Cebidae, Platyrrhini): A primary taxonomic review. *Field Zool, N.s.* 55: 1-109
- Hill WC (1959) The anatomy of *Callimico goeldii* (Thomas). *Trans Am Phil Soc* 49:1-116.
- Hollatz M (2002) Untersuchungen zur chromosomalen Phylogenie und Genomevolution bei Gibbons. Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians Universität München, Geschäftsstelle Humangenetik
- Hopman AH, Wiegant J, Raap AK, Landegent JE, van der Ploeg M, van Duijn P (1986) Bi-color detection of two target DNAs by non-radioactive in situ hybridization. *Histochemistry* 85: 1-4
- Horovitz I, Meyer A (1995) Systematics of New World monkeys (Platyrrhini, Primates) based on 16S mitochondrial DNA sequences: a comparative analysis of different weighting methods in cladistic analysis. *Mol Phylogenet Evol* 4: 448-56
- Hsu TC (1975) A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. *Genetics* 79: 137-150
- Hugot JP (1998) Phylogeny of neotropical monkeys: the interplay of morphological, molecular, and parasitological data. *Mol Phylogenet Evol* 9: 408-13
- Jauch A, Wienberg J, Stanyon R, Arnold N, Tofanelli S, Ishida T, Cremer T (1992) Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8611-5
- 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: 818-21
- Karpen GH und Allshire RC (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet* 13: 489-96
- Kay RF (1990) The phyletic relationships of extant and fossil Pitheciinae (Platyrrhini, Anthropoidea). *J Hum Evol* 19: 175-208
- King M (1993) Species evolution. The Role of chromosome change. Cambridge University Press, Cambridge

- Koehler U, Arnold N, Wienberg J, Tofanelli S, Stanyon R (1995a) Genomic reorganization and disrupted chromosomal synteny in the siamang (*Hylobates syndactylus*) revealed by fluorescence in situ hybridization. *Am J Phys Anthropol* 97: 37-47
- Koehler U, Bigoni F, Wienberg J, Stanyon R (1995b) Genomic reorganization in the concolor gibbon (*Hylobates concolor*) revealed by chromosome painting. *Genomics* 30: 287-92
- Koiffmann CP (1977) Variabilidade cromossômica na família Cebidae (Platyrrhini, Primates). Dissertation am "Instituto de Biologia", São Paulo, Brasilien
- Koss LG (1998) Characteristics of chromosomes in polarized normal human bronchial cells provide a blueprint for nuclear organization. *Cytogenet Cell Genet* 82: 230-7
- Kozubek S, Lukasova E, Jirsova P, Koutna I, Kozubek M, Ganova A, Bartova E, Falk M, Pasekova R (2002) 3D Structure of the human genome: order in randomness. *Chromosoma* 111: 321-31
- Lachner M und Jenuwein T (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 286-98
- Lamond AI, Earnshaw WC (1998) Structure and function in the nucleus. *Science* 280: 547-53
- Landegent JE, Jansen in de Wal N, van Ommen GJ, Baas F, de Vijlder JJ, van Duijn P, Van der Ploeg M (1985) Chromosomal localization of a unique gene by non-autoradiographic in situ hybridization. *Nature* 317: 175-7
- Lau YF, Arrighi FE (1976) Studies of the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*, genome. I. Cytological characterization of chromosomal heterozygosity. *Cytogenet Cell Genet* 17: 51-60
- Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ (1994) *In situ*-Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Lengauer C, Eckelt A, Weith A, Endlich N, Ponielies N, Lichter P, Greulich KO, Cremer T (1991) Painting of defined chromosomal regions by in situ suppression hybridization of libraries from laser-microdissected chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 56: 27-30
- Lengauer C, Speicher MR, Popp S, Jauch A, Taniwaki M, Nagaraja R, Riethman HC, Donis-Keller H, D'Urso M, Schlessinger D, et al. (1993) Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum Mol Genet* 2: 505-12.
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80: 224-34
- Lima MM und Seuánez HN (1989) Cytogenetic characterization of *Alouatta belzebul* with atypical pelage coloration. *Folia Primatol (Basel)* 52: 97-101
- Lima MM, Sampaio MI, Schneider MP, Scheffran W, Schneider A, Salzano FM (1990) Chromosome and protein variation in red howler monkeys. *Rev Brazil Genet* 13: 789-802
- Lima MM und Seuánez HN (1991) Chromosome studies in the red howler monkey, *Alouatta seniculus stramineus* (Platyrrhini, Primates): description of an X1X2Y1Y2/X1X1X2X2 sex-chromosome system and karyological comparisons with other subspecies. *Cytogenet Cell Genet* 57: 151-6
- Lin MS, Comings DE, Alfi OS (1977) Optical Studies of the interaction of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 60: 15-25

- Ma D, Jones TC, Thoringhton RW, Miller A, Morgan L (1975) Y-autosome translocation in the howler monkeys, *Alouatta palliata*. *J Med Primatol* 4: 299-307
- Ma NS, Elliott MW, Morgan L, Miller A, Jones TC (1976) Translocation of Y chromosome to an autosome in the Bolivian owl monkey, *Aotus*. *Am J Phys Anthropol* 45: 191-202
- Ma NS, Simeone T, McLean J, Parham P (1982) Chromosome localization and gene synteny of the major histocompatibility complex in the owl monkey, *Aotus*. *Immunogenetics* 15: 1-16
- Martin DE (1990) Primate origins and evolution. University Press, Cambridge
- Medeiros MA, Barros RM, Pieczarka JC, Nagamachi CY, Ponsa M, Garcia M, Garcia F, Egozcue J (1997) Radiation and speciation of spider monkeys, genus *Ateles*, from the cytogenetic viewpoint. *Am J Primatol* 42: 167-78
- Meireles CM, Czelusniak J, Schneider MP, Muniz JA, Brigido MC, Ferreira HS, Goodman M (1999) Molecular phylogeny of ateline new world monkeys (Platyrrhini, atelinae) based on gamma-globin gene sequences: evidence that brachyteles is the sister group of lagothrix. *Mol Phylogenet Evol* 12: 10-30
- Miller CK, Miller DA, Miller OJ, Tantravahi R, Reese RT (1977) Banded chromosomes of the owl monkey, *Aotus trivirgatus*. *Cytogenet Cell Genet* 19: 215-26
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16: 1215
- Minezawa M, Harada M, Jordan OC, Valdivia Borda CJ (1985) Cytogenetics of Bolivian endemic red howler monkeys (*Alouatta seniculus sara*): Accessory chromosome and Y-autosome translocation related numerical variations. *Kyoto Univ Overseas Res Rep of New World Monkeys* 5: 7-16
- Mittermeier RA, Coimbra-Filho AF (1981) Systematics: Species and subspecies. Academia Brasileira de Ciencias, Rio de Janeiro
- Mittermeier RA, Rylands AB, Coimbra-Filho AF (1988) Systematics: Species and subspecies-an update. World Wild Life Fund, Washington, D.C.
- Miyamoto MM, Slightom JL, Goodman M (1987) Phylogenetic relations of humans and African apes from DNA sequences in the psi eta-globin region. *Science* 238: 369-73
- Moir RD und Spann TP (2001) The structure and function of nuclear lamins: implications for disease. *Cell Mol Life Sci* 58: 1748-57
- Moore CM, Harris CP, Abee CR (1990) Distribution of chromosomal polymorphisms in three subspecies of squirrel monkeys (genus *Saimiri*). *Cytogenet Cell Genet* 53: 118-22
- Moreira MA (2002) SRY evolution in Cebidae (Platyrrhini: Primates). *J Mol Evol* 55: 92-103
- Morescalchi MA, Schempp W, Consiglière S, Bigoni F, Wienberg J, Stanyon R (1997) Mapping chromosomal homology between humans and the black-handed spider monkey by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 5: 527-36
- Moura-Pensin C, Pieczarka JC, Nagamachi CY, Muniz JA, Brigido MC, Pissinati A, Marinho A, Barros RM (2001) Cytogenetic relationship among the genera of subfamily Pitheciinae (Cebidae, Primates). *Caryologia* 54: 385-391
- Mudry MD, Rahn M, Gorostiaga M, Hick A, Merani MS, Solari AJ (1998) Revised karyotype of *Alouatta caraya* (Primates: Platyrrhini) based on synaptonemal complex and banding analyses. *Hereditas* 128: 9-16

- Müller S, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J (1997a) Reciprocal chromosome painting between human and prosimians (*Eulemur macaco macaco* and *E. fulvus mayottensis*). *Cytogenet Cell Genet* 78: 260-71
- Müller S, Rocchi M, Ferguson-Smith MA, Wienberg J (1997b) Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 100: 271-8
- Müller S, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J (1998) Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* 33: 445-52
- Müller S, Stanyon R, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Plesker R, Wienberg J (1999) Defining the ancestral karyotype of all primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans. *Chromosoma* 108: 393-400
- Müller S, Neusser M, O'Brien PC, Wienberg J (2001) Molecular cytogenetic characterization of the EBV-producing cell line B95-8 (*Saguinus oedipus*, Platyrrhini) by chromosome sorting and painting. *Chromosome Res* 9: 689-93
- Müller S und Wienberg J (2001) "Bar-coding" primate chromosomes: molecular cytogenetic screening for the ancestral hominoid karyotype. *Hum Genet* 109: 85-94
- Müller S, Neusser M, Wienberg J (2002) Towards unlimited colors for fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Chromosome Res* 10: 223-32
- Müller S, Hollatz M, Wienberg J (2003) Chromosomal phylogeny and evolution of gibbons (Hylobatidae). *Hum Genet* 113: 493-501
- Müller S, Eder V, Wienberg J (2004) A nonredundant multicolor bar code as a screening tool for rearrangements in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 39: 59-70
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Barros RM (1992) Karyotypic comparison among *Cebuella pygmaea*, *Callithrix jacchus* and *C. emiliae* (Callitrichidae, Primates) and its taxonomic implications. *Genetica* 85: 249-57
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Schwarz M, Barros RM, Mattevi MS (1997) Chromosomal similarities and differences between tamarins, *Leontopithecus* and *Saguinus* (Platyrrhini, Primates). *Am J Primatol* 43: 265-76
- Nagele R, Freeman T, McMorrow L, Lee HY (1995) Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. *Science* 270: 1831-5
- Nagele RG, Freeman T, Fazekas J, Lee KM, Thomson Z, Lee HY (1998) Chromosome spatial order in human cells: evidence for early origin and faithful propagation. *Chromosoma* 107: 330-8
- Nagele RG, Freeman T, McMorrow L, Thomson Z, Kitson-Wind K, Lee H (1999) Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 4): 525-35
- Napier JR (1967) Evolutionary aspects of primate locomotion. *Am J Phys Anthropol* 27: 333-41
- Nash WG, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Menninger JC, O'Brien SJ (1998) Comparative genomics: tracking chromosome evolution in the family ursidae using reciprocal chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 83: 182-92
- Natori M (1994) Craniometral variation among Eastern Brazilian marmosets and their systematic relationships. *Primates* 35: 167-176

- Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK (1989) Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 10: 20-7
- Neusser M (1999) Molekular zytogenetische Untersuchung zur Chromosomenevolution bei Neuweltaffen. Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians Universität München
- Neusser M, Stanyon R, Bigoni F, Wienberg J, Müller S (2001) Molecular cytotaxonomy of New World monkeys (Platyrrhini) - comparative analysis of five species by multi-color chromosome painting gives evidence for a classification of *Callimico goeldii* within the family of Callitrichidae. *Cytogenet Cell Genet* 94: 206-15
- Neusser M, Münch M, Anzenberger G, Müller S (im Druck) Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* x *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and Comparative Genomic Hybridization. *Cytogenet Genome Res*
- Nevo E (2000) Speciation: Chromosomal Mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Reference Ltd., London, pp 1-11
- Nie W, Liu R, Chen Y, Wang J, Yang F (1998) Mapping chromosomal homologies between humans and two langurs (*Semnopithecus francoisi* and *S. phayrei*) by chromosome painting. *Chromosome Res* 6: 447-53
- Nie W, Rens W, Wang J, Yang F (2001) Conserved chromosome segments in *Hylobates hoolock* revealed by human and *H. leucogenys* paint probes. *Cytogenet Cell Genet* 92: 248-53
- O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Nash WG, Wienberg J, Stanyon R, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, Marshall Graves JA (1999) The promise of comparative genomics in mammals. *Science* 286: 458-62, 479-81
- Parada LA, McQueen PG, Munson PJ, Misteli T (2002) Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. *Curr Biol* 12: 1692-7
- Pastorini J, Forstner MR, Martin RD, Melnick DJ (1998) A reexamination of the phylogenetic position of *Callimico* (primates) incorporating new mitochondrial DNA sequence data. *J Mol Evol* 47: 32-41
- Pennisi E (2003) Evolution. Chimpanzee genome draft online. *Science* 302: 1876
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107: 323-37
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J (1988) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9138-42
- Ponsa M, Garcia M, Borrell A, Garcia F, Egozcue J, Gorostiaga MA, Delprat A, Mudry M (1995) Heterochromatin and cytogenetic polymorphisms in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini). *Am J Primatol* 37: 325-331
- Popp S, Scholl HP, Loos P, Jauch A, Stelzer E, Cremer C, Cremer T (1990) Distribution of chromosome 18 and X centric heterochromatin in the interphase nucleus of cultured human cells. *Exp Cell Res* 189: 1-12

- Porter CA, Czelusniak J, Schneider H, Schneider MP, Sampaio I, Goodman M (1997) Sequences of the primate epsilon-globin gene: implications for systematics of the marmosets and other New World primates. *Gene* 205: 59-71
- Porter CA, Czelusniak J, Schneider H, Schneider MP, Sampaio I, Goodman M (1999) Sequences from the 5' flanking region of the epsilon-globin gene support the relationship of *Callicebus* with the pitheciins. *Am J Primatol* 48: 69-75
- Portman OW, Alexander M, Tanaka N, Osuga T (1980) Relationships between cholesterol gallstones, biliary function, and plasma lipoproteins in squirrel monkeys. *J Lab Clin Med* 96: 90-101
- Rahn MI, Mudry M, Merani MS, Solari AJ (1996) Meiotic behavior of the X1X2Y1Y2 quadrivalent of the primate *Alouatta caraya*. *Chromosome Res* 4: 350-6
- Raudsepp T, Fröncke L, Scherthan H, Gustavsson I, Chowdhary BP (1996) Zoo-FISH delineates conserved chromosomal segments in horse and man. *Chromosome Res* 4: 218-25
- Rettenberger G, Klett C, Zechner U, Bruch J, Just W, Vogel W, Hameister H (1995a) ZOO-FISH analysis: cat and human karyotypes closely resemble the putative ancestral mammalian karyotype. *Chromosome Res* 3: 479-86
- Rettenberger G, Klett C, Zechner U, Kunz J, Vogel W, Hameister H (1995b) Visualization of the conservation of synteny between humans and pigs by heterologous chromosomal painting. *Genomics* 26: 372-8
- Richard F, Lombard M, Dutrillaux B (1996) ZOO-FISH suggests a complete homology between human and capuchin monkey (*Platyrrhini*) euchromatin. *Genomics* 36: 417-23
- Richard F, Lombard M, Dutrillaux B (2000) Phylogenetic origin of human chromosomes 7, 16, and 19 and their homologs in placental mammals. *Genome Res* 10: 644-51
- Ried T, Baldini A, Rand TC, Ward DC (1992) Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1388-92.
- Roberts I, Wienberg J, Nacheva E, Grace C, Griffin D, Coleman N (1999) Novel method for the production of multiple colour chromosome paints for use in karyotyping by fluorescence in situ hybridisation. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 241-50
- Rokas A, Holland PW (2000) Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 454-459
- Rosenberger AL (1981) The higher taxa. *Academia Brasileira de Ciencias*, Rio de Janeiro
- Rosenberger AL (1984) Fossil New World Monkeys Dispute the Molecular Clock. *J Hum Evol* 13: 737-742
- Ruddle FH (1981) A new era in mammalian gene mapping: somatic cell genetics and recombinant DNA methodologies. *Nature* 294: 115-20
- Rylands AB, Schneider H, Langguth A, Mittermeier RA, Groves CP, Rodrigues LR An Assessment of the Diversity of New World Primates Primate Taxonomy for the New Millennium, Disney Institute, Orlando, Florida 2000. *Neotropical Primates*, pp 62-93
- Sachs L (2002) *Angewandte Statistik*. Springer-Verlag, Berlin

- Sadoni N, Langer S, Fauth C, Bernardi G, Cremer T, Turner BM, Zink D (1999) Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J. Cell Biol.* 146: 1211-26
- Saracoglu K, Brown J, Kearney L, Uhrig S, Azofeifa J, Fauth C, Speicher MR, Eils R (2001) New concepts to improve resolution and sensitivity of molecular cytogenetic diagnostics by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 44: 7-15
- Sarich VM, Wilson AC (1966) Quantitative immunochemistry and the evolution of primate albumins: micro-complement fixation. *Science* 154: 1563-6
- Scammell JG, Wright JL, Tuck-Muller CM (2001) The origin of four squirrel monkey cell lines established by karyotype analysis. *Cytogenet Cell Genet* 93: 263-4
- Schermelleh L, Solovei I, Zink D, Cremer T (2001) Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells. *Chromosome Res.* 9: 77-80
- Scherthan H, Cremer T, Arnason U, Weier HU, Lima-de-Faria A, Frönicke L (1994) Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. *Nat Genet* 6: 342-7.
- Schneider H, Sampaio I, Harada ML, Barroso CM, Schneider MP, Czelusniak J, Goodman M (1996) Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, primates) based on two unlinked nuclear genes: IRBP intron 1 and epsilon-globin sequences. *Am J Phys Anthropol* 100: 153-79
- Schneider H (2000) The current status of the New World monkey phylogeny. *An Acad Bras Cienc* 72: 165-72
- Schneider H, Canavez FC, Sampaio I, Moreira MA, Tagliaro CH, Seuánez HN (2001) Can molecular data place each neotropical monkey in its own branch? *Chromosoma* 109: 515-23
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-7.
- Schwarzacher T, Heslop-Harrison P (2000) Practical *in situ* Hybridization. BIOS Scientific Publishers: 140-142
- Seuánez HN (1979) The phylogeny of human chromosomes. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Seuánez HN, Forman L, Matayoshi T, Fanning TG (1989) The *Callimico goeldii* (Primates, Platyrrhini) genome: karyology and middle repetitive (LINE-1) DNA sequences. *Chromosoma* 98: 389-95
- Seuánez HN, Alves G, Lima MMC, de Souza Barroso R, Barroso CM, Muniz JA (1992) Chromosome studies in *Chiropotes satanas utahicki* Hershkovitz 1985 (Cebidae, Platyrrhini): Comparison with *Chiropotes satanas chiropotes*. *Am J Primatol* 28: 213-222
- Seuánez HN (im Druck) The primates of the Neotropics: Genomes and chromosomes. Cytogenetic and Genome Research
- Sherlock JK, Griffin DK, Delhanty JD, Parrington JM (1996) Homologies between human and marmoset (*Callithrix jacchus*) chromosomes revealed by comparative chromosome painting. *Genomics* 33: 214-9

- Sibley CG und Ahlquist JE (1984) The phylogeny of the hominoid primates, as indicated by DNA-DNA hybridization. *J Mol Evol* 20: 2-15
- Simons EL (1972) Primate evolution. An introduction to man's place in nature. Macmillan, New York
- Sims RJ, 3rd, Nishioka K, Reinberg D (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 19: 629-39
- Singer SS, Schmitz J, Schwiegk C, Zischler H (2003) Molecular cladistic markers in New World monkey phylogeny (Platyrrhini, Primates). *Mol Phylogenet Evol* 26: 490-501
- Solinas-Toldo S, Lengauer C, Fries R (1995) Comparative genome map of human and cattle. *Genomics* 27: 489-96
- Solovei I, Cavallo A, Schermelleh L, Jaunin F, Scasselati C, Cmarko D, Cremer C, Fakan S, Cremer T (2002a) Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Exp Cell Res* 276: 10-23
- Solovei I, Walter J, Cremer M, Habermann F, Schermelleh L, Cremer T (2002b) FISH on three-dimensionally preserved nuclei. In: Squire J (ed) *FISH: a practical approach*, chapter 7. Oxford University Press, Oxford, pp 119-157
- Sorci G, Morand S, Hugot JP (1997) Host-parasite coevolution: comparative evidence for covariation of life history traits in primates and oxyurid parasites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 264: 285-9
- Spector DL (2001) Nuclear domains. *J Cell Sci* 114: 2891-3
- Spector DL (2003) The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* 72: 573-608
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-75
- Stanyon R, Ardito G, Lamberti L, Bigatti P (1983) The banded karyotypes of *Macaca fuscata* compared with *Cercocebus aterrimus*. *Folia Primatol (Basel)* 41: 137-46
- Stanyon R, Wienberg J, Romagno D, Bigoni F, Jauch A, Cremer T (1992) Molecular and classical cytogenetic analyses demonstrate an apomorphic reciprocal chromosomal translocation in *Gorilla gorilla*. *Am J Phys Anthropol* 88: 245-50
- Stanyon R, Consiglière S, Müller S, Morescalchi A, Neusser M, Wienberg J (2000) Fluorescence in situ hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between the dusky titi and squirrel monkey. *Am J Primatol* 50: 95-107
- Stanyon R, Consiglière S, Bigoni F, Ferguson-Smith M, O'Brien PC, Wienberg J (2001) Reciprocal chromosome painting between a New World primate, the woolly monkey, and humans. *Chromosome Res* 9: 97-106
- Stanyon R, Koehler U, Consiglière S (2002) Chromosome painting reveals that galagos have highly derived karyotypes. *Am J Phys Anthropol* 117: 319-26
- Stanyon R, Bonvicino CR, Svartman M, Seuánez HN (2003a) Chromosome painting in *Callicebus lugens*, the species with the lowest diploid number (2n=16) known in primates. *Chromosoma* 112: 201-6
- Stanyon R, Stone G, Garcia M, Frönicke L (2003b) Reciprocal chromosome painting shows that squirrels, unlike murid rodents, have a highly conserved genome organization. *Genomics* 82: 245-9

- Sun HB, Shen J, Yokota H (2000) Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J* 79: 184-90
- Swofford D (1998) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Tanabe H, Habermann FA, Solovei I, Cremer M, Cremer T (2002a) Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res* 504: 37-45
- Tanabe H, Müller S, Neusser M, von Hase J, Calcagno E, Cremer M, Solovei I, Cremer C, Cremer T (2002b) Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4424-9
- Tanabe H, Küpper K, Ishida T, Neusser M, Mizusawa H (im Druck) Inter- and intra-specific gene-density correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. *Cytogenet Genome Res*
- Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J (1999) New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: COMBined Binary RATIO labelling. *Eur J Hum Genet* 7: 2-11
- Telenius H, Pelmeur AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjöld M, Pfragner R, Ponder BA (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 257-63
- Toder R, Xia Y, Bausch E (1998) Interspecies comparative genome hybridization and interspecies representational difference analysis reveal gross DNA differences between humans and great apes. *Chromosome Res* 6: 487-94
- Toder R, Grutzner F, Haaf T, Bausch E (2001) Species-specific evolution of repeated DNA sequences in great apes. *Chromosome Res* 9: 431-5
- van Roosmalen MGM, van Roosmalen T, Mittermeier RA (2002) Taxonomic review of the titi monkey, genus *Callicebus*, Thomas, 1903, with the description of the two new species, *Callicebus bernhardi* and *Callicebus stephennashi*, from Brazilian Amazonia. *Neotropical Primates* 10: 1-52
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-51
- Viegas Pequignot E, Koiffmann CP, Dutrillaux B (1985) Chromosomal phylogeny of *Lagothrix*, *Brachyteles*, and *Cacajao*. *Cytogenet Cell Genet* 39: 99-104
- Volleth M, Heller KG, Pfeiffer RA, Hameister H (2002) A comparative ZOO-FISH analysis in bats elucidates the phylogenetic relationships between Megachiroptera and five microchiropteran families. *Chromosome Res* 10: 477-97
- von Dornum M, Ruvolo M (1999) Phylogenetic relationships of the New World monkeys (Primates, platyrrhini) based on nuclear G6PD DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 11: 459-76
- Walter J, Schermelleh L, Cremer M, Tashiro S, Cremer T (2003) Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages. *J Cell Biol* 160: 685-97
- Waye JS, Durfy SJ, Pinkel D, Kenwrick S, Patterson M, Davies KE, Willard HF (1987) Chromosome-specific alpha satellite DNA from human chromosome 1: hierarchical

- structure and genomic organization of a polymorphic domain spanning several hundred kilobase pairs of centromeric DNA. *Genomics* 1: 43-51
- Weierich C, Brero A, Stein S, von Hase J, Cremer C, Cremer T, Solovei I (2003) Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Res* 11: 485-502
- Weimer J, Kiechle M, Senger G, Wiedemann U, Ovens-Raeder A, Schuierer S, Kautza M, Siebert R, Arnold N (1999) An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. *Chromosome Res* 7: 355-62
- Weimer J, Kiechle M, Arnold N (2000) FISH-microdissection (FISH-MD) analysis of complex chromosome rearrangements. *Cytogenet Cell Genet* 88: 114-8
- Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2000) Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24: 1016-9
- Wienberg J, Jauch A, Stanyon R, Cremer T (1990) Molecular cytogenetics of primates by chromosomal in situ suppression hybridization. *Genomics* 8: 347-50
- Wienberg J, Stanyon R, Jauch A, Cremer T (1992) Homologies in human and *Macaca fuscata* chromosomes revealed by in situ suppression hybridization with human chromosome specific DNA libraries. *Chromosoma* 101: 265-70
- Wienberg J, Stanyon R (1995) Chromosome painting in mammals as an approach to comparative genomics. *Curr Opin Genet Dev* 5: 792-7
- Wienberg J, Stanyon R, Nash WG, O'Brien PC, Yang F, O'Brien SJ, Ferguson-Smith MA (1997) Conservation of human vs. feline genome organization revealed by reciprocal chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 77: 211-7
- Wienberg J und Stanyon R (1998) Comparative Chromosome Painting of Primate Genomes. *Ilar J* 39: 77-91
- Wienberg J, Fröncke L, Stanyon R (2000) Insights into mammalian genome organization and evolution by molecular cytogenetics. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, NL
- Wildman DE, Uddin M, Liu G, Grossman LI, Goodman M (2003) Implications of natural selection in shaping 99.4% nonsynonymous DNA identity between humans and chimpanzees: enlarging genus *Homo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7181-8
- Yang F, Alkalaeva EZ, Perelman PL, Pardini AT, Harrison WR, O'Brien PC, Fu B, Graphodatsky AS, Ferguson-Smith MA, Robinson TJ (2003) Reciprocal chromosome painting among human, aardvark, and elephant (superorder Afrotheria) reveals the likely eutherian ancestral karyotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1062-6
- Yang F, Carter NP, Shi L, Ferguson-Smith MA (1995) A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* 103: 642-52
- Yang F, Graphodatsky AS, O'Brien PC, Colabella A, Solanky N, Squire M, Sargan DR, Ferguson-Smith MA (2000) Reciprocal chromosome painting illuminates the history of genome evolution of the domestic cat, dog and human. *Chromosome Res* 8: 393-404
- Yu D, Yang F, Liu R (1997) A comparative chromosome map between human and *Hylobates hoolock* built by chromosome painting. *Yi Chuan Xue Bao* 24: 417-23.
- Yunis EJ, Torres de Caballero OM, Ramirez C, Ramirez ZE (1976) Chromosomal variations in the primate *Alouatta seniculus seniculus*. *Folia Primatol* 25: 215-24

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

8.1.1 Chemikalien und Medien

BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxyd
PBS	Phosphatpuffer (Phosphat-Buffered-Saline)
PHA	Phytohämagglutinin
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute (Nährmedium)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (Sodium-Saline-Citrate)
AP	Alkalische Phosphatase
Taq	Thermus aquaticus
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propandiol
Triton-x-100	Octylphenoldecaethylenglycolether
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-Sorbitanmonolaureat

8.1.2 Nukleinsäuren

DNA	Desoxyribonukleinsäure
-----	------------------------

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat

8.1.3 Maßeinheiten

°C	Grad Celcius
g	Gramm oder Fallbeschleunigung (ca. 9,81m/s ²)
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm (10 ⁻³ g)
mM	Millimolar (10 ⁻³ M)
Min.	Minute(n)
Mio.	Million
ml	Milliliter (10 ⁻³ l)
ng	Nanogramm
Sek.	Sekunde(n)
U	Units
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8.1.4 Sonstiges

Abb.	Abbildung
BAC	Bacterial artificial chromosome
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CCD	charge coupled devise
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope

DOP-PCR	Degenerate oligonucleotide primed PCR
et al.	et alteres
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
PCR	Polymerasekettenreaktion
RGB	Rot-Grün-Blau
RT	Raumtemperatur
THG	telomeric bands by heating using Giemsa
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
u.a.	und andere
UF	Unterfamilie
md	Mikrodissektion
vs	versus
vgl	Vergleich

9 Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen

Die molekular-zytogenetische Untersuchung der Neuweltaffen Spezies *Callicebus donacophilus*, *Saimiri ustus*, *Saimiri boliviensis*, *Leontopithecus chrysopygus*, *Saguinus imperator*, *Cacajao calvus*, *Aotus infulatus*, *Alouatta fusca fusca*, *Alouatta fusca clamitans*, *Alouatta seniculus macconnelli*, *Alouatta caraya*, *Ateles belzebul marginatus*, *Ateles paniscus paniscus*, *Cebus apella paraguayanus*, *Cebus albifrons*, *Lagothrix lagothricha*, *Brachyteles arachnoides* und *Callithrix penicillata* mittels *cross species chromosome painting* wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Pieczarka (Laboratório de Citogenética, Depto de Genética, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasilien) unter Beteiligung von Dr. E. H. de Oliveira, Prof. Dr. C. Y. Nagamachi, Prof. R.M.S.Barros und Prof. Dr. J. C. Pieczarka durchgeführt.

Die molekular-zytogenetische Charakterisierung der *Cebuella pygmaea* x *Callithrix jacchus* Inter-Spezies Hybrid Individuen wurde in Zusammenarbeit mit Dipl. biol. M. Münch und Dr. G. Anzenberger (Anthropologisches Institut und Museum, Universität Zürich-Irchel, Schweiz) durchgeführt.

Die vergleichende Karyotypanalyse der Neuweltaffen Spezies *Callithrix jacchus*, *Callithrix argentata*, *Cebuella pygmaea*, *Saguinus oedipus*, *Callimico goeldii* wurde durch eine Kooperation mit Dr. Roscoe Stanyon (Comparative Molecular Cytogenetics Core, Genetics Branch, National Cancer Institute, Frederick, USA) ermöglicht.

10 Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Johannes Wienberg, der diese Arbeit wissenschaftlich betreute, für sein Vertrauen, seine fachliche und freundschaftliche Unterstützung und vor allem seinem ungebrochenen Optimismus und die Begeisterung, die er mir entgegenbrachte.

Zu herzlichem Dank bin ich Prof. Dr. Thomas Cremer verbunden, für seine große Offenheit, sein Vertrauen und fachlichen Rat mit dem er meine Arbeit unterstützte, besonders aber auch für seine freundschaftliche und herzliche Umgangsweise, die eine optimale Arbeitsatmosphäre schuf.

Mein tiefster Dank gilt Dr. Stefan Müller, der mir mit seiner bemerkenswerten fachlichen Kompetenz und Geduld während dieser Doktorarbeit zur Seite stand, mich in alle Geschicke der Laborarbeit einführte und mich in der konzeptionellen Ausarbeitung dieser Arbeit unterstützte. Besonders möchte ich mich bedanken für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und Geduld, die er mir entgegenbrachte.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Dr. Marion Cremer richten für ihre Hilfestellung bei dem Erlernen der 3D-FISH Technik und ihre kritische Durchsicht der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur Zellkernarchitektur, des weiteren an Dr. Irina Solovei und Dr. Steffen Dietzel für ihre Tipps und ihr offenes Ohr für jegliche Fragestellungen.

Bei den Kooperationspartnern Dr. Edivaldo de Oliveira, Dr. Olga Alexandrova Dr. Karsten Rüttgen, Dr. August Anzenberger, Bettina Ebbing und Mirjam Münch möchte ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit an Projekten bedanken, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden oder damit in methodischem Zusammenhang standen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Cremer, die ein wunderbares Arbeitsklima in schufen: Babett Wagler, Kourosch Zolghadr, Heiner Albiez, Iris Hass, Roman Zinner, Katrin Teller, Nandy Klier-Choroba, Dorothee Biener, Simone Otten, Roy Hessing, Carolin Bleese, Dr. Lothar Schermelleh, Dr. Joachim Walter und Heidi Jahn-Henninger. Insbesondere danken möchte ich Alessandro Brero für die vielen anregenden Gespräche, sowie Katrin Küpper und Claudia Weierich für ihre Einführung und Hilfsbereitschaft in der statistischen

Auswertung der 3D FISH Experimente. Mein spezieller Dank geht auch an Daniela Köhler, die mir in allen Lebenslagen freundschaftlich zur Seite stand und an Verena Schwarz, Claudia Hepperger und Robert Mayer für die aufmunternde und heitere Begleitung während des Zusammenschreibens dieser Arbeit.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Familie aussprechen für ihre liebevolle Unterstützung ideeller, wie finanzieller Art und die Zuversicht und großes Verständnis, welche sie mir entgegenbrachten.

11 Lebenslauf

Name: Michaela Neusser
Geburtsdatum: 19.07.1972
Geburtsort: München

Schulausbildung:

1979 bis 1983 Besuch der Grundschule in der Stuntzstrasse München
1983 bis 1992 Besuch des Luitpold-Gymnasiums München
1993 Besuch der Dr. Elhardt Chemieschule (Berufsschule) in München

Hochschulausbildung:

1992 bis 1993 Studium der Philosophie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1993 bis 1999 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
seit 2000 Promotion an der LMU München, Department Biologie II – Humangenetik. unter Anleitung von Prof. Dr. Johannes Wienberg

Praktische Tätigkeiten:

1998 bis 1999 Diplomarbeit an der LMU München, Department Biologie II – Humangenetik mit dem Thema “Molekular zytogenetische Untersuchungen zur Chromosomenevolution bei Neuweltaffen”
1999 bis 2004 Mitbetreuung der Wahlpflicht Praktika „Chromosomenevolution bei Primaten“ und „Multi-colour *in situ* Hybridisierung - Techniken und Anwendungen“
1999 bis 2000 Anstellung bei CMI GmbH (*Centers for Medical Innovation*)
2000 Anstellung bei CHROMBIOS GmbH