

**Etablierung neuer Vielfarben- Fluoreszenz in situ
Hybridisierungs (FISH)- Ansätze zum Einsatz in der
prä- und postnatalen Diagnostik**

Dissertation

aus dem Department Biologie II
Molekulare Zytogenetik
Ludwig- Maximilians- Universität München

vorgelegt von

Sabine Langer
aus München

August 2002

1. Gutachter: Prof. Cremer
2. Gutachter: Prof. Uhl

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.02

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Charakterisierung von Markerchromosomen	1
1.2	Pränatale Diagnostik	4
1.2.1	Allgemeines	4
1.2.2	Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut	6
1.3	Haplotypanalysen: Etablierung eines Sondensatzes zur Analyse von Hybridzelllinien	9
1.4	Ziel dieser Arbeit	10
1.4.1	Charakterisierung von Markerchromosomen	10
1.4.2	Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut	12
1.4.3	Analyse der Chromosomen in Mensch- Maus- Hybridzelllinien	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Charakterisierung von Markerchromosomen	14
2.1.1	Verwendete Sondensätze	14
2.1.1.1	M- FISH	14
2.1.1.2	AkroM- FISH	16
2.1.2	Amplifikation und Markierung der DNA- Sonden	17
2.1.2.1	M- FISH	17
2.1.2.2	AkroM- FISH	20
2.1.3	DNase I- Verdau	22
2.1.4	Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung	23
2.1.4.1	Vorbehandlung der markierten Sonden	23
2.1.4.2	Hybridisierungsmix und Hybridisierung	25
2.1.4.3	Vorbehandlung und Hybridisierung der Chromosomenpräparate	26
2.1.4.4	Nachweis	27
2.1.4.5	Epifluoreszenz- Mikroskopie und Bildanalyse	28
2.2	Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut	29
2.2.1	Herstellung von Cytospinpräparaten	29
2.2.1.1	Verwendete Zellsysteme	29
2.2.1.2	Herstellung der Zellsuspension für Cytospinpräparation	30

2.2.1.3	Aufbringen der Zellen auf Objektträgern	31
2.2.1.4	Herstellung von Folienpräparaten für Einzelzell- CGH	31
2.2.2	Antikörperfärbung der Cytospins	32
2.2.3	Herstellung geeigneter SONDENSÄTZE	32
2.2.3.1	Verwendete Sonden	32
2.2.3.2	Amplifikation und Markierung der Sonden	34
2.2.3.3	Ethanol-fällung, Hybridisierungsmix und Hybridisierung	34
2.2.4	Interphase- FISH auf Cytospinpräparaten	37
2.2.4.1	Vorbehandlung der Cytospins auf Objektträgern	37
2.2.4.2	Vorbehandlung der Cytospins auf Folie	40
2.2.4.3	Hybridisierung und Nachweis	43
2.2.5	Interphase- FISH auf Cytospinpräparaten nach Antikörperfärbung	44
2.2.5.1	Vorbehandlung der Cytospinpräparate auf Objektträgern	45
2.2.5.2	Vorbehandlung der Cytospins auf Folie	47
2.2.5.3	Hybridisierung und Nachweis	49
2.2.6	Einzelzell- CGH	49
2.2.6.1	Verwendete Systeme zur Zellgewinnung	49
2.2.6.2	Zellgewinnung	51
2.2.6.3	Verwendetes Protokoll für die Einzelzell- CGH	51
2.2.6.4	Fällung, Hybridisierungsmix und Hybridisierung	56
2.2.6.5	Weitere Möglichkeiten der Amplifikation und Markierung der DNA	56
2.2.6.6	Vorbehandlung und Hybridisierung der Chromosomenpräparate	57
2.2.6.7	Nachweis	58
2.2.6.8	Epifluoreszenz- Mikroskopie und Erstellen des CGH- Profils	58
2.3	Chromosomenanalyse in Mensch- Maus- Hybridzelllinien mittels einer neuen Technik	59
2.3.1	Verwendete Sonden	59
2.3.2	Amplifikation und Markierung der Sonden	59
2.3.3	Ethanol-fällung, Hybridisierungsmix und Hybridisierung	60
2.3.4	Herstellung der Hybridzelllinien bzw. Chromosomenpräparate	62
2.3.5	Vorbehandlung und Hybridisierung der Präparate	63
2.3.6	Nachweis	63
2.3.7	Epifluoreszenzmikroskopie und Klassifizierung	63

3.	Ergebnisse	65
3.1	Charakterisierung von Markerchromosomen	65
3.1.1	Etablierung von AkroM- FISH	65
3.1.2	Untersuchung von Patientenfällen mittels AkroM- FISH	67
3.2	Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut	79
3.2.1	Etablierung geeigneter Sondensätze	79
3.2.2	Antikörperfärbung der Cytospins	85
3.2.3	Hybridisierung der Sondensätze auf Cytospins der verschiedenen Testsysteme	86
3.2.4	Interphase- FISH bei auf Folie aufgetragenen Cytospins	92
3.2.5	Interphase- FISH auf Cytospinpräparaten nach Antikörperfärbung	99
3.2.5.1	Zellen aufgebracht auf normalen Objektträgern	100
3.2.5.2	Zellen aufgebracht auf Folie	106
3.2.6	Einzelzell- CGH	108
3.3	Chromosomenanalyse in Mensch- Maus- Hybridzelllinien	122
4.	Diskussion	128
4.1	Charakterisierung von Markerchromosomen	128
4.2	Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut	133
4.3	Chromosomenanalyse in Mensch- Maus- Hybridzelllinien	142
5.	Zusammenfassung und Ausblick	145
6.	Literaturverzeichnis	147
7.	Anhang	159
8.	Publikationen	161
9.	Lebenslauf	162
10.	Danksagung	163

1. Einleitung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Fragestellungen aus verschiedenen Bereichen der humangenetischen Diagnostik bearbeitet.

Im Vordergrund stand dabei die Entwicklung neuer methodischer Ansätze, die zum einen eine Analyse bisher nicht aufzuklärender Chromosomenaberrationen, zum anderen aber auch eine Verbesserung des Auflösungsvermögens und eine schnellere Diagnostik ermöglichen sollten.

Unter diesem Aspekt wurden drei verschiedene Themenkomplexe behandelt: Charakterisierung von Markerchromosomen, neue Ansätze aus dem Bereich der pränatalen Diagnostik und Haplotypanalysen.

Darüber hinaus wurden auch Beiträge zum Einsatz von acht verschiedenen Fluorochromen (Azofeifa et al., 2000) und zur hochauflösenden Charakterisierung chromosomaler Instabilität (Jallepalli et al., 2001) geleistet, die aber hier, da sie nicht zu den primär bearbeiteten Themen gehören, nicht weiter erläutert werden.

Im folgenden soll nun der gegenwärtige Stand der Forschung bezüglich oben genannter Themenkomplexe zusammengefasst werden.

1.1 Charakterisierung von Markerchromosomen

Als Markerchromosom (SMC= Supernumerary marker chromosome) wird ein zusätzliches Chromosom bezeichnet, dessen Herkunft und Zusammensetzung mit konventioneller Bänderungstechnik nicht definierbar sind.

Markerchromosomen werden pränatal in ca. 1 von 2000 Schwangerschaften diagnostiziert und liegen häufig als Mosaik vor (Warbuton, 1991; Blennow et al., 1994). Die Inzidenz bei Neugeborenen liegt bei 0,3/1000 (Buckton et al., 1985). Etwa 20% der Marker werden familiär vererbt, 80% treten de novo auf. Erhöhtes Alter der Mutter scheint ein Risikofaktor für das Auftreten von Markerchromosomen zu sein (Hook and Cross, 1987; Djalali, 1990).

Wenn ein Elternteil Träger des pränatal diagnostizierten Markers und phänotypisch unauffällig ist, liegt in der Regel kein erhöhtes Risiko vor (Brondum- Nielsen and Mikkelsen, 1995).

Bei Markerchromosomen, die de novo auftreten, zeigt sich eine hohe Variabilität bzgl. des Phänotyps. Man geht von einem Risiko für Anomalien, die sich bereits beim Feten oder unmittelbar beim Neugeborenen zeigen von ca. 13% aus (Warbuton, 1991). Das Risiko bei nichtsatellitierten Markern liegt bei 15%, bei satellitierten Markern bei 11%.

Eine spezielle Entstehungsart ist, dass ein Elternteil Träger einer balancierten Translokation ist und der Marker beim Kind infolge einer 3:1 Fehlsegregation entstanden ist. In diesem Fall kommt es meist zu schweren phänotypischen Anomalien.

Mehr als 80% aller Markerchromosomen leiten sich von den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen ab (Crolla et al., 1998). Mehr als die Hälfte aller akrozentrischen Marker wiederum stammt von Chromosom 15, gefolgt von Chromosom 22. Falls euchromatisches Material enthalten ist, besteht gewöhnlich eine Assoziation mit mentaler Retardierung (Buckton et al., 1985; Mohandas et al., 1985; Cheung et al., 1990; Blennow et al., 1994).

Der Entstehungsmechanismus dieser Markerchromosomen soll mit untenstehender Abbildung verdeutlicht werden:

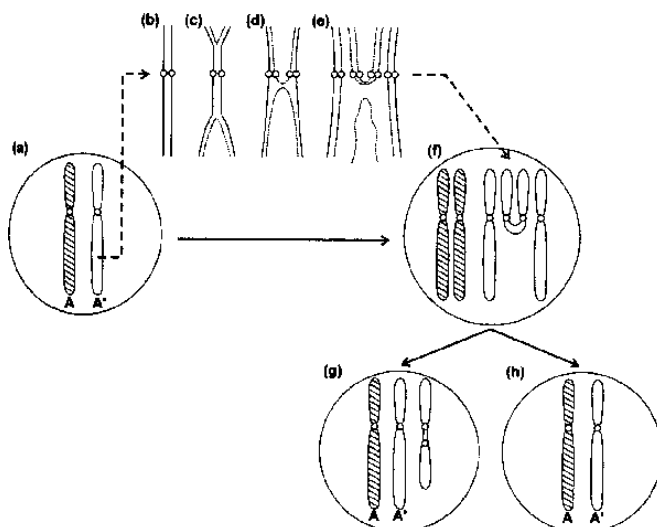


Abb.1: Theoretisches Modell zur Entstehung von Markerchromosomen/ Isochromosomen (Sjöstedt et al., 1989)

Bei der DNA- Replikation des rechts dargestellten Homologs A' kommt es zur Bildung eines „U- Loops“ zwischen den sich replizierenden DNA- Strängen, sehr nah am Centromer. Eine Endoreduplikation führt zu zwei vollständigen Homologen, einem dizentrischen Isochromosom und einem azentrischen Fragment, das verloren geht.

Aufgrund des häufigen Auftretens einiger Marker kennt man die Auswirkungen auf den Phänotyp.

Im folgenden sollen zwei Beispiele für solche Marker genannt werden:

inv dup(15):

Diese Marker werden in drei Gruppen unterteilt (Webb,1994):

- sehr kleine Chromosomen: das zusätzliche Material ist beschränkt auf die Region q11; diese Marker sind in der Regel harmlos
- mittelgroße Chromosomen: Bruchpunkt in 15q12
- große Chromosomen: Bruchpunkt in 15q13 oder noch telomernaher

Die mittelgroßen und großen Marker haben phänotypische Auswirkungen. Man bestimmt in der Regel mit einer Sonde für die Prader Willi/Angelman Region (15q13) den Gehalt an Euchromatin. Das Vorliegen einer trisomen bzw. tetrasomen Dosis dieser Region korreliert mit Anomalien wie mentaler Retardierung, körperlichen Fehlbildungen usw.

inv dup(22):

inv dup(22)(pter→ q11.2) ist mit dem cat eye- Syndrom assoziiert, das in seiner phänotypischen Ausprägung sehr variabel ist (Schinzel et al., 1981). Der Phänotyp scheint nicht sehr gut mit der Größe des Chromosoms zu korrelieren. Trotzdem kommt es eher zu der phänotypischen Ausprägung des cat-eye- Syndroms, wenn die kritische Region in vierfacher als wenn sie in dreifacher Kopie vorliegt (Mears et al., 1995). Phänotypische Merkmale sind hier Hypertelorismus, antimongoloide Lidachsenstellung, präaurikulare Anhängsel und Iriscolobome.

Bei der Diagnose eines Markerchromosoms ist es somit wichtig, herauszufinden, ob der Marker Euchromatin enthält und wenn ja, von welchem Chromosom dieses euchromatische Material stammt. Im pränatalen Bereich ist eine möglichst schnelle Diagnostik diesbezüglich wichtig, während im postnatalen Bereich eine genaue Charakterisierung des Markerchromosoms eine Korrelation mit dem Phänotyp ermöglicht.

Mit Hilfe der FISH- Technik kann die Herkunft von Markerchromosomen bestimmt werden. Dies erleichtert eine Risikoabschätzung für mögliche Anomalien, indem man Berichte aus der Literatur über ähnliche Markerchromosomen heranzieht.

Verschiedenste Möglichkeiten für die Identifizierung von Markerchromosomen sind bereits beschrieben worden:

Eine geeignete, aber nur in wenigen Labors durchführbare Methode stellt hier die Mikrodissektion dar (Thangavelu et al., 1994; Müller- Navia et al., 1995).

Auch die Analyse aller Chromosomen mittels M-FISH (Uhrig et al., 1999) oder SKY (Haddad et al., 1998) kann die Herkunft eines Markerchromosoms aufklären. Hier stehen in zahlreichen Labors schon kommerzielle Systeme zur Verfügung. Eine Charakterisierung des Markerchromosoms ist allerdings mit diesen Techniken nicht möglich, falls der Marker ausschließlich aus Heterochromatin besteht.

Außerdem können Hybridisierungen mit Einzelsonden wie pericentromerischen DNA-Proben (Callen et al., 1992; Verschraegen- Spae et al., 1993), Centromer-spezifischen Proben (Blennow et al., 1993; Crolla et al., 1998) sowie Sonden für α -Satelliten-DNA (Plattner et al., 1993) zur Identifizierung eines Markerchromosoms beitragen.

Eine relativ neue Methode zur Charakterisierung von Markerchromosomen stellt CM-FISH (Henegariu et al., 2001)/ cenM-FISH (Nietzel et al., 2001) dar: es werden simultan Centromerproben für alle menschlichen Chromosomen hybridisiert. Mit diesem Ansatz ist es allerdings nicht möglich, den Gehalt von Euchromatin zu ermitteln, der für die Ausprägung des Phänotyps eine entscheidende Rolle spielt.

Deshalb sollte, wie unten beschrieben, ein neuer Ansatz etabliert werden.

1.2 Pränatale Diagnostik

1.2.1 Allgemeines

Pränataldiagnostik ist inzwischen ein fester Bestandteil des medizinischen Angebotes für Schwangere geworden.

Bei ca. 700.000 Schwangerschaften im Jahr wird in ca. 70.000 Fällen, d.h. in 10%, eine Pränataldiagnostik durchgeführt (KBV-Zahlen). 97% der gemeldeten Schwangerschaftsabbrüche wurden nach der Beratungsregelung vorgenommen. In rund 3% der Fälle waren medizinische Indikationen die Begründung (statistisches Bundesamt, 2000). Durch die Einführung der Zellkultivierungstechniken sowie der Chromosomenbänderungsverfahren konnten bereits in den 70er Jahren numerische und strukturelle Chromosomenanomalien identifiziert werden. Die parallele Entwicklung der Amniozentese in den 70er Jahren und der Chorionzottenbiopsie Mitte der 80er Jahre ermöglichte dann eine routinemäßige vorgeburtliche Diagnostik von Chromosomenaberrationen. Ein erhöhtes Alter der Mutter (über 35 Jahre) ist die bedeutendste Indikation.

Eine Chorionzottenbiopsie kann ungefähr in der 10. SSW durchgeführt werden. Die Dauer bis zur Chromosomenanalyse beträgt 1 Tag bis eine Woche, da sowohl eine Direktpräparation durchgeführt als auch eine Kurzzeitkultur angelegt wird.

Eine Amniozentese wird ungefähr in der 16. SSW gemacht. Es werden mehrere parallele Langzeitkulturen angelegt, somit dauert es bis zur Chromosomenanalyse 2 bis 3 Wochen. Die Fehlgeburtsrate bei der Amniozentese und der Chorionzottenbiopsie beträgt 0,5-1%. Eine weitere Möglichkeit ist die Nabelschnurpunktion, die ab der 20.SSW durchgeführt wird. Das Ergebnis der Chromosomenanalyse liegt ca. nach einer Woche vor, das Risiko einer Fehlgeburt entspricht in etwa dem bei der Amniozentese/Chorionzottenbiopsie.

Als Standardverfahren bei der Chromosomenanalyse gilt die Bänderungstechnik (Casperson et al., 1968). Diese Technik basiert auf der unterschiedlichen Einlagerung von Farbstoffen in die DNA. Bei der am häufigsten verwendeten GTG- Färbung färben sich die GC- reichen Regionen hell, die AT- reichen Sequenzen hingegen dunkel.

Neben der G-Bänderungsanalyse wird häufig auch ein sogenannter „Schnelltest“ durchgeführt. Bei diesem Interphase-FISH- Test wird die Zahl der Chromosomen 13,18,21,X und Y bestimmt. Der Vorteil dieses Tests besteht darin, dass ein Ergebnis bereits innerhalb von 1-2 Tagen nach der Amniozentese vorliegt. Der Interphase- Test sollte nach den Empfehlungen des Berufsverbandes Medizinische Genetik an eine konventionelle Chromosomenanalyse gekoppelt sein.

Pränatale Chromosomendiagnostik erfordert einen invasiven Eingriff, entweder eine Chorionzottenbiopsie oder eine Amniozentese. Bei beiden Methoden besteht ein, wenn auch sehr geringes Risiko für Mutter und Kind. Dazu kommt, dass eine Amniozentese in der Regel im zweiten Trimester durchgeführt wird und so im Falle einer Chromosomenstörung eine Beendigung der Schwangerschaft erst zu einem relativ späten Zeitpunkt durchgeführt werden kann.

Von großem Vorteil und auch angenehmer für die Patientin wäre es deshalb, wenn man diese invasiven Methoden durch eine nicht- invasive Technik ersetzen könnte. Dafür gibt es verschiedene Ansätze:

In der 2. Hälfte der 80er Jahre und Anfang der 90er Jahre wurden der mögliche Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Schwangerschaft mit Trisomie 21 und dem Vorhandensein einer Nackenfalte von über 3 mm in der 11./12. Schwangerschaftswoche sowie andere Ultraschallhinweise in der späteren Schwangerschaft bekannt (Wald et al., 1999).

Deshalb wird im Rahmen der allgemeinen, in regelmäßigen Abständen während der Schwangerschaft durchgeführten Ultraschalluntersuchungen meist in der 10.- 14. SSW ein sogenanntes „Nackenscreening“ durchgeführt.

Das Down- Syndrom wird dabei in ca. 68% der Fälle erkannt (de Graaf et al., 1999).

Anfang der 90er Jahre kam das Triple-Screening dazu, das mit mütterlichem Blut ab der 15. SSW durchgeführt werden kann.

Der sogenannte Triple- Test wird zwischen der 14. und 20. SSW durchgeführt. Die Bestimmung von drei mütterlichen Serummarkern (AFP, β - HCG, freies Östriol) unter Berücksichtigung des mütterlichen Alters ermöglicht eine Risikoberechnung für das Vorliegen einer Trisomie 21 beim Feten. Trisomie 21 wird hier in 55% - 63% der Fälle erkannt (Falsch-positiv: 5%) (de Graaf et al., 1999).

Kombiniert man Nacken- und Ersttrimesterscreening wird die Trisomie 21 in 58- 85% der Fälle entdeckt, mit einer falsch- positiv Rate von 5% (Zimmermann et al., 1996).

Serumscreening und Ultraschallscreening gehören zu den bereits weit eingesetzten nicht-invasiven Methoden.

Diese Screening- Untersuchungen bieten jedoch lediglich eine Risikoabschätzung. Unauffällige Ergebnisse sind keine Garantie für ein Kind ohne Chromosomenschäden.

Ein sicherer Ausschluss von Chromosomenstörungen ist nur durch invasive Methoden wie Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese möglich. Bei den invasiven Methoden besteht aber ein, wenn auch geringes Risiko einer Fehlgeburt.

Von großem Vorteil und auch angenehmer für die Patientin wäre es deshalb, wenn man diese invasiven Methoden durch eine nicht- invasive Technik ersetzen könnte, die aber nicht die beträchtlichen Limitationen der bisher eingesetzten nicht- invasiven Untersuchungen aufweist.

Seit ungefähr einem Jahrzehnt ist die Entwicklung einer solchen Methode für die Pränataldiagnostik Gegenstand intensiver Forschungen. Darauf soll im folgenden Abschnitt eingegangen werden.

1.2.2 Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut

1893 beschrieb Schmorl erstmals das Vorkommen fetaler Zellen im Blutkreislauf der Mutter. Er fand Trophoblasten in den Lungen von Patientinnen, die an einer Eklampsie verstorben waren.

Viele Jahre lang wurde die Existenz fetaler Zellen im Blut der Mutter kontrovers diskutiert. Ein definitiver Beweis war erst zu dem Zeitpunkt möglich, als sensitive molekulare Techniken für genetische Analysen wie PCR und FISH entwickelt waren.

So ist inzwischen die Existenz fetaler Zellen im mütterlichen Blut nachgewiesen, jedoch ist ihre Frequenz extrem gering. Angaben in der Literatur schwanken zwischen $1/10^5$ - $1/10^9$ mütterliche Zellen (Goldberg et al., 1997).

Liegt allerdings beim Feten eine Aneuploidie vor, steigt die Anzahl der fetalen Zellen im mütterlichen Blutkreislauf, was hinsichtlich der pränatalen Diagnostik vorteilhaft ist, da die Zellen leichter auffindbar sind.

Im Blut der Schwangeren sind verschiedene fetale Zelltypen enthalten. Man findet Trophoblasten, Lymphozyten, Granulozyten und nucleäre Erythroblasten, die jeweils bestimmte Vor- und Nachteile für die pränatale Diagnostik aufweisen.

Trophoblasten sind die ersten Zellen, die im mütterlichen Kreislauf nachgewiesen wurden (Schmorl, 1893). Sie sind fertig differenziert und besitzen eine spezifische Morphologie, was eine einfache mikroskopische Identifizierung erlaubt. Allerdings sind sie nicht generell in mütterlichem Blut nachweisbar. Was die Zuverlässigkeit der Diagnostik anbetrifft, so besteht ein Nachteil darin, dass sie häufig multinucleär und u.a. Teil der Plazenta sind und somit eine genetische Analyse nicht repräsentativ für den fetalen Karyotyp sein muss.

Lymphozyten wurden als erste Zellen erfolgreich mit FACS angereichert (Herzenberg et al., 1979), wofür aber eine HLA- Typisierung beider Eltern notwendig ist.

Ein Nachteil dieses Zelltyps für die pränatale Diagnostik besteht darin, dass fetale Lymphozyten bis zu 27 Jahren im mütterlichen Blutkreislauf zirkulieren können, was zu Fehldiagnosen führen kann (Bianchi et al., 1990).

Verwendet man Trophoblasten, Lymphozyten oder auch Granulozyten für die vorgeburtliche Diagnostik, so besteht eine weitere Schwierigkeit darin, dass für alle drei Zelltypen keine spezifischen Antikörper für eine Isolierung zur Verfügung stehen.

Am besten geeignet für die Pränataldiagnostik sind hingegen die fetalen nucleären Erythroblasten (NRBCs). Sie sind mononucleär und gut differenziert und besitzen außerdem, was ein entscheidender Vorteil dieses Zelltyps ist, nur eine begrenzte Lebensspanne (Bianchi, 1995), was sie nach der Schwangerschaft nicht mehr nachweisbar macht.

Weiterhin entscheidend ist, dass sie schon im ersten Trimester vorhanden sind, was eine frühzeitige Diagnostik ermöglicht.

Dadurch, dass sie mehrere Antigene exprimieren, wie z.B. Transferrinrezeptor, Glycophorin A, fetale Hämoglobinketten, ist mit Hilfe dieser Marker eine Isolierung und auch Identifizierung (Bianchi et al., 1990; Zheng et al., 1995) möglich.

Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass die Anzahl der Zellen in mütterlichem Blut sehr gering ist ($1/10^5$ - $1/10^9$ kernhaltige Zellen) (Price et al., 1991; Gänshirt- Ahlert et al., 1990) und außerdem der Anteil maternaler Erythroblasten während der Schwangerschaft steigt (Slunga- Tallberg et al., 1995; Sohda et al., 1997).

Für eine Analyse dieser Zellen sind aus diesem Grunde Anreicherungsverfahren notwendig. Eine Anreicherung/Isolierung lässt sich z.B. mittels Erylyse oder Ficoll- Dichtegradient (Bianchi et al., 1994), MACS (magnetic activated cell sorting) (Gänshirt- Alhert et al., 1993; Rodriguez de Alba et al., 1999; Wang et al., 2000) oder auch FACS (fluorescence-activated cell sorting) (Bianchi et al., 1990; Samura et al., 2000) durchführen.

Weiterhin sind z.B. Kultur fetaler Erythroblasten (Lo et al., 1994; Han et al., 2001) oder auch eine Auftrennung der Zellen nach ihrer Ladung (Charge flow separation) (Wachtel et al., 1998) beschrieben.

Zur Identifikation der fetalen Zellen können dann z.B. Immunfärbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen fetales Hämoglobin (Oosterwijk et al., 1998b) zum Einsatz kommen.

Das Problem besteht aber darin, dass bisher kein Antikörper zur Verfügung steht, der 100%ig spezifisch für die fetalen Zellen ist.

Aus den aus mütterlichem Blut isolierten fetalen Zellen konnten bereits in einzelnen Fällen sowohl kindliche Trisomien als auch monogene Erkrankungen diagnostiziert werden.

Die Identifizierung fetaler Aneuploidien erfolgte mit kommerziellen Kits (Hamada et al., 1995; Oosterwijk et al., 1998; Rodriguez de Alba et al., 1999), die Diagnostik monogener Erkrankungen oder auch eine Geschlechtsbestimmung mit verschiedenen PCR- Techniken (Sekizawa et al., 1998).

Alle beschriebenen Methoden befinden sich gegenwärtig noch in einer Testphase, d.h. sie werden zusätzlich zu den etablierten invasiven Techniken durchgeführt. So können die Ergebnisse der routinemäßig durchgeführten Chromosomendiagnostik mit den Ergebnissen dieser neuen Methode verglichen werden, um eine Aussage über die Validität der nicht-invasiven Methode zu erhalten.

Die Einführung einer nicht- invasiven und frühen pränatal- diagnostischen Methode würde das Risiko eines Abortes, das sowohl bei der Amniozentese als auch bei Chorionzotten- biopsie besteht, vermeiden, würde eine Analyse des fetalen Karyotyps bei allen Schwangeren, unabhängig von ihrem Alter, ermöglichen und würde außerdem die Patientin einer geringeren psychischen Belastung aussetzen als es bei einem invasiven Eingriff der Fall ist.

1.3 Haplotypenanalysen: Etablierung eines Sondensatzes zur Analyse von Hybridzelllinien

Der Fortschritt auf dem Gebiet der Genetik in den letzten Jahren hat entscheidende Auswirkungen auf den diagnostischen Bereich. Es ist z.B. möglich, das Risiko für eine Krankheit vor Beginn der entsprechenden Symptome zu bestimmen.

Solche Informationen ermöglichen es, bei Individuen, die die entsprechenden mutierten Gene tragen, präventive Maßnahmen zu treffen. Bei familiär gehäuft auftretendem Brustkrebs und Nachweis einer Mutation in einem der bekannten Brustkrebsgene, können die Individuen z.B. ein engmaschigeres Vorsorgeprogramm in Anspruch nehmen. Andererseits sind diese genetischen Tests in gleicher Weise für diejenigen Familienmitglieder von Bedeutung, die die relevante Mutation nicht tragen. Ihnen können so unnötige medizinische Maßnahmen und auch Ängste erspart bleiben.

Genetische Tests haben aber nicht ausschließlich Vorteile. Ihre Nachteile liegen im psychosozialen Bereich, wenn z.B. für eine vererbte Krankheit keine entsprechenden Behandlungsmethoden zur Verfügung stehen oder pränatal eine Prädisposition für eine Krankheit diagnostiziert wird, die in der Regel erst spät im Laufe des Lebens auftritt, wie es z.B. bei Chorea Huntington der Fall ist. Die Mutation besteht in einer Verlängerung der repetitiven Trinucleotidsequenz im HD- Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 4. Es handelt sich hier um eine autosomal- dominante Erkrankung, die sich meist zwischen dem 30.- und 50. Lebensjahr manifestiert und mit progressiver Demenz verbunden ist.

Außerdem bestehen auch technische Probleme. So können bei routinemäßig durchgeführten Tests, selbst wenn das mutierte Gen bekannt ist, in 25-75% der Fälle Mutationen übersehen werden (Yan et al., 2001). Diese hohe Fehlerrate hängt von der Art der Mutation ab:

Es gibt sogenannte Mutations-„Hotspots“, d.h. das entsprechende Gen enthält nahezu in allen Fällen immer an dieser Stelle (hotspot) die Mutation. Dies ist z.B. bei der Sichelzellanämie der Fall. Solche Mutationen sind leicht zu identifizieren.

Die meisten vererbten Krankheiten werden jedoch durch verschiedene Mutationen irgendwo im entsprechenden Gen verursacht.

Mutationen können entweder mit sogenannten direkten Methoden, wie DNA- Sequenzierung oder Mikroarrays oder mit sogenannten indirekten Methoden, wie z.B. SSCP (single-strand conformation polymorphism)- Analysen identifiziert werden.

Für eine Mikroarray- Analyse stellt nach wie vor der Nachweis heterozygoter Mutationen, d.h. die zwei Kopien des entsprechenden Gens tragen unterschiedliche Mutationen oder

eine Kopie ist defekt, die andere hingegen normal, ein Problem dar. Leider ist jedoch die Mehrheit der Mutationen heterozygot.

Viele Mutationen können überhaupt nicht mit oben erwähnten Techniken identifiziert werden.

Dies ist z.B. der Fall, wenn die untersuchte Region auf dem mutierten Allel deletiert ist und das PCR-Produkt von der genomischen DNA so ausschließlich vom Wildtyp-Allel stammt (Yan et al., 2001).

Um die Identifizierung solcher Mutationen zu erleichtern, wurde eine neue Technik, genannt „Conversion“, entwickelt (Yan et al., 2000). Die Bezeichnung „Conversion“ leitet sich davon ab, dass der diploide Chromosomensatz in einen haploiden umgewandelt bzw. convertiert wird.

Dafür werden Zellen des Patienten mit einer Nager-Zelllinie fusioniert. Auf diese Weise entstehen Hybridzelllinien, die stabil eine Teilmenge der menschlichen Chromosomen enthalten. Etwa ein Viertel der Hybridzellen enthält nur eine Kopie des Chromosoms, das analysiert werden soll. Conversion Technologie bedeutet also, dass der diploide Chromosomensatz in einen haploiden umgewandelt wird, so dass die Hybride nur eine statt zwei Kopien des gewünschten Chromosoms enthalten. Eine Reihe von Mutationen kann mit dieser Technik einfacher identifiziert werden, da die untersuchte Mutation nicht mehr von der normalen Sequenz des Wildtyp- Allels überdeckt wird.

Die „Conversion Technik“ kann nicht die oben beschriebenen Methoden für die Identifizierung von Mutationen ersetzen, aber sie kann die Sensitivität der konventionellen Methoden verbessern.

Wichtig für die „Conversion Technologie“ ist die Überprüfung der Stabilität der Hybridzellen und die genaue Bestimmung des Gehalts an menschlichen Chromosomen.

Hierfür ist eine Gesamtanalyse der menschlichen und der Maus-Chromosomen notwendig, für die es bislang keine effizienten Analyseverfahren gab.

1.4 Ziel dieser Arbeit

1.4.1 Charakterisierung von Markerchromosomen

Ziel war es, einen neuen Probenmix zu generieren, der eine schnelle, eindeutige Identifizierung und Charakterisierung von Markerchromosomen ermöglicht. Da sich 80% aller

Marker von den akrozentrischen Chromosomen ableiten, sollte dieser Ansatz speziell auf alle Regionen dieser akrozentrischen Chromosomen hybridisieren. Führt man zusätzlich eine M-FISH- Hybridisierung durch, was im Bereich der Pränataldiagnostik auf jeden Fall angeraten ist, so lassen sich auch die restlichen 20% der Markerchromosomen auf ihren Gehalt an Euchromatin untersuchen.

Mit diesem Mix ist es, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Methoden möglich, eu- und heterochromatische Bereiche simultan anzufärben.

Hierfür mussten Hybridisierungsbedingungen etabliert werden, die sowohl für repetitive Sonden als auch für Paintingsonden zu sicher beurteilbaren Ergebnissen führen.

Es werden Paintingproben für alle akrozentrischen Chromosomen mit Centromer-spezifischen Proben für die Chromosomen 13/21, 14/22 und 15 kombiniert. Zusätzlich wird eine für die rDNA spezifische Probe eingesetzt.

Die Abbildung zeigt die für Akro-M-FISH verwendeten Proben:

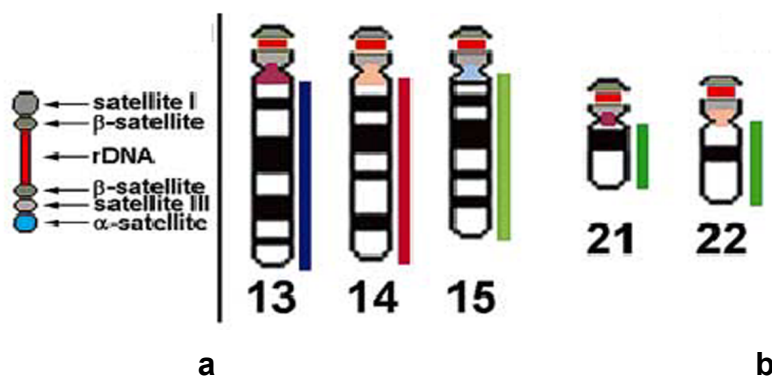


Abb. 2: Schema der für AkroM-FISH verwendeten Proben

Abbildung 2a zeigt die Anordnung der verschiedenen Familien tandemartig wiederholter DNA auf dem kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen.

Die Centromere setzen sich aus α - Satelliten zusammen. Die Anordnung tandemartig wiederholter DNA, angefangen vom Centromer in Richtung Telomer ist auf den p-Armen der meisten akrozentrischen Chromosomen folgende:

Satellit III, β - Satellit, rDNA, β - Satellit und Satellit I.

Abbildung 2b zeigt den kompletten Probenmix für AkroM-FISH. Heterochromatische und euchromatische Regionen der akrozentrischen Chromosomen werden simultan angefärbt.

Mit dieser neuen Methode (**AkroM-FISH**: Langer et al., 2001) wurden im Rahmen der Arbeit insgesamt 20 Markerchromosomen prä- oder postnatal charakterisiert.

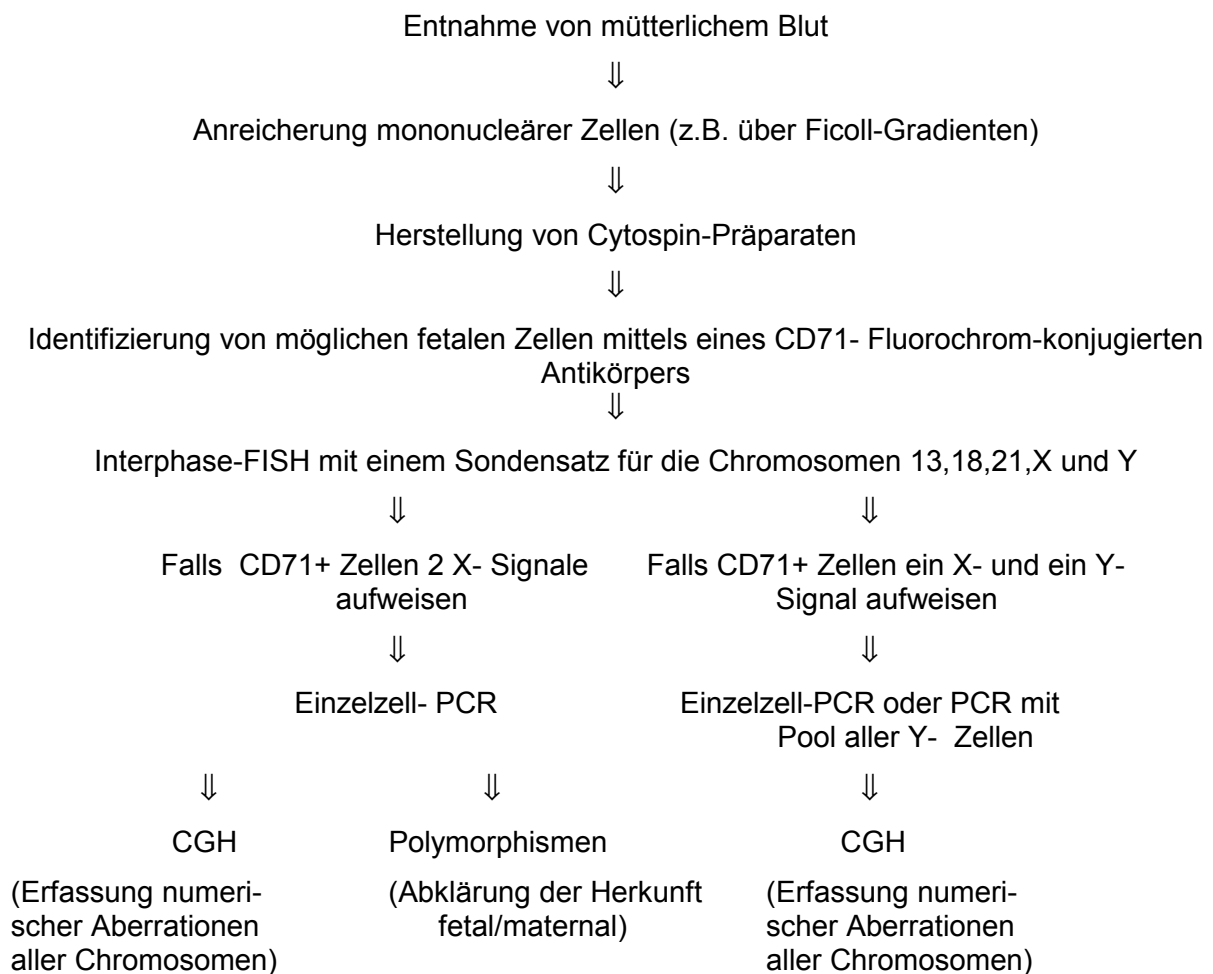
Darüberhinaus konnten auch p-Arm-Strukturvarianten an akrozentrischen Chromosomen aufgeklärt werden.

1.4.2 Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut

Ziel des Projektes war das Austesten einer Kombination von Zellanreicherung, Identifizierung fetaler Zellen durch Verwendung von Antikörpern, Interphase-Fluoreszenz in situ-Hybridisierung und Einzelzell-CGH für eine nichtinvasive pränatale Chromosomendiagnostik aus fetalen Zellen im mütterlichen Blut.

Da die Entwicklung eines Antikörpers, der hochspezifisch nur die fetalen und nicht die mütterlichen Zellen anfärbt, in naher Zukunft nicht abzusehen ist, sollte versucht werden, mit unten genanntem Konzept, das unterschiedliche FISH- Methoden kombiniert, diese Hürde zu umgehen: die nach Antikörperfärbung als fetal identifizierten Zellen werden zunächst mit Interphase-FISH untersucht. Zur Überprüfung und Erweiterung der Aussage wird nach der FISH aus diesen Zellen DNA extrahiert, mit der dann eine CGH zur weiteren Untersuchung auf numerische Veränderungen durchgeführt wird.

Dieses Konzept ist in nachfolgendem Schema näher erläutert:



Bei CD 71 handelt es sich um einen Transferrinrezeptor, der von nucleären Erythroblasten (NRBCs), aber auch von maternalen NRBCs, aktivierten Lymphozyten und Reticulozyten exprimiert wird.

Für die einzelnen Arbeitsschritte mussten völlig neue Protokolle etabliert und ausgetestet werden. Dies gilt insbesondere für die Kombination von Antikörperfärbung und Interphase-FISH, wofür zunächst ein geeigneter SONDENSATZ hergestellt wurde.

Für die Einzelzell-CGH wurden zwei verschiedene Systeme zur Zellgewinnung verwendet: Das Laser Pressure Catapulting System von PALM und das Laser Pressure Microdissection System von Arcturus, die im Rahmen dieser Arbeit verglichen werden sollten.

Für die Verwendung des PALM- Systems müssen die Zellen auf einer Spezialfolie aufgebracht sein. FISH auf dieser Folie, insbesondere in Kombination mit einer Antikörperfärbung, stellt ein besonderes Problem dar. Auch hierfür musste ein geeignetes Protokoll etabliert werden.

Bevor Interphase-FISH (insbesondere bei Zellen auf Folie) und Einzelzell-CGH mit ein und derselben Zelle durchgeführt werden können, müssen diese beiden Methoden zunächst getrennt etabliert und ausgetestet werden.

1.4.3 Analyse der Chromosomen in Mensch- Maus- Hybridzelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein SONDENSATZ entwickelt werden, der eine automatische Analyse aller Chromosomen in Hybridzelllinien ermöglicht. Mensch- und Mausechromosomen wurden kombinatorisch mit denselben fünf Fluorochromen markiert (Eils et al., 1998; Jentsch et al., 2001). Somit besitzen manche Chromosomen der Genome von Mensch und Maus identische Fluorochrom-Kombinationen. Um eine Unterscheidung von Mensch- und Mausechromosomen möglich zu machen, wurde menschliche gesamt-genomische DNA mit einem 6. Fluorochrom markiert und dann simultan mit den Mensch- und Maus- Vielfarbenansätzen hybridisiert. Mensch- und Mausechromosomen sind so einfach zu unterscheiden.

Mensch- M-FISH- Pool und Maus- M-FISH- Pool mussten zunächst getrennt auf die Hybridzelllinien hybridisiert werden, um geeignete Hybridisierungsbedingungen zu etablieren und die einzusetzenden Sondenmengen zu bestimmen. In einem nächsten Schritt konnten dann die beiden Vielfarbenansätze in Kombination ausgetestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Charakterisierung von Markerchromosomen

Da eine genaue Charakterisierung von Markerchromosomen mit traditioneller Bänderungsanalyse nicht möglich ist, wurde eine neue Strategie entwickelt, mit der die Zusammensetzung eines Markerchromosoms mit zwei Hybridisierungen bestimmt werden kann.

Bei der ersten Hybridisierung, genannt **AkroM-FISH**, wird ein neu generierter Probenmix verwendet, der aus Painting-Proben für alle akrozentrischen Chromosomen, Centromerproben für die Chromosomen 13/21, 14/22 und 15 und einer für die rDNA spezifischen Sonde besteht. Auf diese Weise können nahezu 80% aller Markerchromosomen charakterisiert werden.

Mittels einer zweiten Hybridisierung mit 5- oder 7-Fluorochrom -M- FISH können die restlichen 20% der Markerchromosomen auf den Gehalt von Euchromatin hin überprüft werden.

2.1.1 Verwendete SONDENSÄTZE

2.1.1.1 M- FISH

Für den klassischen 5-Fluorochrom -M- FISH-Pool (5f) (Speicher et al., 1996) wurden folgende Fluorochrome zur Markierung der DNA- Sonden verwendet:

In Klammern stehen jeweils die Wellenlängen der Anregungs- und Emissionsmaxima.

- 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (350 nm/456 nm)
- Spectrum Green (SG) (495 nm/520 nm)
- Cyanin-Farbstoff CY3 (554 nm/568 nm)
- Cyanin-Farbstoff CY3.5 (581 nm/588 nm)
- Cyanin-Farbstoff CY5 (652 nm/672 nm)
- Cyanin-Farbstoff CY5.5 (682 nm/703 nm)

Als Sonden dienten durch Durchflusscytometrie gewonnene Chromosomen- spezifische DNA- Bibliotheken aus dem Labor von Prof. M. Ferguson-Smith, Cambridge, die uns zur Verfügung gestellt wurden.

Die Markierung der Proben erfolgte kombinatorisch nach unten stehendem Schema:

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	
Colour																									
FITC	X			X		X		X	X		X		X			X		X			X				X
Cy3			X		X			X	X		X		X		X				X	X			X	X	
Cy3.5	X		X	X			X			X	X				X		X		X						X
Cy5	X				X	X	X	X				X		X	X	X							X		
Cy5.5		X	X		X	X			X	X		X										X		X	X

Tabelle 1: Schema der M-FISH- Probenmarkierung mit 5 Fluorochromen und zugehörigen Klassifizierungsfarben.

Zur Verbesserung des Auflösungsvermögens wurde zu Beginn meiner Doktorarbeit ein 7-Fluorochrom-M-FISH- Pool (Azofeifa et al., 2000) generiert.

Folgende Fluorochrome wurden zusätzlich eingesetzt:

- Diethylaminocoumarin (DEAC) (426 nm/480 nm)
- Avidin Laser Pro IR 790 (755 nm/778 nm)

Die Markierung der Proben erfolgte nach unten stehendem Schema:

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	ps	
Colour																										
SC8	X					X				X			X			X							X		X	
FITC	X			X	X		X											X	X		X					
Cy3			X			X		X			X				X			X		X						
Cy3.5			X	X					X	X							X						X		X	X
Cy5		X										X	X		X		X				X					
Cy5.5		X					X		X		X			X		X										
Cy7					X			X			X		X									X	X		X	

Tabelle 2: Schema der M-FISH- Probenmarkierung mit 7 Fluorochromen und zugehörigen Klassifizierungsfarben.

Der genaue Verlauf der Spektrallinien der Fluorochrome wird in Abbildung 3 dargestellt:

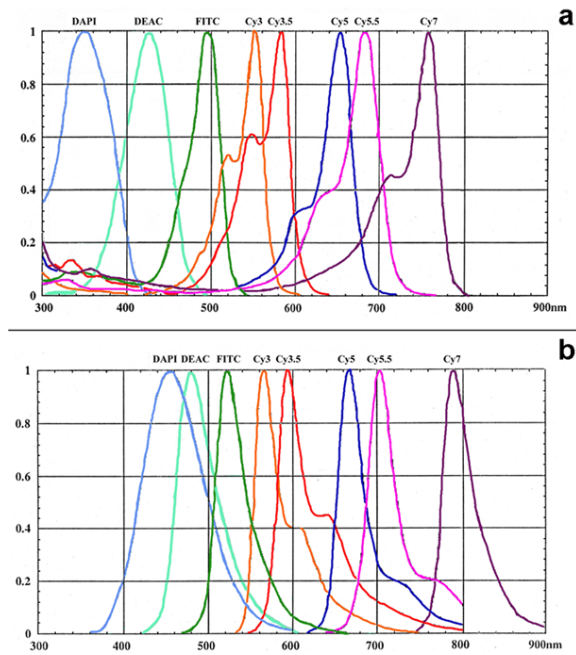


Abb. 3: Anregungsspektren (a) und Emissionsspektren (b) der Fluorochrome

Die Abszisse beschreibt die Wellenlänge in nm. Auf der Ordinate sind die Anregungs- bzw. Emissionsspektren mit einem Maximum bei 1 aufgetragen. Folgende Fluorochrome sind berücksichtigt: DAPI, DEAC, FITC, CY3, CY3.5, CY5, CY5.5, CY7

2.1.1.2 AkroM- FISH

Der AkroM-FISH- Mix enthält die in Tabelle 3 aufgeführten Sonden:

DNA-Sonde	Fluorochrom
WCP 13	Cy3
WCP 14	Cy5
WCP 15	Cy3.5
WCP 15	FITC
WCP 21	Cy3.5
WCP 22	FITC
Cen 13/21 (pZ21A)	Cy5
Cen 15 (pMC15)	Cy3
Cen 14/22 (p14.1)	Cy3.5
pHsrDNA 11.9 kb	DEAC
pHsrDNA 19.8 kb	

Tabelle 3: Sonden des AkroM- FISH- Mixes

Die Chromosomen- spezifischen Paintingsonden (WCPs = whole chromosome painting probes) stammen ebenfalls aus dem Labor von Prof.M. Ferguson- Smith (Cambridge,UK), die Centromer-spezifischen Proben (Cen) wurden von Dr.M. Rocchi (Cytogenetics Unit, University of Bari) zur Verfügung gestellt. Bei der Probe für die rDNA handelt es sich um 11.9 kb und 19.8 kb große EcoRI- Fragmente (Labella und Schlesinger, 1989).

2.1. 2 Amplifikation und Markierung der DNA- Sonden

2.1.2.1 M- FISH

Die Amplifikation der DNA- Pools wurde mittels DOP- PCR (degenerate oligonucleotide-primed-PCR nach Telenius et al., 1992) durchgeführt. Die DOP-PCR amplifiziert homogen die eingesetzte DNA durch Einsatz eines degenerierten Primers, der etwa alle 4 kb an den DNA-Strang bindet.

Reagenzien:

10x PCR Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH 8.4) + 500 mM KCl; GIBCO

50 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂); GIBCO

5 mM dNTP`s: aus dATP, dGTP, dTTP und dCTP (je 100 mM, pH 7.5); Roche

6MW-Primer (100 µM): 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'

Taq-Polymerase (5U/µl); GIBCO

PCR-Gerät: MJ Research PTC-225; Peltier Thermal Cycler

PCR- Ansatz:

Volumen: 25µl

Stocklösung	Ansatz in µl	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2,5	1×
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
5 mM dNTP`s	1	0,2 mM
100µM 6MW	0,5	2 µM
Aqua bidest	18,8	1.25
Taq- Polymerase	0,2	1 U
DNA- Pool	1	

PCR- Programm:

- 94°C: 3 min (Anfangsdenaturierung)
- 94°C: 1 min (Denaturierung)
- 56°C: 1 min (Annealing)
- 72°C: 4 min (Elongation)

insgesamt: 35 Zyklen

- 72°C: 5 min (Elongation)

Ergebniskontrolle :

Nach der PCR werden die DNA-Proben auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen.

Reagenzien:

TAE (Tris/Acetat/EDTA)-Puffer(50x): 40 mM TrisAcetat, 2 mM EDTA

TE-Puffer (1x), pH 7.5: 10mM TrisHCl, 1 mM EDTA

Gelloading Buffer: 1% Bromphenolblau, 1% Xylencyanol, Glycerol (40%)

Marker : 100 bp Ladder

Markeransatz: 8 µl Stocklösung

8 µl Gelloading Buffer

64 µl 1x TE-Puffer

Ansatz:

1%iges Agarosegel:

- 0.5 g Agarose auf 50 ml 1x TAE-Puffer
- erhitzen
- 1 µl Ethidiumbromid zugeben

Laufpuffer:

- 1x TAE-Puffer
- ca. 3 µl Ethidiumbromid

- ca. 1/10 des Volumens der DNA-Probe mit 1-2 µl Gelloading Buffer auftragen

Die Sondenmarkierung wurde mit einer „Labeling-DOP-PCR“ (degenerate oligonucleotide-primed-PCR nach Telenius et al.,1992) durchgeführt (s.o.).

Während der PCR werden markierte Basenanaloga in die synthetisierten DNA-Stränge eingebaut.

Drei Pools werden direkt mit Fluorochromen (FITC, Cy3, Cy5; bei 7f-M-FISH zusätzlich DEAC und Texas Red) und zwei mit Haptenen (Digoxigenin, Biotin) markiert.

Reagenzien:

10x PCR Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH 8.4) + 500 mM KCl; GIBCO

50 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂); GIBCO

5 mM AGC: aus dATP, dGTP und dCTP (je 100 mM, pH 7.5); Roche

5 mM AGT: aus dATP, dGTP, dTTP (je 100 mM, pH 7.5); Roche

5 mM dTTP: aus 100 mM dTTP

5 mM dCTP: aus 100 mM dCTP

6MW Primer (100 µM): 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'

Taq-Polymerase (5U/µl); GIBCO

Biotin-16-dUTP (50nmol); Roche

Digoxigenin-11-dUTP (125 nmol); Roche

FITC; FluorX-dCTP (25mM); Amersham Pharmacia Biotech

Spectrum Green-dUTP (50nmol); Vysis

Cy3-dUTP (25 nmol); Amersham Pharmacia Biotech

Cy5-dUTP (25 nmol); Amersham Pharmacia Biotech

DEAC (Diethylaminocoumarin)-5-dUTP (25 nmol); NEN

Texas Red – 12-dUTP (1mM); Molecular Probes

Für die „Labeling-PCR“ gibt es verschiedene Ansätze (siehe nachfolgende Pipettierschemata), die sich nach dem unterschiedlichen, aber definierten Verhältnis von markierten Basenanaloga zu ihren unmarkierten Nukleotiden richten.

Molverhältnis von nicht markierten dTTPs zu markierten Thymidin-Basenanaloga 3:1

Dieser Ansatz gilt für **DEAC, Spectrum Green/FITC, CY3, Texas Red** und **Biotin**.

Stocklösung	Ansatz in µl	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2,5	1×
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
5 mM AGC	1	0,2 mM
5 mM dTTP	0,75	0,15 mM
1 mM Fluorochrom/ Hapten	1,25	0,05 mM
100 µM 6MW Primer	0,5	2 µM
Aqua bidest	16,8	
Taq- Polymerase	0,2	1 U
DNA	1	

Molverhältnis von nicht markierten dTTPs zu markierten Thymidin-Basenanaloga von 1:1

Dieser Ansatz gilt für **CY5** und **Digoxigenin**

Stocklösung	Ansatz in µl	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2,5	1×
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
5 mM AGC	1	0,2 mM
5 mM dTTP	0,5	0,1 mM
1 mM Fluorochrom/ Hapten	2,5	0,1 mM
100 µM 6MW Primer	0,5	2 µM
Aqua bidest	15,8	
Taq- Polymerase	0,2	1 U
DNA	1	

Molverhältnis von nicht markierten dCTPs zu markierten Cytidin-Basenanaloga von 1:1

Dieser Ansatz gilt für **FITC**.

Stocklösung	Ansatz in µl	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2,5	1×
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
5 mM AGC	1	0,2 mM
5 mM dCTP	0,5	0,1 mM
1 mM FITC	2,5	0,1 mM
100 µM 6MW Primer	0,5	2 µM
Aqua bidest	15,8	
Taq- Polymerase	0,2	1 U
DNA	1	

Die Fragmentlängen der markierten PCR- Proben werden auf einem 1%igen Agarosegel getestet (s.o.).

Die PCR- Produkte zeigen auf dem Gelbild einen „Schmier“, der im Kilobasen-Bereich liegt. Um die gewünschte Fragmentlänge von 100-800 bp zu erreichen, ist ein Verdau mit DNase I erforderlich (siehe Abschnitt 2.1.3).

2.1.2.2 AkroM- FISH

Die Amplifikation der Painting- Sonden und der rDNA- Sonde erfolgte mittels DOP- PCR (siehe 2.1.2.1), die Amplifikation der Centromersonden mittels Insert-PCR (Strachan und Read, 1996) aus der Minipräparation (Vergleiche dazu Diplomarbeit von Monika Grabowski). Die Markierung der Paintingproben und der rDNA- Probe wurde mit der „Labeling-DOP-PCR“ (siehe 2.1.2.1) durchgeführt, die Markierung der Centromersonden hingegen mit Nicktranslation.

Insert- PCR

Reagenzien:

10x PCR Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH 8.4) + 500 mM KCl; GIBCO

50 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂); GIBCO

W1 (1%); GIBCO

5 mM dNTPs, Roche

pUC forward (10 µM): 5`- CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG- 3`

pUC reverse (10 µM): 5`- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3`

Taq-Polymerase (5U/µl); GIBCO

PCR- Ansatz:

Volumen: 22µl

Stocklösung	Ansatz in µl	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2	1×
50 mM MgCl ₂	0,6	1,5 mM
5 mM dNTP` s	1	250µM
W1 (1%)	1	0,05%
pUC forward (10 µM)	0,4	0,2 µM
pUC reverse (10 µM)	0,4	0,2 µM
Aqua bidest	14,4	
Taq- Polymerase	0,2	0,05 U/µl
DNA- Pool	2	

PCR- Programm:

- 95°C: 5 min (Anfangsdenaturierung)
- 95°C: 45 sec (Denaturierung)
- 66°C: 45 sec (Annealing)
- 72°C: 1 min (Elongation)
- insgesamt: 30 Zyklen
- 72°C: 5 min (Elongation)

Nicktranslation

Bei der Nicktranslation werden in der zu markierenden DNA mittels DNase I Einzelstrangbrüche („nicks“) gesetzt, von denen aus die DNA- Polymerase I durch ihre 5`- 3` Exonucleaseaktivität Nucleotide abbaut und durch die gleichzeitige Polymeraseaktivität bei der Reparatursynthese markierte Nucleotide in den DNA- Strang einbaut.

Die Reaktion wird bei 15 °C durchgeführt.

Bei der Nicktranslation wird von der zu markierenden DNA ungefähr 1 µg eingesetzt.

Reagenzien:

Nicktranslations-(NT)-Puffer (10x): 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0); 50 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml BSA
β-Mercaptoethanol (0.1 M)

AGC-Mix (0.5 M): aus dATP, dGTP und dCTP (je 100 mM); Roche

DNA-Polymerase I (5 U/μl); Boehringer Mannheim

DNase I Stocklösung (3 mg/ml); Boehringer Mannheim

Biotin-16-dUTP; Roche

Digoxigenin-11-dUTP, Roche

Cy3-dUTP, Amersham

Cy5-dUTP, Amersham

Ansatz für eine Nicktranslation: 50 μl Volumen

Stocklösung	Ansatz in μl
10x NT- Puffer	5
0,1 M MercaptoEtOH	5
0,5 mM AGC	5
1 mM Fluorochrom/Hapten	1
DNA- Polymerase I	1
DNase I (1 :10000 Verd.)	6
1 μg DNA	
Aqua bidest	add 50

Der Nicktranslationsansatz wird bei 15°C im Wasserbad für 1,5 bis 2 h inkubiert.

Die Fragmentlänge wird auf einem 1%igen Agarosegel überprüft: die optimale Fragmentgröße liegt zwischen 100 und 800 bp.

2.1. 3 DNase I- Verdau

Für optimale FISH- Ergebnisse sollten die markierten DNA- Sonden eine Länge von 100 bis 800 bp besitzen. Da das markierte PCR- Produkt in der Regel jedoch größer ist, muss ein DNase I- Verdau durchgeführt werden.

Reagenzien:

Nicktranslations-(NT)-Puffer (10x): 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0); 50 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml BSA

DNase I Stocklösung (3 mg/ml); Roche

Ansatz für den DNase I-Verdau: 50 µl Volumen

Zu jedem 25 µl PCR-Amplifikationsprodukt wird folgendes hinzugegeben:

- 10× NT- Puffer 5 µl
- DNase I (1:1000 Verd.) 5- 8 µl
- Aqua bidest 15 µl

Die Menge der zuzugebenden DNase I und die Dauer der Inkubation werden anhand des vorausgegangen Gelbildes bzw. anhand von Erfahrungswerten bestimmt.

Der DNase I- Verdau wird in einem 15° C Wasserbad durchgeführt und zwar in der Regel zwischen 20 min und 1 h.

Die Fragmentlänge wird erneut auf einem 1%igen Agarosegel überprüft.

2.1. 4 Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung müssen die bereits markierten DNA-Proben sowie Chromosomenpräparate vorbereitet werden.

Sowohl die markierten Sonden als auch die DNA auf den Präparaten müssen einzelsträngig vorliegen, damit sich während der Hybridisierung die komplementären DNA- Stränge finden.

2.1.4.1 Vorbehandlung der markierten DNA- Sonden

Ethanol-fällung

Zur Volumeneinengung und zur Entfernung noch vorhandener freier Nucleotide wird entweder über Nacht bei -20°C oder für ca. 1h bei -80°C („Schnellfällung“) eine Ethanol-fällung durchgeführt.

Salmon testes DNA dient hierbei als Trägermaterial, Cot1- DNA zum Absättigen repetitiver Sequenzen zur Erhöhung der Spezifität der Hybridisierungssignale.

Die eingesetzten Mengen der jeweiligen Sonden sind Erfahrungswerte.

Reagenzien:

Markierte DNA

Cot-1 DNA (1 mg/ml); GIBCO BRL

Salmon testes-DNA (10.4 mg/ml) ; Sigma

Natriumacetat: NaOAc (3 M, pH 5.2)

100% Ethanol

Ansatz der Ethanol-Salz-Fällung

1.) 5-Fluorochrom-M-FISH

DNA-Pool	Volumen (µl)	Cot1- DNA (µl)	Salmon testis (µl)	3 M NaOAc (1/10Vol.) (µl)	100%EtOH (*2,5 Vol.) (µl)
Bio- Pool	5	30	5	8	215
Dig- Pool	5				
Cy3- Pool	9				
Cy5- Pool	12				
FITC- Pool	12				

2.) 7- Fluorochrom-M-FISH

DNA-Pool	Volumen (µl)	Cot1- DNA (µl)	Salmon testis (µl)	3 M NaOAc (1/10Vol.) (µl)	100%EtOH (*2,5 Vol.) (µl)
DEAC- Pool	9	30	5	9	240
SpGreen-Pool	9				
Cy3- Pool	8				
TexasRed-Pool	5				
Cy5- Pool	8				
Dig- Pool	6				
Bio- Pool	7				

3.) AkroM-FISH

DNA-Sonde Fluorochrom	Volumen (µl)	Cot1- DNA (µl)	Salmon testis (µl)	3 M NaOAc (1/10Vol.) (µl)	100%EtOH (*2,5 Vol.) (µl)
WCP 13 Cy3	9	30	5	10,5	286
WCP 14 Cy5	6				
WCP 15 Bio (1:10)	5				
WCP 15 Dig	6				
WCP 21 Bio	7				
WCP 22 Dig	6				
Cen 13/21 Cy5	7				
Cen 14/22 Bio (1:50)	16				
Cen 15 Cy3	3				
rDNA DEAC	4				

Bei den Mengenangaben für die eingesetzten Sonden des Akromixes handelt es sich nur um ungefähre Angaben. Die einzusetzenden Mengen müssen nach jeder neuen Amplifikation ausgetestet und in Kombination austariert werden.

- Der Mix wird über Nacht bei –20°C gefällt.
- Nach der Fällung wird der Mix 30 min bei 4°C und 13000 U/min abzentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen.
- Das Pellet wird mit 70% Ethanol (-20°C) 10 min bei 13000 U/min gewaschen.
- Der Überstand wird abgenommen und das Pellet luftgetrocknet.

2.1.4.2 Hybridisierungsmix und Hybridisierung

Reagenzien:

Deionisiertes Formamid (pH 7); Sigma

40% oder 30% Dextransulfat in 4x SSC (NaCl, Na-citrat, aqua bidest), siehe Anhang

- Das luftgetrocknete Pellet wird in 12µl (M-FISH) bzw. 6µl (AkroM-FISH) deionisiertem Formamid bei 42°C gelöst.

- Wenn die DNA gelöst ist, gibt man 12µl 40% Dextransulfat (M-FISH) bzw. 3µl 30% Dextransulfat (AkroM-FISH) dazu.
- Der Mix wird 7 min bei 78°C im Heizblock denaturiert und 20 min bei 42°C vorhybridisiert („preannealt“).
- 6 bzw. 8 µl des Hybridisierungsmixes werden auf ein vorbehandeltes Präparat (siehe dazu Punkt 2.1.4.3) aufgetragen und mit einem 15x15 mm bzw. 18x18 mm Deckglas und Fixogum luftdicht verschlossen.
- Die Hybridisierung erfolgt in einer Metallbox bei 37°C im Wasserbad über zwei Nächte.

2.1.4.3 Vorbehandlung und Hybridisierung der Chromosomenpräparate

Pepsin-Verdau der Präparate

Um die Hybridisierungsergebnisse zu verbessern und den Hintergrund zu reduzieren, wird das überschüssige Cytoplasma auf den Chromosomenpräparaten durch das Einwirken von Pepsin entfernt.

Da es sich bei dem Anwendungsbereich von AkroM-FISH sehr häufig um Pränataldiagnostik und somit um Chorionzotten- bzw. Amniozentesepräparate handelt, muss beim Pepsinverdau sehr vorsichtig vorgegangen werden.

Reagenzien:

1x PBS siehe Anhang

Pepsin Stocklösung (10%, in 0.01 M HCl pH 2.3; 100 mg/ml); Sigma

Ethanol: 70%, 90% und 100%

- Präparate werden 1 x 5 min in 2 x SSC äquilibriert.
- Die Inkubation in der Pepsinlösung (15 µl der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0.1 M HCl) erfolgt je nach Cytoplasmaanteil zwischen 20 sec und 2 min bei 37°C.
- Die Präparate werden 2 x 5 min in 1 x PBS gewaschen.
- Präparate werden jeweils 3 min durch die aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) gezogen.
- Präparate werden luftgetrocknet und der Cytoplasma-Verdau unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

Denaturierung der Präparate

Für die Hybridisierung muss die DNA auf den Präparaten genau wie die DNA-Sonden einzelsträngig vorliegen.

Reagenzien:

Formamid (reinst)

Denaturierungslösung (70% Formamid), 50 ml Volumen:

35 ml Formamid
15 ml 2x SSC
auf pH 7 einstellen

Ethanol: 70%, 90% und 100%

- Denaturierung der Chromosomenpräparate 1 min 45 sec in 70% Formamidlösung bei 72°C
- Entwässerung der Präparate mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) bei -20°C, je 3 min
- Präparate lufttrocknen
- auf die Chromosomenpräparate werden die bereits denaturierten und vorhybridisierten Sonden aufgetragen, mit einem Deckglas bedeckt und mit Fixogum abgedichtet.
- Die Hybridisierung erfolgt im Wasserbad bei 37°C über zwei Nächte.

2.1.4.4 Nachweis

Reagenzien:

4x SSC/0.2% Tween siehe Anhang

1x SSC, siehe Anhang

BSA-Lösung: 1% bzw. 3% in 4x SSC/0.2% Tween

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) Stocklösung (2 mg/ml)

Antifade: p-Phenylendiamindihydrochlorid (50 mg in 5 ml PBS, pH 8)

Nachweis der indirekt markierten Proben:

Avidin-Cy3.5 (1 mg/ml); Amersham Pharmacia Biotech

sheep anti-Dig Cy5.5 (1mg/ ml); Roche Diagnostics

sheep anti-Dig FITC (200 µg/ml); Roche Diagnostics

Avidin-LaserPro790 (Cy7) (2 mg/ml); Amersham Pharmacia Labeling Kit

- Deckglas wird von den Präparaten vorsichtig entfernt.
- 3 x 5 min waschen in 4x SSC/Tween bei 42°C
- 3 x 5 min waschen in 1x SSC bei 60°C
- Präparate einige Sekunden in 4x SSC/Tween schwenken
- Blocken: Je 1 ml der 3%igen BSA-Lösung auf Präparate geben und 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubieren

Bei diesem Schritt werden unspezifische Bindungsstellen blockiert, wodurch ein spezifisches Binden der Antikörper ermöglicht wird.

- Blocking-Lösung abkippen und einige Sekunden in 4x SSC/Tween schwenken
- Nachweis der indirekt markierten Proben:

Folgende Antikörper wurden verwendet:

5f-M-FISH

- Avidin-Cy3.5 (1:300 verdünnt)
- sheep-anti-Dig Cy5.5 (1:100 verdünnt)

7f-M-FISH

- Avidin-LaserPro IR 790 (1:50 verdünnt)
- sheep-anti-Dig-Cy5.5 (1:100 verdünnt)

AkroM-FISH

- Avidin-Cy3.5 (1:300 verdünnt)
- sheep-anti-Dig-FITC (1:200 verdünnt)

Die Antikörper werden zunächst 2 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und anschließend in 1%iger BSA-Lösung verdünnt.

- Von der Antikörperlösung wird 200 µl auf jedes Präparat gegeben, mit einem Deckglas (24 x 60 mm) bedeckt und 45 min bei 37°C in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert.
- Deckglas wird entfernt.
- Präparate werden 3 x 5 min in 4x SSC/Tween bei 42°C gewaschen.
- Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI:
0.5 µl der DAPI-Stocklösung in 10 ml 4x SSC/Tween lösen
Je 1 ml der verdünnten DAPI-Lösung auf die Präparate geben und 3 min bei 37°C in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubieren
- Objektträger gründlich mit deionisiertem Wasser abspülen und lufttrocknen
- Mit Antifade eindeckeln

2.1.4.5 Epifluoreszenz-Mikroskopie und Bildanalyse

Die Fluorochrome werden nach der Hybridisierung mit einem motorisierten Epifluoreszenz-Mikroskop Leica DMRXA-RF8 (Leica Microsystems) aufgenommen (Eils et al., 1998). Dieses

Mikroskop ist mit einem 8-Filter-Rad sowie hochspezifischen Filtern ausgestattet, die es ermöglichen, jedes Fluorochrom mit einem separaten Anregungs-, Teilungs- und Emissionsfilter zu analysieren. Mit einer Sensys CCD-(charge coupled device) Kamera werden die Fluorochrome als skalierbare Grauwert-Bilder aufgenommen und dann einer bestimmten Farbe zugeordnet. Mikroskop und Kamera werden über eine Software (Leica QFISH, Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) gesteuert. Durch Überlagerung der Einzelbilder (Farbkanäle) erhält man ein sogenanntes „true-colour“ Bild. Die Klassifizierung der mit M-FISH hybridisierten Metaphasen erfolgte mit dem Leica Programm MCK (Eils et al., 1998).

2.2. Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut

Seit bekannt ist, dass sich kindliche Zellen im mütterlichen Blutkreislauf befinden, wurden zahlreiche Versuche unternommen, die invasive pränatale Diagnostik durch eine nichtinvasive zu ersetzen.

2.2. 1 Herstellung von Cytospinpräparaten

2.2.1.1 Verwendete Zellsysteme

Für die Etablierung einer geeigneten Vorbehandlung der Präparate für die Interphase-FISH, zum Austesten der Sonden und zur Überprüfung der generellen Durchführbarkeit oben beschriebener Methode wurden folgende Zellsysteme verwendet:

- 1.) **Zelllinie K562** (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) Chronisch myeloische Leukämie in der Blastenkrise; CD71- positiv
- 2.) **weibliche Lymphozyten** (Blut von Mitarbeiterin aus dem Labor)
- 3.) **Nabelschnurblut** (Frauenklinik; Klinikum Rechts der Isar)
- 4.) **Trisomie 21- Zellen** (Amniozentese, Chorionzottenbiopsie, Frauenklinik; Klinikum Rechts der Isar)
- 5.) **Gemisch aus K562- Zellen und weiblichem Blut**

2.2.1.2 Herstellung der Zellsuspensionen für Cytospinpräparation

Reagenzien:

RPMI 1640; Biochrom

Chang Medium in Situ mit L-Glutamin; Irvine Scientific

Amniomed; Euro- lone

Foetales Kälberserum (FCS); Biochrom

Penicillin/Streptomycin (10000 I.E./ 10000 µg/ ml); Biochrom

Hanks- Lösung; Sigma

Ficoll Hypaque 1,077 g/ml; Sigma

1. Zelllinie K562

Als Kulturmedium diente RPMI 1640 mit Hepes-Puffer und stabilem Glutamin, versetzt mit 10% FCS und Penicillin/ Streptomycin in einer Konzentration von 100 µg/ml.

Die Kultivierung erfolgte in einem begasteten Brutschrank mit einer CO₂- Konzentration von 5%.

Nach zwei bis drei Tagen Kultivierung wurden ca. 10 ml Zellsuspension bei 700g, Raumtemperatur, abzentrifugiert, der Rest verworfen bzw. weiterkultiviert.

Das Zellpellet wurde dreimal mit PBS gewaschen und danach, je nach Zellzahl, in 5 bis 8 ml PBS aufgenommen.

2. Lymphozyten

- 5 ml Blut wird mit gleicher Menge Hanks- Lösung gemischt.
- 5 ml Ficoll werden in einem 15 ml Falconröhrchen mit Blut-Hanks- Gemisch überschichtet.
- 30 min Zentrifugation bei 400g; Raumtemperatur
- obere Phase (Plasma und Thrombozyten) wird abgesaugt.
- Mittlere Phase (Lymphozyten) wird in neues Falconröhrchen überführt.
- Erythrozyten werden verworfen.
- isolierte Lymphozyten werden mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und 10 min bei 700g, Raumtemperatur zentrifugiert.
- Lymphozyten werden zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen und danach je nach Zellzahl in 1-4 ml PBS aufgenommen.

3. Nabelschnurblut

Es standen meist ca. 2 ml Blut pro Patient zur Verfügung.

Bei der Herstellung der Zellsuspension wurde nach obigem Protokoll verfahren, wobei die geringere Blutmenge zu berücksichtigen ist.

4. Trisomie 21- Zellen (Amniozentese bzw. Chorionzotten)

Als Kulturmedium diente für die Chorionzotten Chang Medium in Situ mit L- Glutamin, für die Amnionzellen Amniomed.

Die Kultivierung erfolgte in einem begasten Brutschrank mit einer CO₂- Konzentration von 5%.

Nach ca. 14 Tagen Kultivierung wurden die Zellen abtrypsiniert.

Die Herstellung der Zellsuspension erfolgte wie oben bei der Zelllinie K562 beschrieben.

2.2.1.3 Aufbringen der Zellen auf Objektträgern

Für die Herstellung der Cytospins wurde das Cytospingerät Universal 32, Hettich Zentrifugen verwendet.

Es wurden Cytospins mit einem Durchmesser von 6,2/30 mm² angefertigt. Dafür wurden 200µl Zellsuspension in den dafür vorgesehenen Trichter gefüllt.

Die Zentrifugation wurde 3 min bei 1000 RPM durchgeführt.

2.2.1.4 Herstellung von Folienpräparaten für Einzelzell- CGH

Um mit dem PALM-Gerät (siehe 2.2.6.1) einzelne Zellen katapultieren zu können, müssen diese auf Folie aufgebracht sein.

Es wurden zwei verschiedene Folien verwendet:

- PEN (Polyethylenphtalat); Dicke: 1,35 µm
- Pol (Polyester); Dicke: 1,0 µm

Diese Folien wurden mit Hilfe von 70%igem Alkohol, um eine Haftung zu erreichen, auf Deckgläsern bzw. Objektträgern aufgebracht, unter Verwendung eines kleinen Gummischers glatt gestrichen und mit Nagellack oder Fixogum befestigt.

Das Aufbringen der Cytospins auf die mit Folie bespannten Objektträger erfolgte wie unter 2.2.1.3 beschrieben.

2.2. 2 Antikörperfärbung der Cytospins

Die Antikörperfärbung gegen den Transferrinrezeptor CD71 wurde zunächst an K562- Zellen ausgetestet, da diese alle CD71- positiv sind und danach an Zellen des Nabelschnurblutes durchgeführt.

Es wurden zwei verschiedene, FITC-gekoppelte CD71- Antikörper ausgetestet.

Reagenzien:

Formaldehydlösung 37%; Merck

4x SSC/0.2% Tween siehe Anhang

1x PBS, siehe Anhang

BSA-Lösung: 1% bzw. 3% in 4x SSC/0.2% Tween

CD71- FITC (Anti-Transferrin-Rezeptor); Biosciences (Katalognummer: 347513;
32004X)

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) Stocklösung (2 mg/ml)

Antifade: p-Phenylendiamindihydrochlorid (50 mg in 5 ml PBS, pH 8)

Verwendetes Protokoll

- Formaldehydfixierung (700µl/ 50ml PBS); 10 min
- 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- 30 min blocken mit 3% BSA; 37°C, feuchte Kammer
- 45 min Inkubation mit CD71- Antikörper (1:50 bzw 1:600** in 1% BSA verdünnt); 37°C, feuchte Kammer
(* : zuerst verwendeter AK (s.o.) 1:50, anderer AK dann 1:600 verdünnt)
- Präparate 3× 3 min waschen mit 4× SSC/Tween
- DAPI-Färbung (siehe 2.1.4.4)

2.2. 3 Herstellung geeigneter Sondensätze

2.2.3.1 Verwendete Sonden

1. Chromosomenspezifische Centromersonden

Die Cytospins wurden sowohl auf normalen Objektträgern als auch auf Folie (für nachfolgende Einzelzell- CGH) (siehe Punkt 2.2.1.4) aufgebracht. Um geeignete Protokolle

für eine Vorbehandlung und eine erfolgreiche Hybridisierung auszutesten, wurden zunächst verschiedene Centromersonden aus Bari, Italien, eingesetzt. Die verwendeten Centromersonden und ihre jeweiligen Markierungen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Es wurden vor allem Sonden ausgewählt, die intensive Hybridisierungssignale liefern und möglichst geringe Kreuzhybridisierungstendenzen aufweisen.

Sonde	Centromer	Markierung	Farbe
PZ7.6B	7	Bio	rot
PZ8.4	8	Digoxigenin-FITC	grün
PRB11	11	Cy5	blau
D15 Z1	15	Cy3	gelb
pZ 17- 14	17	Cy3	gelb
2Xba	18	Estradiol-Cy5.5	violett
pZ20	20	Biotin-Avidin Cy3.5	rot

Tabelle 4: Chromosomenspezifische Centromersonden

2. Regionen- spezifische Sonden

Ein Vielfarben- Interphase-FISH-Ansatz zur Untersuchung fetaler Zellen soll die Diagnostik der am häufigsten vorkommenden Trisomien und eine Geschlechtsbestimmung ermöglichen. Es wurden Centromer-nahe YACs („CenYACs“) und Subtelomer- YACs („TelYACs“) verwendet. Bei den Centromer-nahen YACs ist der genaue physikalische Abstand zum Centromer nicht bekannt.

Es wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Sonden verwendet:

Sonde	Region	Markierung	Farbe
967 b01; CenYAC	13q	Bio- Cy5.5 Cy3	violett gelb
854 g08; TelYAC	18p11.3	Bio-Cy5.5	violett
949 b09 937 e12 746 b10 CenYACs	21q	Cy3	gelb
iA 02015; CenYAC	Xp	Dig-FITC	grün
878 a07; TelYAC	Xq27- 28	Cy5	blau
Armspez. Paintingsonde	Yp	Texas Red	rot

Tabelle 5: Regionen- spezifische Sonden

Die hier verwendeten YAC-Klone stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Thomas Haaf, Universität Mainz.

2.2.3.2 Amplifikation und Markierung der Sonden

1. Chromosomenspezifische Centromersonden

Die Amplifikation der Centromersonden erfolgte mit Insert-PCR aus einer 1:10-Verdünnung der Minipräparation, die Markierung mit Nicktranslation (siehe 2.1.2.2).

2. Regionen- spezifische Sonden

Die Amplifikation wurde mit der Telenius-DOP (siehe 2.1.2.1) durchgeführt. Die drei Centromer-nahen YACs für Chromosom 21 (siehe Tabelle 5) wurden gepoolt (je 1µl DNA) und dann gemeinsam amplifiziert, da sie einzeln zu schwache Signale ergaben.

Die Markierung der YAC- Sonden erfolgte mit Nicktranslation, die Markierung der Paintingsonde für Chromosom Yp mit „Labeling-DOP“ (vergleiche 2.1.2.1).

2.2.3.3 Ethanol-fällung, Hybridisierungsmix und Hybridisierung

1. Chromosomenspezifische Centromersonden

Für eine Hybridisierung mit repetitiven Sonden reichen in der Regel geringe Mengen an DNA (20-50ng), um intensive Signale zu erzielen.

Für die Hybridisierung wurden folgende Sondenmengen verwendet:

Centromer	Markierung	eingesetzte Menge in µl
Centromer 7	Bio	1 µl (1:50 Verdünnung der Nicktranslation)
Centromer 8	Dig	1 µl (1:50 Verdünnung der Nicktranslation)
Centromer 11	Cy5	4-6 µl (1:50 Verdünnung der Nicktranslation)
Centromer 15	Cy3	2 µl (1:10 Verdünnung der Nicktranslation)
Centromer 17	Cy3	4 µl (1:50 Verdünnung der Nicktranslation)
Centromer 18	Estradiol	0,5- 1 µl (1:50 Verdünnung der Nicktranslation)
Centromer 20	Bio	2 µl (1:50 Verdünnung der Nicktranslation)

Tabelle 6: Verwendete Sondenmengen

Die Centromersonde für Chromosom 20 wurde später wegen zu starker Kreuzhybridisierungstendenzen durch die Centromersonde für Chromosom 7 ersetzt.

Außerdem wurde anfangs noch die Centromersonde für Chromosom 17 verwendet, die dann später durch die Centromersonde für Chromosom 15 ausgetauscht wurde.

- Die Centromersonden werden unter Rotation, Vakuum und Wärme in einer Vakuumpumpe (Christ RVC 2-18) je nach Anzahl der Sonden 10- 20 min eingedampft.
- Anschließend werden die Sonden in einem Hybridisierungsmix aus 65% Formamid und 0,5% Dextransulfat resuspendiert. Die Formamidkonzentration von 65% erhöht die Stringenz und damit die Spezifität der Centromersonden.

Reagenzien:

Deionisiertes Formamid, Sigma

2× SSC in der Endkonzentration aus 20× SSC, siehe Anhang

40% Dextransulfat; daraus 5% Dextransulfat; Endkonzentration von 0,5% im Hybridisierungsmix

Folgende Mengen werden für den Hybridisierungsmix aus 65% Formamid und 0,5% Dextransulfat zusammenpipettiert:

Stocklösung	1× Ansatz in µl
Formamid	4,55
20× SSC	0,7
5% Dextransulfat	0,7
Aqua bidest	1,05
Endvolumen	7

Tabelle 7: Hybridisierungsmix für Centromersonden

- Sonden- Hybridisierungsmix 7 min bei 78°C im Heizblock denaturieren
- 7 µl des Mixes auf ein vorbehandeltes Präparat (siehe 2.1.4.3) auftragen und mit einem 18× 18 mm Deckglas und Fixogum luftdicht abschließen
- Hybridisierung vergleiche 2.1.4.2

2. Regionen- spezifische Sonden

Alle verwendeten YAC-Sonden wurden, um eine erfolgreiche Markierung mit ausreichend hoher Signalintensität zu überprüfen, zunächst einzeln und danach in verschiedenen Kombinationen und Markierungen auf Metaphasepräparaten von Lymphozyten, aber auch auf Metaphasen der Zelllinie K562 ausgetestet.

Danach waren bei der Fällung des Sondensatzes folgende Mengen an Sonden einzusetzen:

DNA-Sonde Fluorochrom	Region	Volumen (µl)	Cot1- DNA (µl)	Salmon testis (µl)	3 M NaOAc (1/10Vol.) (µl)	100%EtOH (*2,5 Vol.) (µl)
967 b01 CenYAC Cy3	13q	10	70	5	14,5	395
967 b01 CenYAC Bio	13q	10				
854 g01 TelYAC Bio	18p	10				
949 b09 937 e12 746 b10 CenYACs Cy3	21q	10				
iA 02015 CenYAC Dig	Xp	11				
878 a07 TelYAC Cy5	Xq	11				
Armspezifische Paintingsonde Texas Red	Yp	6				

Tabelle 8: Verwendete Mengen Regionen-spezifischer Sonden

- Mix über Nacht bei –20°C fällen
- 30 min bei 4°C und 13000 U/min abzentrifugieren
- Überstand abnehmen
- Auf das Pellet 200 µl 70% Ethanol (-20°C) geben
- 10 min bei 13000 U/min abzentrifugieren
- Überstand abnehmen, Pellet bei 37°C trocknen

Hybridisierungsmix und Hybridisierung siehe 2.1.4.2

2.2. 4 Interphase-FISH auf Cytospinpräparaten

Im Rahmen der Doktorarbeit mussten geeignete Protokolle für die Vorbehandlung der Cytospinpräparate etabliert werden. Dies gilt insbesondere für die auf Folie aufgebrauchten Cytospins, da FISH bei Zellen, die auf Folie fixiert sind, noch nie zuvor durchgeführt wurde, es keine entsprechenden Publikationen gibt und somit nicht auf etablierte Protokolle zurückgegriffen werden konnte. Es wurden verschiedenste Vorbehandlungsmöglichkeiten ausgetestet.

Die notwendigen Vorbehandlungen unterscheiden sich je nach Zelltyp und je nachdem, ob sich die Zellen auf einem normalen Objektträger oder auf Folie befinden.

Eine besondere Problematik stellt die Interphase-FISH nach vorangegangener Antikörperfärbung dar (siehe 2.2.5).

Für die jeweiligen Hybridisierungen wurden zunächst Chromosomen- spezifische Centromersonden (vgl. 2.2.3) verwendet, da diese intensivere Hybridisierungssignale liefern als Regionen- spezifische Sonden.

Angegeben ist jeweils nur das Protokoll, das nach zahlreichen Abwandlungen letztendlich zu guten Hybridisierungsergebnissen führte.

2.2.4.1 Vorbehandlung der Cytospins auf Objektträgern

Reagenzien:

Formaldehydlösung (37%); Merck

RNAse- Stocklösung: 10 mg/ml in 1 ml TE- Puffer, pH 7,5; 10mM TrisHCl, 1 mM EDTA

2× SSC, siehe Anhang

HCl (1N)

1× PBS

Pepsin Stocklösung (10%; 100 mg/ ml; in 0,01 M HCl), Sigma

Ethanol: 70%, 90%, 100%

Triton X 100 (0,1%); Merck

Tween 20; Merck

Methanol/Eisessig (3:1); für Analyse; Merck

0,28% KCl

Anmerkung:

Die Methanol-Eisessig- Fixierung wurde zu Beginn der Versuche vor dem Pepsinverdau durchgeführt. Da diese Reihenfolge aber einen extrem intensiven Pepsinverdau notwendig machte, wurde die Reihenfolge schließlich umgedreht.

1. Zelllinie K562

A) Hybridisierung mit Centromersonden

- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ **2 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**15 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ Präparate lufttrocknen

B) Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

Hier wurden in der Testphase anfangs noch andere YACs verwendet als die, die im endgültigen Sondensatz enthalten sind:

Sonde	Region	Markierung	eingesetzte Menge
967 b01 CenYAC	13q	Dig	6 µl
746 b10 CenYAC	21q	Bio	6 µl
Xp1 mikrodissektierte Sonde	Xp11.1	Cy3	10 µl
Xq2 mikrodissektierte Sonde	Xq21	Cy5	10 µl

- ❖ **30 min** Fixierung mit **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ **3 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**15 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ Präparate lufttrocknen

2. Nabelschnurblut

A) Hybridisierung mit Centromersonden

- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ **30 min** Fixierung mit **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ **9 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**30 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ Präparate lufttrocknen

B) Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

- ❖ **5 min** 200 µl **0,28% KCl**; 37°C, auf Präparat, in feuchter Kammer
- ❖ 3 min mit 1× PBS waschen
- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ **10 min 2× SSC, 60°C**
- ❖ 3 min mit 1× PBS waschen
- ❖ **5 min PBS/ 0,2% Tween**
- ❖ 3 min mit 2× SSC waschen
- ❖ **30 min RNase-Verdau** (RNase-Stock 1:200 in 2× SSC verdünnt), in feuchter Kammer
- ❖ **10 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**25 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ Präparate lufttrocknen

3. Trisomie 21- Zellen

Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ 1× 3 min waschen mit 2× SSC
- ❖ **30 min RNase-Verdau** (RNase-Stock 1:200 in 2× SSC verdünnt), in feuchter Kammer
- ❖ **2,5 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**15 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ **2 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ Präparate lufttrocknen

2.2.4.2 Vorbehandlung der Cytospins auf Folie

Die Fluoreszenz-in situ Hybridisierung von Zellen, die auf Folie aufgebracht sind, stellt, wie oben bereits erwähnt, eine noch nicht etablierte Technik dar. Die hierbei aufgetretenen Probleme werden im Ergebnisteil unter 3.2.4 erläutert.

Hier wird jeweils nur das Protokoll beschrieben, das zu den besten Hybridisierungsergebnissen führte.

Wichtig für die Hybridisierung von Centromersonden auf Folienpräparaten ist die Zugabe von Cot1-DNA, da die Centromersonden in Zellen, die auf Folie aufgebracht sind extreme Kreuzhybridisierungen zeigen.

Folgende Mengen an Sonden und Cot1- DNA wurden eingesetzt:

Cen 7 Bio	(1:50 verdünnt):	3 µl
Cen 8 Dig	(1:50 verdünnt):	3 µl
Cen 11 Cy5	(1:50 verdünnt):	6 µl
Cen 15 Cy3	(1:10 verdünnt):	2 µl
Cen 18 Estradiol	(1:50 verdünnt):	2 µl
Cot1- DNA:		1 µl

1. Zelllinie K562

A) Hybridisierung mit Centromersonden

- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ **15 min** Inkubation in **Triton X100 (20 µl/50 ml 1× PBS)**; RT
- ❖ **1h** Inkubation in **2× SSC, 37°C**
- ❖ **10 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**60 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ Präparate lufttrocknen

B) Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ **15 min** Inkubation in **Triton X100 (50 µl /50 ml 1× PBS)**; RT
- ❖ **1h 40 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**45 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in **1 ml 0,01 M HCl**)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ Präparate lufttrocknen

2. Lymphozyten

A) Hybridisierung mit Centromersonden

- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ **12 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**40 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS

- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ Präparate lufttrocknen

B) Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ 1× 3 min waschen mit 2× SSC
- ❖ **30 min RNase-Verdau** (RNase-Stock 1:200 in 2× SSC verdünnt), in feuchter Kammer
- ❖ **10 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**27 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in **1 ml 0,01 M HCl**)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ Präparate lufttrocknen

3. Nabelschnurblut

A) Hybridisierung mit Centromersonden

- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ **15 min** Inkubation in **Triton X100 (50 µl /50 ml 1× PBS)**; RT
- ❖ **15 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**60 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ Präparate lufttrocknen

B) Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ 1× 3 min waschen mit 2× SSC
- ❖ **30 min RNase-Verdau** (RNase-Stock 1:200 in 2× SSC verdünnt), in feuchter Kammer

- ❖ **10 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**10 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in **1 ml 0,01 M HCl**)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ Präparate lufttrocknen

4. Trisomie 21- Zellen

Regionen- spezifische Sonden

- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700 µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ **15 min 2× SSC, 60°C**
- ❖ **30 min RNase-Verdau** (RNase-Stock 1:200 in 2× SSC verdünnt), in feuchter Kammer
- ❖ **10 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**10 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in **1 ml 0,01 M HCl**)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ Präparate lufttrocknen

2.2.4.3 Hybridisierung und Nachweis

Reagenzien:

Denaturierungslösung (70% Formamid); 50 ml Volumen:

35 ml Formamid

15 ml 2× SSC

auf pH 7 einstellen

Ethanol:70%, 90%,100%

Vorbereitung der verwendeten Sonden:

siehe 2.2.3.3

Denaturierung und Hybridisierung der Präparate:

- Denaturierung der Cytospinpräparate 2 min 30 sec in 70% Formamidlösung bei 72°C
- Entwässerung der Präparate mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) bei -20°C, je 3 min
- Präparate lufttrocknen
- auf die Cytospinpräparate werden die bereits denaturierten und vorhybridisierten Sonden aufgetragen, mit einem Deckglas bedeckt und mit Fixogum abgedichtet.
- Die Hybridisierung erfolgt im Wasserbad bei 37°C über zwei Nächte.

Nachweis:

Die Durchführung des Hybridisierungsnachweises ist unter 2.1.4.4 nachzulesen.

Reagenzien:

IgG rabbit/anti- estradiol (200µg/ml); Roche
anti- rabbit Cy5.5 (1mg/ml); Amersham

Für den Nachweis der indirekten Centromersonden wurden folgende Antikörper verwendet:

Fluorochrom	1.Antikörperschicht	2.Antikörperschicht
Biotin		Avidin Cy3.5 (1:300)
Dig		sheep-anti-Dig-FITC (1:200)
Estradiol	IgG rabbit/anti-estradiol (1:200)	anti-rabbit-Cy5.5 (1:400)

Für den Nachweis der indirekten Regionen- spezifischen Sonden wurden folgende Antikörper verwendet:

Fluorochrom	Antikörper
Biotin	Avidin Cy5.5 (1:200)
Dig	sheep-anti-Dig-FITC (1:200)

2.2. 5 Interphase-FISH auf Cytospinpräparaten nach Antikörperfärbung

Die Schwierigkeit der Interphase-FISH nach Antikörperfärbung besteht in der Identifizierung der FISH- Signale in mit dem Antikörper angefärbten Zellen.

Wie oben beschrieben, erwies sich der anfangs verwendete CD71- Antikörper für FISH- Anwendungen als ungeeignet und wurde deshalb gegen einen anderen ausgetauscht.

Trotzdem war nach wie vor die Auswertung der FISH-Signale in positiven Zellen problematisch und erforderte die Etablierung spezieller Protokolle.

Auch hier wurde immer zuerst eine Hybridisierung mit Centromersonden durchgeführt.

Nach der unter 2.2.2 beschriebenen Antikörperfärbung und Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop unter Aufschreiben der Koordinaten wird durch Waschen mit 4× SSC/Tween das Deckglas vorsichtig entfernt und eine Entwässerung der Präparate mit aufsteigender Alkoholreihe durchgeführt. Die weitere Vorbehandlung ist für die verschiedenen Zellsysteme unten beschrieben.

2.2.5.1 Vorbehandlung der Cytospinpräparate auf Objektträgern

1. Zelllinie K562

A) Hybridisierung mit Centromersonden

- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ **15 min** Inkubation in **Triton** (**10 µl**/50 ml 1× PBS)
- ❖ **1h** Inkubation in **2× SSC, 37°C**
- ❖ **10 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**25 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ Präparate lufttrocknen

B) Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ **15 min** Inkubation in **Triton** (**10 µl**/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ **1h** Inkubation in **2× SSC, 37°C**
- ❖ **12 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**25 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ Präparate lufttrocknen

2. Nabelschnurblut

A) Hybridisierung mit Centromersonden

- ❖ **30 min RNase-Verdau** (RNase-Stock 1:200 in 2× SSC verdünnt), in feuchter Kammer
- ❖ **3 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**15 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ Präparate lufttrocknen

B) Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

- ❖ **5 min** 200 µl **0,28% KCl**; 37°C, auf Präparat, in feuchter Kammer
- ❖ 3 min mit 1× PBS waschen
- ❖ 10 min Formaldehydfixierung (700 µl/ 50 ml 1× PBS)
- ❖ 3× 3 min waschen mit 1× PBS
- ❖ **10 min 2× SSC, 60°C**
- ❖ 3 min mit 1× PBS waschen
- ❖ **5 min PBS/ 0,2% Tween**
- ❖ 3 min mit 2× SSC waschen
- ❖ **30 min RNase-Verdau** (RNase-Stock 1:200 in 2× SSC verdünnt), in feuchter Kammer
- ❖ **10 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**30 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ Präparate lufttrocknen

3. Gemisch aus K562- Zellen und weiblichen Lymphozyten

A) Hybridisierung mit Centromersonden

- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ **3 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**15 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen

B) Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

- ❖ **5 min** 200 µl **0,28% KCl**; 37°C, auf Präparat, in feuchter Kammer
- ❖ 3 min mit 1× PBS waschen
- ❖ **45 min 2× SSC, 60°C**
- ❖ 3 min mit 1× PBS waschen
- ❖ **20 min PBS/ 0,2% Tween**
- ❖ 3 min mit 2× SSC waschen
- ❖ **30 min RNase-Verdau** (RNase-Stock 1:200 in 2× SSC verdünnt), in feuchter Kammer
- ❖ **15 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**25 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in 50 ml 0,1 M HCl)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ Präparate lufttrocknen

2.2.5.2 Vorbehandlung der Cytospins auf Folie

1. Zelllinie K562

A) Hybridisierung mit Centromersonden

Die Vorbehandlung entspricht der unter 2.2.5.2 1A beschriebenen.

B) Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

Die Vorbehandlung entspricht der unter 2.2.5.2 1B beschriebenen.

2. Nabelschnurblut

A) Hybridisierung mit Centromersonden

Die Centromersonden wurden hier bei Hybridisierung auf Folie nach Antikörperfärbung der Zellen in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Cen 7 Bio	(1:25 verdünnt):	2 µl
Cen 8 Dig	(1:25 verdünnt):	1 µl
Cen 11 Cy5	(1:25 verdünnt):	6 µl
Cen 15 Cy3	(1:10 verdünnt):	2 µl
Cen 18 Es	(1:25 verdünnt):	1 µl
Cot1-DNA:		1 µl

- ❖ **30 min RNase-Verdau** (RNase-Stock 1:200 in 2× SSC verdünnt), in feuchter Kammer
- ❖ **10 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**5 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in **1 ml 0,01 M HCl**)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS
- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ Präparate lufttrocknen

B) Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden

- ❖ **40 min 2× SSC, 60°C**
- ❖ 3 min mit 1× PBS waschen
- ❖ **20 min PBS/ 0,2% Tween**
- ❖ 3 min mit 2× SSC waschen
- ❖ **30 min RNase-Verdau** (RNase-Stock 1:200 in 2× SSC verdünnt), in feuchter Kammer
- ❖ **10 min** Inkubation in der Pepsinlösung (**32 µl** der 10%igen Pepsin- Stocklösung in **1 ml 0,01 M HCl**)
- ❖ 2× 5 min waschen in 1× PBS

- ❖ Präparate je 3 min durch aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen
- ❖ **30 min** Inkubation in **Methanol/Eisessig** (3:1; -20°C) bei 4°C
- ❖ Präparate lufttrocknen

2.2.5.3 Hybridisierung und Nachweis

Hybridisierung und Nachweis sind unter 2.2.4.3 nachzulesen.

2.2.6 Einzelzell- CGH

Die CGH (Vergleichende genomische Hybridisierung) ermöglicht es, unbalancierte genomische Veränderungen leicht zu kartieren. Bei diesem Verfahren werden die Test- DNA und die Referenz- DNA mit jeweils einem Fluorochrom markiert und auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert. Durch vergleichende Analyse der Fluorochromintensitäten entlang der Chromosomenachse können unbalancierte chromosomale Aberrationen identifiziert werden.

Die Einzelzell-CGH wurde mit folgenden Zellsystemen durchgeführt:

- Zelllinie K562 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
- weibliche Lymphozyten (Blut von Mitarbeiterin aus dem Labor)
- Zelllinie RCC 26 (Klinikum Großhadern; durchgeführt von Rainer Gangnus)
- Fetale Zellen (Nabelschnurblut; Frauenklinik, Klinikum Rechts der Isar)
- Trisomie 21- Zellen (Amniozentese, Chorionzotten; Frauenklinik, Klinikum Rechts der Isar)
- XYY- Zellen (Blut aus dem Klinikum Rechts der Isar, in unserem Labor kultiviert)

2.2.6.1 Verwendete Systeme zur Zellgewinnung

1. Arcturus- System

Bei dem PixCell System von Arcturus handelt es sich um ein **LCM (Laser Capture Microdissection)**- System. Es setzt sich zusammen aus einem Invers- Mikroskop (Olympus), einem Dioden-Laser im nahen UV- Bereich (Wellenlänge: 980 nm), einer CCD-Kamera und einem Monitor (Emmert- Buck et al., 1996).

Ein Plastikcap, das mit einer speziellen thermoplastischen Folie bespannt ist, wird über dem Cytospin platziert. Der Laser wird durch das Cap geschickt, die thermoplastische Folie wölbt

sich infolge der Laserenergie, sodass sie den Raum zwischen Cap und Cytospin ausfüllt. Durch die entstehende Wärme (ca. 90°C) schmilzt die Folie und die gewünschten Zellen bleiben an der Membranoberfläche haften. Dadurch, dass das Plastikcap hochgehoben wird, werden die gewünschten Zellen aus dem Cytospin entfernt und können danach von der Folie isoliert werden.

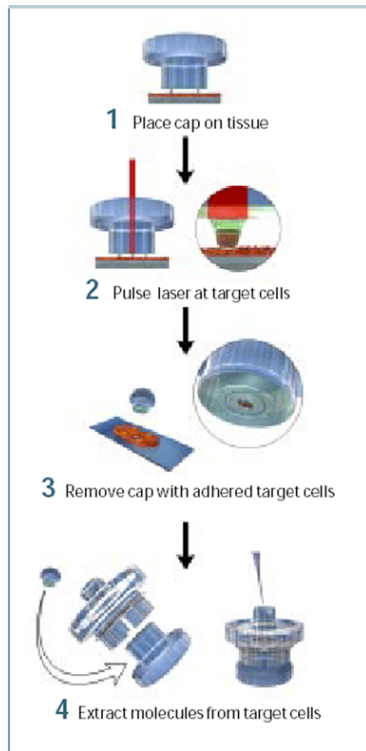


Abb.4: Zellisolierung mit dem Arcturus-System

2. PALM- System

Bei dem PALM Microbeam Gerät handelt es sich um ein **LPC (Laser Pressure Catapulting)**- System. Ein gepulster Nitrogen – Laser (Wellenlänge: 337 nm) wird durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur focussiert.

Der Laserfokus hat einen Durchmesser von weniger als 1 µm. Die extrem hohe Photonendichte in dem engen Laserfokus wird dazu benutzt, biologische Strukturen zu durchtrennen bzw. wie es in dieser Arbeit der Fall ist, einzelne, auf einer speziellen Folie aufgebrachte Zellen auszuschneiden und in ein Cap zu katapultieren (Schütze et al., 1998).

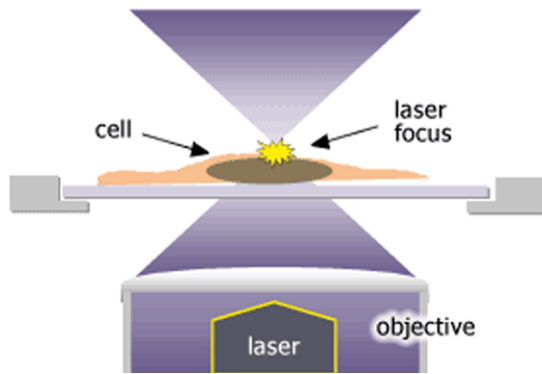


Abb.5: Zellisolierung mit dem PALM- System

2.2.6.2 Zellgewinnung

1. Arcturus- System

Einzelne Zellen wurden, wie oben beschrieben, in ein Cap geschossen und haften dann an der Folie. Diese im Cap befindliche Folie wird unter möglichst sterilen Bedingungen vorsichtig mit einer Pinzette vom Cap gelöst und in ein neues PCR- Gefäß überführt. Hier wird in einem Volumen von ca. 20 µl der Proteinase K- Verdau (siehe 2.2.6.3) durchgeführt. Die PCR- Gefäße werden dafür auf einem Drehrad eingespannt, das über Nacht in einem Wärmeschrank (42°C) rotiert.

2. PALM- System

Reagenzien:

1× PBS

Igepal CA 630; Sigma

Einzelne Zellen werden in den Deckel von PCR- Tubes katapultiert, in den vorher 2 µl Puffer (0,5% Igepal/ PBS) pipettiert wurden.

Die Tubes werden danach 10 min abzentrifugiert, bevor der Proteinase K- Verdau durchgeführt wird.

2.2.6.3 Verwendetes Protokoll für die Einzelzell- CGH

Verwendet wurde das von Klein et al. beschriebene Protokoll (PNAS, Vol 96 pp. 4494-4499, April 1999), das allerdings adaptiert werden musste.

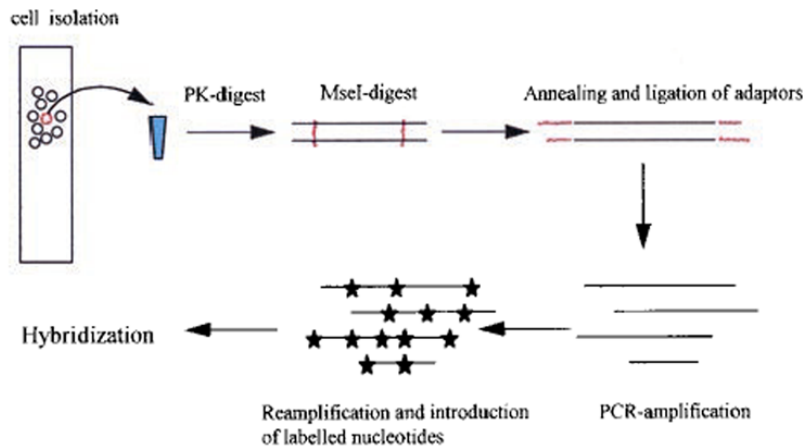


Abb.6: Single cell-CGH- Protokoll (Klein et al. PNAS Vol.96, pp. 4494- 4499; April 1999)

Die DNA aus den isolierten Zellen wird durch eine Proteinase K- Behandlung gewonnen. Nach Inaktivierung der Proteinase K wird die doppelsträngige DNA mittels der Restriktionsendonuclease MseI verdaut. Hierbei entsteht ein TA- Überhang, sodass ein Annealing der Adapter und die nachfolgende Ligation möglich sind. Nach einer ersten Amplifikation wird 1/100 des PCR- Produkts reamplifiziert und dabei durch den Einbau Fluorochrom- oder Hapten-gekoppelter Nucleotide markiert. Ca. 2 µg der markierten DNA werden für die Hybridisierung verwendet.

1. Proteinase K- Verdau

Reagenzien:

10x One-Phor-All-Buffer-Plus (OFA); Pharmacia

Tween 20; Merck

Igepal CA 630; Sigma

Proteinase K 10mg/ ml; Roche

10x Ansatz:

2 µl OFA

1,3 µl Tween 10%ig

1,3 µl Igepal 10%ig

2,6 µl Proteinase K 10 mg/ ml

12,8 µl H₂O

- 2 µl zu Zellen, die sich bereits in 2 µl Puffer (s.o; PALM-System) befinden, geben

Bei Zellen, die mit dem Arcturus-System isoliert wurden, wird die Folie, auf der sich die Zelle befindet, mit dem 10-fachen Ansatz des Proteinase K- Verdau überschichtet.

- PK- Verdau ca. 10h bei 42°C

Hier wurde im Laufe der Versuche die Zeit verlängert und die Temperatur auf 55°C erhöht.

- PK- Inaktivierung bei 80°C 10 min

2. Msel- Verdau

Reagenzien:

10× One-Phor-All-Buffer-Plus (OFA); Pharmacia

Msel; 50.000 U/ ml; New England Biolabs

Plazenta-DNA als Kontroll-DNA; 225 ng/ µl

1× Ansatz Test-DNA

0,2 µl OFA

0,5 µl Msel

1,3 µl H₂O

1× Ansatz Kontroll-DNA

0,5 µl OFA

0,5 µl Msel

3 µl H₂O

1 µl DNA

- 2 µl pro Tube zu PK- verdauten Zellen pipettieren
- Msel- Verdau bei 37°C für 3h
- Msel- Inaktivierung bei 65°C für 5 min

3. Preannealing der Adapter

Reagenzien:

10× One-Phor-All-Buffer-Plus (OFA); Pharmacia

LIB 1, 100 µM; 5'- AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT-3'

ddMse11 100 µM, 5'- TAA CTG ACA GCdd-3'

1× Ansatz

0,5 µl OFA

0,5 µl LIB1 100 µM

0,5 µl ddMse11 100 µM

1,5 µl H₂O

Das Annealing wird in der PCR- Maschine mit einem speziellen Annealing-Programm durchgeführt und zwar von 65°C bis 15°C in 1 Minuten- Schritten.

4. Ligation

Reagenzien.

10 mM ATP; Roche

T4- DNA- Ligase; 2.000000 U/ ml; NEB

- Zu den 3 µl preannealten Adaptern
1 µl 10 mM ATP
1 µl T4 DNA- Ligase
- 5 µl der Ligationslösung zu MseI- verdauten Zellen geben
- bei 15°C über Nacht ligieren

5. Primäre PCR

Reagenzien:

10× BM- Puffer 1; 17,5 mM MgCl₂

dNTPs; 10 mM; Roche

PolMix; 3,5U/ µl; Roche

1× Ansatz:

3 µl BM Puffer 1

2 µl dNTPs 10 mM

1 µl PolMix

1,2 µl 3% Formamid

32,8 µl H₂O

- 40 µl PCR- Mix zu Ligationsprodukt geben
- PCR- Programm:

1x	14x	8x	22x	1x	
65°C 3min	94°C 40 sec 57°C 30 sec 68°C 1`30 sec	94°C 40 sec 57°C 30 sec +1°C/Zyklus 68°C 1`45 sec	94°C 40 sec 65°C 30 sec 68°C 1`53 sec +1 min/ Zyklus	68°C 3`40 sec	4°C

6. Markierungs-PCR

Reagenzien:

10x BM- Puffer 1; 17,5 mM MgCl₂

LIB 1, 100 µM; 5'- AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT-3'

7/8- Nucleotidmix

Dig- dUTP; Roche

Bio-dUTP; Roche

Taq- Polymerase 5U/ µl ; Roche

7/8- Mix:

dTTP: 4,37µl

dATP: 5 µl

dCTP: 5 µl

dGTP : 5 µl

H₂O : 30,625 µl

1x Ansatz Test- DNA

BM- Puffer1: 4 µl

100 µM LIB1: 6 µl

7/8 Nucleotid- Mix : 1,4 µl

Dig-dUTP: 1,75 µl

Taq-Polymerase : 0,5 µl

3% Formamid : 1,2 µl

H₂O: 25,2 µl

1x Ansatz Kontroll- DNA

BM- Puffer1: 4 µl

100 µM LIB1 : 6 µl

7/8 Nucleotid- Mix: 1,4 µl

Bio-dUTP: 1,75 µl

Taq- Polymerase : 0,5 µl

3% Formamid : 1,2 µl

H₂O: 25,2 µl

1 µl von Primär-PCR- Produkt zu obigem Ansatz geben

- PCR- Programm:

1x		10 x	
94°C	1 min	94°C	30 sec
60°C	30 sec	60°C	30 sec
72°C	2 min	72°C	2 min + 20 sec/ Zyklus

2.2.6.4 Fällung, Hybridisierungsmix und Hybridisierung

Ethanol-fällung:

DNA/ Fluorochrom	Volumen (µl)	Cot1- DNA (µl)	Salmon testis (µl)	3 M NaOAc (1/10Vol)(µl)	100% EtOH (*2,5 Vol) (µl)
Test-DNA/ Dig	40	65	2	15	405
Kontroll-DNA/ Bio	40				

Die Durchführung der Ethanol-fällung ist unter 2.1.4.1 nachzulesen.

Hybridisierungsmix und Hybridisierung:

siehe 2.1.4.6

Für den Hybridisierungsmix wurden 4µl Formamid und 4µl 30% Dextransulfat verwendet.

2.2.6.5 Weitere Möglichkeiten der Amplifikation und Markierung der DNA

Neben dem Protokoll nach Klein et al. (1999) wurden für die Einzelzell-CGH folgende PCR-Protokolle ausgetestet:

1. Amplifikation mit Telenius-DOP, Markierung mit Nicktranslation

Die Telenius-DOP wurde wie unter 2.1.2.1 beschrieben durchgeführt, allerdings unter der Zugabe von 3% Formamid.

Die Nicktranslation ist unter 2.1.2.2 beschrieben.

2. Amplifikation mit „Donna“-PCR, Markierung mit Nicktranslation

Die hier verwendete PCR ist beschrieben bei Snijders et al., 2001.

Die sogenannte „DONNA“- PCR ist bei uns im Labor nach Donna Albertson benannt (siehe oben genanntes Paper).

Reagenzien:

10x BM- Puffer 2; 22,5 mM MgCl₂; Roche

50 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂); GIBCO

dNTP`s 5 mM; Roche

LIB 1, 100 µM; 5`- AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT-3`

Taq- Polymerase 5U/ µl ; Roche

1x Ansatz:

50 µl

Stocklösung	Ansatz in µl	Endkonzentration
10x BM Puffer 2	5	1x
50 mM MgCl ₂	2,25	5,5 mM (2,25 mM in BM-Puffer)
5 mM dNTP`s	2	0,2 mM
LIB1 (100 µM)	2	4 µM
Aqua bidest	33,25	
Taq- Polymerase	0,5	2,5 U/µl
DNA	5	

PCR- Programm:

- 95°C: 10 min (Anfangsdenaturierung)
- 95°C: 30 sec (Denaturierung)
- 50°C: 30 sec (Annealing)
- 72°C: 2 min (Elongation)

insgesamt: 45 Zyklen

- 72°C: 7 min (Elongation)

2.2.6.6 Vorbehandlung und Hybridisierung der Chromosomenpräparate

Für die CGH- Experimente ist eine Reduzierung von unspezifischem Hintergrund auf den Chromosomenpräparaten besonders entscheidend. Deshalb wurde hier vor dem Pepsin-Verdau noch eine RNase-Behandlung durchgeführt.

RNAse-Behandlung:

Reagenzien:

RNAse A- Stock: 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 15 mM NaCl

- Präparate kurz in 2× SSC schwenken
- Präparat mit 200 µl RNAse-Lösung (1:200 verdünnt in 2× SSC) in feuchter Kammer 30 min inkubieren
- 2× 5 min waschen mit 2×SSC

Pepsin-Verdau der Präparate

Die Durchführung des Pepsin-Verdau ist unter 2.1.4.5 nachzulesen.

Denaturierung der Präparate

Die Denaturierung der Präparate ist ebenfalls unter 2.1.4.5 beschrieben.

2.2.6.7 Nachweis

Die Durchführung des Hybridisierungsnachweises ist unter 2.1.4.6 nachzulesen.

Bei der Einzelzell-CGH wurden folgende Antikörper verwendet:

- Avidin-Cy3.5 (1:300 verdünnt)
- sheep- anti-Dig- FITC (1:200 verdünnt)

2.2.6.8 Epifluoreszenz- Mikroskopie und Erstellen des CGH- Profils

Die Mikroskopie wurde wie unter 2.1.4.5 beschrieben durchgeführt.

Für die Erstellung des CGH- Profils wurde das Computerprogramm QCGH verwendet, das dem MCK- Programm (siehe 2.1.4.5) sehr ähnlich ist.

Das Prinzip der CGH- Auswertung wurde bereits in vielen Publikationen ausführlich beschrieben (Kallionemi et al., 1992; du Manoir et al., 1993; Forozaan et al., 1997).

2.3 Chromosomenanalyse in Mensch- Maus- Hybridzelllinien mittels einer neuen Technik

Wichtig bei dieser Technik ist es, die Stabilität der Hybridzellen zu analysieren. Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt, mit der alle in einer Zelle enthaltenen Mensch- und Mausechromosomen simultan analysiert werden können.

2.3.1 Verwendete Sonden

1. Mensch-M- FISH mit 5 Fluorochromen (5f)

Der verwendete 5f- M-FISH- Pool ist bereits unter 2.1.1.1 genau beschrieben.

2. Maus-M- FISH mit 5 Fluorochromen

Als Sonden dienten durch Durchflusscytometrie gewonnene Chromosomen- spezifische DNA- Bibliotheken aus dem Labor von Johannes Wienberg und Nigel Carter.

Die Markierung der Proben erfolgte kombinatorisch nach untenstehendem Schema:

(vgl. Jentsch et al., 2001)

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y
Colour																					
FITC			X			X		X	X		X	X			X				X	X	
Oy3	X	X		X							X	X	X			X			X		X
Oy3.5		X				X	X	X	X	X	X		X					X			
Oy5	X				X				X	X		X					X			X	X
Oy5.5	X	X				X	X							X	X	X	X				

Tabelle 9: Schema der M-FISH- Probenmarkierung mit 5 Fluorochromen und zugehörigen Klassifizierungsfarben.

3. Menschliche gesamt-genomische DNA

Für die eindeutige Identifizierung menschlicher Chromosomen bzw. Chromosomenfragmente wurde Plazenta-DNA, markiert mit einem zusätzlichen Fluorochrom, das nicht in den 5 Farben- M- FISH- Mixen enthalten war, eingesetzt.

2.3.2 Amplifikation und Markierung der Sonden

1. Menschlicher 5-Fluorochrom- M- FISH- Mix

Die Amplifikation und Markierung der Sonden ist unter 2.1 2.1 beschrieben.

Ein Unterschied bestand hier nur in der Markierung:

- Der FITC- Pool wurde nicht direkt markiert, sondern indirekt mit Bio und dann mit dem Antikörper Avidin- FITC nachgewiesen.
- Der Bio- Pool wurde direkt mit Texas- Red markiert.

2. Maus- 5-Fluorochrom- M- FISH- Mix

Die Amplifikation und Markierung der Sonden entspricht der für den menschlichen M-FISH-Mix (siehe 2.1.2.1).

Ein Unterschied bestand nur in dem verwendeten Primer: anstelle des 6MW- Primers wird bei der Amplifikation und Markierung der Maus- Sonden der 6A1- Primer verwendet, da dieser die Anzahl der Kreuzhybridisierungen in den Centromeren von Mausechromosomen reduziert:

6A1- Primer 100pmol/μl: 5'- CCG ACT CGA GNN NNN NTA CAC C-3'

Der Bio- Pool wurde hier ebenfalls direkt mit TR markiert.

3. Gesamt-genomische menschliche DNA

Verwendet wurde Plazenta- DNA, die mit Nicktranslation (siehe 2.1.2.2) markiert wurde. Zur Markierung wurde das Fluorochrom DEAC (*Diethylaminocoumarin*)-5-dUTP eingesetzt.

2.3.3 Ethanolfällung, Hybridisierungsmix und Hybridisierung

Ethanolfällung:

Die Durchführung der Ethanolfällung ist unter 2.1.4.1 nachzulesen.

Zusätzlich verwendete Reagenzien:

Maus Cot1- DNA, 1mg/ml; GIBCO

Sowohl Mensch- als auch Maus-M-FISH- Mix wurden zunächst einzeln auf den Chromosomenpräparaten aus den Hybridzelllinien getestet:

Für eine erfolgreiche Hybridisierung des menschlichen M-FISH- Mixes auf den Hybridzelllinien sind folgende Mengen einzusetzen:

DNA-Pool	Menge (µl)	Cot1- DNA (µl) (Mensch)	Cot1- DNA (µl) (Maus)	Salmon testis (µl)	3 M NaOAc (1/10Vol.) (µl)	100%EtOH (*2,5 Vol.) (µl)
Bio- Pool	5	30	30	5	8,7	239
Cy3- Pool	4,5					
TR- Pool	5					
Cy5- Pool	6					
Dig- Pool	2,5					

Warum auch hier Maus- Cot zugegeben werden muss, ist im Ergebnisteil unter 3.3 erläutert.

Für die Hybridisierung des Maus-M-FISH- Mixes sind folgende Mengen einzusetzen:

DNA-Pool	Menge (µl)	Cot1- DNA (µl) (Mensch)	Cot1- DNA (µl) (Maus)	Salmon testis (µl)	3 M NaOAc (1/10Vol.) (µl)	100%EtOH (*2,5 Vol.) (µl)
FITC- Pool	7	60	60	5	15	409
Cy3- Pool	5					
Bio- Pool	2,5					
Cy5- Pool	6					
Dig- Pool	3					

Warum hier menschliche Cot1- DNA zugegeben werden muss, wird im Ergebnisteil unter 3.3 beschrieben.

Für eine simultane Hybridisierung von Mensch-M-FISH, Maus-M-FISH und menschlicher, genomischer DNA sind folgende Mengen einzusetzen:

DNA-Pools (Mensch)	Menge (µl)	Cot1-DNA (µl) (Mensch)	Cot1-DNA (µl) (Maus)	Salmon testis (µl)	3 M NaOAc (1/10Vol.) (µl)	100%EtOH (*2,5 Vol.) (µl)
Bio- Pool	5	60	60	5	15	409
Cy3- Pool	4,5					
TR- Pool	5					
Cy5- Pool	6					
Dig- Pool	2,5					
DNA-Pools (Maus)						
SpG-Pool	6					
Cy3-Pool	5					
TR-Pool	6					
Cy5-Pool	6					
Dig-Pool	5					
Plazenta-DNA	20					

Hybridisierungsmix und Hybridisierung:

siehe 2.1.4.6

Mensch-M-FISH:

Für den Hybridisierungsmix wurden 3µl Formamid und 3µl 40% Dextransulfat verwendet.

Maus-M-FISH:

Für den Hybridisierungsmix wurden 5µl Formamid und 5µl 40% Dextransulfat eingesetzt.

Mensch- und Maus- M-FISH:

Für den Hybridisierungsmix wurden 4µl Formamid und 4µl 40% Dextransulfat verwendet.

2.3.4 Herstellung der Hybridzelllinien bzw. Chromosomenpräparate

Die Mensch-Maus- Hybridzelllinien wurden im Labor von Christoph Lengauer hergestellt (Yan et al., 2000b).

Die Hybridzelllinien wurden nach 15- 20 Passagen analysiert.

Die Metaphasechromosomen wurden nach dem Standardprotokoll ebenfalls im Labor von Christoph Lengauer präpariert.

2.3.5 Vorbehandlung und Hybridisierung der Präparate

RNAse-Behandlung:

Die RNAse- Behandlung ist unter 2.2.6.6 beschrieben.

Sie wurde bei den Hybridzelllinien 1 h lang durchgeführt.

Pepsin-Verdau der Präparate:

Die Durchführung des Pepsinverdaus ist unter 2.1.4.5 nachzulesen.

Die Inkubation in der Pepsinlösung (20 µl der 10%igen Pepsin Stocklösung in 50 ml 0.1 M HCl) erfolgte je nach Cytoplasmaanteil zwischen 9 und 12 min bei 37°C.

Denaturierung der Präparate:

Die Denaturierung der Präparate ist ebenfalls unter 2.1.4.5 beschrieben.

Die Denaturierungszeit betrug hier 3 min.

2.3.6 Nachweis

Die Durchführung des Hybridisierungsnachweises ist unter 2.1.4.6 nachzulesen.

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

- Avidin- FITC (1:200 verdünnt)
- sheep- anti-Dig- Cy5.5 (1:100 verdünnt)

2.3.7 Epifluoreszenz- Mikroskopie und Klassifizierung

Die Mikroskopie wurde wie unter 2.1.4.5 beschrieben durchgeführt.

Die Analyse der Metaphasen erfolgte mit der Leica MCK- Software, wie bereits für menschliche (Uhrig et al., 1999; Azofeifa et al., 2000) und Maus-Chromosomen (Jentsch et al., 2001) beschrieben.

Bei der simultanen Hybridisierung des Mensch- und Maus-M-FISH- Mixes müssen die Mensch- und Mausechromosomen mit dem jeweiligen MCK- Klassifizierungsprogramm

zunächst getrennt klassifiziert werden, indem jeweils entweder die Mensch- oder die Mauschromosomen mit einer speziellen Softwarefunktion entfernt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von Markerchromosomen

Da sich, wie bereits beschrieben, ca. 80% der Markerchromosomen von akrozentrischen Chromosomen ableiten (Crolla et al., 1998), wurde ein neuer Probenmix, genannt **AkroM-FISH**, generiert, der alle akrozentrischen Chromosomen anfärbt und zwar sowohl die euchromatischen als auch die heterochromatischen Bereiche.

3.1.1 Etablierung von AkroM- FISH

Bei AkroM- FISH kommen Chromosomen-spezifische Paintingsonden, Centromersonden und eine für die rDNA spezifische Sonde zum Einsatz.

Diese Sonden wurden zunächst auf normalen 46 XY- Lymphozytenpräparaten ausgetestet und zwar zunächst Painting- ,Centromersonden und rDNA- Sonde getrennt, danach in Kombination.

Entscheidend war hier, Hybridisierungsbedingungen zu finden, die sowohl für repetitive als auch für nicht- repetitive Sonden zu guten Ergebnissen führen. Hierfür wurden unterschiedliche Formamid- und Dextransulfatkonzentrationen ausgetestet.

Da für gute Hybridisierungsergebnisse der Paintingsonden Cot1- DNA eingesetzt werden muss, mussten die Centromersonden in relativ hohen Konzentrationen verwendet werden, da ihre Signale sonst durch den Einsatz von Cot1- DNA zu stark unterdrückt werden. Die Menge an eingesetzten Centromersonden übersteigt das üblicherweise eingesetzte Maß um das 20-50 fache, die Konzentration der Paintingsonden bewegt sich dagegen im Normbereich.

Die in zahlreichen Experimenten etablierten einzusetzenden Sondenmengen sind unter 2.1.4.1 (Seite 25) beschrieben.

Abbildung 6 zeigt eine Hybridisierung mit AkroM- FISH auf normalen 46XY- Lymphozytenpräparaten.

In den Abbildungen 6a- 6f sind die einzelnen Farbkanäle dargestellt, in 6g das Überlagerungsbild.

6a: DAPI: Gegenfärbung der Chromosomen

6b: DEAC: rDNA

6c: FITC: WCP 22, WCP 15

6d: Cy3: WCP 13, Centromer 15

6e: Cy3.5: WCP 15, WCP 21, Centromer 14+22

6f: Cy5: WCP 14, Centromer 13+21

6g: Überlagerungsbild

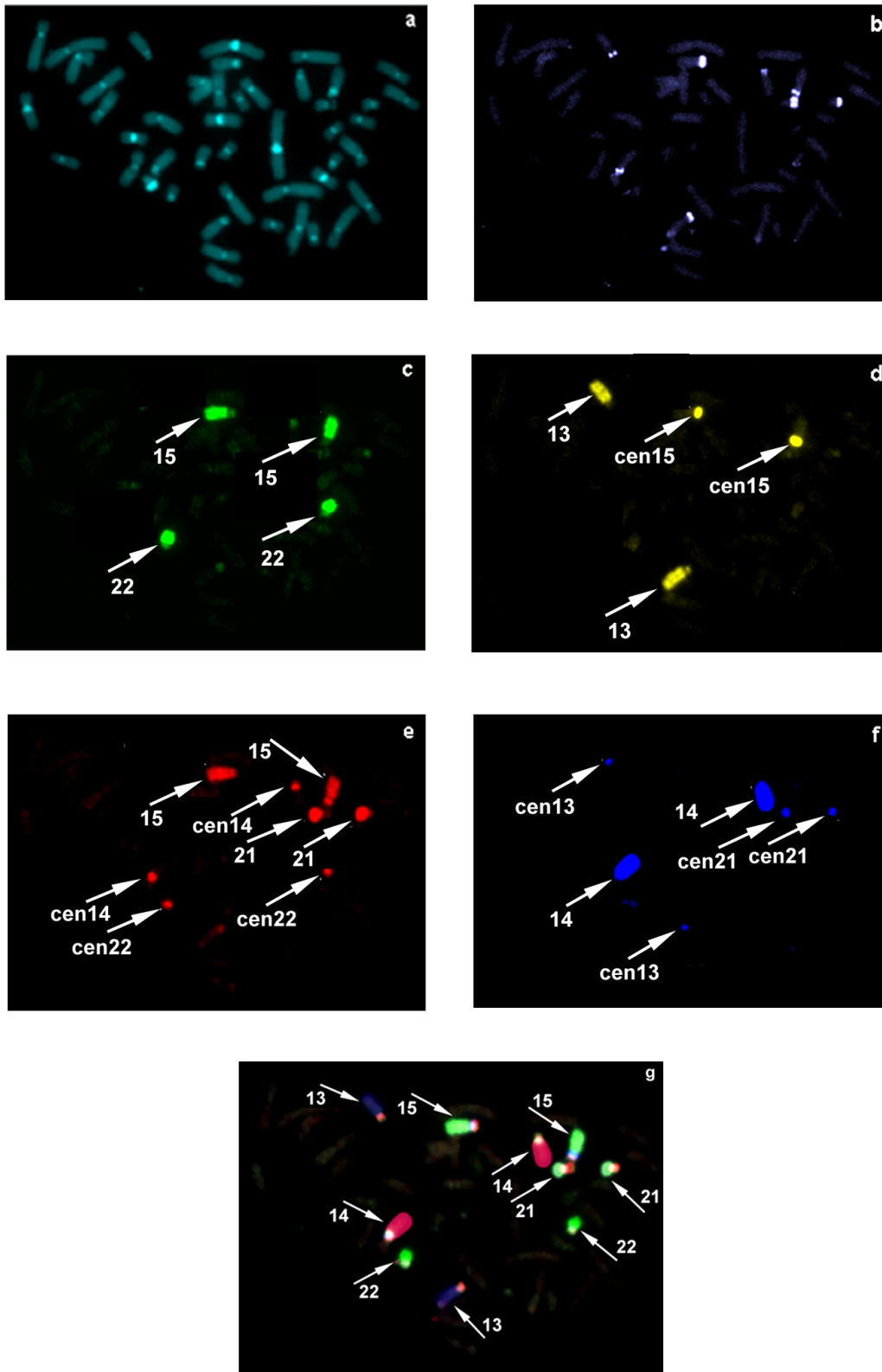


Abb.6

3.1.2 Untersuchung von Patientenfällen mittels AkroM- FISH

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden insgesamt 20 Patientenfälle, bei denen ein Markerchromosom zu charakterisieren war, mittels AkroM- FISH untersucht. Weiterhin können mit diesem Mix auch Strukturvarianten aufgeklärt werden.

Wie bereits beschrieben, können mit AkroM- FISH ca. 80% der Markerchromosomen identifiziert werden. Die restlichen 20% der Markerchromosomen können mit M-FISH in einer zweiten Hybridisierung auf ihren Gehalt an Euchromatin hin untersucht werden. Bei Pränatalfällen ist es empfehlenswert, diese beiden Hybridisierungen parallel durchzuführen, um ein möglichst schnelles und sicheres Ergebnis vorliegen zu haben.

Falls der Marker weder mit AkroM- FISH noch mit M- FISH eine Anfärbung zeigt, kann eine pan- alphoide Sonde hybridisiert werden, um zu bestätigen, dass der Marker sich, soweit es im Rahmen des Auflösungsvermögens beurteilbar ist, nur aus heterochromatischem Material zusammensetzt.

Eine detaillierte Strategie, die mit größtmöglicher Sicherheit Markerchromosomen abklärt und auch die seltenen Sonderfälle einer uniparentalen Disomie berücksichtigt, wird in der Diskussion vorgestellt.

Tabelle 10 fasst die bisher analysierten Markerchromosomen zusammen.

Ergebnisse

Fallnr.	ISCN- Nomenklatur	Chromosomale Herkunft	Euchromatin-Gehalt	Indikation für Chromosomenanalyse
1	+der(22)(22pter→22q11::11q23→11qter)	22	11q23→11qter	Pränataldiagnostik Später weiterführende Diagnostik: maternale Translokation (11;22)
2 *	r(X)(::q ?→q10 ::) 1. Marker (groß) in 10% 2. Marker (klein) in 50%	X	q ?→q10	Kleinwuchs, Entwicklungsverzögerung
3	+der(12)(:12p13 ?→12q12~13 ?:)	12	12p13→12q13	Pränataldiagnostik Geschlechtsbestimmung wegen Hämophilie A
4	+der(17)(:17p11.2?→q11.2~12?:)	17	17p11.2→ 17q11.2~12	Pränataldiagnostik; Altersindikation
5	+psu dic(15)(15pter→15q15::15q15→15pter)	15	15q11→15q15	Pränataldiagnostik US : Dysmorphie
6	+del(14 or 22)(pter→q10:)	14 oder 22	Kein Euchromatin	Pränataldiagnostik Altersindikation
7	+r(X)(:p11.1~21→q12~13::)	X	Xp11.1~21→Xq12~13	Dysmorphie Mentale Retardierung
8 *	+psu idic(15)(pter→q11::q11→pter)	15	15q11	Pränataldiagnostik Altersindikation
9 *	+der(15)(qter→q23::q23[neocen]q23→qter)	15	2×15q23→15qter	Mentale Retardierung Dysmorphie
10 *	+der(13 or 21)(pter→q11?:q11?→pter)	13 or 21	Kein Euchromatin	Dysmorphie
11 *	+der(13 or 21)(pter→q11?:q11?→pter)	13 or 21	Kein Euchromatin	Pränataldiagnostik Altersindikation

Ergebnisse

12 *	+der(?)(:cen:)	?	Kein Euchromatin	Mentale Retardierung
13	+idic(22)(pter→q11:q11→pter)	22	22q11	Entwicklungsverzögerung
14	der(8):(p11.2~12?→q11.2?:)	8	8p11.2~12?8q11.2?	Pränataldiagnostik Altersindikation
15	+der(22)(pter→q11?:q11→pter)	22	22q11	Entwicklungsverzögerung
16	+r(9)::p23?→q12?:)	9	9p23?→9q12?	Dysmorphie, mentale Retardierung, keine Sprachentwicklung
17	+der(?)(:cen:)	?	Kein Euchromatin	Pränataldiagnostik Altersindikation
18	+22	22	Trisomie 22	Pränataldiagnostik Altersindikation
19	+del(14 or 22)(pter→q10:)	14 oder 22	Kein Euchromatin	Pränataldiagnostik, Altersindikation
20	psu dic(15)(15pter→15q12?:15q12?→15pter)	15	15q11→15q12	Aplastische Anämie, Entwicklungsverzögerung

Tabelle 10: Markerchromosomen, analysiert mit AkroM- FISH, M- FISH und pan-alphoider Sonde

* Diese Fälle werden nachfolgend näher beschrieben.

Im folgenden sollen sechs ausgewählte Patientenfälle näher vorgestellt werden:
Die Fallnummern entsprechen denen in der Tabelle 10.

Fall 2:

In der G- Bänderungsanalyse waren zwei Markerchromosomen aufgefallen, die genauer charakterisiert werden sollten.

Eine Hybridisierung mit dem Akromix ergab bei beiden Markern keine Anfärbung. Somit wurden weitere, in **Abbildung 7a-g** dargestellte Hybridisierungen durchgeführt.

Abbildung 7:

- a:** 7- Farben-M-FISH: der Pfeil zeigt auf den großen Marker, der Pfeilkopf auf den kleinen Marker.
- b-d:** Hybridisierungssignale auf dem großen Marker
- e-f:** Hybridisierungssignale auf dem kleinen Markerchromosom
- b und e:** Hybridisierungssignale armspezifischer Paintingsonden für das X-Chromosom
- c und f:** Hybridisierungssignale der für Chromosom X spezifischen Centromersonde
- d und g:** Hybridisierungssignale der Pantelomersonde

Aus den durchgeführten Hybridisierungen ergab sich, dass sich beide Markerchromosomen vom X- Chromosom ableiten.

Da die Form der Chromosomen in der DAPI- Gegenfärbung der von Ringchromosomen ähnelte, wurde eine Pantelomersonde hybridisiert. Das fehlende Signal (Abb. **7d** und **g**) zeigte, dass diese Vermutung richtig war.

Weiterhin bestanden beide Marker nur aus q-Arm-Material (Abb. **7b** und **e**) und besaßen ein Centromer, was ihre relativ große Stabilität erklärt.

Die genaue ISCN- Nomenklatur ist der Tabelle zu entnehmen.

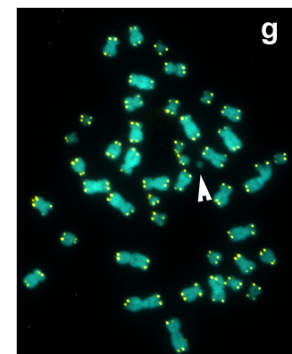
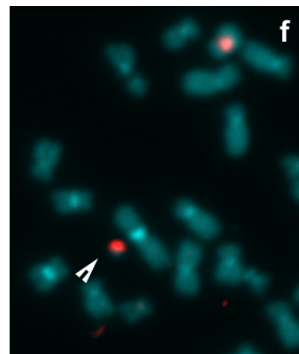
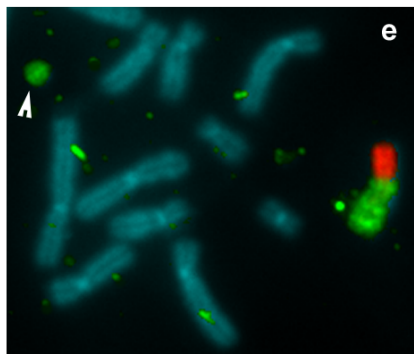
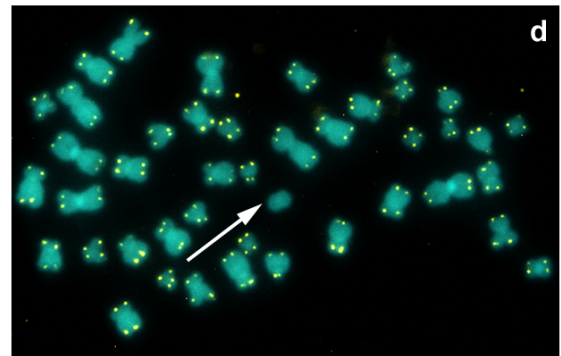
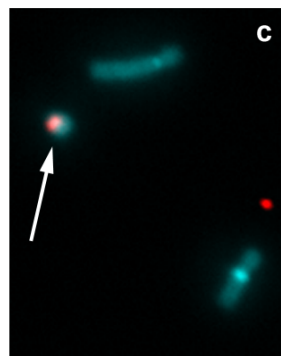
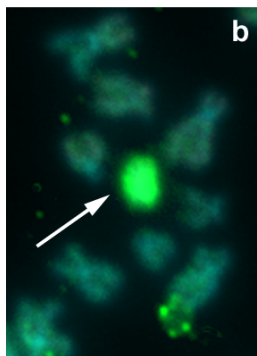
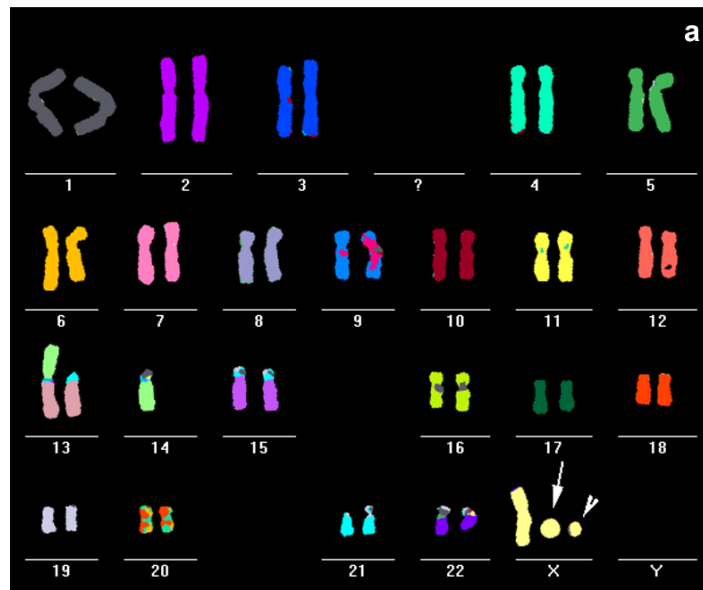


Abb.7

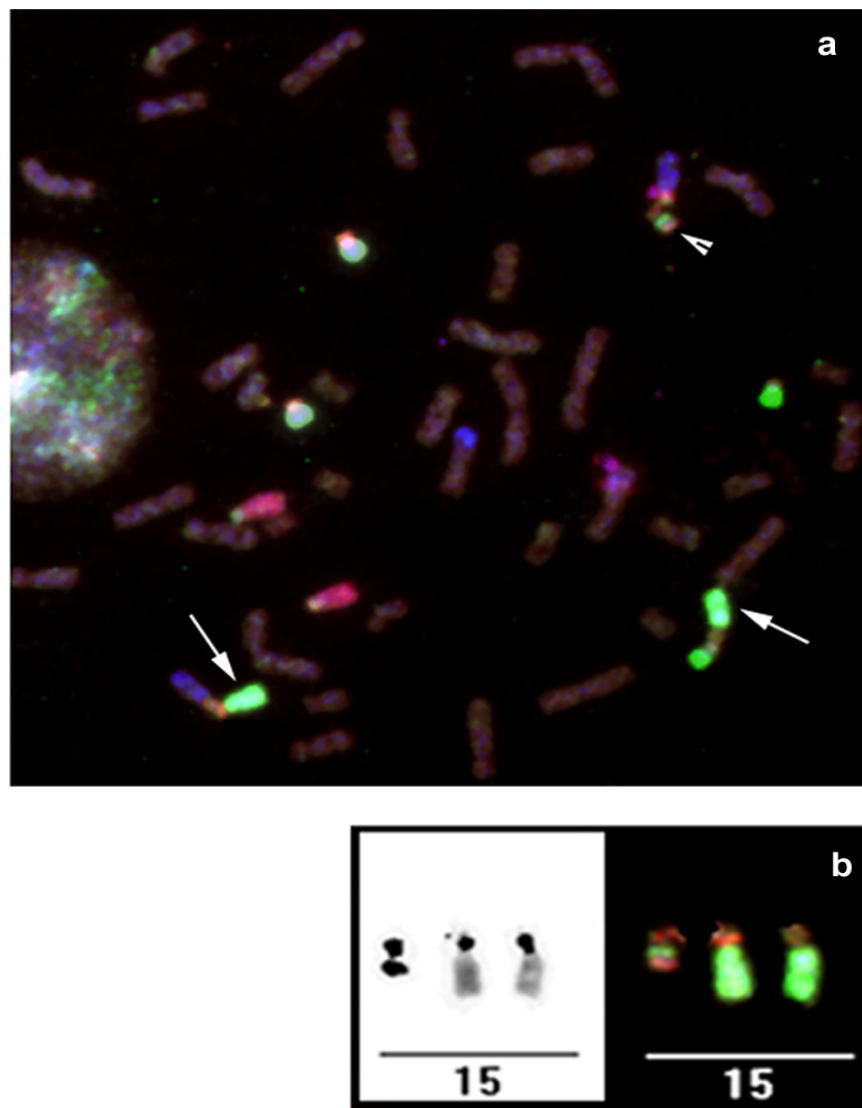
Fall 8:

Abbildung 8 zeigt die Hybridisierungsergebnisse, die zur Aufklärung des unter Nr.8 in der Tabelle aufgelisteten Falles führten.

a: AkroM- FISH: Die Pfeile kennzeichnen die beiden Chromosomen 15, der Pfeilkopf den Marker.

b: DAPI- Färbung und Hybridisierungssignale des Akromixes auf den beiden Chromosomen 15 und dem Markerchromosom

Der Marker besitzt an seinen beiden Enden rDNA- Material, dazwischen befindet sich euchromatisches Material von Chromosom 15.

**Abb.8**

Fall 9:

Die genaue Charakterisierung des unter Nr. 9 in der Tabelle aufgeführten Markerchromosoms soll mit **Abbildung 9** erläutert werden:

- a:** M- FISH, der Pfeil zeigt auf den Marker.
- b-d:** Akro-M-FISH; die Pfeile kennzeichnen die beiden Chromosomen 15, der Pfeilkopf den Marker.
- b:** DAPI- Färbung
- c:** Akromix
- d:** Hybridisierungssignale der Centromersonde für Chromosom 15 und der rDNA
- e:** Hybridisierung mit der Pancentromersonde
- f:** Hybridisierungssignale der für Chromosom 15 spezifischen Paintingsonde (rot) und Subtelomersonde (gelb) (J.Trent)

M-FISH und AkroM-FISH zeigten, dass sich der Marker von Chromosom 15 ableitet (Abb. **9a** und **c**). Interessant ist, dass weder die für Chromosom 15 spezifische Centromersonde noch die Pancentromersonde auf dem Marker ein Signal ergaben (Abb. **9d** und **e**). Da sich dieses Markerchromosom aber in jeder Metaphase nachweisen ließ und somit offenbar eine sehr zuverlässige Segregation zu den Tochterzellen bestand, liegt die Vermutung nahe, dass sich bei diesem Chromosom ein Neocentromer gebildet hat. Dieses Phänomen wird gelegentlich beobachtet (Choo, 1997). Leider standen keine weiteren Präparate zur Verfügung, um ein Neocentromer mit Antikörpern nachzuweisen.

Die Hybridisierung mit der Subtelomersonde ergab, dass der Marker an seinen beiden Enden Telomer material enthält (Abb. **9f**).

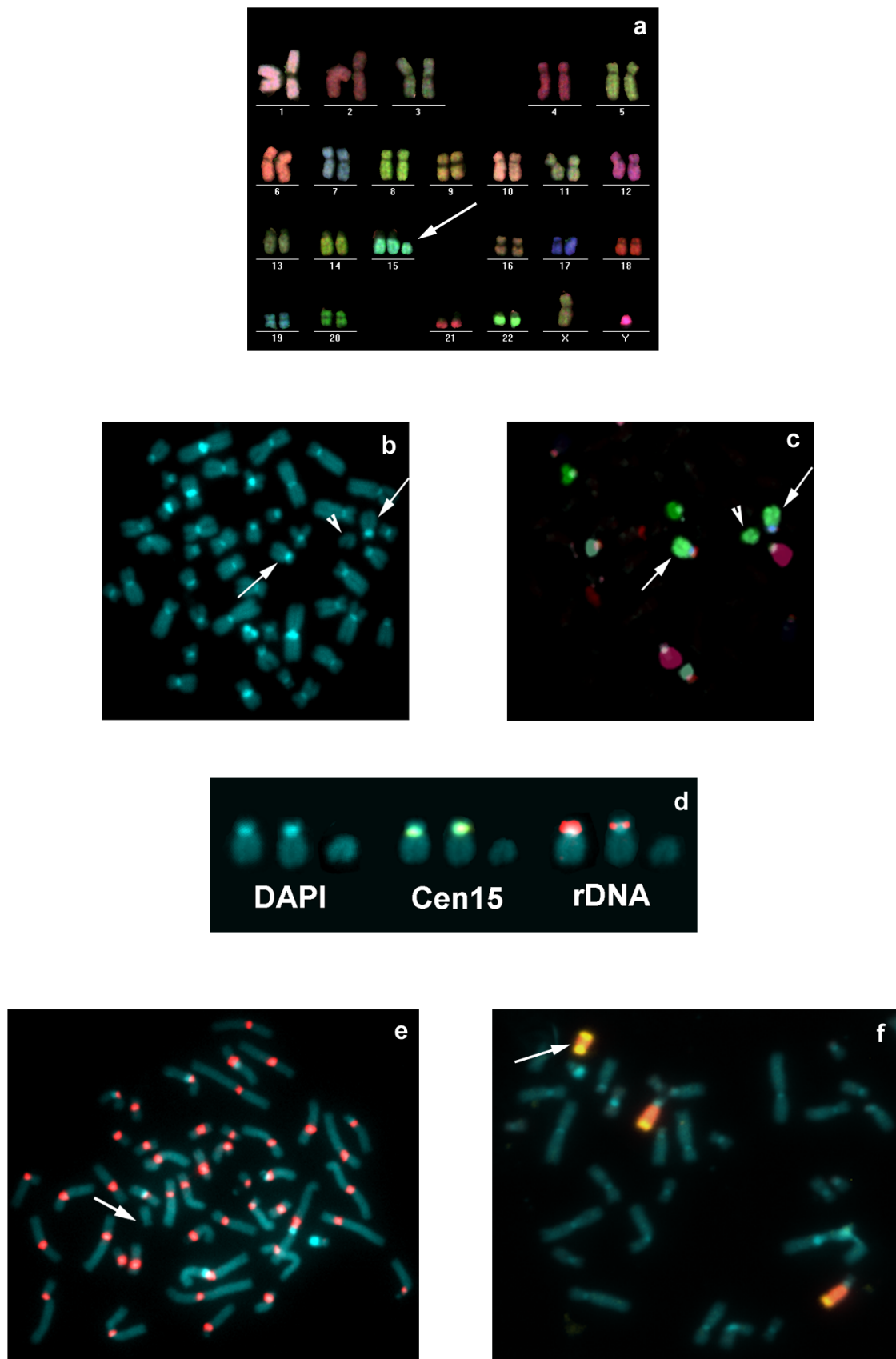


Abb.9

Fall 10:

Abbildung 10 fasst die Hybridisierungsergebnisse des unter Nr. 10 in der Tabelle aufgeführten Falls zusammen.

- a:** DAPI- Färbung, der Pfeil zeigt auf den Marker.
- b:** M-FISH der in a dargestellten Metaphase
- c-f:** AkroM- FISH, der Pfeil kennzeichnet den Marker.
 - c:** DAPI- Färbung
 - d:** Akromix
 - e:** Hybridisierungssignale der rDNA- Sonde
 - f:** Hybridisierungssignale der Centromersonde für Chromosom 13/21

Der Marker (Abb. **10a**) zeigte in der M-FISH- Hybridisierung keine Anfärbung (Abb. **10b**), bei der Hybridisierung mit AkroM-FISH jedoch ein Signal der rDNA- Sonde und der für Chromosom 13/21 spezifischen Centromersonde (Abb. **10c** und **d**).

Daraus ergab sich, soweit es im Rahmen des Auflösungsvermögens beurteilbar war, dass der Marker kein Euchromatin enthielt, sondern sich lediglich aus rDNA und Centromermaterial zusammensetzte.

Die bei dem Patienten beschriebene Dysmorphie dürfte somit nicht in Zusammenhang mit dem Marker stehen.

Fall 12:

In **Abbildung 11** werden die Ergebnisse zu unter Nr. 12 in der Tabelle aufgeführtem Fall präsentiert.

- a:** DAPI- Färbung, der Pfeil zeigt auf den Marker.
- b:** M-FISH der in a gezeigten Metaphase
- c:** AkroM-FISH
- d:** DAPI- Färbung, der Pfeil kennzeichnet den Marker.
- e:** Hybridisierung der in d dargestellten Metaphase mit der Pancentromersonde

Weder M-FISH (Abb. **12b**) noch AkroM-FISH (Abb. **12c**) ergaben auf dem Markerchromosom ein Signal. Somit kann man davon ausgehen, dass der Marker kein euchromatisches Material enthält. Mit der Pancentromersonde erhielt man auf dem Markerchromosom ein Signal. Somit besteht dieser Marker aus einem Centromer, das sich von einem nicht- akrozentrischen Chromosom ableitet.

Für diesen Fall sieht die ISCN- Nomenklatur keine Schreibregel vor. Ich wählte die Bezeichnung +der(?)(:cen:).

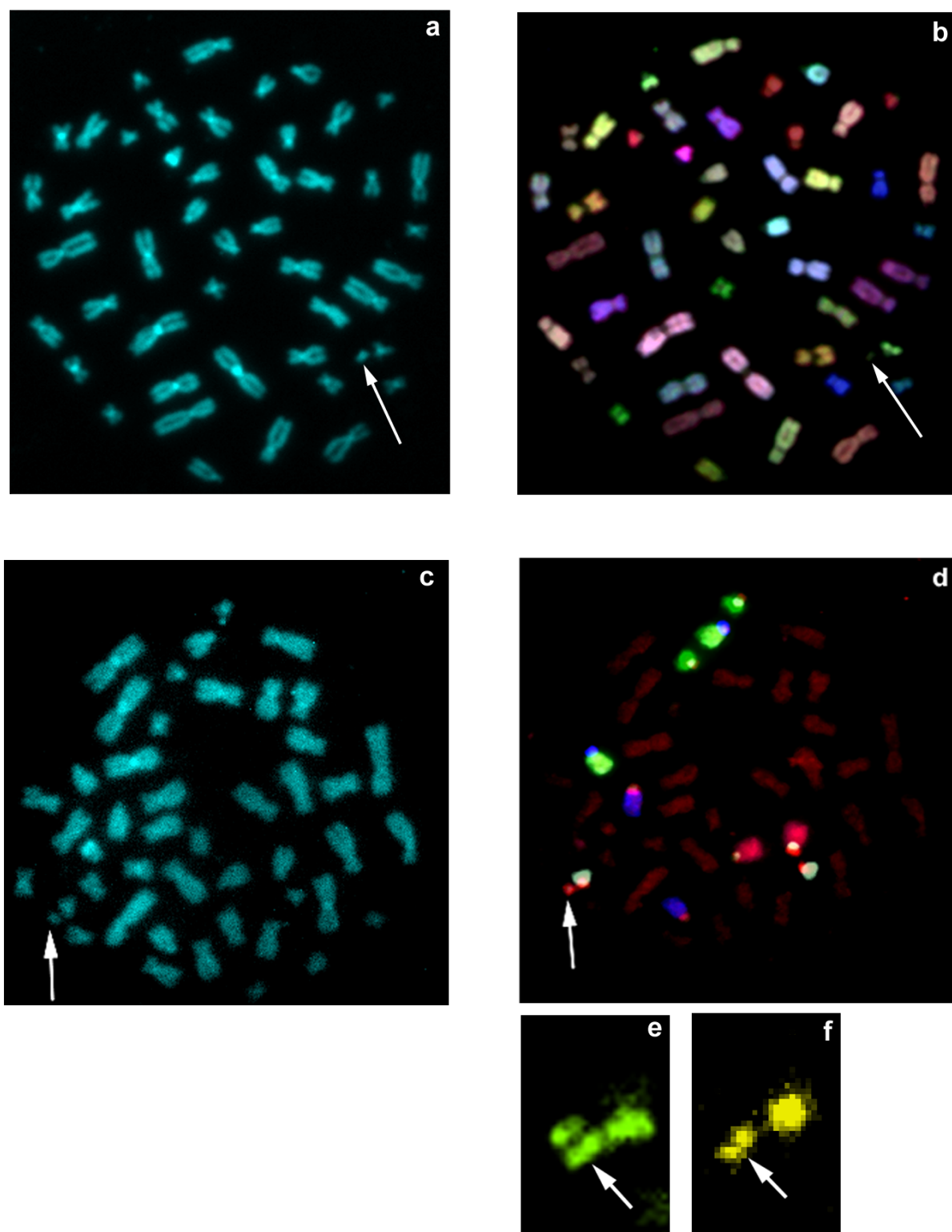


Abb.10

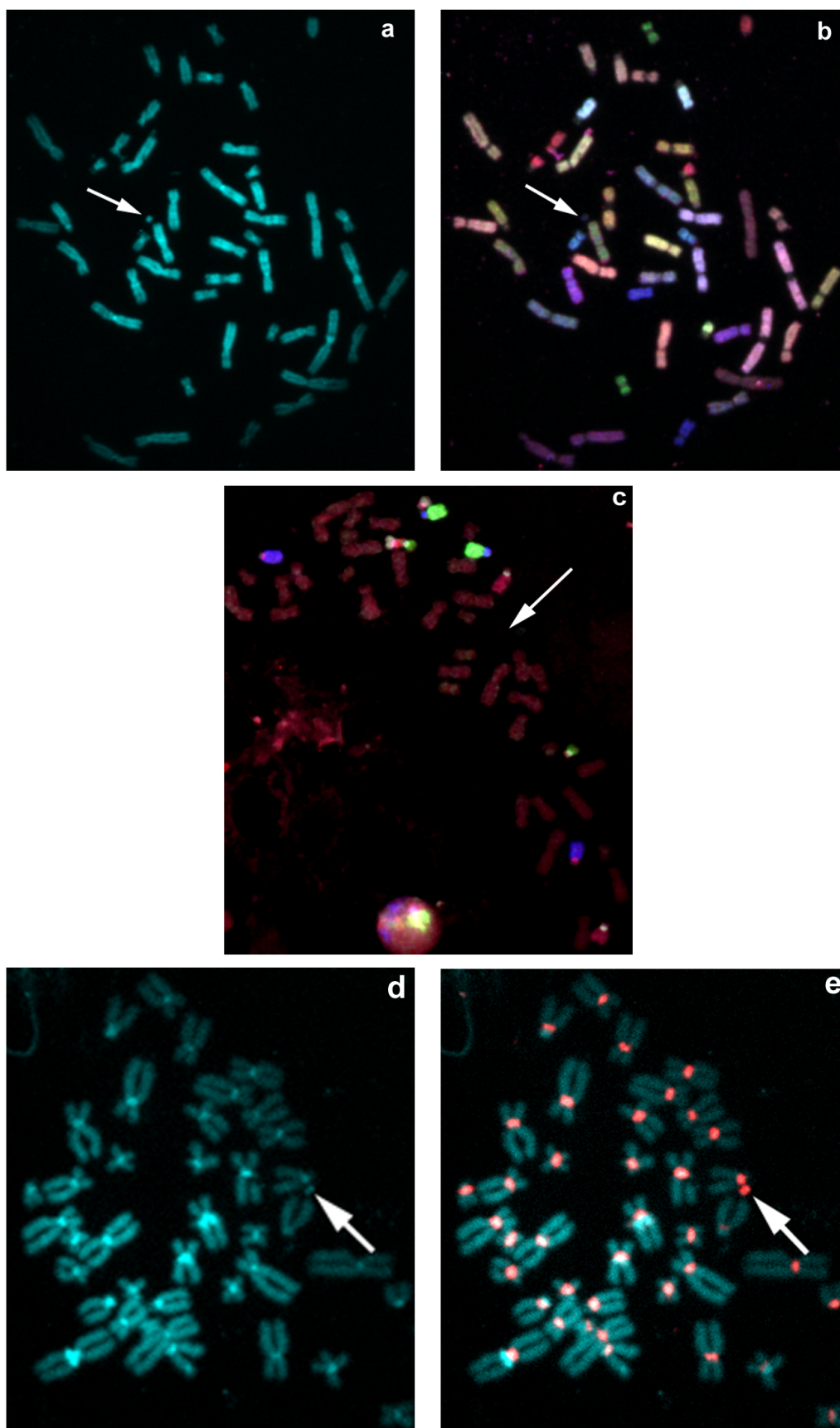


Abb.11

Mit Hilfe von AkroM-FISH ist neben der Charakterisierung von Markerchromosomen auch eine Aufklärung von Strukturvarianten möglich.

Dies soll in **Abbildung 12** dargestellt werden.

a: M-FISH; der Pfeil kennzeichnet das normale Chromosom 22, der Pfeilkopf das derivative.

b: AkroM- FISH

c: Chromosomen 22 (M-FISH) vergrößert dargestellt, mit zugehöriger DAPI- Färbung

d: Chromosomen 22 (AkroM- FISH) vergrößert dargestellt mit zugehöriger DAPI- Färbung

Die fehlende Anfärbung im M-FISH- Experiment legt bereits nahe, dass es sich nur um Heterochromatin handelt (Abb. **12a** und **c**). Das normale und derivative Chromosom 22 zeigten hier bezüglich ihrer Färbung keinen Unterschied. Mit AkroM- FISH hingegen wurde deutlich, dass es sich bei dem zusätzlichen Material an Chromosom 22 lediglich um rDNA handelt und somit eine Strukturvariante vorliegt (Abb. **12b** und **d**).

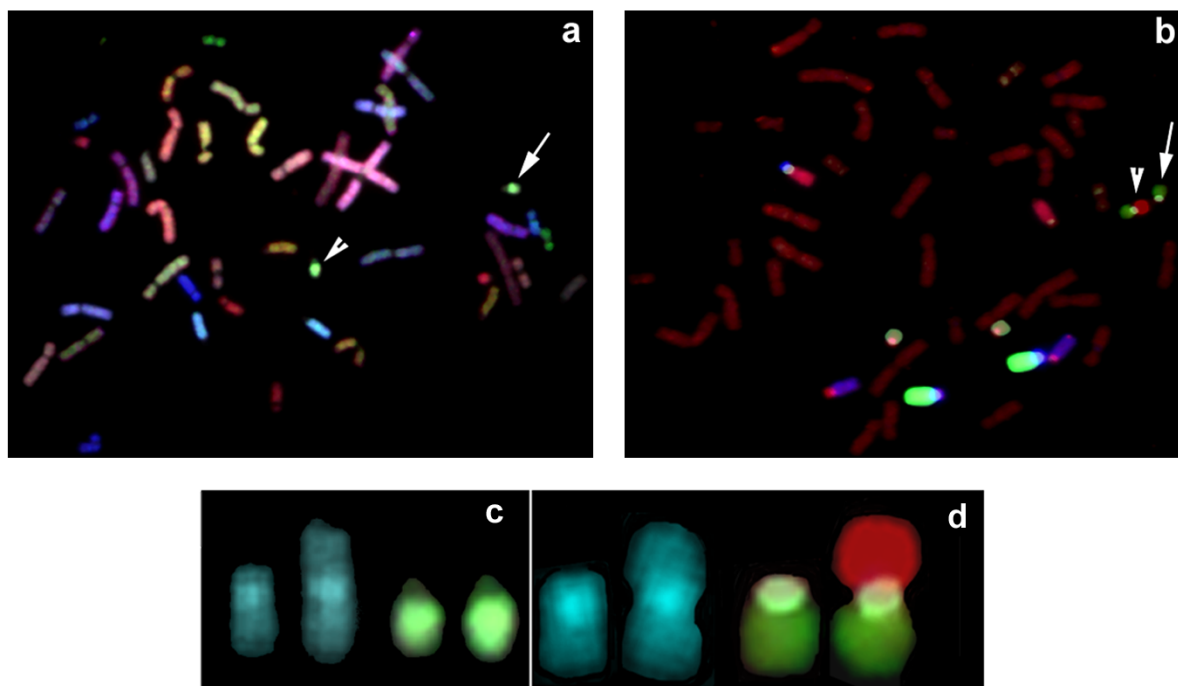


Abb.12

3.2 Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut

3.2.1 Etablierung geeigneter Sondensätze

1. Chromosomen-spezifische Centromersonden

Um geeignete Protokolle für eine Vorbehandlung und damit eine erfolgreiche Hybridisierung auf Cytospins der verschiedenen Zellsysteme (siehe 2.2.1.1) zu etablieren, wurde, wie bereits erwähnt, eine Reihe von Centromersonden verwendet. Diese wurden zunächst auf Metaphasepräparaten überprüft. Die verwendeten Chromosomen-spezifischen Centromersonden können in Tabelle 4 auf Seite 33 nachgeschlagen werden.

Abbildung 13 zeigt eine Hybridisierung der verwendeten Centromersonden auf Lymphozytenpräparaten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist jede Sonde nur auf jeweils einem der homologen Chromosomen bezeichnet.

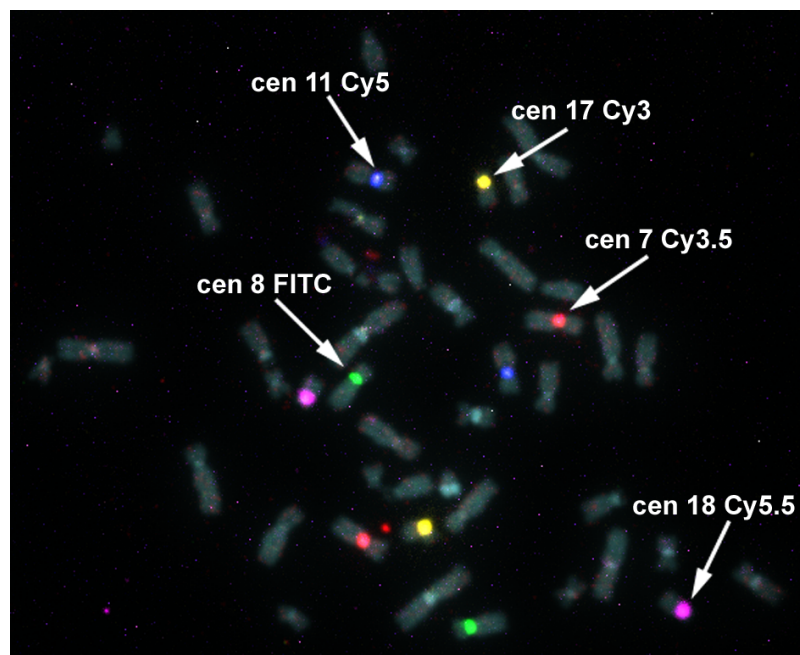


Abb.13

Wie erwartet hybridisierten die Centromersonden unter Standardbedingungen sehr zuverlässig. Entsprechende Signale waren immer deutlich sichtbar.

2. Regionen- spezifische Sonden

Es wurde ein Sondensatz zusammengestellt, der eine Diagnostik der am häufigsten vorkommenden Trisomien (13,18,21) und eine Geschlechtsbestimmung ermöglicht. Die einzelnen Sonden wurden systematisch in ihren jeweiligen Markierungen einzeln und in Mehrfarbenansätzen auf Metaphasechromosomen und Lymphozytenkernen ausgetestet.

Die eingesetzten Konzentrationen der einzelnen Sonden wurden in mehreren Versuchen sorgfältig ausbalanciert.

Die verwendeten Sonden sind in Tabelle 5 auf Seite 33 aufgeführt.

Abbildung 14 gibt exemplarisch das Hybridisierungsergebnis der sechs Regionenspezifischen Sonden auf Lymphozytenpräparaten wieder. Es wurden hier weibliche Lymphozytenpräparate verwendet. Daher ist das Signal der Y- Sonde nicht vorhanden.

14a: Hybridisierungssignale auf Metaphasechromosomen

14b: Hybridisierungssignale auf einem Lymphozytenzellkern

Es ist das Überlagerungsbild der Sonden dargestellt und links daneben die DAPI- Gegenfärbung des Zellkerns.

In diesem Zellkern waren alle Sonden für die entsprechenden Chromosomenpaare sichtbar.

Für eine bessere Übersichtlichkeit ist auch hier jede Sonde nur auf jeweils einem der beiden homologen Chromosomen bezeichnet.

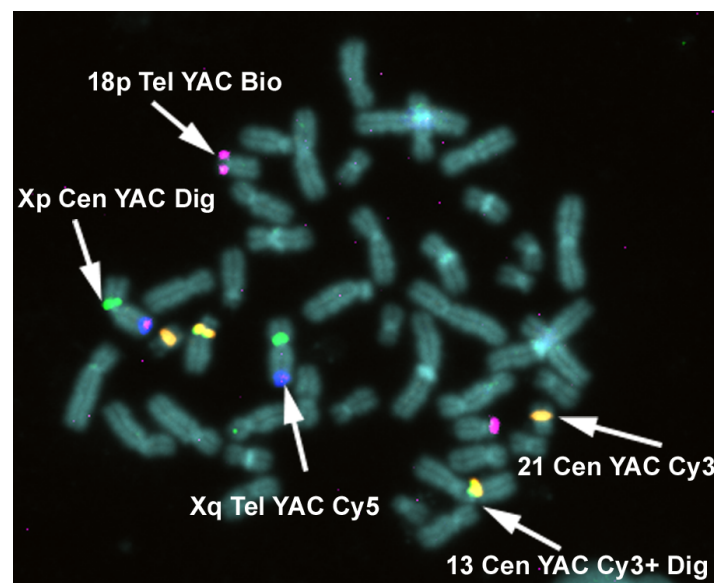


Abb.14a

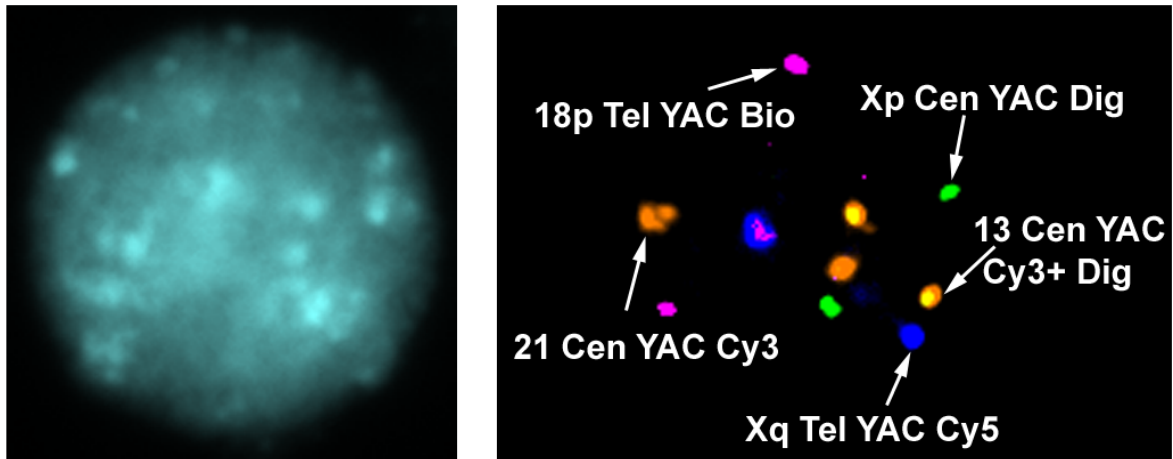


Abb.14b

Um die Hybridisierungseffizienz der verwendeten Regionen- spezifischen Sonden zu bestimmen, wurden 100 Lymphozytenzellkerne ausgezählt. Das Ergebnis war folgendes:

Sonde	Region	Markierung	% der Zellen mit 2 Signalen
967 b01 Centromernaher YAC	13q	Dig- FITC/ Cy3	97%
854 g08 Subtelomer-YAC	18p11.3	Bio- Cy5.5	90%
949 b09 937 e12 746 b10 Centromernahe YACs	21q	Cy3	93%
iA 02015 Centromernaher YAC	Xp	Dig- FITC	97%
878 a07 Subtelomer- YAC	Xq27-28	Cy5	98%
Yp Armspezifische Paintingsonde	Yp	Texas Red	98%

Insgesamt zeigten 80% der Kerne für alle Sonden zwei Signale.

Bei einer zweidimensionalen Aufnahme sind nicht immer alle Hybridisierungssignale sichtbar. Dies liegt daran, dass die Signale teilweise in verschiedenen Focusebenen liegen. Um alle Signale, auch die, die in einer anderen Focusebene liegen, beurteilen zu können, muss man in jedem einzelnen Kanal per Hand unter Beobachtung des Live- Modus auf dem Bildschirm durchfocussieren oder sogenannte Z-Stapel aufnehmen. Auf diese Technik soll hier nicht detailliert eingegangen werden (Vergleiche dazu Maierhofer et al., 2002; in press). Die einzelnen Bilder können als Galerie dargestellt werden.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch Abbildungen aus den einzelnen Ebenen (a bis e) als Überlagerungsbild. Es wurde von einem Lymphozytenzellkern in insgesamt 11 verschiedenen Z- Ebenen mit einem definierten Abstand von jeweils 250 nm eine Bildsequenz (DAPI, FITC, Cy3, Cy3.5 Cy5, Cy5.5) aufgenommen.

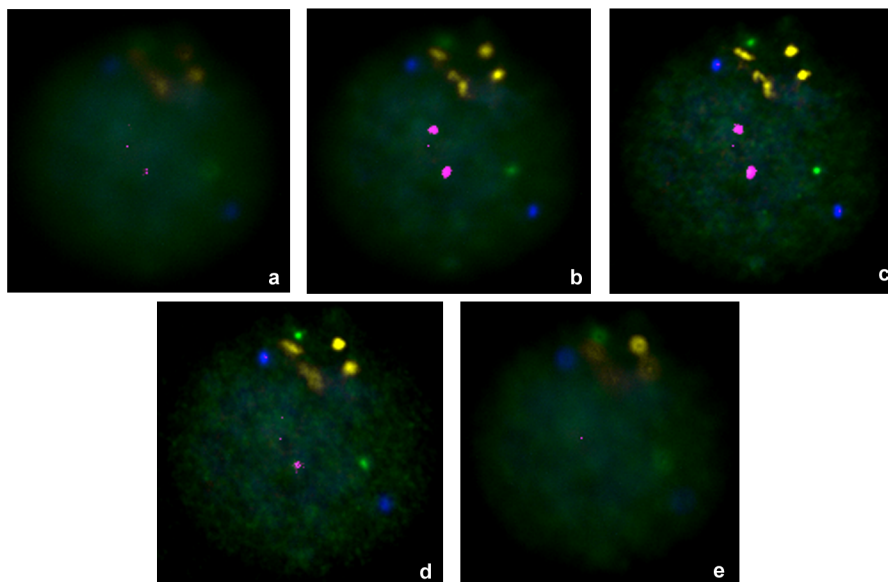


Abb.15

Weiterhin wurden die Regionen-spezifischen Sonden auf Metaphasen der Zelllinie K562 hybridisiert. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine chronisch myeloische Leukämie in der Blastenkrise. Diese Zelllinie wurde verwendet, da alle Zellen CD71 positiv sind und dieser Oberflächenmarker für die Identifizierung der fetalen nucleären Erythroblasten verwendet wurde (siehe 3.2.2, Seite 86).

Hier konnte ebenfalls die Hybridisierungseffizienz der eingesetzten Sonden untersucht werden. Anfangs wurde noch ein anderer SONDENSATZ (siehe 2.2.4.1, Seite 38) verwendet,

bei dem auch mikrodisektierte Sonden enthalten waren. Diese wurden dann durch Telomer- und Centromer- YACs ersetzt, da diese sich für die Interphase als besser geeignet erwiesen.

Abbildung 16 zeigt Hybridisierungen des alten und neuen Sondensatzes auf Metaphasepräparaten der Zelllinie K562. Da es sich um eine weibliche Zelllinie handelt, ergibt die Y- Sonde kein Signal.

16a: Hybridisierungssignale auf Metaphasechromosomen (alter Sondensatz)

16b: Hybridisierungssignale auf Metaphasechromosomen (neuer Sondensatz)

16c: Hybridisierungssignale auf einem Lymphozytenzellkern (neuer Sondensatz)

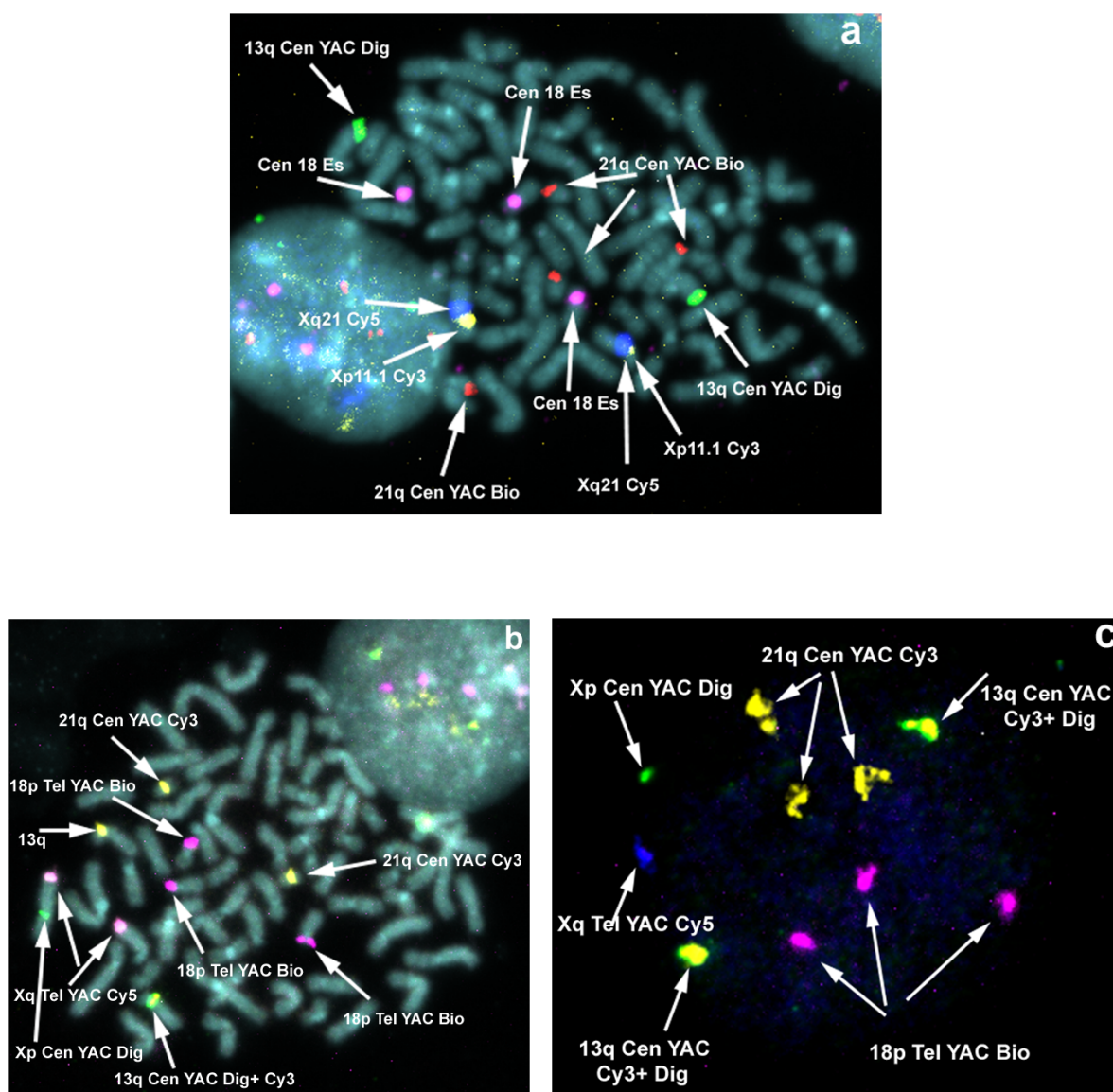


Abb.16

Zytogenetische Veränderungen bei dieser Zelllinie wurden in der Vergangenheit bereits detailliert beschrieben (Naumann et al., 2001). Bezüglich der Chromosomen, für die hier eine Sonde verwendet wurde, ist folgendes publiziert:

- Chromosom 13: eine normale Kopie und der(13)t(9;13)(?:13p11→13qter)
- Chromosom 18: zwei normale Kopien, zusätzlich 18p- Material in mehrere kleine Rearrangements involviert
- Chromosom 21: zwei normale Kopien und zusätzlich teilweise der(21)t(1;21)(1qter→1q23::21p11→21qter)
- Chromosom X: ein normales X- Chromosom und del(X)(:p11→qter)

Die ausgewerteten Metaphasen waren aber auch teilweise heterogen.

Für die verwendeten Sonden wären somit folgende Signalzahl in der Mehrheit der Zellen zu erwarten:

- 13q: 2 Signale
- 18p: mehr als 2 Signale
- 21q: 2 oder 3 Signale
- Xp: 1 oder 2 Signale
- Xq: 2 Signale

Die hier verwendeten Sonden wurden in 75 Zellkernen ausgezählt mit folgendem Ergebnis:

Sonde/Markierung	1 Signal	2 Signale	3 Signale
13q- Dig/Cy3	7%	93%	0%
18p- Bio	1,3%	2,7%	96%
21q- Cy3	1,3%	12%	86,7%
Xp- Dig	81%	16%	3%
Xq- Cy5	1,5%	98,5%	0%
Yp- Texas Red	0%	0%	0%

Dies korreliert sehr gut mit den publizierten Daten (s.o.) und zeigt die Sensitivität des Interphaseansatzes für die Identifizierung numerischer Anomalien.

3.2.2 Antikörperfärbung der Cytospins

Zur Identifizierung der fetalen Zellen wurde ein gegen den Transferrinrezeptor (CD 71) gerichteter Antikörper verwendet. CD 71 wird von nucleären Erythroblasten, aber auch von maternalen NRBCs, aktivierten Lymphozyten und Reticulozyten exprimiert.

Die Antikörperfärbung wurde zunächst an K562- Zellen, die alle CD71- positiv sind, getestet, bevor sie bei Zellen aus Nabelschnurblut angewandt wurde.

Abbildung 17 zeigt die gegen CD71 gerichtete Antikörperfärbung von K562- Zellen. Alle Zellen zeigen eine Anfärbung.

Als Kontrollexperiment für die Spezifität des Antikörpers wurde eine Färbung an einem Lymphozytenpräparat durchgeführt. Hier war keinerlei Anfärbung zu sehen.

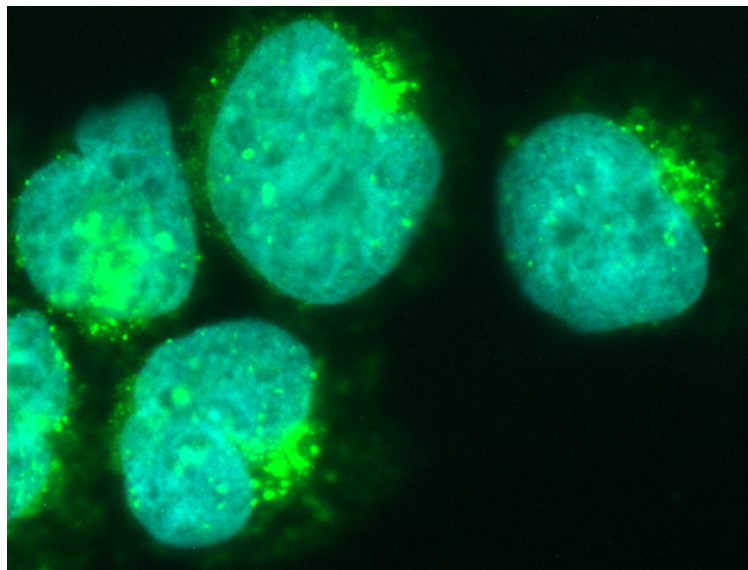


Abb.17

Abbildung 18 demonstriert die Antikörperfärbung an Zellen des Nabelschnurblutes. Nur einzelne Zellen weisen eine Anfärbung auf.

Der anfangs verwendete Antikörper gegen CD71 führte zu einer extrem starken Anfärbung, die in jeden Fluoreszenzkanal einstrahlte. Dieser Antikörper ließ sich auch mit einer intensiven Vorbehandlung der Zellen nicht in ausreichendem Maße entfernen, so dass die FISH- Signale für eine Analyse sichtbar gewesen wären. Dieser Antikörper wurde schließlich

nach zahlreichen Versuchen gegen einen anderen, jedoch ebenfalls gegen CD71-gerichteten Antikörper ausgetauscht.

18a: anfangs verwendeter Antikörper

18b: neuer, besser in Kombination mit FISH geeigneter Antikörper

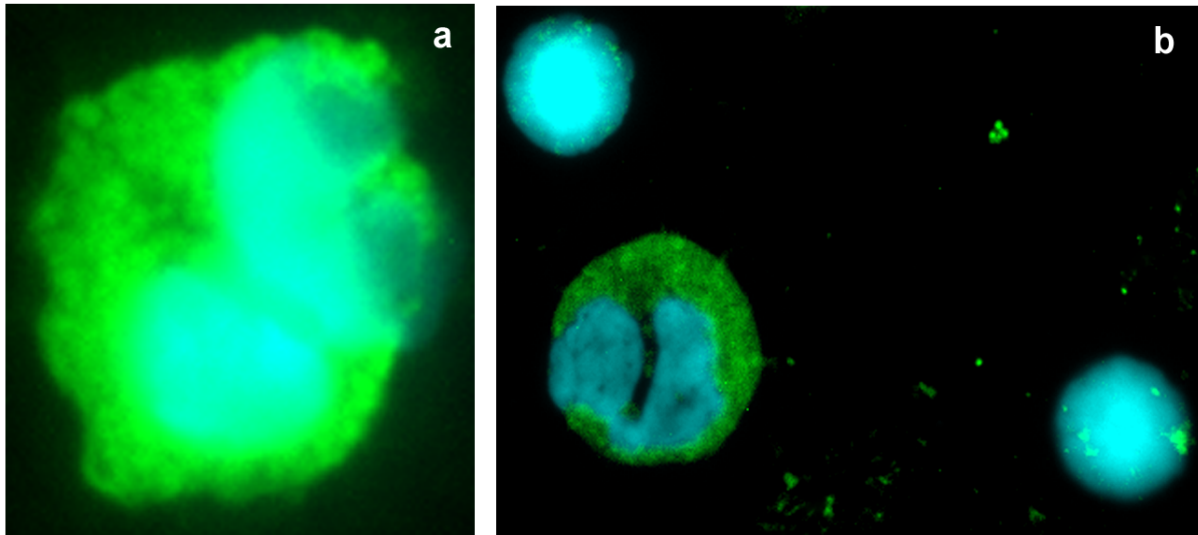


Abb.18

3.2.3 Hybridisierung der Sondenätze auf Cytospins der verschiedenen Testsysteme

Für die Etablierung einer geeigneten Vorbehandlung der Präparate, zum Austesten der Sonden und zur Überprüfung der generellen Durchführbarkeit der unter 1.4.2 (Seite 12) vorgestellten Methode zur Anreicherung, Identifizierung und Untersuchung fetaler Zellen wurden, wie bereits unter 2.2.1.1 (Seite 29) beschrieben, verschiedene Testsysteme verwendet.

Das intensive Austesten war notwendig, da sich Cytospins von Standardpräparaten durch folgende wichtige Kriterien unterscheiden:

- Art der Fixierung
- Zelldichte

Zunächst wurden jeweils Centromersonden für die Hybridisierung eingesetzt, da diese besonders intensive Signale liefern.

Im folgenden sollen die Ergebnisse der Hybridisierungen bei den einzelnen Testsystemen gezeigt werden, außerdem soll auf die verschiedenen Probleme eingegangen werden, die sich bei der Vorbehandlung und Hybridisierung der Präparate ergaben.

1. Zelllinie K562

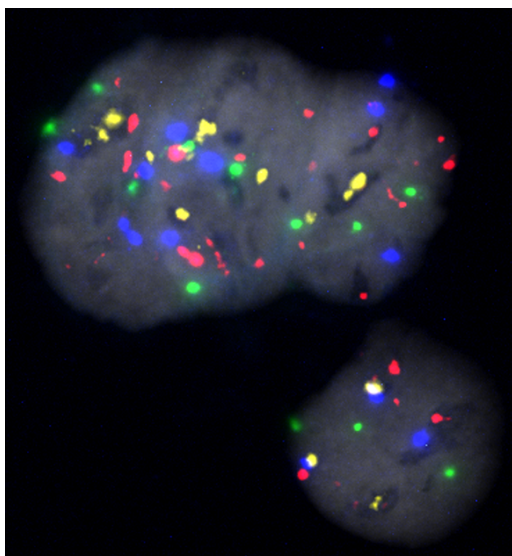
Da alle Zellen CD71 positiv sind und dieser Oberflächenmarker für die Identifizierung der fetalen nucleären Erythroblasten verwendet wurde, konnte mit dieser Zelllinie der Antikörper getestet und ein Protokoll entwickelt werden, mit dem es möglich ist, Antikörperfärbung und Interphase-FISH zu kombinieren.

Abbildung 19 stellt das Ergebnis der Hybridisierung von vier verschiedenen Centromersonden auf K562- Zellen dar.

Folgende Sonden wurden hybridisiert:

Centromer	Markierung	Farbe
8	dig- FITC	grün
11	Cy5	blau
15	Cy3	gelb
20	bio- Cy3.5	rot

Das Protokoll für die Vorbehandlung ist unter 2.2.4.1 auf Seite 38 nachzulesen.



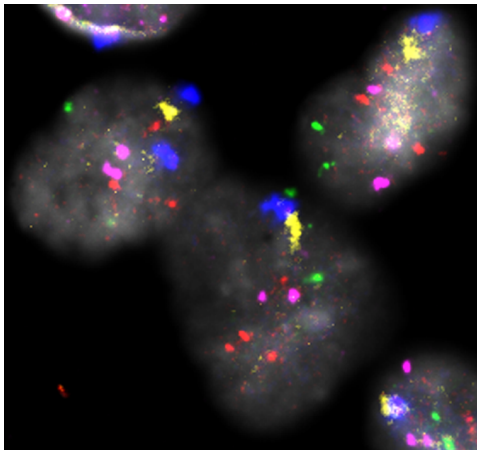
Sonde	Farbe
Cen 7	Rot
Cen 8	Grün
Cen 11	Blau
Cen 15	Gelb

Abb.19

Abbildung 20 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung von vier verschiedenen Regionenspezifischen Sonden. Die verwendeten Sonden (vgl. auch Abb.16) sind unter 2.2.4.1 auf Seite 38 aufgeführt.

Das Protokoll für die Vorbehandlung ist ebenfalls auf Seite 38 beschrieben.

Die Hybridisierung mit Regionenspezifischen Sonden gestaltete sich wesentlich schwieriger als mit Centromersonden, die viel intensivere Signale liefern. Eine Methanol- Eisessig-Behandlung, um das Cytoplasma schon vor dem Pepsinverdau zum großen Teil zu entfernen, führte dann aber auch zu intensiven Signalen bei den Regionenspezifischen Sonden.



Sonde	Farbe
13q Cen YAC	Grün
21q Cen YAC	Rot
Xp11.1	Gelb
Xq21	Blau
Cen 18	Lila

Abb.20

Zusammenfassend konnten bei den Cytospins der K562- Zellen ähnliche Hybridisierungsprotokolle wie bei den Standardpräparaten eingesetzt werden. Der wesentliche Unterschied lag nur in einer längeren Behandlung mit Pepsin.

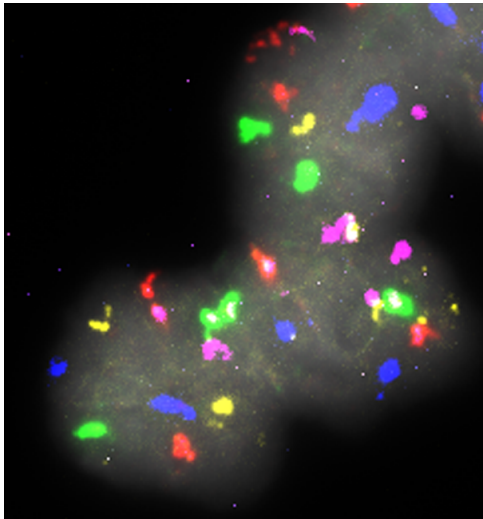
2. Zellen des Nabelschnurblutes

Nach einigen Versuchen zeigte sich, dass die fetalen Zellen im Gegensatz zu den K562-Zellen extrem empfindlich auf eine längere Inkubation in Triton und auch in 2× SSC bei 37°C reagieren. Diese beiden Reagenzien führen bei einer Hybridisierung mit Centromersonden zu langen, undefinierbaren Signalen. Für ein gutes Hybridisierungsergebnis ist hier lediglich eine Methanol- Eisessig-Behandlung und ein Pepsinverdau notwendig.

Das genaue Protokoll ist unter 2.2.4.1 auf Seite 39 beschrieben.

Abbildung 21 stellt exemplarisch ein Hybridisierungsergebnis mit Centromersonden bei fetalen Zellen dar.

Es wurden die unter 2.2. 3.1, Seite 33 gezeigten Sonden verwendet.



Sonde	Farbe
Cen 7	Rot
Cen 8	Grün
Cen 11	Blau
Cen 15	Gelb
Cen 18	Lila

Abb.21

Die Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden erwies sich bei den fetalen Zellen als extrem schwierig.

Es ergab sich im Verlauf der Versuche, dass es günstiger ist, die Methanol/Eisessig-Behandlung nicht vor dem Pepsinverdau, sondern als letzten Schritt bei der Vorbehandlung durchzuführen. Eine Methanol-Eisessig-Behandlung zu Beginn der Vorbehandlung entfernt zwar das Cytoplasma, führt aber zusätzlich zu einer starker Fixierung der Zellen, was einen extrem intensiven Pepsinverdau nötig macht.

Weiterhin ließ sich durch eine lediglich kurze Inkubation in 2× SSC, allerdings bei 60°C und danach in PBS/Tween eine gute Durchlässigkeit der Zellen erreichen. Dies wurde noch durch eine anfängliche KCl- Behandlung verstärkt, die die Zellen etwas aufquellen lässt.

Eine Reduktion des Hintergrundes auf den Präparaten war mittels RNase- Behandlung möglich.

Das genaue Protokoll ist unter 2.2.4.1 auf Seite 39 beschrieben.

Abbildung 22 zeigt das Hybridisierungsergebnis mit Regionen- spezifischen Sonden bei fetalen Zellen. Die DAPI- Gegenfärbung ist links daneben abgebildet.

Sehr häufig liegen hier die Signale in unterschiedlichen Focusebenen. Deshalb ist es notwendig, in jedem Kanal per Hand durchzufocussieren oder aber, wie auf Seite 83 beschrieben, Z-Stapel aufzunehmen.

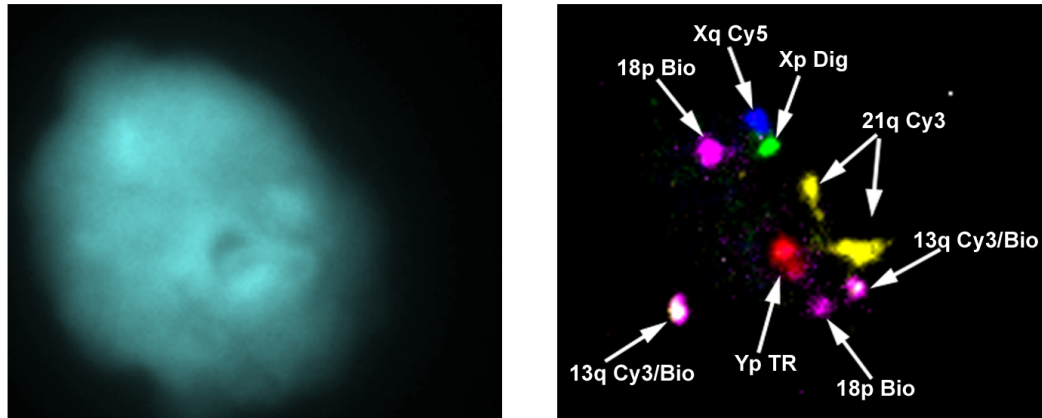


Abb.22

Abbildung 23 gibt exemplarisch Überlagerungsbilder aus verschiedenen Ebenen wieder. Es wurde von einer fetalen Zelle in insgesamt 25 verschiedenen Z- Ebenen mit einem definierten Abstand von jeweils 250 nm eine Bildsequenz (DAPI, FITC, Cy3, Cy3.5 Cy5, Cy5.5) aufgenommen.

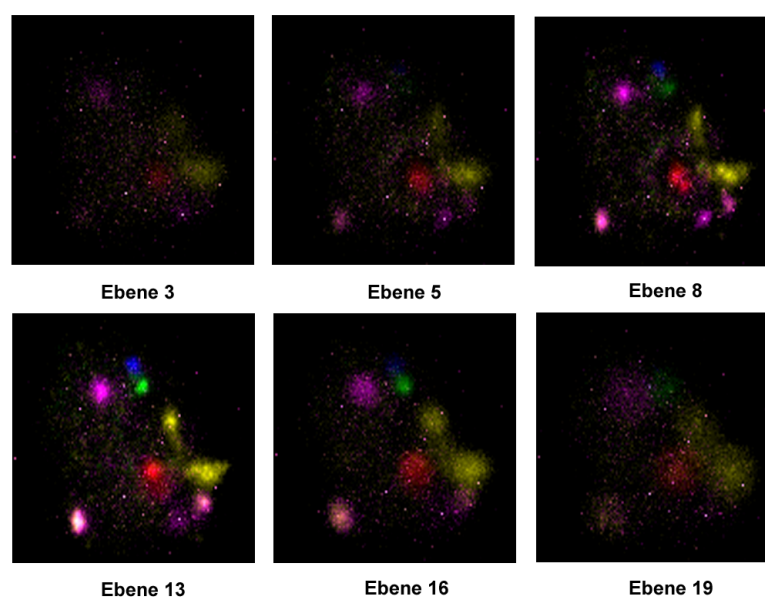


Abb.23

Damit ergeben sich bezüglich der Vorbehandlung fetaler Zellen im Vergleich zu den Standard-Lymphozytenpräparaten folgende Unterschiede:

Bei einer Hybridisierung mit Centromersonden war lediglich ein intensiverer Pepsinverdau notwendig und zwar verglichen mit Standardpräparaten mit der doppelten Pepsinkonzentration und 4- 5 facher Inkubationszeit.

Bei einer Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden waren weitere Abwandlungen erforderlich: wegen des bei diesem Zelltyp sehr dicht gepackten Chromatins wurde eine KCl-Behandlung zur Auflockerung durchgeführt. Um eine gute Permeabilisierung zu erreichen, war die Inkubation in 2× SSC, PBS/Tween entscheidend. Eine Behandlung mit RNase führte zu einer Reduktion des Hintergrundes. Die einzusetzende Pepsinkonzentration entsprach in etwa der bei der Hybridisierung mit Centromersonden.

3. Trisomie 21- Zellen

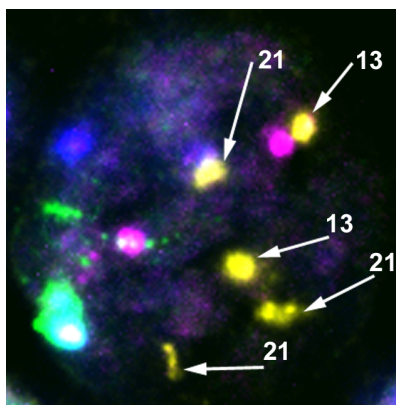
Es standen sowohl Zellen von einer Amniozentese als auch von einer Chorionzottenbiopsie zur Verfügung.

Insgesamt erwiesen sich die Zellen bei der Vorbehandlung als extrem empfindlich. Die Inkubation sowohl in 2× SSC bei 60°C als auch in PBS/ 0,2% Tween musste weggelassen werden, da die Zellen ansonsten völlig beschädigt waren. Außerdem durfte nur ein kurzer, wenig intensiver Pepsinverdau durchgeführt werden.

Das genaue Protokoll ist unter 2.2.4.1 auf Seite 40 beschrieben.

Abbildung 24 zeigt eine Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden auf Trisomie 21 Zellen (Amniozentese). Insgesamt wurden 15 Zellen ausgewertet. Die Trisomie war in allen Zellen deutlich erkennbar.

Die Signale der Sonden für Chromosom 13 und Chromosom 21 sehen in vorliegender Abbildung ähnlich aus, sind aber bei Durchsicht der einzelnen Kanäle aufgrund der Doppelmarkierung für Chromosom 13 eindeutig unterscheidbar.



Sonde	Farbe
13q	Gelb+Lila
18p	Lila
21q	Gelb
Xp	Grün
Xq	Blau

Abb.24

In der Diskussion wird auf mögliche Gründe für die z.T. gravierenden Unterschiede der Vorbehandlung bei den einzelnen Zellsystemen eingegangen.

3.2.4 Interphase- FISH bei auf Folie aufgebrauchten Cytospins

FISH an Zellen, die auf Folie aufgebracht sind, stellt eine völlig neue, noch nicht beschriebene Technik dar. Selbst der Firma PALM waren diesbezüglich keine Referenzen bekannt. Die Durchführung der FISH auf Folie war anfänglich als eine einfache Übertragung sonst üblicher Protokolle gedacht. Wie sich jedoch herausstellte, war dies keineswegs der Fall, sondern es mussten sowohl die Vorbehandlung erneut angepasst als auch die FISH-Protokolle deutlich umgestellt werden. Die Etablierung dieser Technik ist entscheidend, um Interphase- FISH und Einzelzell- CGH kombinieren zu können.

Zunächst musste ein geeignetes Protokoll für die Hybridisierung entwickelt werden. Hierbei trat- wie gesagt- eine Reihe von unerwarteten Problemen auf, die anhand der verschiedenen Zellsysteme näher erläutert werden sollen.

Zuvor sei noch erwähnt, dass zwei verschiedene Folien zur Verfügung standen: die PEN- (Polyethylennaphtalat) und die POL- Folie (Polyester) (siehe 2.2.1.4, Seite 31).

Es zeigte sich, dass auf der PEN- Folie eine DAPI- Färbung der Zellen durchführbar war, sich die POL- Folie hingegen bei einer DAPI- Färbung homogen extrem anfärbte, sodass keine Zellen identifizierbar waren.

Weil aber bereits unbehandelte Zellen, sobald sie auf Folie aufgebracht sind, eine intensive Autofluoreszenz zeigen, sind sie im DEAC- oder FITC- Kanal deutlich zu erkennen, sodass eine zusätzliche Gegenfärbung nicht nötig ist.

1. Zelllinie K562

Als Testsystem wurde zunächst wieder die Zelllinie K562 verwendet. Als erstes wurde eine Hybridisierung mit Centromersonden durchgeführt. Hier zeigte sich, dass in allen Zellen wesentlich mehr Signale als erwartet auftraten, d.h. die Centromersonden machten in Zellen, die auf Folie aufgebracht waren, extreme Kreuzhybridisierungen.

Um das Auftreten der unspezifischen Signale zu verhindern, wurden verschiedene Versuche gemacht:

- unterschiedliche Denaturierungszeiten
- erhöhte Formamidkonzentrationen, kein bzw. extrem wenig Dextransulfat
- Ersatz der indirekten Markierungen durch direkte, da erhöhte Zahl der Signale besonders bei indirekter, somit stärkerer Markierung, sichtbar wird

- geringere Antikörperkonzentration, um unspezifische Signale weniger stark hervortreten zu lassen
- Zugabe von 1µl Cot1- DNA in den Hybridisierungsmix, um Kreuzhybridisierungen zu unterdrücken

Die Zugabe von Cot1- DNA führte schließlich zu einem guten Hybridisierungsergebnis!

Weiterhin zeigten die Zellen auf Folie eine viel stärkere Autofluoreszenz, was insbesondere bei der Hybridisierung von Regionen- spezifischen Sonden problematisch war. Dieses Problem konnte mit einem intensiveren Pepsinverdau etwas reduziert werden.

Für eine Hybridisierung mit Centromersonden erwies sich eine Inkubation der Präparate in 2× SSC und Triton, um eine gute Permeabilisierung der Zellen zu erreichen, als günstig. Der Pepsinverdau musste im Vergleich zu den Cytospins auf normalen Objektträgern um die 3-4 fache Pepsinkonzentration intensiviert werden.

Abbildung 25 zeigt Hybridisierungsergebnisse mit Centromersonden bei auf Folie aufgebrachten K562- Zellen.

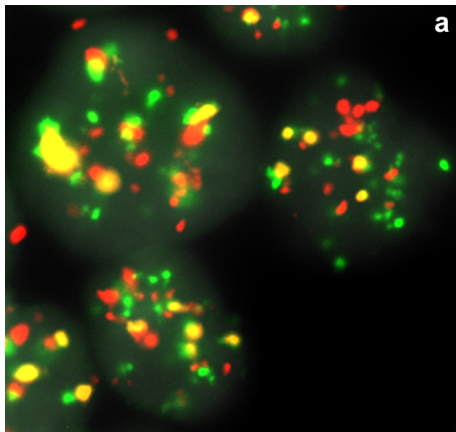
a: Hybridisierungsergebnis ohne Zugabe von Cot1- DNA

Aufgrund der zuvor durchgeführten Experimente dürften von jeder Sonde höchstens 4 Signale pro Zelle vorhanden sein. Insbesondere die indirekt markierten Sonden (rot, grün) ergaben wesentlich mehr Signale.

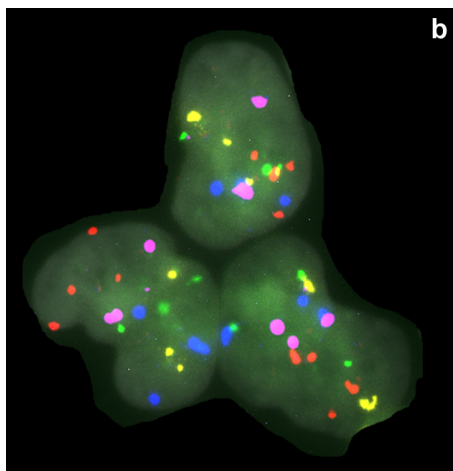
b: Hybridisierungsergebnis mit Zugabe von Cot1- DNA

Das verwendete Protokoll ist unter 2.2.4.2 auf Seite 41 nachzulesen.

Da es hier ausschließlich um die Etablierung der Hybridisierung auf Folie ging, wurde keine detaillierte Auswertung einer bestimmten Anzahl von Kernen durchgeführt.



Sonde	Farbe
Cen 7	Rot
Cen 8	Grün
Cen 15	Gelb



Sonde	Farbe
Cen 7	Rot
Cen 8	Grün
Cen 11	Blau
Cen 15	Gelb
Cen 18	Lila

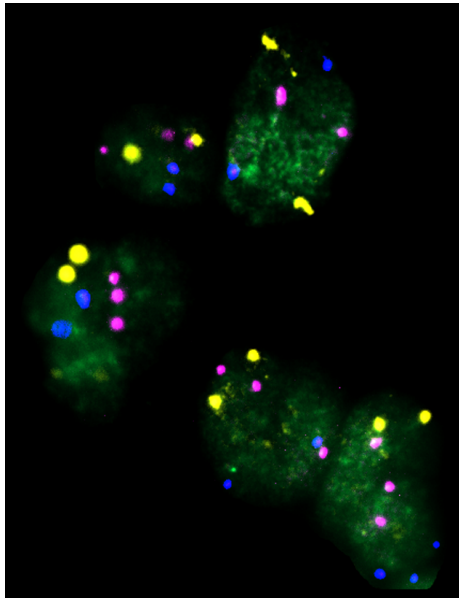
Abb.25

Für ein gutes Hybridisierungsergebnis mit Regionen-spezifischen Sonden war ein extrem intensiver und langandauernder Pepsinverdau notwendig: im Vergleich zu Standard-Lymphozytenpräparaten musste die 150- fache Konzentration an Pepsin eingesetzt werden und parallel die Inkubationszeit um das 50- fache erhöht werden. Eine der Ursachen hierfür war sicher die zuvor durchgeführte Methanol/ Eisessig- Fixierung. Aus diesem Grund wurde bei den späteren Versuchen und somit auch bei den anderen Zellsystemen schließlich die Reihenfolge der Vorbehandlungsschritte abgeändert und die Methanol-/Eisessig-Behandlung abschließend durchgeführt (vergleiche auch Diskussion, Seite 140). Außerdem war eine Inkubation in Triton entscheidend für ein gutes Hybridisierungsergebnis.

Das genaue Protokoll ist unter 2.2.4.2 auf Seite 41 beschrieben.

Abbildung 26 präsentiert eine Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden auf K562- Zellen.

Insgesamt wurden 25 Kerne ausgewertet. Die Anzahl der Signale entsprach den Werten der Auszählung bei K562- Zellen, aufgebracht auf normalen Objektträgern (siehe 3.2.1, Seite 85).



Sonde	Farbe
13q Cen YAC	Grün
21q Cen YAC	Rot
Xp11.1	Gelb
Xq21	Blau
Cen 18	Lila

Abb.26

2. Nabelschnurblut

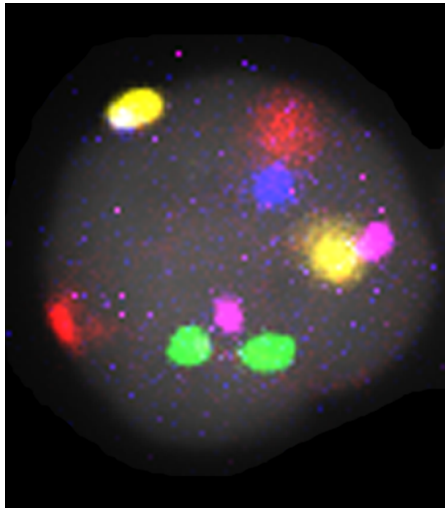
Da, wie nach zahlreichen Versuchen deutlich wurde, auf Folie aufgebrachte Zellen für ein gutes Hybridisierungsergebnis eine intensivere Vorbehandlung benötigen als wenn sie sich auf einem normalen Glasobjektträger befinden, wurde hier zusätzlich zu der Methanol/Eisessig- Behandlung und einem intensiven Pepsinverdau (vergleichbar wie bei den K562- Zellen, aufgebracht auf Folie) eine Inkubation in Triton durchgeführt.

Das genaue Protokoll ist unter 2.2.4.2 auf Seite 42 nachzulesen.

Die geeigneten Hybridisierungsbedingungen für Centromersonden waren bereits mit Hilfe der K562- Zellen etabliert. Somit wurden hier die Centromersonden gleich unter Zugabe von Cot1- DNA hybridisiert, was zu guten Hybridisierungsergebnissen führte.

Abbildung 27 zeigt eine Hybridisierung mit Centromersonden auf fetalen Zellen.

Die Signale liegen in unterschiedlichen Ebenen. Deshalb erscheinen manche Sonden stärker als andere, da versucht wurde, so zu focussieren, dass möglichst alle Sonden sichtbar sind.



Sonde	Farbe
Cen 7	Rot
Cen 8	Grün
Cen 11	Blau
Cen 15	Gelb
Cen 18	Lila

Abb.27

Bei der Hybridisierung von Regionen- spezifischen Sonden war mit einer RNase-Behandlung eine Reduzierung des Hintergrundes auf dem Präparat möglich, der sich auf der Folie besonders stark zeigt. Außerdem war ein sehr intensiver Pepsinverdau für eine gute Signalintensität notwendig: verglichen mit Standardpräparaten musste die 50- fache Konzentration an Pepsin eingesetzt werden und parallel die Inkubationszeit auf das ca. 4- fache erhöht werden (Protokoll unter 2.2.4.2 auf Seite 42).

Abbildung 28 gibt eine Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden auf fetalen Zellen wieder.

Auch hier liegen die Signale, unter anderem auch bedingt durch die Unebenheiten der Folie, in unterschiedlichen Ebenen. Daher sind in vorliegender Abbildung die Signale unterschiedlich gut erkennbar.

Die Zahl der Signale entsprach den auf Lymphozytenpräparaten ausgezählten Werten (Seite 82).

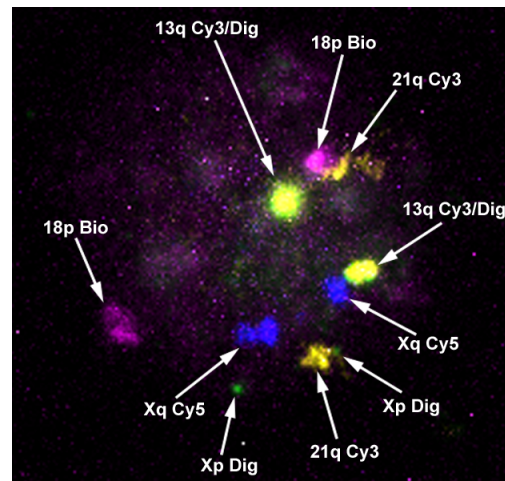


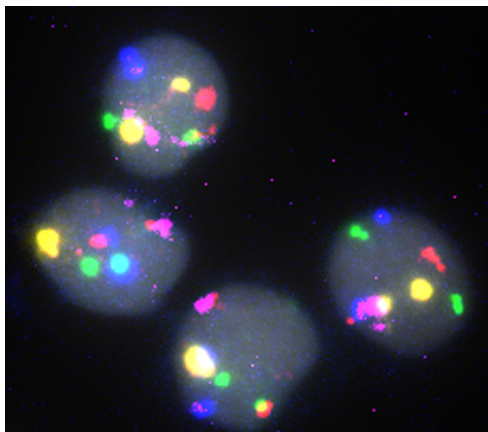
Abb.28

3. Lymphozyten

Hier war schon bei der Hybridisierung mit Centromersonden im Vergleich zu Standard-Lymphozytenpräparaten eine Erhöhung der Pepsinkonzentration um das 3- 4- fache und parallel eine Verlängerung der Inkubationszeit um das ca. 6- fache notwendig. Für eine Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden musste, verglichen mit der Hybridisierung von Centromersonden, die Pepsinkonzentration noch mal um mehr als das 25- fache erhöht werden.

Die genauen Protokolle sind unter 2.2.4.2 auf Seite 41 und Seite 42 nachzulesen.

Abbildung 29 zeigt eine Hybridisierung mit Centromersonden bei Lymphozyten. Es zeigte sich die erwartete Anzahl von Signalen.



Sonde	Farbe
Cen 7	Rot
Cen 8	Grün
Cen 11	Blau
Cen 15	Gelb
Cen 18	Lila

Abb.29

Abbildung 30 stellt das Hybridisierungsergebnis mit Regionen-spezifischen Sonden bei Lymphozyten dar.

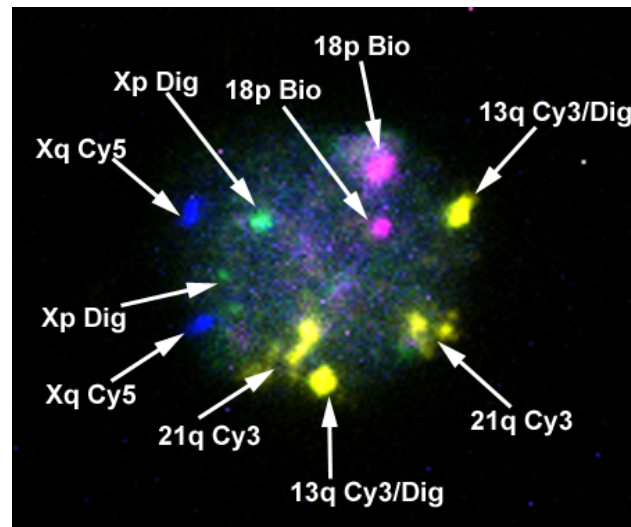


Abb.30

4. Trisomie 21 Zellen

Wegen der Empfindlichkeit dieser Zellen wurde auch hier auf eine Inkubation in $2\times$ SSC und in PBS/0,2% Tween verzichtet.

Das genaue Protokoll ist unter 2.2.4.2 auf Seite 43 nachzulesen.

Abbildung 31 zeigt ein FISH- Bild mit Regionen-spezifischen Sonden bei Trisomie 21-Zellen (Chorionzotten).

Um die Signale besser sichtbar zu machen, sind zusätzlich zu dem Überlagerungsbild auch die Einzelkanäle dargestellt.

Es wurden 15 Zellkerne ausgewertet. Davon war in 12 die Trisomie 21 eindeutig sichtbar.

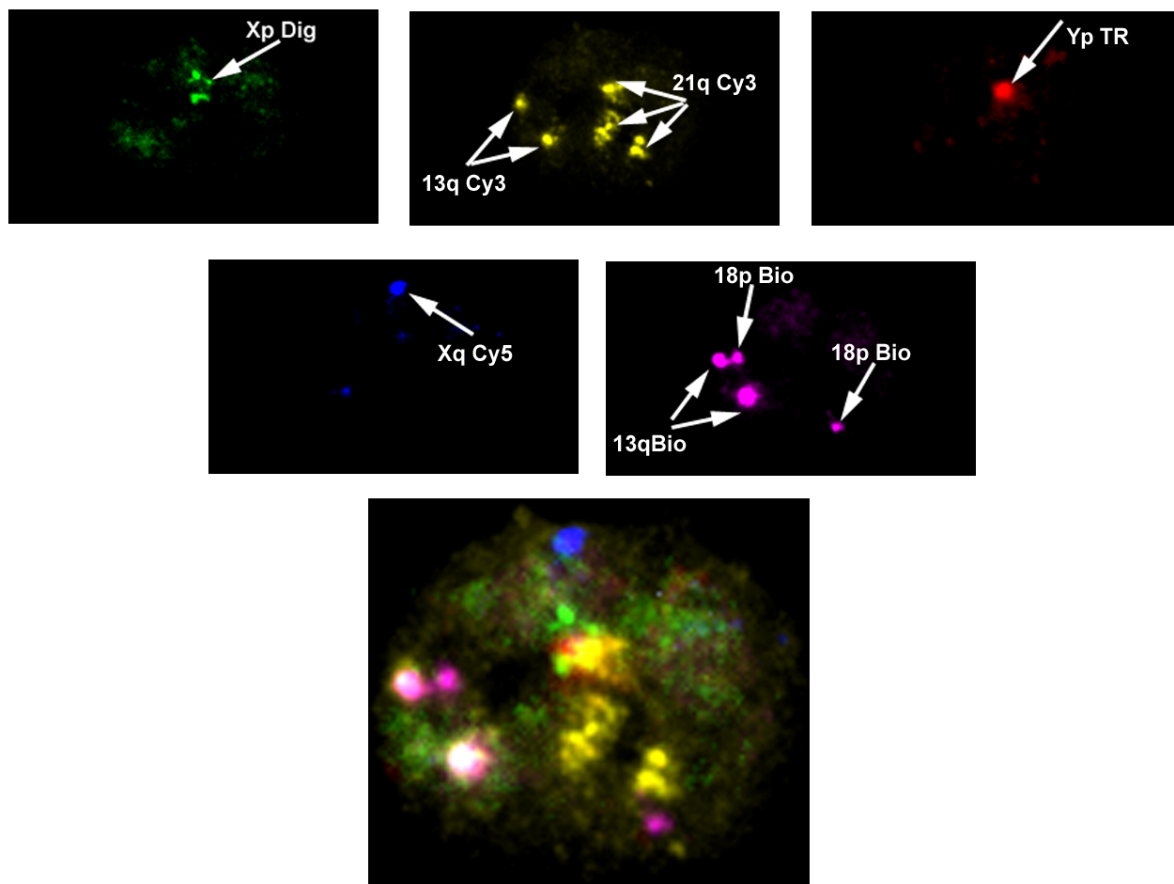


Abb.31

3.2.5 Interphase-FISH auf Cytospinpräparaten nach Antikörperfärbung

Anfangs wurde versucht, ein Protokoll zu etablieren, das eine simultane Antikörperfärbung und Interphase-FISH ermöglicht. Hiermit ist gemeint, dass sowohl Antikörperfärbung als auch FISH- Signale gleichzeitig sichtbar sind. Dies würde die Untersuchungen erleichtern, da mit einer einzigen Aufnahmeserie am Mikroskop die Präparate sowohl nach positiven Zellen durchgesucht werden könnten, als auch gleichzeitig dann die positiven Zellen auf die Anzahl der FISH- Signale der eingesetzten Sonden hin untersucht werden könnten.

Nach zahlreichen Versuchen zeigte sich aber, dass ein solches Vorgehen in der hier verwendeten Konstellation nicht möglich ist. Wenn man versucht, eine Antikörperfärbung zu erhalten, sind die FISH- Signale im Vergleich zur Antikörper- Fluoreszenz für eine entsprechende Auswertung viel zu schwach bzw. wegen der überstrahlenden Fluoreszenz des Antikörpers nicht sichtbar. Dies liegt daran, dass für gute Hybridisierungsergebnisse eine

ausreichende Vorbehandlung der Präparate wichtig ist. Bei dieser Vorbehandlung wird aber auch die Antikörperfärbung größtenteils entfernt bzw. abgeschwächt, da der Antikörper gegen Oberflächenmoleküle gerichtet ist, die bei Entfernung des Cytoplasmas zum Teil verloren gehen. Eine vollständige Auflösung aller Antigen- Antikörperbindungen war aber nicht möglich, da die extrem starke Antikörper- Antigenaffinität durch Pepsin, Proteinase K oder auch Trypsin nicht vollständig gelöst werden konnte. Um die Antikörperfärbung vollständig zu entfernen, wäre eine Entfernung der Antigene notwendig. Hierauf soll im Rahmen der Diskussion noch eingegangen werden.

Somit wurde eine sequentielle Vorgehensweise gewählt: zunächst müssen die Präparate nach positiven Zellen durchsucht und die Koordinaten, wo sich diese Zellen befinden, notiert oder abgespeichert werden. Danach kann man die für Interphase-FISH notwendige Vorbehandlung der Präparate durchführen. Die positiven Zellen können anhand der vorher gespeicherten Koordinaten auch mit jetzt schwächerer Antikörperfärbung leicht wiedergefunden und auf die Zahl der FISH- Signale hin untersucht werden.

Nach der Antikörperfärbung benötigen die Zellen eine intensivere Vorbehandlung, um gute FISH- Signale zu erhalten als ohne vorausgegangene Antikörperfärbung.

Der anfangs verwendete Antikörper erwies sich in Kombination mit Interphase- FISH als ungeeignet, da er extrem stark in jeden Fluoreszenzkanal einstrahlte. Dies war ganz besonders problematisch bei den fetalen Zellen.

Der später verwendete, ebenfalls gegen CD71 gerichtete und auch FITC- gekoppelte Antikörper war etwas geeigneter, allerdings ist eine vollständige Entfernung der Antikörperfärbung auch hier, wie oben beschrieben, nicht möglich. Der Unterschied zu dem anfangs verwendeten Antikörper besteht unter anderem auch darin, dass er zusätzlich denaturierte Antigene erkennen kann, was bei fixierten Zellen entscheidend ist.

3.2.5.1 Zellen, aufgebracht auf normalen Objektträgern

1. K562- Zellen

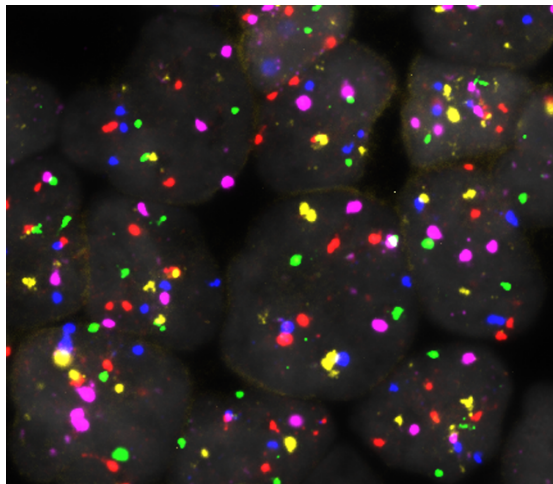
Für ein gutes Hybridisierungsergebnis sowohl mit Centromersonden als auch mit Regionenspezifischen Sonden wurden die Präparate, verglichen mit dem Protokoll ohne vorausgegangene Antikörperfärbung, zusätzlich in Triton und anschließend noch in 2× SSC bei 37°C inkubiert. Dadurch wurde eine bessere Durchlässigkeit der Zellen erreicht, was zu

stärkeren Signalen der eingesetzten Sonden führte. Außerdem ist ein wesentlich intensiverer Pepsinverdau notwendig.

Für die Hybridisierung mit Centromersonden ist hier ebenfalls eine Methanol- Eisessig Behandlung angeraten, um die Antikörperfärbung abzuschwächen.

Das genaue Protokoll ist unter 2.2.5.1 auf Seite 45 nachzulesen.

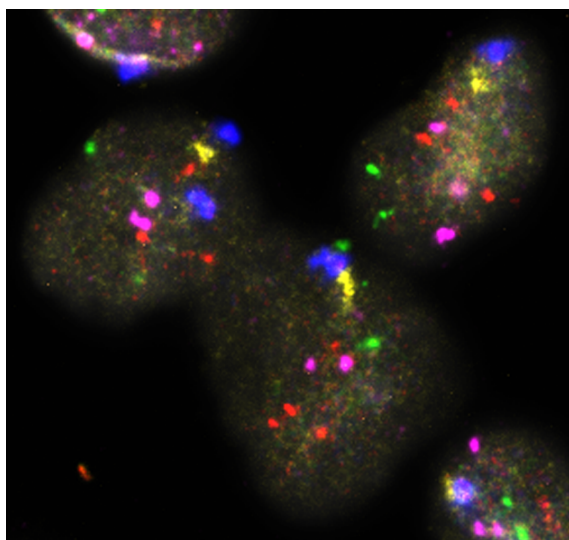
Abbildung 32 zeigt eine Hybridisierung mit Centromersonden nach Antikörperfärbung auf K562- Zellen.



Sonde	Farbe
Cen 7	Rot
Cen 8	Grün
Cen 11	Blau
Cen 15	Gelb
Cen 18	Lila

Abb.32

Abbildung 33 stellt eine Hybridisierung mit Regionen-spezifischen Sonden nach Antikörperfärbung dar.



Sonde	Farbe
13q	Grün
21q	Rot
Xp	Gelb
Xq	Blau
Cen 18	Lila

Abb.33

Sowohl mit Centromersonden als auch mit Regionen- spezifischen Sonden konnten nach Antikörperfärbung gute Hybridisierungsergebnisse erzielt werden. Der Antikörper verursachte bei diesem Zelltyp eine nicht so intensive Anfärbung wie z.B. bei den fetalen Zellen (siehe Abbildungen 34 und 35) und ließ sich deshalb auch recht gut entfernen.

2. Nabelschnurblut

Das Protokoll für die Hybridisierung von Centromersonden entspricht in etwa dem ohne vorangegangene Antikörperfärbung. Allerdings ist es hier vorteilhaft, eine RNase-Behandlung zur Reduzierung des Hintergrundes durchzuführen.

(Protokoll unter 2.2.5.1 auf Seite 46)

Abbildung 34 zeigt eine Hybridisierung mit Centromer- spezifischen Sonden nach Antikörperfärbung. Links ist jeweils die Antikörperfärbung dargestellt. Die Signale liegen in unterschiedlichen Ebenen und teilweise übereinander. Daher sind sie in vorliegenden Abbildungen nicht alle sichtbar.

a: anfangs verwendeter Antikörper

b: neuer Antikörper

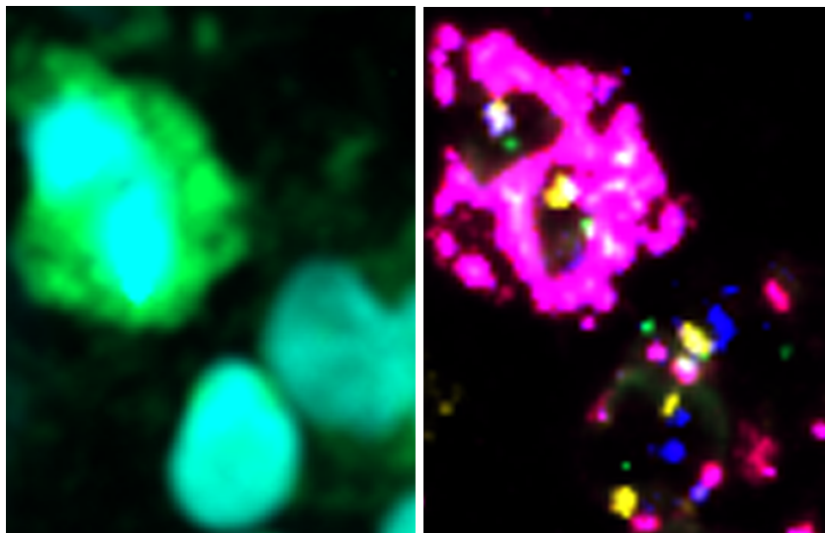


Abb.34a

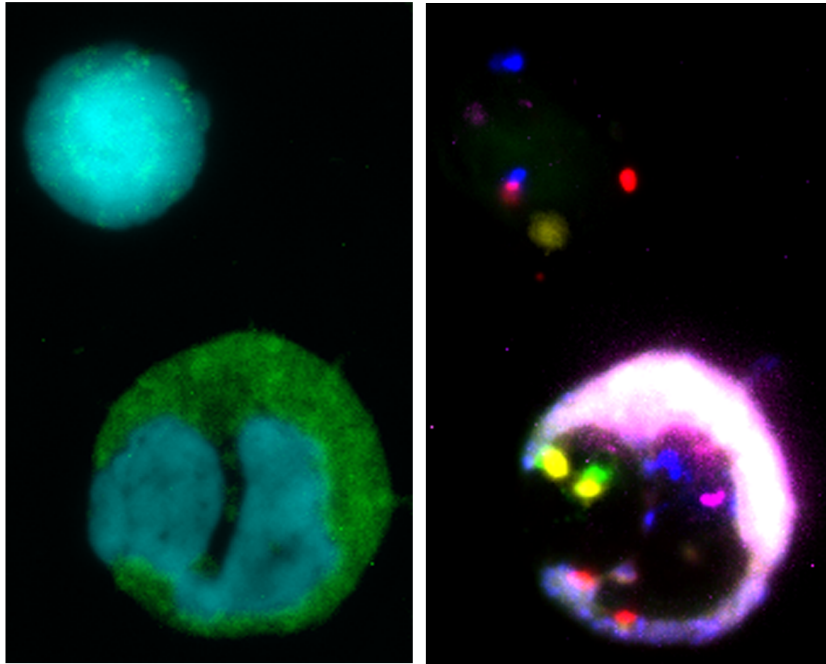


Abb.34b

Abb.34a verdeutlicht, wie ungeeignet der anfangs verwendete Antikörper war. Wegen des intensiven Einstrahlens in alle benachbarten Kanäle waren die FISH- Signale nicht auswertbar.

Der in den folgenden Versuchen verwendete Antikörper (Abb.34b und Abb.35) strahlte zwar auch in die benachbarten Kanäle ein, mit der entsprechenden Vorbehandlung konnte er aber in einem Maße abgeschwächt werden, dass die FISH- Signale deutlich erkennbar waren. Für ein gutes Hybridisierungsergebnis war außerdem eine gute Permeabilisierung der Zellen entscheidend.

Das Protokoll für die Hybridisierung von Regionen- spezifischen Sonden entspricht dem ohne vorangegangene Antikörperfärbung, bis auf eine geringfügige Verstärkung des Pepsinverdaus.

(Protokoll unter 2.2.5.1 auf Seite 46)

Abbildung 35 gibt eine Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden nach Antikörperfärbung wieder. Um die einzelnen Signale besser erkennen zu können, sind die verschiedenen Kanäle bei der Ak- positiven Zelle dargestellt. Ein Signal der Y- Sonde (Cy3.5) ist nicht vorhanden, da es sich um eine weibliche Zelle handelt.

a: Antikörperfärbung, der Pfeil zeigt auf die positive Zelle.

b: Überlagerungsbild, der Pfeil kennzeichnet die positive Zelle.

c-f: FITC, Cy3, Cy5, Cy5.5

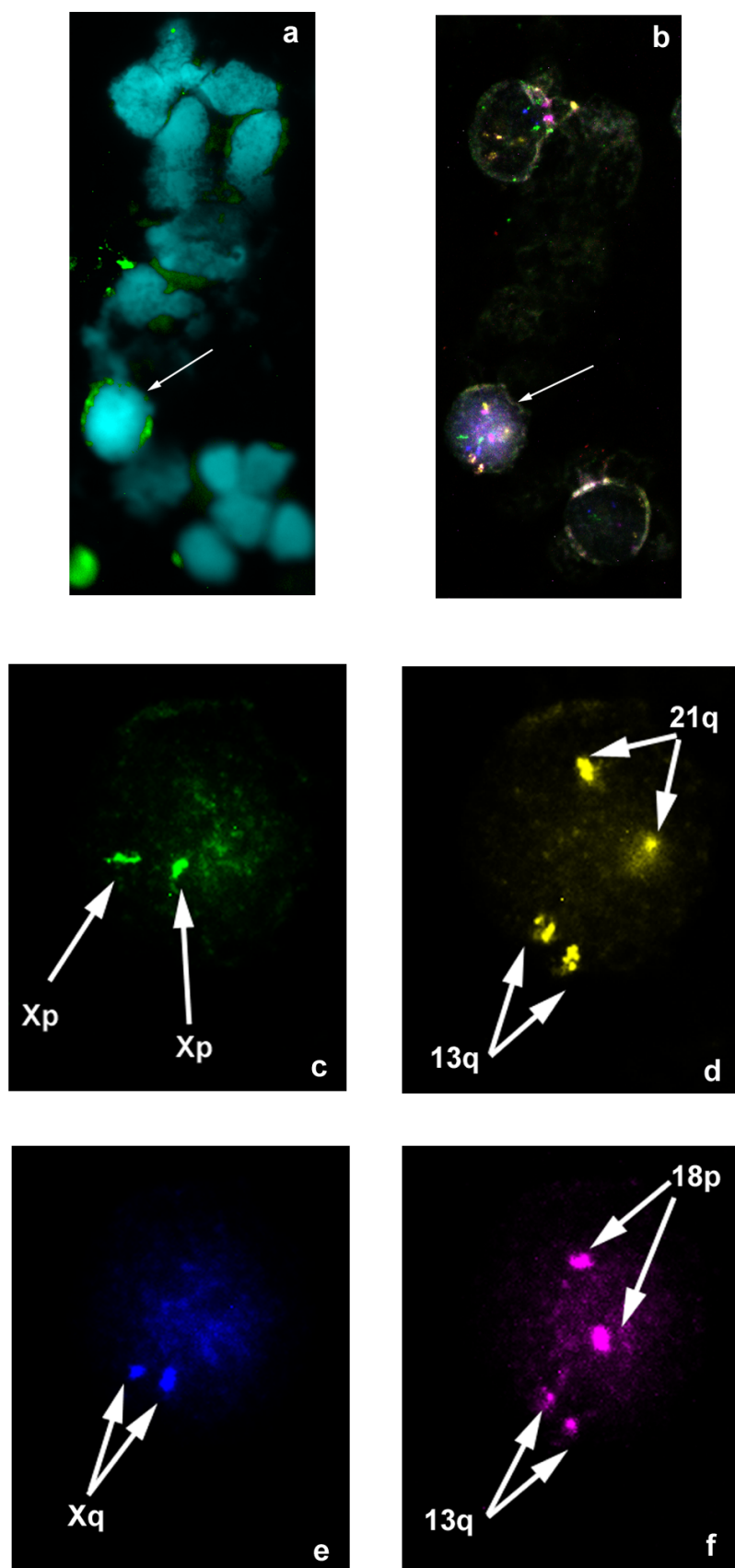


Abb.35

3. Gemisch aus K562- Zellen und weiblichen Lymphozyten

Dieses Gemisch wurde verwendet, um eine Versuchsanordnung zu schaffen, die ähnlich einer Blutabnahme bei Schwangeren wäre.

So wurden einige K562- Zellen, die wegen ihres CD71- Transferrinrezeptors den fetalen Zellen entsprechen können, weiblichem Blut untergemischt.

Der verwendete Antikörper gegen CD 71 dürfte nur die K562- Zellen, nicht aber die Lymphozyten anfärben.

Abbildung 36 zeigt eine Antikörperfärbung auf den Präparaten mit K562- Zellen und weiblichen Lymphozyten. Aufgrund morphologischer Kriterien muss es sich bei den angefärbten Zellen ausschließlich um K562- Zellen handeln.

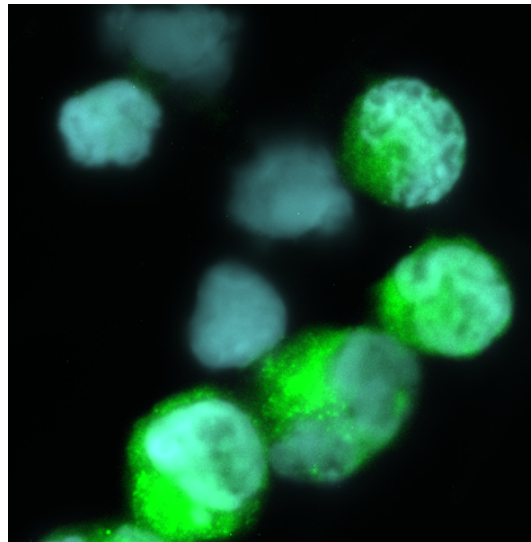


Abb.36

Weiterhin wurden nach der Antikörperfärbung Hybridisierungen mit Centromer- spezifischen Sonden und auch mit Regionen-spezifischen Sonden (ohne Abbildung) durchgeführt.

Das Problem einer geeigneten Vorbehandlung bestand darin, dass es sich bei den K562- Zellen und den weiblichen Lymphozyten um zwei völlig verschiedene Zellarten handelt.

Die verwendeten Protokolle sind unter 2.2.5.1 (Seite 47) beschrieben.

In **Abbildung 37** ist eine Hybridisierung mit Centromersonden nach Antikörperfärbung dargestellt.

a: Antikörperfärbung

b: Centromersignale

Links ist jeweils eine K562- Zelle zu sehen, rechts ein Lymphozyt.

Die mittels Antikörper identifizierte K562- Zellen haben wie erwartet deutlich mehr Signale als die benachbarten Lymphozyten.

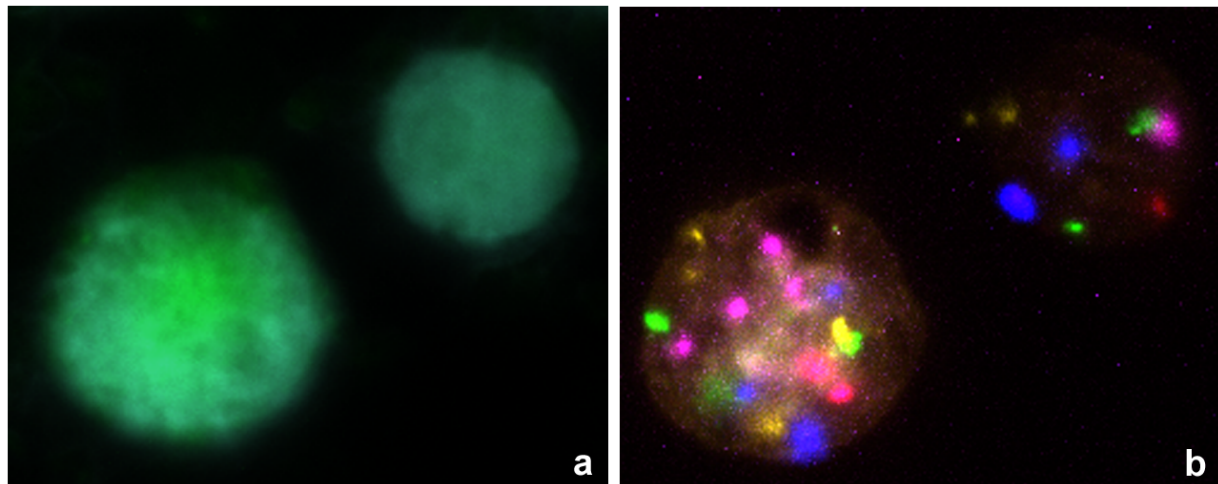


Abb.37

3.2.5.2 Zellen, aufgebracht auf Folie

Insgesamt ist hier, außer bei den K562 Zellen, ein sehr intensiver Pepsinverdau der Zellen notwendig. Dies liegt daran, dass zwei Schwierigkeiten überwunden werden müssen:

- Entfernung des Antikörpers, um FISH- Signale gut sichtbar zu machen, ähnlich wie bei den oben aufgeführten Experimenten
- Besonderheiten bei der Hybridisierung auf Folie

1. Zelllinie K562

Das Protokoll für die Vorbehandlung der K562- Zellen für die Hybridisierung mit Centromersonden und auch Regionen- spezifischen Sonden entspricht der Vorbehandlung, die unter 2.2.5.2 1A und 1B (Seite 45) beschrieben ist.

2. Nabelschnurblut

Um gute Hybridisierungssignale zu erhalten, mussten die Centromersonden in relativ hoher Konzentration eingesetzt werden (siehe 2.2.5.2; Seite 48). Im Vergleich zu der Hybridisierung mit Centromersonden nach Antikörperfärbung, wenn sich die Zellen auf normalem Objektträger und nicht auf Folie befinden, musste von jeder Centromersonde mehr als das Doppelte eingesetzt werden.

Das Protokoll für die Vorbehandlung ist unter 2.2.5.2 2A auf Seite 48 beschrieben.

Abbildung 38 zeigt eine Hybridisierung mit Centromersonden nach Antikörperfärbung bei fetalen Zellen, aufgebracht auf Folie.

a: Antikörperfärbung

b: Centromersignale in Antikörper- positiver Zelle

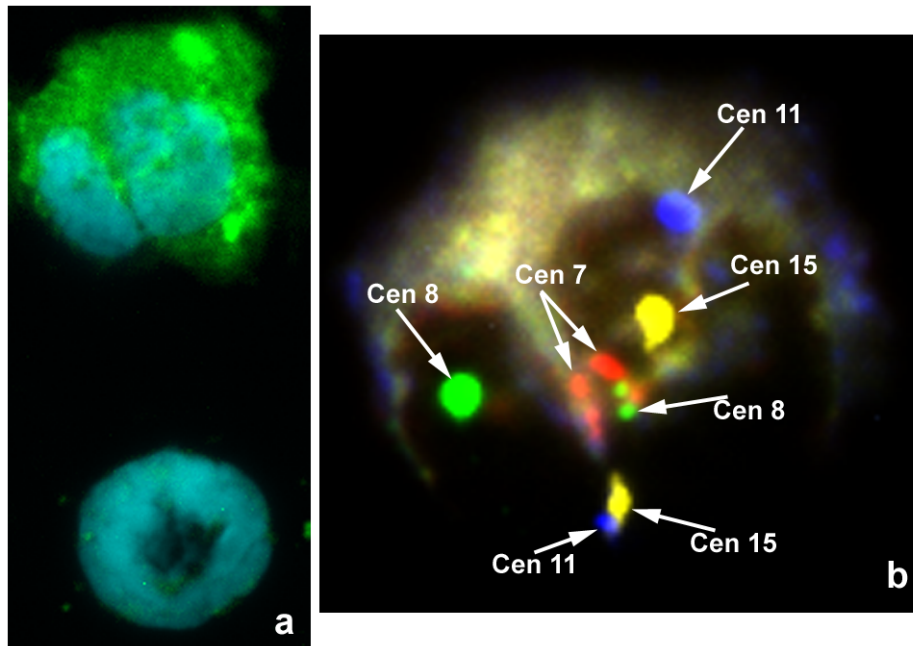


Abb.38

Für eine erfolgreiche Hybridisierung Regionen- spezifischer Sonden nach Antikörperfärbung bei fetalen Zellen ist es entscheidend, eine sehr gute Durchlässigkeit der Zellen zu erreichen. Dafür ist eine intensive Behandlung mit 2× SSC, 60°C und PBS/Tween notwendig. Außerdem wurde hier, verglichen mit allen anderen Protokollen die höchste Pepsinkonzentration eingesetzt.

(Protokoll unter 2.2.5.2 2B, Seite 48)

Abbildung 39 gibt eine Hybridisierung mit Regionen- spezifischen Sonden nach Antikörperfärbung bei fetalen Zellen wieder.

Auf die Darstellung des Überlagerungsbildes wird hier verzichtet, da die Signale dort nicht gut erkennbar sind.

a- d: FITC, Cy3, Cy5, Cy5.5

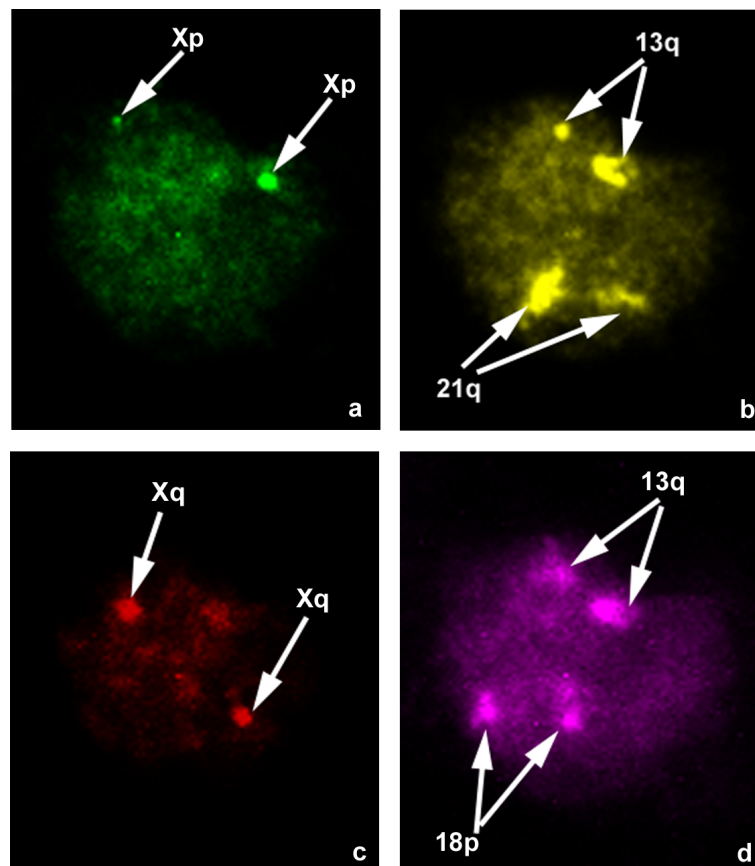


Abb.39

3.2.6 Einzelzell- CGH

Wie bereits unter 2.2.6.1 (Seite 49) erwähnt, wurden sowohl das Arcturus- als auch das PALM- System für die Zellgewinnung verwendet.

Wie unter 2.2.6 (Seite 49) beschrieben, wurden außerdem verschiedene Zellsysteme zum Testen benutzt.

Für die CGH- Profile wurden jeweils 15- 20 Metaphasen ausgewertet.

Arcturus- System

Der Vorteil bei der Verwendung des Arcturus- Systems besteht darin, dass die Zellen, die untersucht werden sollen, auf einen normalen Objektträger aufgebracht werden können und nicht auf Folie aufgeschleudert sein müssen. Damit kann man, wenn man Interphase-FISH und Einzelzell- CGH kombinieren will, die unter 3.2.4 beschriebenen Schwierigkeiten einer Hybridisierung von Zellen auf Folie umgehen.

Obwohl das Arcturus- System bereits vielfach eingesetzt wurde (Emmert- Buck et al., 1996), gibt es keine Erfahrungen für den Einsatz zur Einzelzellanalyse. Die Isolierung einzelner Zellen stellte sich als außerordentlich schwierig heraus. Es gab zwei Probleme, die das Verfahren extrem erschwerten:

1. Die geeignete Fixierung von Zellen, damit diese sich überhaupt vom Objektträger ablösen.

Dies wurde u.a. dadurch erschwert, dass die Präparate extrem trocken sein müssen. Das Standardprotokoll der Firma Arcturus sieht einen Entwässerungsschritt mit Xylol vor. Die von uns hergestellten Präparate waren trotz dieses Xylol-Schrittes meist zu feucht, sodass sich die Zellen überhaupt nicht ablösen ließen.

Da zunächst nicht klar war, ob die Schwierigkeiten, Zellen abzulösen mit der Entwässerung, Beschichtung der Objektträger oder der Präparateherstellung mittels Cytospin zusammenhingen, wurde das Protokoll zur Herstellung der Präparate immer wieder abgewandelt.

- Es wurden verschiedene Objektträger ausgetestet: hier zeigte sich, dass einfache, unbehandelte Objektträger am besten geeignet waren. Die Zellen ließen sich von Superfrost und Superfrost Plus- Objektträgern hingegen schlechter ablösen.
- Weiterhin wurden die Zellen mit unterschiedlichen Umdrehungszahlen, angefangen mit 500 RPM bis 1000 RPM auf die Objektträger geschleudert: eine niedrige Umdrehungszahl von 500 RPM erwies sich als am besten für die Ablösung der Zellen. Allerdings besteht hier wiederum die Gefahr, dass sich auch ungewünschte Zellen aus dem Nachbarbereich mit ablösen (siehe unten).
- Wenn die Präparate nach der Inkubation in Xylol durch die Alkoholreihe gezogen wurden, lösten sich die Zellen besser ab, als wenn die Präparate zum Abschluss in Xylol inkubiert wurden. Außerdem erwies es sich als besser, keine Alkoholreihe, sondern sofort 100%igen Alkohol zu verwenden.

2. Die sichere Isolierung einzelner Zellen

Nachdem es gelungen war, die Zellen so auf dem Objektträger aufzubringen, dass sie mit dem Arcturus- System abgelöst werden konnten, musste nach Mikroskopkontrolle festgestellt werden, dass sich nicht nur die gewünschten Zielzellen, sondern auch benachbarte Zellen aus der Umgebung mit abgelöst hatten.

Eine weitere Erschwernis bestand darin, dass sich verschiedene Zellarten auch unterschiedlich leicht ablösen ließen.

Trotz dieser Schwierigkeiten, die zahlreiche Experimente erforderten, gelang es, geeignete Bedingungen zu finden (siehe oben unter Punkt 1), um mit dem Arcturus- System einzelne Zellen zu isolieren und das erwartete CGH- Profil zu erhalten.

Abbildung 40 stellt das CGH- Profil eines einzelnen weiblichen Lymphozyten, isoliert mit dem Arcturus- System, dar.

Für die Amplifikation und Markierung der DNA wurde das unter 2.2.6.3 (Seite 51) beschriebene Protokoll verwendet.

Insbesondere die Profile der Geschlechtschromosomen belegen die erfolgreiche Durchführung des Experiments. Da die Referenz-DNA männlich und die Test-DNA weiblich ist, erscheint das X-Chromosom überrepräsentiert und das Y-Chromosom unterrepräsentiert. Alle Autosomen zeigen erwartungsgemäß, da es sich um eine normale Zelle handelt, weder Gewinne noch Verluste.

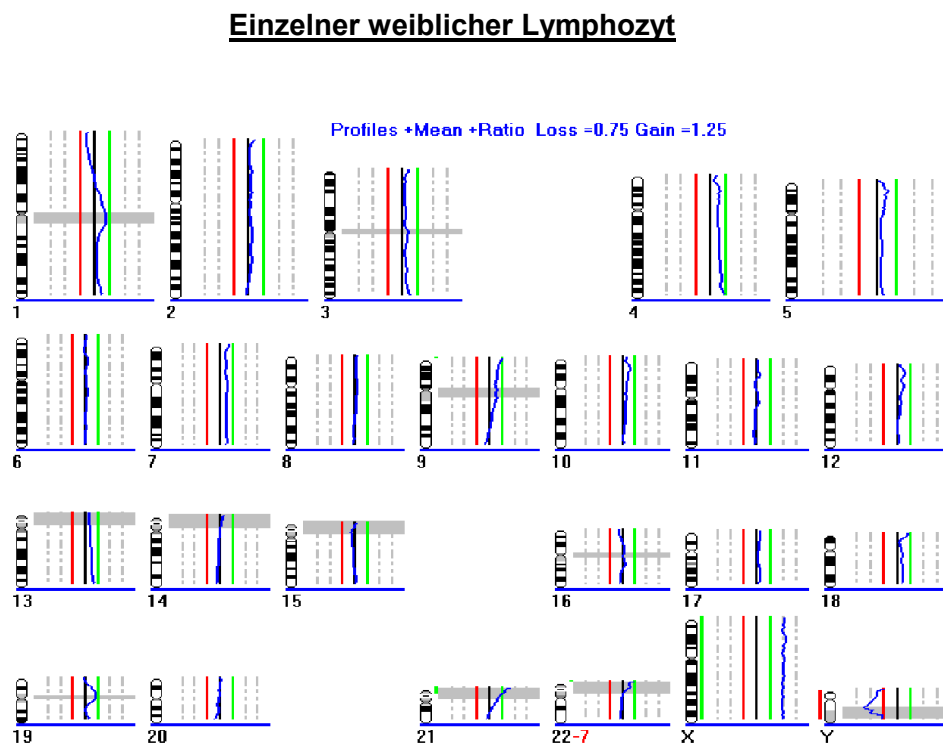
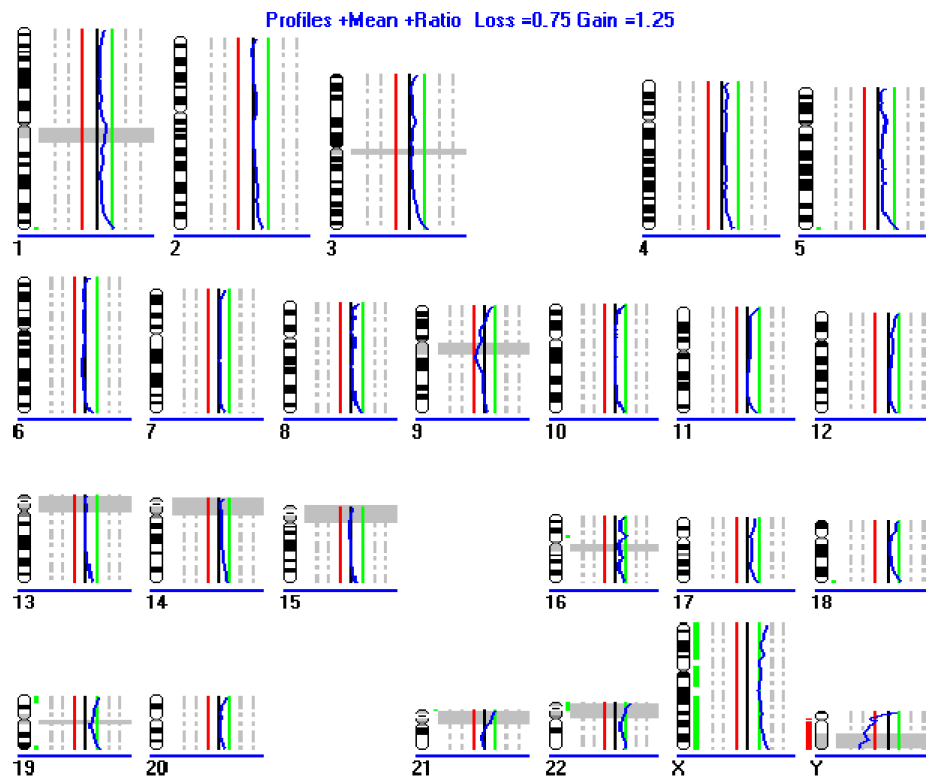


Abb.40

Abbildung 41 zeigt das CGH- Profil von zwei weiblichen fetalen Zellen.

Für die Amplifikation und Markierung der DNA wurde ebenfalls das unter 2.2.6.3 beschriebene Protokoll verwendet.

2 weibliche fetale Zellen**Abb.41****PALM- System**

Verwendet man das PALM- System, müssen die zu katapultierenden Zellen auf Folie aufgebracht sein. Ein Katapultieren von Zellen, die auf einem normalen Objektträger aufgebracht sind, ist zwar u.U. auch möglich, allerdings werden hier die Zellen mit zahlreichen Einzelschüssen vom Objektträger entfernt. Dies kann dazu führen, dass man nicht die vollständige, sondern nur Teile der einzelnen Zelle gewinnt.

Die Herstellung geeigneter Präparate ist recht einfach. Es bestehen nicht die oben beim Arcturus- System beschriebenen Probleme, dass sich Zellpräparate extrem variabel verhalten.

Die Trockenheit der Präparate ist ein wichtiger Parameter, damit der Laser gut schneiden kann. Falls die Präparate zu feucht sind, ist es möglich, durch eine kurze Inkubation im Trockenschrank die Feuchtigkeit hinreichend zu reduzieren.

Ein Ablösen von Zellen aus der Umgebung der gewünschten Zelle, wie beim Arcturus- System erwähnt, ist hier nicht zu beobachten. Somit ist gewährleistet, dass sich wirklich nur

die gewünschte einzelne Zelle im Deckel des PCR- Gefäßes befindet, aus der dann die DNA isoliert wird.

Auch für die Einzelzell- CGH wurden, genauso wie für die Interphase-FISH, sowohl die PEN- als auch die POL- Folie ausgetestet.

Insgesamt waren die Ergebnisse mit Zellen, die auf der PEN- Folie aufgebracht waren, besser.

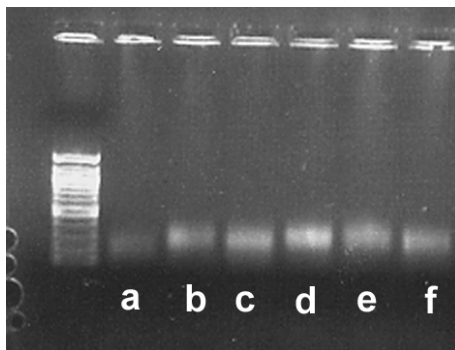
Mit der POL- Folie zeigte sich zwar auch häufig nach der Primär- PCR ein Amplifikationsprodukt auf dem Gel, die Hybridisierung hingegen war aber meist hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten der markierten Test- DNA recht schlecht.

Abbildung 42 zeigt ein Gelbild des Primär-PCR- Produktes mit typischen Banden der zu erwartenden Größe (zwischen 300 bp und 500 bp).

a: K562- Zellen

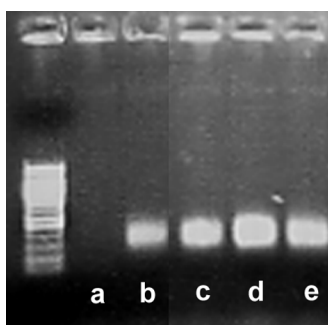
b: Lymphozyten

Die Amplifikation und auch die Markierung der isolierten DNA konnte durch die Zugabe von 3% Formamid in den PCR- Ansatz (siehe 2.2.6.3, Seite 54 bzw. 55) deutlich verbessert werden. Dies gilt unabhängig von der verwendeten PCR- Methode.



Gelspur	Zellzahl
a	1 Zelle
b	1 Zelle
c	2 Zellen
d	3 Zellen
e	4 Zellen
f	4 Zellen

a



Gelspur	Zellzahl
a	2 Zellen (kein Produkt)
b	2 Zellen
c	9 Zellen
d	15 Zellen
e	20 Zellen

b

Abb.42

Abbildung 43 gibt das CGH- Profil von 2 weiblichen Lymphozyten wieder. Hier wurde die Amplifikation ohne Zugabe von 3% Formamid durchgeführt.

Das CGH- Profil zeigt zahlreiche Abweichungen, die nicht vorhanden sein dürften, da es sich um normale Zellen handelt. Ein Teil dieser Abweichungen kommt dadurch zustande, dass die hybridisierten Chromosomen ein Bandenmuster zeigen, d.h. die DAPI- intensiven und somit AT-reichen Banden sind angefärbt, während die GC- reichen Banden hingegen nicht richtig amplifiziert wurden und somit wesentlich schwächer angefärbt sind. Außerdem treten falsch positive Gewinne bzw. Verluste bestimmter Chromosomen auf (z.B. Chr. 16,17 und 18).

2 weibliche Lymphozyten (Amplifikation ohne Formamid)

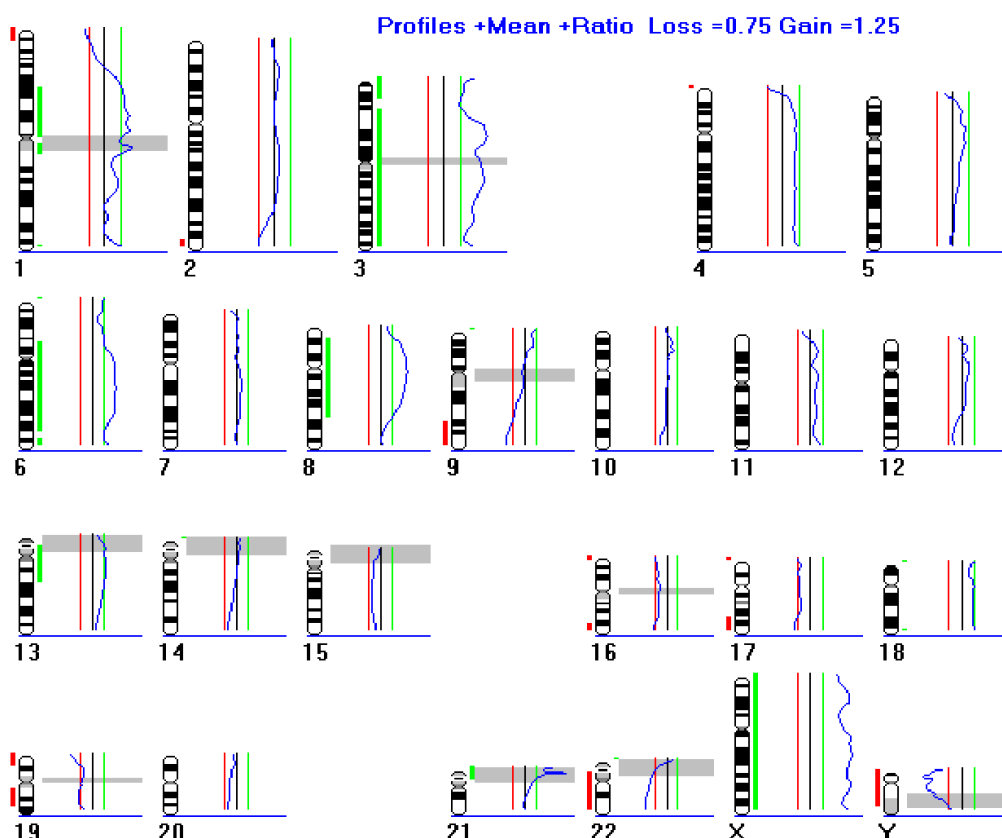
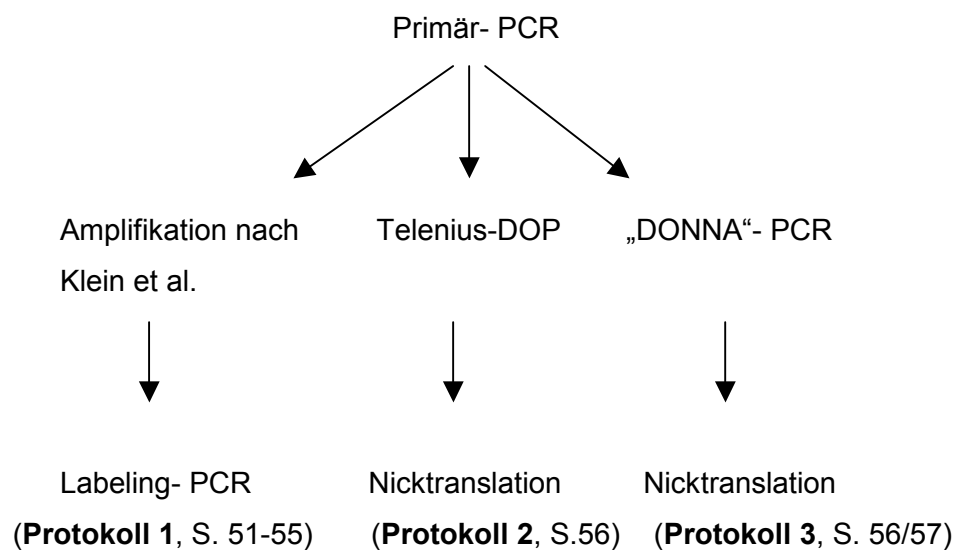


Abb.43

Es wurden unterschiedliche Zahlen von Lymphozyten katapultiert und jeweils das CGH-Profil erstellt. Bei allen folgenden Abbildungen wurde Formamid in den PCR-Ansatz zugegeben.

Außerdem wurden verschiedene PCRs für eine weitere Amplifikation des Primär-PCR-Produktes ausgetestet (beschrieben 2.2.6.5, Seite 56/57) und auch verschiedene Methoden für die anschließende Markierung der DNA.

Untenstehende Abbildung fasst die verwendeten Protokolle zusammen:



Die folgenden Abbildungen zeigen ein paar ausgewählte CGH-Profile der verschiedenen Zellsysteme, geordnet nach den oben genannten Protokollen:

Experimente mit Protokoll 1:

Abbildung 44 gibt das CGH- Profil von vier K562- Zellen wieder.

Abbildung 45 zeigt zum Vergleich das Profil einer klassischen CGH von K562- Zellen, das mit DNA aus zahlreichen Zellen gewonnen wurde.

Der Vergleich beider Profile ergibt eine gute Übereinstimmung (vgl. z.B. für die Chromosomen 3,6,9,11,22, X).

4 K562- Zellen

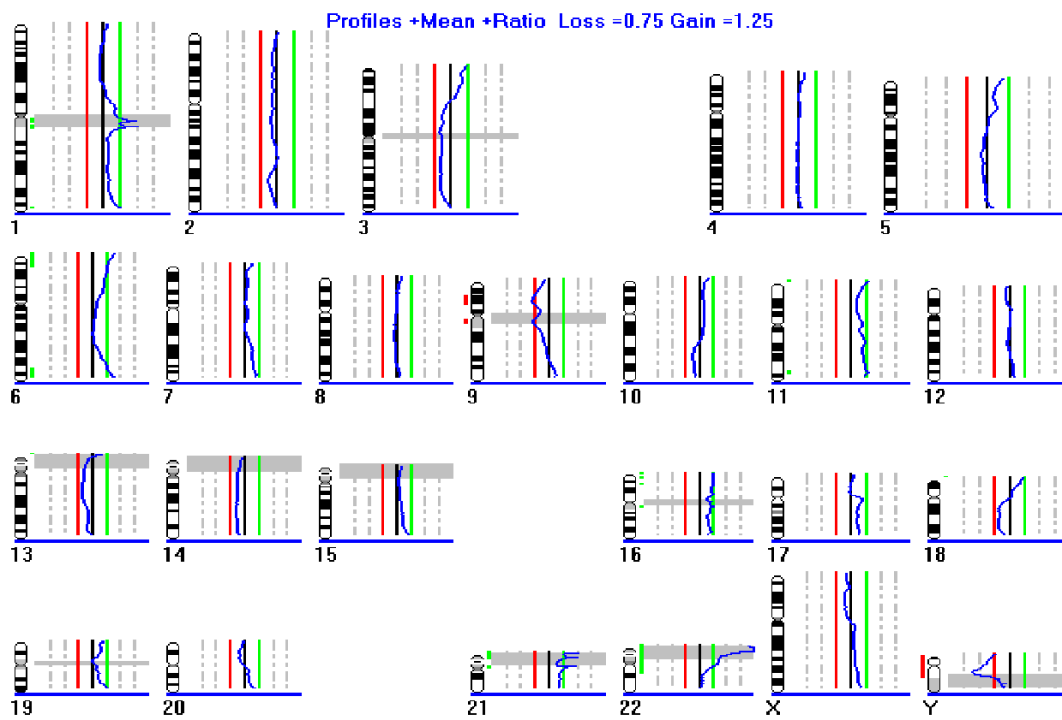


Abb.44

Klassische CGH der Zelllinie K562

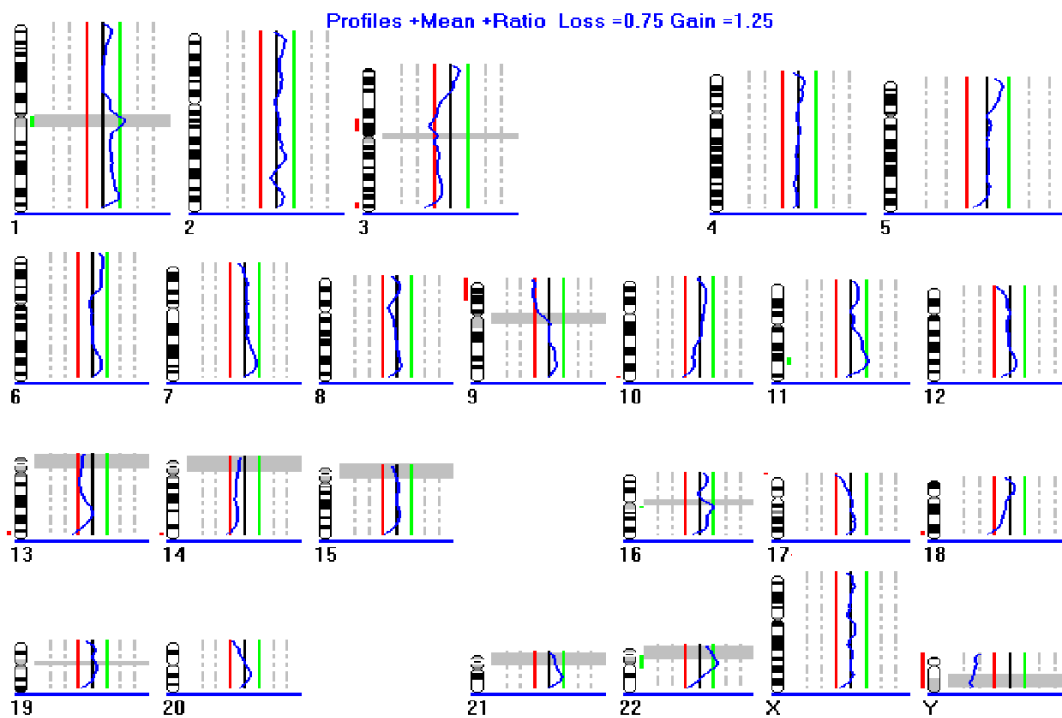


Abb.45

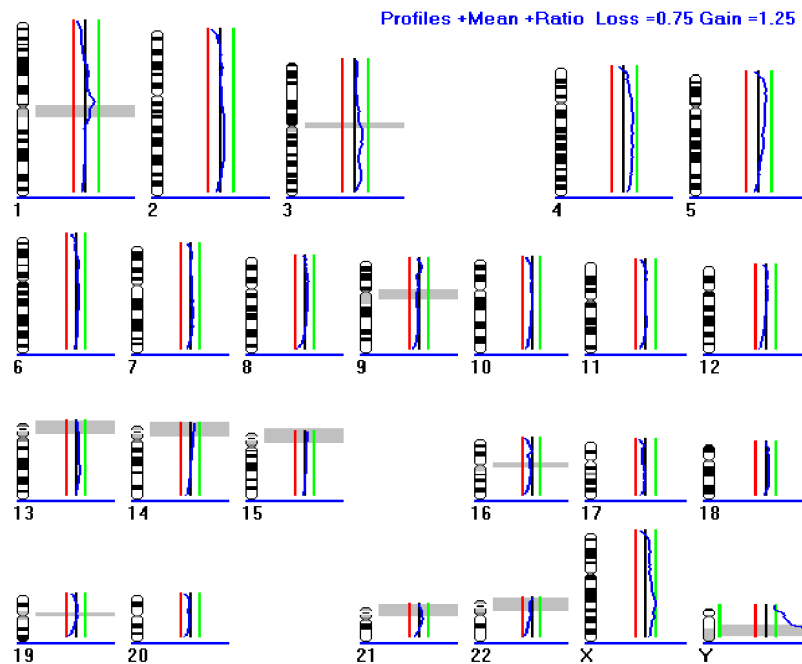
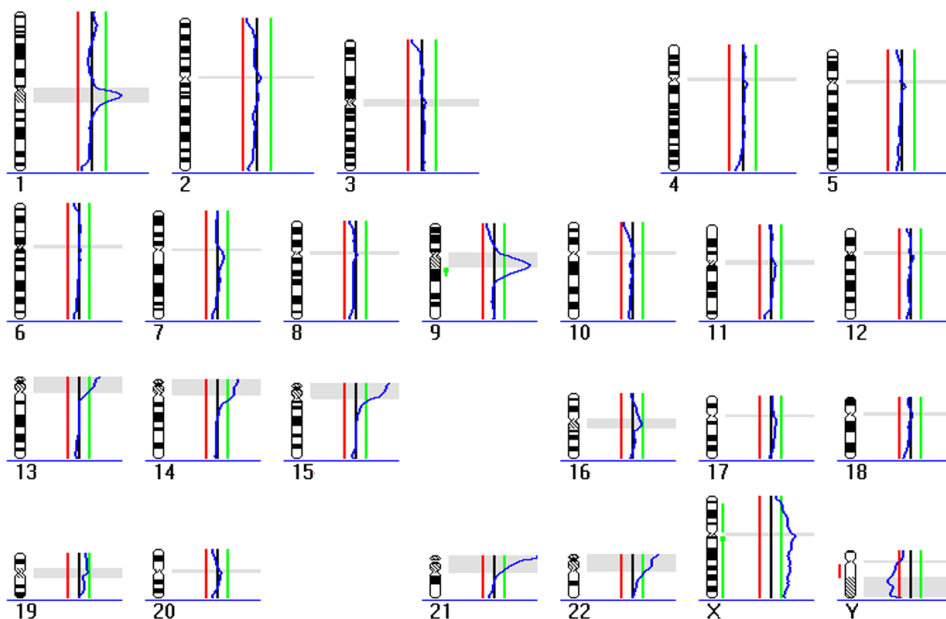
1 XYY- Zelle**Abb.46**

Abbildung 46 stellt das CGH- Profil einer einzelnen XYY- Zelle dar.

Die Überrepräsentation von Chromosom Y ist deutlich erkennbar. Die Profile der anderen Chromosomen liegen auf der Mittellinie, da hier weder Gewinne noch Verluste vorliegen.

Abbildung 47 präsentiert das CGH- Profil von einem weiblichen Lymphozyten.

1 weiblicher Lymphozyt (Protokoll nach Klein et al.)**Abb.47**

Experiment mit Protokoll 2 (Telenius- DOP, Nicktranslation):

Abbildung 48 stellt das CGH- Profil von 5 Lymphozyten dar.

Die Abweichungen im Bereich der Centromere/Heterochromatinblöcke sind ein bekanntes Artefact, das bei der CGH gelegentlich auftritt.

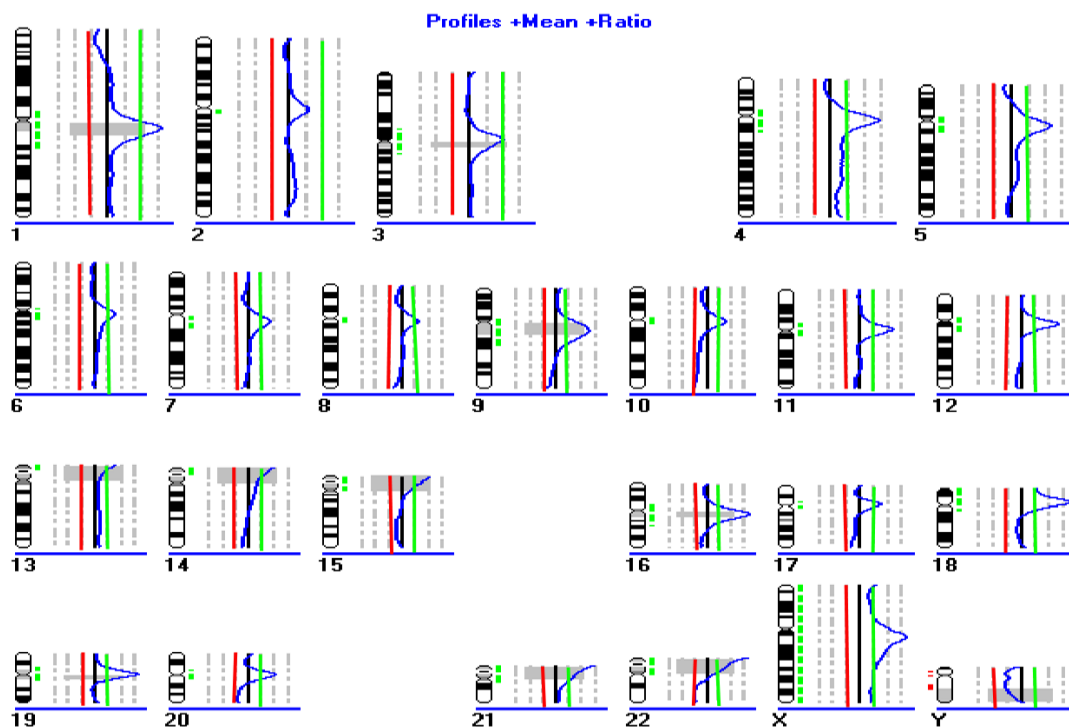
5 weibliche Lymphozyten (Telenius- DOP)**Abb.48****Experimente mit Protokoll 3 (DONNA- PCR, Nicktranslation):**

Abbildung 49 zeigt das CGH- Profil von 10 Lymphozyten.

Das Profil ist hier noch relativ inhomogen, da es sich um eines der ersten Experimente handelt.

Sowohl bei 10 als auch bei 1 Lymphozyten beweist insbesondere das Profil der Geschlechtschromosomen die erfolgreiche Durchführung des Experiments.

10 weibliche Lymphozyten („DONNA“- PCR)

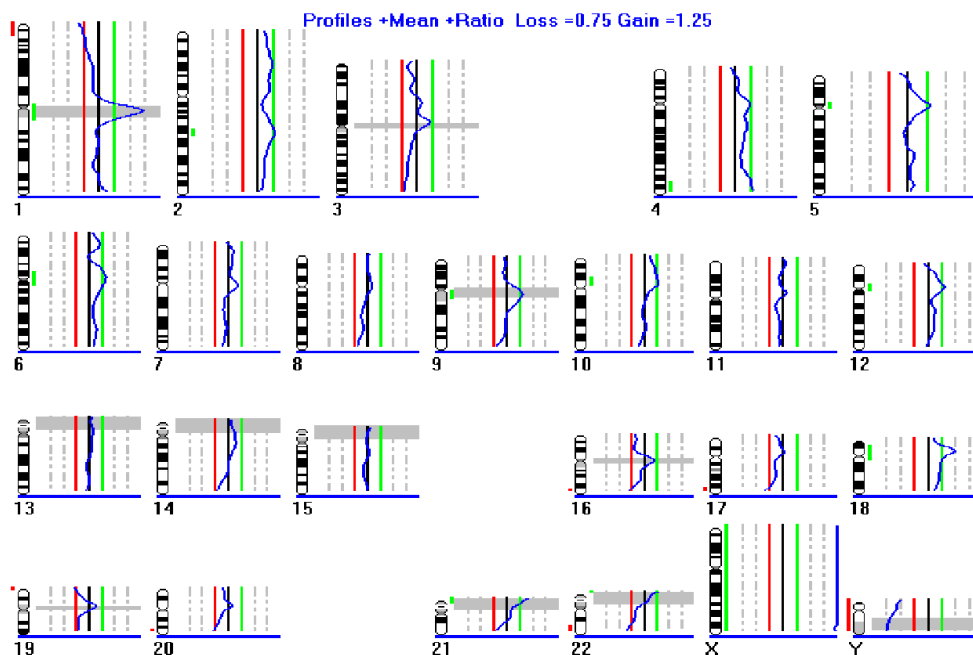


Abb.49

Abbildung 50 präsentiert das CGH- Profil von einem Lymphozyten.

1 weiblicher Lymphozyt („DONNA“- PCR)

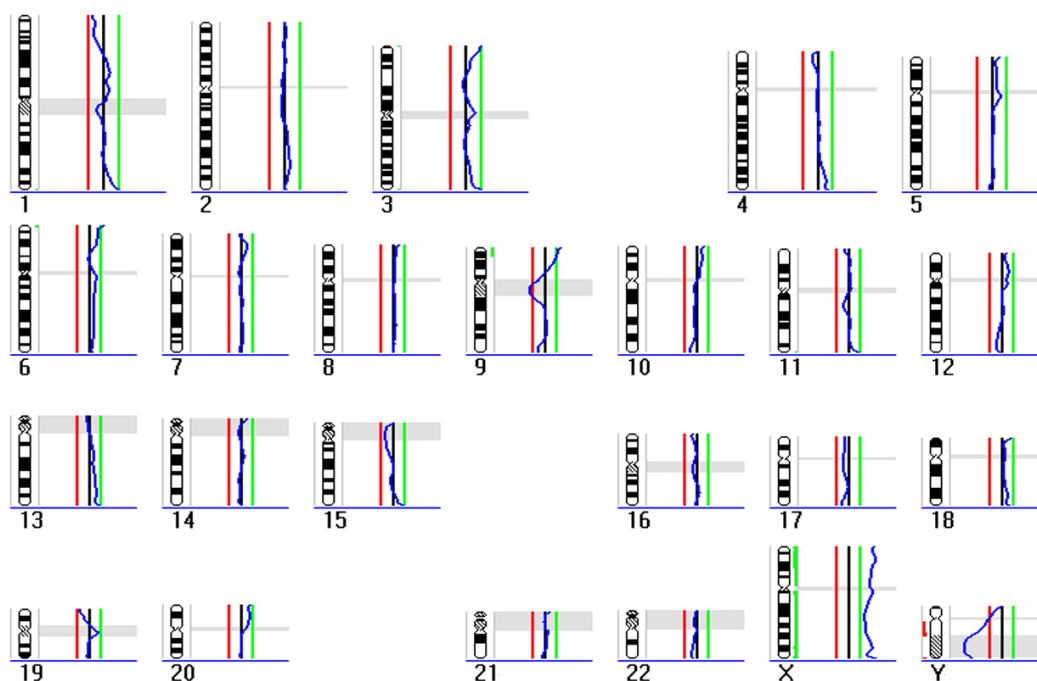


Abb.50

Abbildung 51 zeigt das CGH- Profil von 3 (a) und 2 (b) männlichen fetalen Zellen.

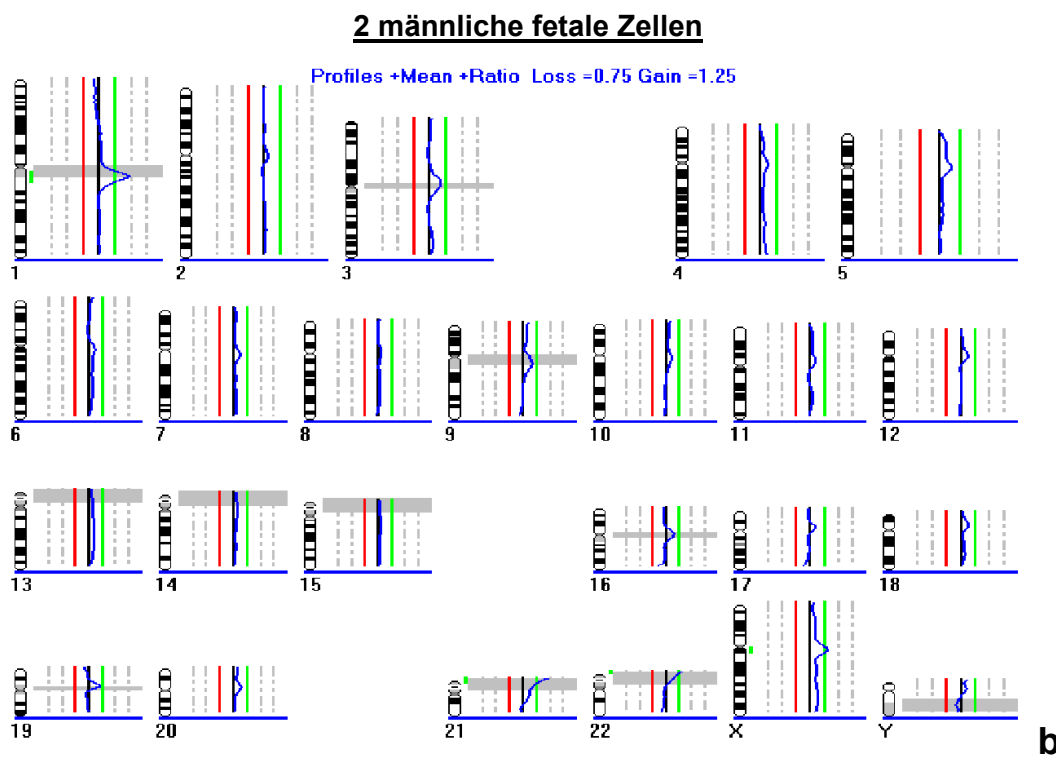
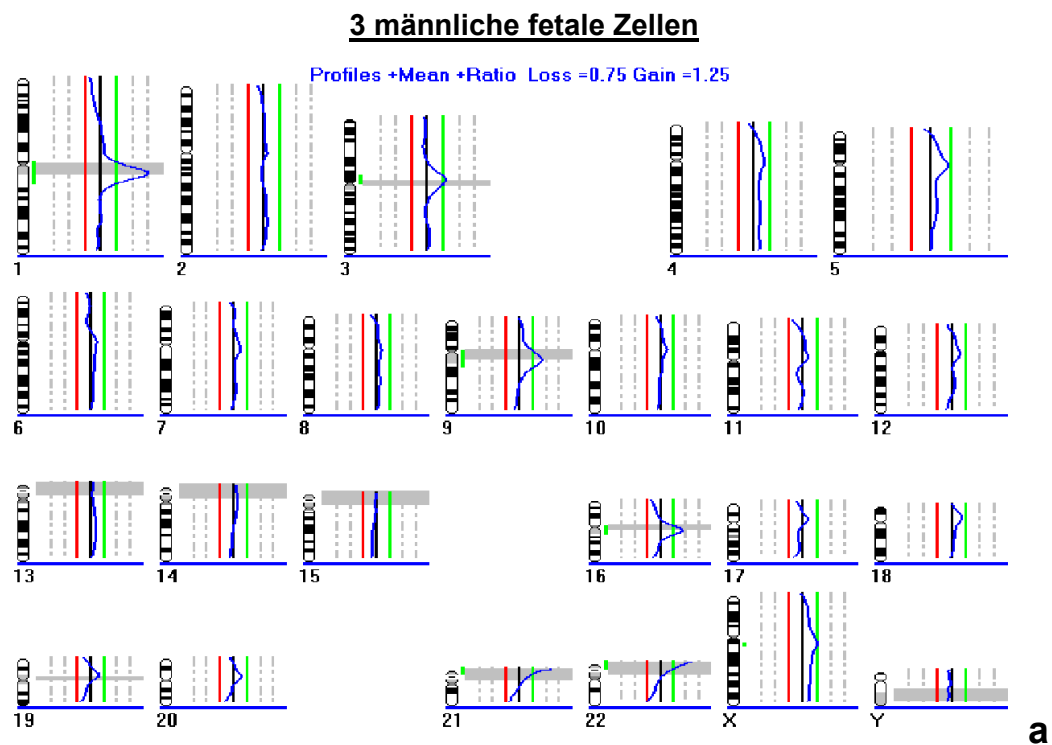


Abb.51

Bei den isolierten fetalen Zellen liegen die Profile für alle Chromosomen auf der Mittellinie. Dies ist zu erwarten, wenn man männliche Referenz-DNA und männliche Test-DNA hybridisiert, da hier bei den Geschlechtschromosomen gleiche Verhältnisse vorliegen und somit keine Abweichungen auftreten dürfen.

Abbildung 52 präsentiert das CGH Profil von 6- 8 Zellen aus einer Chorionzottenbiopsie, bei der eine Trisomie 21 diagnostiziert wurde.

Bei dem Profil ist bei fast allen Chromosomenenden eine Abweichung der Profile nach rechts zu beobachten, ein Phänomen, das bei der CGH gelegentlich auftritt. Die Überrepräsentation von Chromosom 21 wird deutlich. Die Profile aller anderen Chromosomen, sowohl der Autosomen als auch der Geschlechtschromosomen, liegen erwartungsgemäß auf der Mittellinie.

6- 8 Zellen aus Chorionzottenbiopsie (Trisomie 21)

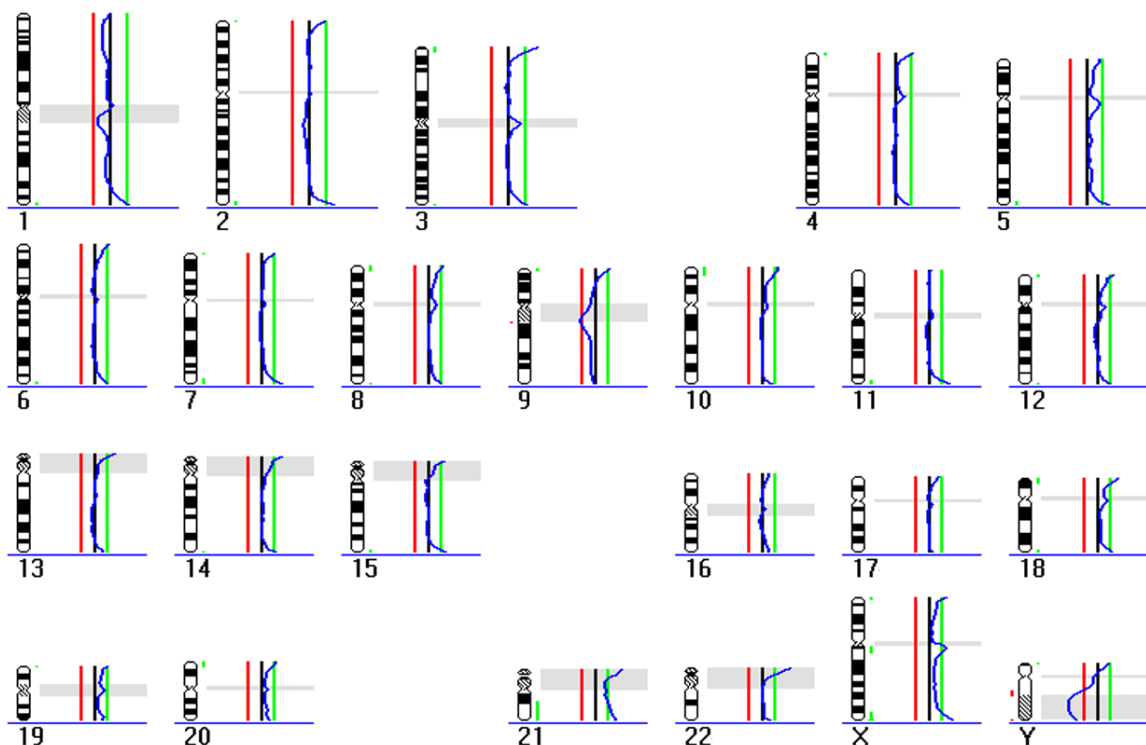


Abb.52

Zusammenfassung:

Die hier vorgestellten Ergebnisse der Einzelzell- CGH zeigen, dass eine Amplifikation der DNA aus einzelnen Zellen für nachfolgende CGH- Experimente möglich ist. Wichtig im Gegensatz zum publizierten Erstprotokoll ist allerdings die Zugabe von 3% Formamid in den PCR- Ansatz.

Das Primär- PCR- Produkt kann mit verschiedenen PCR- Protokollen weiter amplifiziert und markiert werden. Auch hier hat sich die Zugabe von Formamid als vorteilhaft erwiesen. Für die nachfolgende Amplifikation sind „DONNA“- PCR und das Markierungs-Protokoll nach Klein et al. (1999) vergleichbar gut geeignet.

Verwendet man die „DONNA- PCR“ und anschließend die Nicktranslation zur Markierung der DNA, erhält man die stärksten Fluoreszenzintensitäten.

Was die Telenius-DOP anbelangt, so sind die Hybridisierungsergebnisse variabler.

Untenstehende Tabelle fasst zusammen, in wieviel Prozent der Experimente die Einzelzell- CGH, durchgeführt mit unterschiedlichen Zellzahlen und anhand verschiedener Zellsysteme, das erwartete CGH- Profil zeigte: insgesamt wurden 64 Experimente durchgeführt, davon:

- 29 mit 1 Zelle
- 21 mit 2-3 Zellen
- 4 mit 5 Zellen
- 10 mit 10 und mehr Zellen

Verwendete Zellzahl	Zahl durchgeführter Experimente mit erwartetem CGH- Profil in %
1 Zelle	45%
2 –3 Zellen	60%
5 Zellen	75%
10 und mehr Zellen	70%

Anhand der in der Tabelle aufgeführten Werte wird deutlich, dass erwartungsgemäß die Ergebnisse reproduzierbarer sind, wenn eine größere Zellzahl verwendet wird.

In der Diskussion wird darauf eingegangen, wie diese Zahlen noch verbessert werden können.

3.3. Chromosomenanalyse in Mensch- Maus- Hybridzelllinien

Für eine Analyse aller Chromosomen in Mensch- Maus- Hybridzelllinien wurde ein neuer Sondensatz entwickelt.

Als Testsystem wurden Hybridzelllinien, hergestellt für die Conversion Technologie, (1.3, Seite 10) verwendet.

Zunächst wurden einzelne Paintingsonden auf die Chromosomenpräparate der Hybridzelllinien hybridisiert, um geeignete Hybridisierungsbedingungen, einschließlich der richtigen Vorbehandlung der Präparate, auszutesten.

Da die Chromosomenpräparate insgesamt relativ viel Hintergrund und viel Cytoplasma aufwiesen, war ein intensiver Pepsinverdau für ein gutes Hybridisierungsergebnis wesentlich.

Abbildung 53 zeigt eine Hybridisierung mit menschlichen Paintingsonden für Chromosom 5 und Chromosom X. Es wurde nur humane Cot1- DNA eingesetzt.

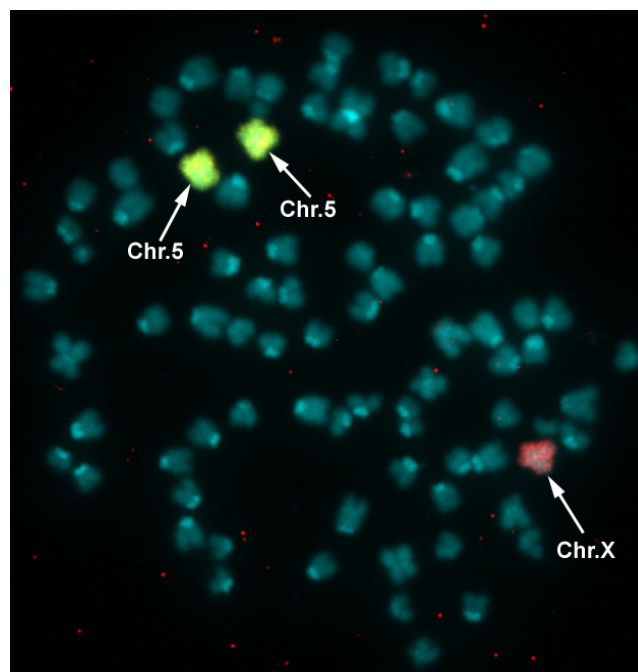


Abb.53

Mensch- und Maus-M-FISH- Mix wurden zunächst getrennt auf die Hybridzelllinien hybridisiert.

Für eine erfolgreiche Hybridisierung des humanen M-FISH- Mixes war eine Erhöhung der Probenkonzentration notwendig, verglichen mit derjenigen, die bei einer M-FISH-Hybridisierung auf Präparaten mit ausschließlich menschlichen Chromosomen eingesetzt wird.

Eine Verdopplung der normalerweise eingesetzten Menge von jedem einzelnen Pool führte zu einem guten Hybridisierungsergebnis.

Allerdings war anfangs eine Anfärbung aller Centromere der Mausechromosomen zu beobachten. Dies konnte durch die Zugabe von Maus-Cot1- DNA verhindert werden.

Abbildung 54 gibt die Hybridisierung des humanen M-FISH- Mixes auf die Mensch- Maus-Hybridzelllinien und die Klassifizierung der menschlichen Chromosomen wieder.

54a: DAPI- Färbung

54b: Hybridisierungsmuster des menschlichen M-FISH- Mixes

54c: Klassifizierung der menschlichen Chromosomen

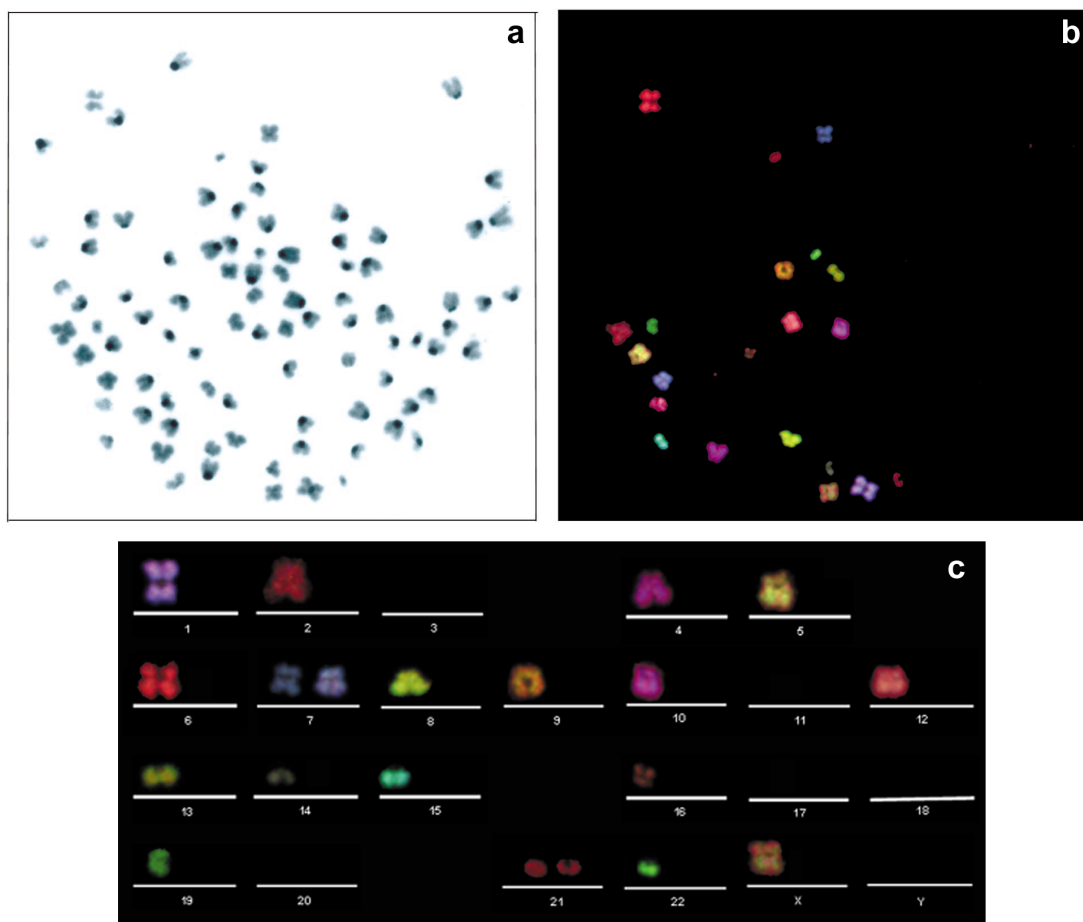


Abb.54

Eine Hybridisierung des Maus-M-FISH- Mixes auf die Hybridzelllinien führte dazu, dass alle Chromosomen, auch die menschlichen, angefärbt waren. Um dies zu verhindern, war es entscheidend, menschliche Cot1- DNA zuzugeben.

Abbildungen 55 a und **b** zeigen die Hybridisierung des Maus-M-FISH- Mixes auf die Hybridzelllinien:

- (a) ohne menschliche Cot1- DNA: das DAPI- Bild links belegt, dass ohne menschliche Cot1- DNA die menschlichen Chromosomen mit angefärbt werden. Die Pfeile zeigen auf menschliche Chromosomen.
- (b) unter Zugabe von menschlicher Cot1- DNA: die menschlichen Chromosomen sind nicht angefärbt. Die Pfeile zeigen auf die mit dem Maus-M-FISH- Mix nicht gefärbten menschlichen Chromosomen.

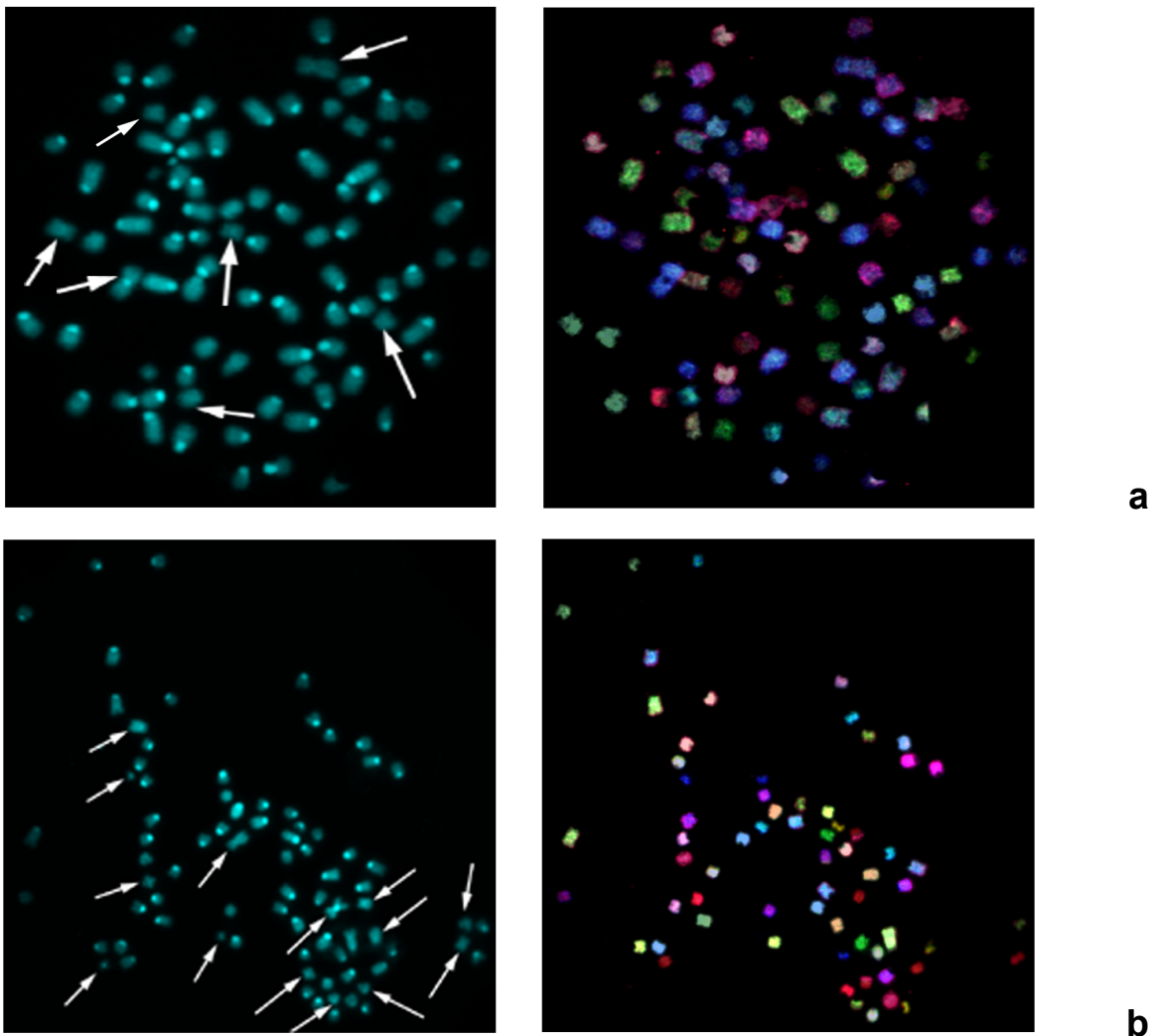


Abb.55

Abbildung 56 präsentiert die Hybridisierung mit dem Maus-M-FISH- Mix und die Klassifizierung der Mausechromosomen.

56a: DAPI- Färbung; die menschlichen Chromosomen sind mit einem Pfeil markiert.

56b: Hybridisierungsmuster des Maus-M- FISH- Mixes. Menschliche Chromosomen (hervorgehoben durch einen Pfeil in a), zeigen kein Hybridisierungssignal.

56c: Klassifizierung der Mausechromosomen

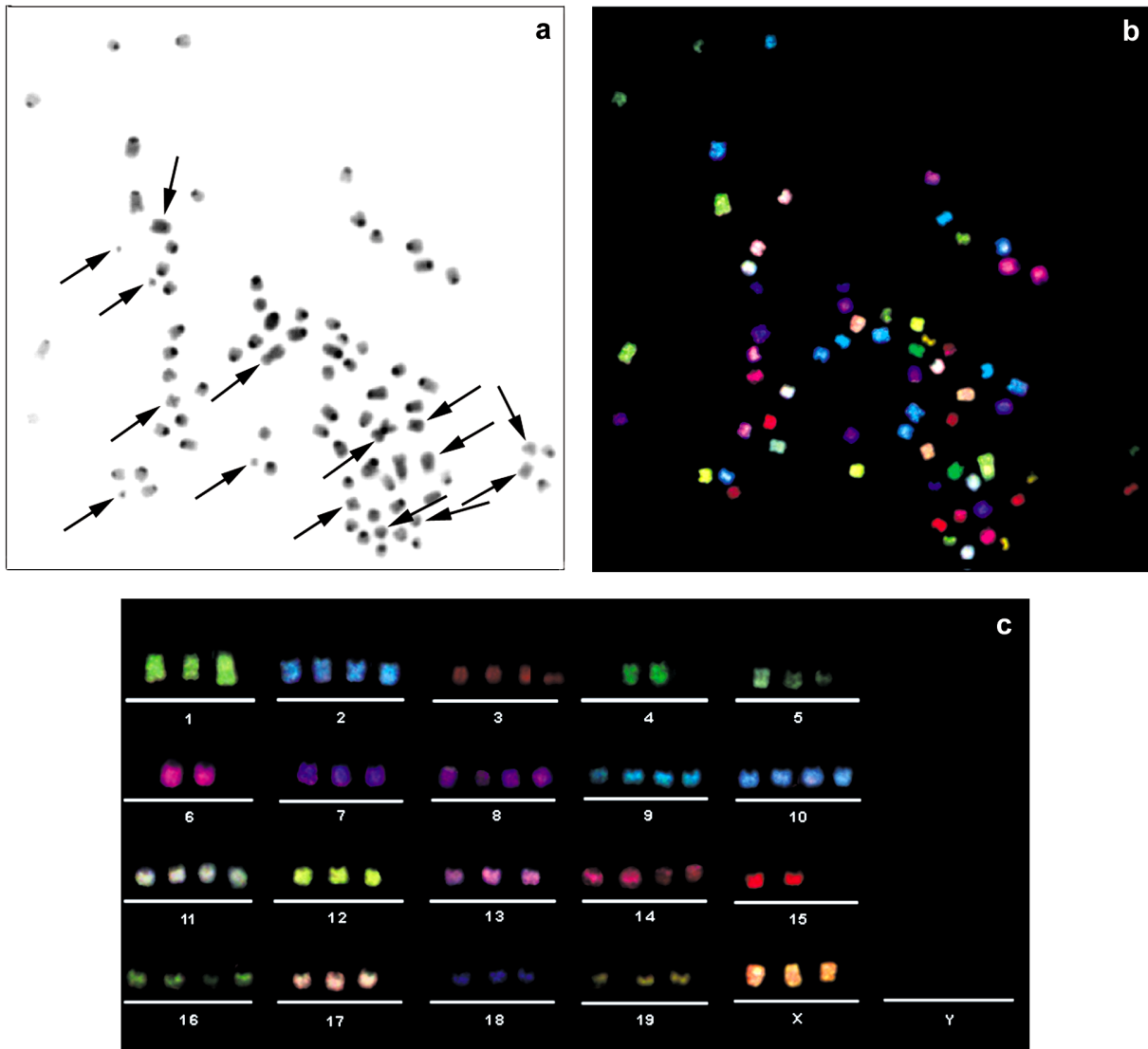


Abb.56

Nachdem die einzusetzenden Probenkonzentrationen und die geeigneten Hybridisierungsbedingungen für Maus- und Mensch- M-FISH auf Hybridzelllinien etabliert waren, konnten die beiden Mixe in Kombination ausgetestet werden. Um eine einfache Unterscheidung der Mensch- und Maus- Chromosomen bzw. Chromosomenfragmente zu

ermöglichen, wurde zusätzlich noch menschliche gesamt-genomische DNA eingesetzt, die mit einem sechsten, nicht in den M- FISH-Mixen enthaltenen Fluorochrom (DEAC) markiert wurde.

Abbildung 57 zeigt die Hybridisierung mit dem kombinierten Mensch-Maus-M- FISH- Mix.

57a: DAPI- Färbung

57b: Hybridisierung des kombinierten Mensch- Maus- Probenmixes als „true-color“- Überlagerungsbild

57c: Anfärbung der Mausechromosomen

57d: Anfärbung der menschlichen Chromosomen

57e: Klassifizierung der Mausechromosomen

57f: Klassifizierung der menschlichen Chromosomen

Nach Etablierung des kombinierten Mensch- Maus- M-FISH- Mixes, der eine schnelle, simultane Analyse aller menschlichen und aller Mausechromosomen in Hybridzelllinien ermöglicht, wurden mit dieser Technik 8 verschiedene Hybridzelllinien charakterisiert, die ebenfalls für die Conversion- Technologie hergestellt worden waren. Bei allen Zelllinien ließ sich diese neue Technik erfolgreich anwenden.

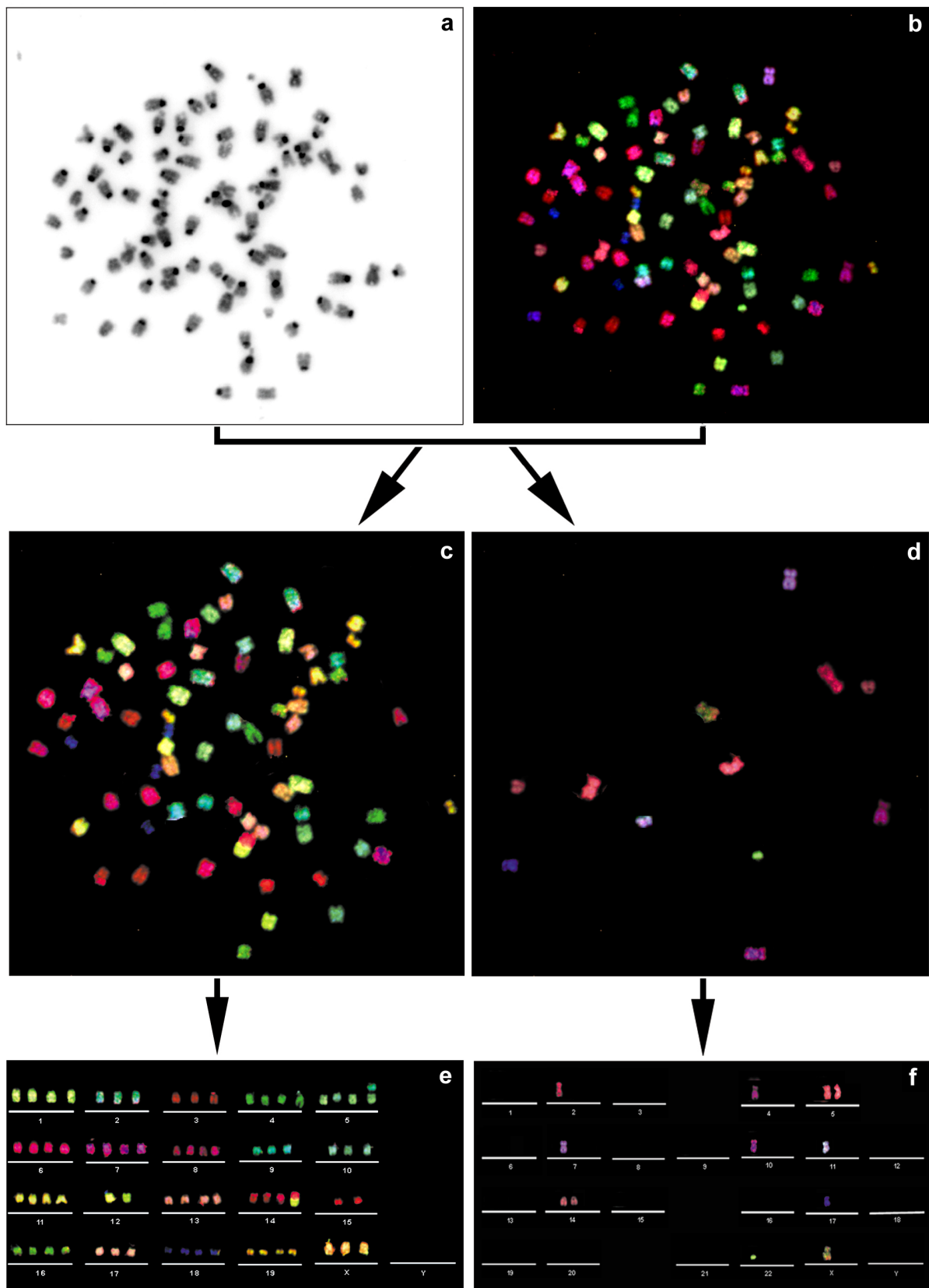


Abb. 57

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung von Markerchromosomen

Markerchromosomen werden pränatal in ca. 1 von 2000 Schwangerschaften diagnostiziert (Blennow et al., 1994), ihre Inzidenz bei Neugeborenen liegt bei 0,3/1000 (Buckton et al., 1985).

Die pränatale Diagnose eines Markerchromosoms stellt eine schwierige genetische Beratungssituation dar, insbesondere, wenn es de novo auftritt. Dies liegt daran, dass die phänotypischen Auswirkungen extrem variabel sein können. Markerchromosomen können mit Entwicklungsverzögerung, mentaler Retardierung und körperlichen Fehlbildungen assoziiert sein, können andererseits aber auch in klinisch völlig unauffälligen Individuen gefunden werden.

Das Risiko eines auffälligen Phänotyps liegt bei de novo Fällen allgemein bei 12,8% (Warbuton et al., 1991).

Der Phänotyp korreliert in der Regel mit der Größe des Markers und seinem Gehalt an Euchromatin (Buckton et al., 1985; Cheung et al., 1990). Setzt sich der Marker lediglich aus Centromermaterial und/oder rDNA zusammen, besteht laut Literaturangaben (Hastings et al., 1999) ein extrem geringes Risiko pathologischer Auswirkungen. Genaue Zahlenangaben hierzu existieren aber nicht. Weiterhin ist kein Mechanismus bekannt, der dazu führen könnte, dass ein Markerchromosom, das ausschließlich aus Heterochromatin besteht, Auswirkungen auf den Phänotyp hat.

Eine möglichst genaue Charakterisierung von Markerchromosomen stellt die Grundlage für eine genetische Beratung dar. Hierfür sind in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Methoden entwickelt worden.

Mit der konventionellen Bänderungstechnik lässt sich die Herkunft und Zusammensetzung eines Markers nicht aufklären. Hier kommen FISH- Techniken zum Einsatz.

Bei der Hybridisierung einer limitierten Anzahl Regionen- spezifischer Sonden (Blennow et al., 1993; Callen et al., 1992; Crolla et al., 1998; Plattner et al., 1993; Verschraegen- Spae et al., 1993) besteht der Nachteil darin, dass schon bestimmte Vorkenntnisse für eine geeignete Auswahl der Sonden vorliegen müssen, da ansonsten zahlreiche zeitaufwendige Einzelhybridisierungen notwendig sind.

Mit dem sogenannten „reverse painting“, worunter man die Mikrodissektion des zu identifizierenden Chromosoms, die nachfolgende Amplifikation und Hybridisierung des Amplifikationsproduktes auf normale Metaphasen versteht, kann in zwei Hybridisierungen sowohl der Gehalt an Euchromatin als auch die Herkunft des Centromers bei einem Marker

bestimmt werden (Müller-Navia et al., 1996). Diese Methode verlangt aber ausreichende Erfahrung und wird nur in sehr wenigen Labors durchgeführt.

Eine geeignete Technik für die Charakterisierung eines Markerchromosoms stellen die Vielfarbenansätze wie M-FISH (Speicher et al., 1996) und SKY (Schröck et al., 1996) dar. Mit ihrer Hilfe sind bereits zahlreiche Markerchromosomen identifiziert worden (Haddad et al., 1998; Uhrig et al., 1999). Bei diesen Vielfarbenansätzen wird Cot1-DNA zugegeben, um repetitive DNA-Sequenzen zu supprimieren. Markerchromosomen bestehen aber häufig zum Teil oder auch gänzlich aus Heterochromatin. Somit zeigen sie dann bei einer Hybridisierung mit M-FISH bzw. SKY kein Fluoreszenzsignal. In diesem Fall kann man davon ausgehen, dass der Marker kein euchromatisches Material enthält. Es ist aber problematischer, eine Diagnose aufgrund eines nicht vorhandenen Signals zu stellen als aufgrund einer bestimmten Anfärbung. Es besteht nämlich die Gefahr, dass es wegen schlechter Metaphasenqualität und/oder schlechter Hybridisierungsqualität trotz vorhandenen Euchromatins zu einem fehlenden Fluoreszenzsignal kommen kann.

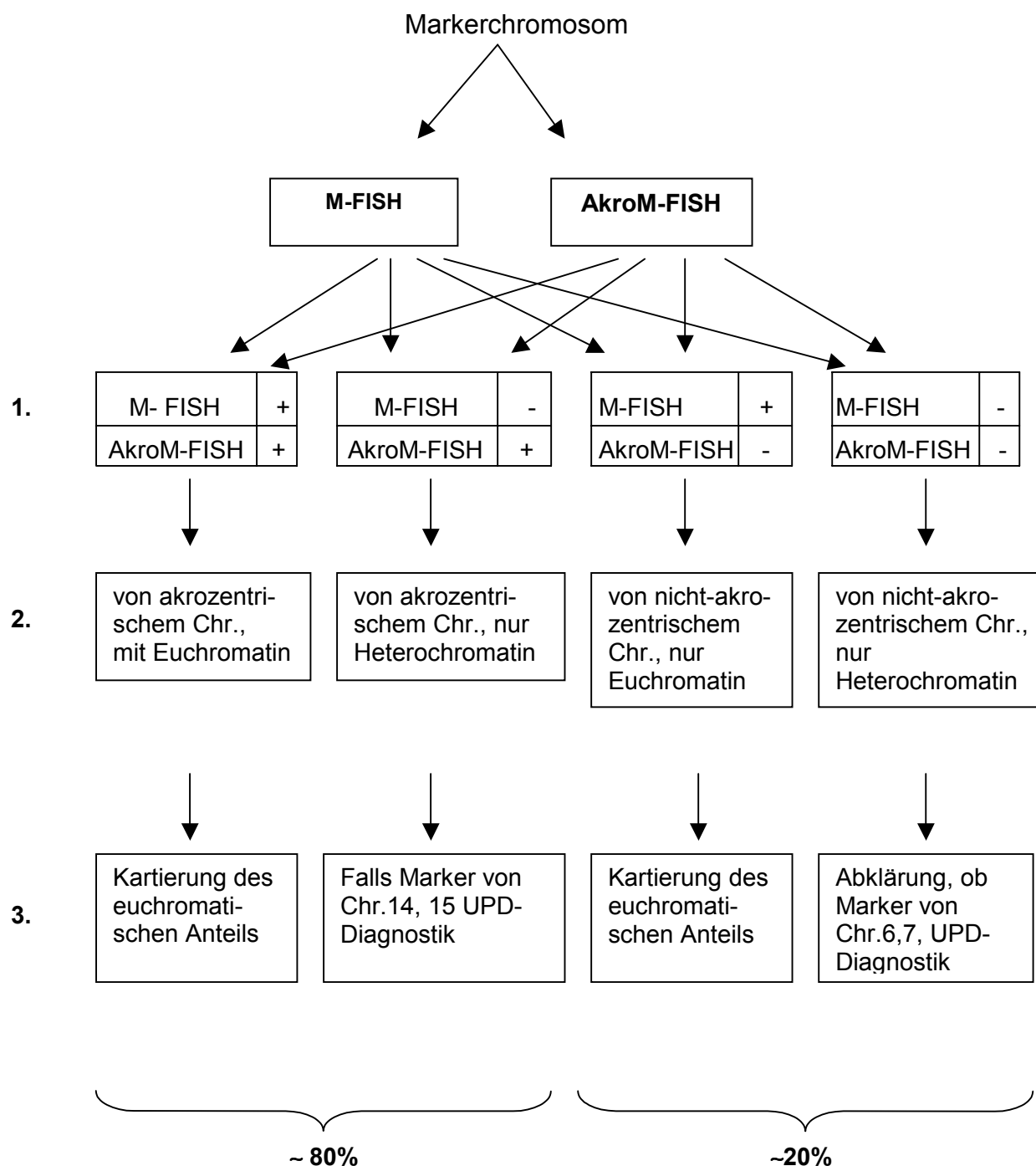
In den letzten Jahren wurden Vielfarbenansätze mit Centromerproben entwickelt (Henegariu et al., 2001; Nietzel et al., 2001). Der Vorteil dieses Ansatzes gegenüber M-FISH bzw. SKY besteht darin, dass hier eine Aussage über die Herkunft des Markerchromosoms gemacht werden kann, auch wenn es kein Euchromatin enthält. Gerade in diesem Punkt liegt aber auch ein Nachteil: der Gehalt an Euchromatin, der für die phänotypische Ausprägung entscheidend ist, kann nicht bestimmt werden. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die Herstellung und Ausbalancierung dieses SONDENSATZES einen extremen Arbeitsaufwand erfordert, der für eine Anwendung im pränataldiagnostischen Bereich in keinem Verhältnis zu seinem Nutzen steht. Die Herkunft eines Markerchromosoms, das kein Euchromatin enthält, ist für die Beratungssituation, abgesehen von wenigen Ausnahmen, auf die im folgenden noch eingegangen wird, unwesentlich.

Ideal wäre es demnach, Centromerproben und Chromosomen-spezifische Paintingproben in Kombination einzusetzen.

Da sich 80% der Markerchromosomen von akrozentrischen Chromosomen ableiten (Crolla et al., 1998), wurde der sogenannte AkroM-FISH-Mix generiert (Langer et al., 2001), bei dem heterochromatische und euchromatische DNA-Proben kombiniert sind (siehe Abb. 1; Seite 11). Mit diesem Mix können alle Bestandteile eines Markers, der sich von einem akrozentrischen Chromosom ableitet, mit einer einzigen Hybridisierung bestimmt werden.

Die restlichen 20% der Markerchromosomen, die mit AkroM-FISH nicht erfasst werden, können in einer zweiten Hybridisierung mit M-FISH auf ihren Gehalt an Euchromatin hin überprüft werden. Im Bereich der Pränataldiagnostik werden immer beide Hybridisierungen parallel durchgeführt, um ein möglichst schnelles Ergebnis vorliegen zu haben.

Die Strategie, mit der mit größtmöglicher Sicherheit Markerfälle aufgeklärt werden, wird mit unten stehender Abbildung zusammengefasst:



Die Zeile 1 zeigt die vier möglichen Untersuchungsergebnisse der kombinierten M-FISH- und AkroM-FISH- Analysen. Das „+“ zeigt, dass mit dem jeweiligen FISH- Ansatz ein Signal auf dem Marker gesehen wurde, das „-“ entsprechend, dass keine Anfärbung zu sehen war.

In Zeile 2 sind die daraus folgenden Interpretationen aufgeführt, die in der Regel bereits sehr detaillierte Aussagen über den Marker zulassen. Häufig ist es sinnvoll, bestimmte Untersuchungen (Zeile 3) nachfolgen zu lassen, z.B. sollte ein Euchromatin- Anteil

feinkartiert werden, um die möglichen Auswirkungen auf den Phänotyp beurteilen zu können (vgl. Chr. 15: auf diese Situation wir im Rahmen unten aufgeführter Fälle näher eingegangen).

Falls der Marker nur aus Centromermaterial besteht, sollte seine Herkunft für bestimmte Chromosomen (6,7,14 und 15) abgeklärt werden, da die Entstehung mit einer uniparentalen Disomie assoziiert sein könnte. Unter uniparentaler Disomie (UPD) versteht man die Weitergabe eines Chromosomenpaares von nur einem Elternteil. Klinische Konsequenzen können sich durch eine Homozygotie autosomal rezessiver Erbanlagen oder durch die Veränderung der Expression von Genen, die der genomischen Prägung unterliegen, ergeben.

Im Rahmen der bei uns durchgeführten Diagnostik sind bereits alle in obigem Schema aufgeführten Situationen aufgetreten:

Die im Ergebnisteil beschriebenen Fälle Nr.8 (**Abb.8**) und Nr. 9 (**Abb.9**) zeigen Marker, die sich von Chromosom 15 ableiten.

Der in **Abb. 8** dargestellte Marker setzte sich aus rDNA, Centromermaterial von Chromosom 15 und Euchromatin von Chromosom 15 zusammen (**8b**). In diesem Fall ist es, wie bereits oben erwähnt, angeraten, mit einer Sonde für die Prader Willi/Angelman Region (15q13) den Gehalt an Euchromatin zu überprüfen. Falls diese Region trisom bzw. tetrasom vorliegt, hat dies Auswirkungen auf den Phänotyp. Es kommt u.a. zu mentaler Retardierung und körperlichen Fehlbildungen.

Das Markerchromosom, das in **Abb.9** (Seite 75) vorgestellt wird, stammte, wie sowohl M-FISH (**9a**) als auch AkroM-FISH (**9c**) zeigen, ebenfalls von Chromosom 15. Die für Chromosom 15 spezifische Centromersonde und auch die rDNA- Sonde ergaben auf dem Marker jedoch kein Signal (**9d**). Auch die Pancentromersonde, die alle Centromere simultan anfärbt, zeigte kein Fluoreszenzsignal (**9e**). Es handelt sich hier um ein „analphoides“ Markerchromosom, das ein sogenanntes „Neocentromer“ besitzt. Analphoide Marker entstehen durch eine de novo invertierte Duplikation distaler Segmente von Chromosomen (Choo et al., 1997; Depinet et al., 1997; Levy et al., 2000). Dieser Entstehungsmechanismus wird durch die Hybridisierungssignale der Subtelomersonde unterstützt: der Marker enthält an seinen beiden Enden Telomermaterial (**9f**).

Bei den Fällen 10 und 12 handelt es sich um Pränatalfälle. AkroM-FISH und M-FISH wurden parallel durchgeführt und der Vorteil dieses Vorgehens wird jeweils deutlich.

Bei Fall 10, dargestellt in **Abb.10** (Seite 77), ergibt die Hybridisierung mit M-FISH (**10b**) keine Anfärbung auf dem Markerchromosom. Somit könnte hier die Diagnose nur aufgrund eines nicht vorhandenen Signals gestellt werden. Die Hybridisierung mit dem Akromix (**10d**)

hingegen zeigt, dass der Marker das Centromer von Chromosom 13 oder 21 besitzt und an seinen beiden Enden rDNA- Material enthält (**10e, f**). Zwischen den Centromeren für Chromosom 13 und Chromosom 21 kann nicht unterschieden werden, da diese evolutionär hoch konservierte Regionen darstellen.

AkroM- FISH komplementiert also das Ergebnis der M-FISH- Hybridisierung insofern, dass man davon ausgehen kann, dass der Marker kein Euchromatin enthält.

Falls sich ein Marker von Chromosom 14 ableitet, wäre – wie oben beschrieben- eine weiterführende Diagnostik der beiden Chromosomen 14 bezüglich einer UPD empfehlenswert. Die Annahme dabei ist, dass der Marker ein Hinweis auf eine mögliche Verdopplung des maternalen bzw. paternalen Chromosoms sein könnte. Das Vorliegen einer UPD 14 hat Auswirkungen auf den Phänotyp: bei maternaler UPD 14 zeigt sich Wachstumsverzögerung, Überstreckbarkeit der Gelenke, im allgemeinen aber normale Intelligenz und nur kleinere Dysmorphiezeichen. Im Falle einer paternalen UPD 14 kommt es zu einer Wachstumsverzögerung, Skelettanomalien, Gelenkkontrakturen und verschiedenen Fehlbildungen (Towner et al., 2001). Deshalb ist in einem solchen Fall, obwohl der Marker keine Anfärbung mit dem M-FISH- Mix zeigt und man somit davon ausgehen kann, dass der Marker nur aus Heterochromatin besteht, weitere Diagnostik angeraten.

Der in Abbildung **11** dargestellte Fall Nr.12 (Seite 78) stellt die Situation vor, dass weder M-FISH (**11b**) noch AkroM- FISH (**11c**) auf dem Markerchromosom eine Anfärbung ergeben. Somit besteht der Marker aus Heterochromatin, das aber nicht von einem akrozentrischen Chromosom stammt. Unter diesen Umständen kann man davon ausgehen, dass der Marker für den Patienten keine pathologischen Auswirkungen haben wird. Meist wird in diesem Fall als Bestätigung des Ergebnisses noch eine Pancentromersonde (Dunham et al., 1992) hybridisiert (**11e**). Zusätzlich könnte noch mit Centromer-spezifischen Sonden für Chromosom 6 und 7 überprüft werden, ob sich der Marker von Chromosom 6 bzw. 7 ableitet, da man in diesem Fall eine weiterführende Diagnostik bezüglich UPD in Erwägung ziehen könnte.

Maternale UPD 6 ist assoziiert mit intrauteriner Wachstumsverzögerung, congenitaler adrenaler Hyperplasie, paternale UPD 6 mit transientem neonatalem Diabetes und intrauteriner Wachstumsverzögerung mit oder ohne Makroglossie.

Uniparentale Disomie 7 kann Ursache für das Silver- Russel- Syndrom sein. Phänotypisch zeigt sich dies in postnatalem Wachstumsdefizit, asymmetrischem Körperbau, kraniofacialer Dysmorphie mit schmaler, dreieckiger Gesichtsform und Klinodactylie des 5. Fingers.

Bei Fall 2 wurden ebenfalls M-FISH und AkroM- FISH parallel durchgeführt: die beiden hier identifizierten Ringchromosomen gehörten zu den 20% der Markerchromosomen, die sich

nicht von akrozentrischen Chromosomen ableiten, sondern, wie M-FISH zeigte (**7a**), vom X-Chromosom. Zusätzliche Hybridisierungen mit der armspezifischen Paintingsonde für Chromosom X, der spezifischen Centromersonde und der Pantelomersonde (**7b- g**) führten zur genaueren Charakterisierung der beiden Marker.

Der Patient zeigte Minderwuchs und eine Entwicklungsverzögerung, Merkmale, die zum Phänotyp des Turner-Syndroms gehören. Die Pathogenese beim Turner-Syndrom besteht in einer vollständigen oder teilweisen Monosomie für den kurzen Arm des X-Chromosoms. Diese Situation besteht hier, da sich in jeder Zelle des Patienten nur ein normales X-Chromosom befindet, das entweder alleine oder in Kombination mit einem der beiden Ringchromosomen auftritt, die nur aus q-Arm-Material bestehen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für AkroM-FISH ist die Aufklärung von Strukturvarianten der p-Arme akrozentrischer Chromosomen, wie der in Abbildung **12** (Seite 79) dargestellte Fall beispielhaft demonstriert. Mit M-FISH zeigten das normale und das derivative Chromosom 22 keinen Unterschied. Das M-FISH-Ergebnis legt bereits nahe, dass es sich bei dem p-Arm-Material nur um Heterochromatin, also um eine harmlose Variante handelt. Die Diagnose basiert aber auf einem nicht vorhandenen Signal, was - wie auch bei den Markerchromosomen erwähnt - gerade bei schlechteren Hybridisierungen problematisch ist. Mit AkroM-FISH ließ sich aufklären, dass es sich bei dem zusätzlichen Material an Chromosom 22 um rDNA handelt.

Ein Anwendungs-bezogener Vorteil von AkroM-FISH besteht darin, dass dieser Mix wegen seiner geringeren Komplexität im Vergleich zu M-FISH auch bei recht schlechten Metaphasepräparaten in der Regel immer zu einem auswertbaren Hybridisierungsergebnis führt.

Die vorgestellten Patientenfälle zeigen, dass AkroM-FISH neben den bisher zur Verfügung stehenden Vielfarbenansätzen (Übersicht Fauth and Speicher, 2001) eine hilfreiche Ergänzung bei der Charakterisierung von Markerchromosomen darstellt und somit auch die genetische Beratung erleichtert.

4.2 Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut

Pränatale Diagnostik ist inzwischen ein fester Bestandteil des medizinischen Angebotes für Schwangere, insbesondere für Frauen über 35 Jahre. Die Festlegung dieser Altersgrenze hat sich daraus ergeben, dass es bei der Pränataldiagnostik hauptsächlich um die

Erkennung eines Down Syndroms geht und hier das Risiko mit zunehmendem Alter der Mutter ansteigt.

Eine invasive pränatale Diagnostik, Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese, ist seit Jahrzehnten der einzige sichere diagnostische Test, um eine Chromosomenstörung auszuschließen. Beide Methoden beinhalten ein, wenn auch relativ geringes Risiko einer Fehlgeburt. Außerdem wird eine Amniozentese relativ spät im Verlauf der Schwangerschaft vorgenommen, sodass in vielen Fällen eine Beendigung der Schwangerschaft im Falle eines aneuploiden Feten nicht vor der 18. Schwangerschaftswoche angeboten werden kann.

Insgesamt haben aber die Chorionzottenbiopsie und die Amniozentese wenig Einfluss auf die Inzidenz der Trisomie 21, die bei 1 auf 700 Lebendgeburten liegt. Ein Grund dafür besteht darin, dass die Pränataldiagnostik nur bei einer Minderheit von Schwangeren durchgeführt wird und zwar bei älteren, die ein erhöhtes Risiko für Trisomie 21 tragen. Diese machen jedoch einen relativ geringen Anteil der Gesamtgebärenden aus. Somit werden 80% der Neugeborenen mit Trisomie 21 von Frauen unter 35 Jahren geboren, denen die invasive Diagnostik wegen des Risikos einer Komplikation nicht angeboten wird (Bianchi et al., 1999). Ein weiterer Grund für den geringen Einfluss der invasiven Diagnostik auf die Inzidenz des Down- Syndroms liegt darin, dass das Durchschnittsalter bei Schwangeren in den letzten Jahren/Jahrzehnten deutlich angestiegen ist, was im Gesamten eine Risikozunahme bedeutet.

Nicht invasive Techniken, wie maternales Serumscreening und das sogenannte Nackenscreening, die im ersten bzw. zweiten Trimester durchgeführt werden, besitzen nicht die Sensitivität und Spezifität der invasiven Methoden (de Graaf et al., 1999a). Mit diesen nicht invasiven Screening- Methoden werden viele aneuploide Feten nicht frühzeitig entdeckt (Zhong et al., 2000), gleichzeitig werden aber auch wegen der hohen falsch- positiv Rate viele unnötige invasive Eingriffe vorgenommen.

Eine Isolierung der fetalen nucleären Erythroblasten (NRBCs) aus dem mütterlichen Blut könnte viele Limitierungen der invasiven und nichtinvasiven Methoden in der Pränataldiagnostik überwinden. Außerdem würde eine solche nicht invasive Technik eine Risiko-freie Pränataldiagnostik für alle Schwangeren möglich machen.

Ein weiterer Vorteil besteht gegenüber den invasiven Methoden darin, dass diese Diagnostik schon sehr früh durchführbar ist. Eine Anreicherung der fetalen NRBCs ist wohl bereits in der 6. Schwangerschaftswoche (Gänshirt et al., 1998) möglich.

Die geschätzte Zahl fetaler NRBCs, die im mütterlichen Blutkreislauf zirkulieren, beläuft sich auf ca. $1/10^6$ kernhaltige mütterliche Zellen (Bianchi et al., 1994; Reading et al., 1995; Takabayashi et al., 1995; Bianchi et al., 1997). Die geringe Anzahl fetaler Zellen im mütterlichen Blutkreislauf hängt unter anderem auch damit zusammen, dass das Immunsystem der Mutter durch T-Zellaktivierung bei den fetalen Zellen Apoptose induziert.

Dies stellt einen Schutzmechanismus gegen eine Immunisierung der Mutter gegen den Feten dar (Sekizawa et al., 2000).

Bei einer vorliegenden Aneuploidie steigt die Zahl der fetalen Zellen im mütterlichen Blut an (Bianchi et al., 1997), womit die Wahrscheinlichkeit, diese zu erfassen, zunimmt. Dies gilt auch im Falle einer intrauterinen Wachstumsverzögerung (Al- Mufti et al., 2000). Man nimmt an, dass die Plazentation oder die Immunantworten am feto- maternalen Übergang bei chromosomal anormalen Schwangerschaften sich im Vergleich zu normalen Schwangerschaften wesentlich unterscheiden (Bianchi, 1994).

Gleichzeitig kommt es aber während der Schwangerschaft zu einer gesteigerten Erythropoese. Dadurch nimmt die Zahl an Erythrozyten und Reticulozyten im maternalen venösen Blut zu, parallel aber auch die Zahl an NRBCs, d.h. viele NRBCs sind maternalen Ursprungs (Slunga- Tallberg et al., 1995; Oosterwijk et al., 1998; Troeger et al., 1999).

Wegen ihrer Seltenheit ist für eine Analyse der fetalen Zellen eine Anreicherung mononucleärer Zellen notwendig, wofür bereits zahlreiche Methoden in der Literatur beschrieben sind (Hahn et al., 1998). Außerdem ist aber eine möglichst gute Unterscheidung zwischen fetalen und maternalen Zellen wesentlich.

Als Anreicherungsmethoden werden meist Dichtegradientenzentrifugation, FACS (Bianchi et al., 1990) oder MACS (Gänshirt et al., 1992) verwendet. Alle diese Techniken führen aber zu Zellfraktionen, die sowohl fetale als auch maternale Zellen enthalten, was eine präzise Pränataldiagnostik mit FISH oder PCR behindert.

Mit FACS lässt sich bei der Zellisolierung eine relativ hohe Reinheit erreichen, da mehrere Kriterien für eine einzelne Zelle simultan analysiert werden können. Die Vorteile von MACS gegenüber FACS bestehen darin, dass es relativ billig ist und einfach und schnell durchzuführen. Der Nachteil besteht darin, dass die „magnetic beads“ sehr stark haften und auch relativ groß sind, was eine nachfolgende FISH behindern kann (Simpson et al., 1995). Außerdem beruht die Selektion nur auf einem einzigen Kriterium, was zu einer hohen Kontamination mit mütterlichen Zellen führt.

Eine einfache Dichtegradientenzentrifugation, die auch in vorliegender Arbeit zur Anreicherung der gewünschten Zellen verwendet wurde, weist oben genannte Nachteile nicht auf, es kommt aber auch hier, genauso wie bei FACS und MACS, zu relativ hohen Zellverlusten (Huber et al., 2000).

Als Testsystem wurde Nabelschnurblut verwendet, da es ca. 10% NRBCs enthält (Gänshirt et al., 1998).

Häufig wird zur Identifizierung der fetalen Zellen eine Immunfärbung für HbF (fetales Hämoglobin) (Zheng et al., 1995) durchgeführt. Hier ist aber bereits nachgewiesen, dass ein relativ großer Prozentsatz der HbF- positiven Zellen im Blut der Schwangeren maternal ist (Oosterwijk et al., 1998b, Slunga- Tallberg et al., 1995). Dies liegt u.a. daran, dass die

Schwangerschaft die Synthese kleiner Mengen von HbF in den adulten weiblichen Erythrozyten stimuliert (Slunga- Tallberg et al., 1995).

Es sind keine Oberflächenantigene bekannt, die ausschließlich von den fetalen Zellen exprimiert werden (Hohmann et al., 2001). Auch der sehr häufig, u.a. auch in vorliegender Arbeit verwendete Antikörper gegen den Transferrinrezeptor (CD 71) bindet nur *präferentiell* an die fetalen Zellen. Das Antigen befindet sich auch auf der Oberfläche von aktivierten Lymphozyten und Reticulozyten (Loken et al., 1987).

Man kann davon ausgehen, dass in naher Zukunft eine eindeutige Unterscheidung zwischen fetalen und maternalen Zellen aufgrund einer Antikörperfärbung allein nicht möglich sein wird. Deshalb sind zusätzliche Marker und weitere Untersuchungen, um die Spezifität bei der Identifikation fetaler Erythrozyten zu sichern, notwendig. Hier eignen sich PCR- Techniken, die z.B. XY- spezifische Primerpaare verwenden (von Eggeling et al., 1997; Lo et al., 1989, 1990; Bianchi et al., 1990; Wachtel et al., 1991) oder FISH- Methoden, indem eine für Chromosom Y spezifische Sonde verwendet wird (Elias et al., 1992; Hamada et al., 1993; Oosterwijk et al., 1998). Während die Bestimmung der Herkunft bei männlichen Zellen relativ einfach ist, bleibt sie bei weiblichen Feten problematisch. Weiter unten wird die weitere Analyse des Einzelzell-PCR- Protokolls als Lösungsansatz bei weiblichen Zellen diskutiert.

Was die Diagnostik anbelangt, kann mit FISH eine Untersuchung auf die am häufigsten vorkommenden Trisomien durchgeführt werden, wofür kommerzielle Kits verwendet werden (Rodriguez de Alba et al., 1999; Zhen et al., 1998). Hier beeinflusst aber auch gerade die Detektion von fetalem Hämoglobin vor FISH die Hybridisierungseffizienz und somit die Qualität des Ergebnisses (Zheng et al., 1993).

Für die Interphase-FISH wurde im Rahmen dieser Arbeit ein SONDENSATZ aus 6 verschiedenen Sonden zur Identifizierung der am häufigsten vorkommenden Trisomien und zur Geschlechtsbestimmung zusammengestellt (Seite 81, **Abb. 14**). Bisher ist in der Literatur in der Regel die Verwendung von zwei, meist kommerziellen Sonden oder in einzelnen Fällen des bereits oben erwähnten kommerziellen Kits (Vysis) beschrieben (Rodriguez de Alba et al., 1999; Zhen et al., 1998).

Um ein geeignetes Protokoll für die Antikörperfärbung und nachfolgende Interphase- FISH zu etablieren, wurde die Zelllinie K562 (Gribble et al., 2000, Naumann et al., 2001) verwendet, da diese Zellen den Transferrinrezeptor CD71 exprimieren, der als Marker zur Identifizierung der fetalen Zellen dienen sollte. Zu beachten ist hier, dass eine vorangegangene Antikörperfärbung die Identifizierung der FISH- Signale behindert. Eine simultane Antikörperfärbung und Interphase-FISH war bei den hier vorliegenden Konstellationen nicht durchführbar. Der Antikörper musste so weit wie möglich entfernt werden und zusätzlich musste durch eine geeignete Vorbehandlung eine gute Permeabilisierung der Zellen erreicht werden. Durch den Einsatz von Methanol/Eisessig und

einer intensiven Pepsinbehandlung ließ sich eine Abschwächung der Antikörperfärbung in dem Maße erreichen, dass die FISH- Signale zu identifizieren waren. Eine vollständige Entfernung des Antikörpers ist nicht möglich, da dafür die Affinität zwischen Antigen und Antikörper zu stark ist. Der anfangs verwendete Antikörper strahlte auch nach Pepsinbehandlung der Zellen in jeden Fluoreszenzkanal extrem intensiv ein, sodass eine Auswertung der FISH- Signale nicht möglich war (S. 104, **Abb.34a**). Der später verwendete Antikörper war besser geeignet (**Abb.34b**), da er u.a auch daraufhin ausgerichtet war, bereits denaturierte Antigene, was bei fixiertem Material entscheidend ist, zu erkennen. Außerdem war hier nicht ein so intensives Einstrahlen in die benachbarten Kanäle zu beobachten.

Es ist bereits eine Methode für eine simultane Charakterisierung morphologischer, immunophänotypischer und genetischer Merkmale von Tumorzellen (FICTION= Fluorescence Immunphenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for the Investigation of Neoplasms) beschrieben (Weber- Matthiesen et al., 1992). Eine Modifikation dieser Methode stellt M- FICTION dar (Martin- Subero et al., 2002). Zu berücksichtigen ist hier, dass, wie in vorliegender Arbeit deutlich wurde, eine an einem bestimmten Zelltyp etablierte Methode nicht ohne weiteres auf einen anderen Zelltyp übertragen werden kann. Außerdem könnte auch der verwendete Antikörper einen Unterschied ausmachen, insofern, dass sich manche Antikörper einfacher entfernen bzw. abschwächen lassen, um eine Kombination mit Interphase- FISH zu ermöglichen.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellsysteme benötigten für ein gutes Hybridisierungsergebnis extrem unterschiedliche Vorbehandlungen. Eine Ursache hierfür ist, dass völlig verschiedene Zelltypen (Tumorzellen, Lymphozyten, Zellen aus Nabelschnurblut, Zellen aus Amniozentese bzw. Chorionzottenbiopsie) verwendet wurden, die auch unterschiedlich aufbereitet werden müssen. Bei den Tumorzellen und auch den Amniozentese- bzw. Chorionzotten- Zellen handelt es sich um Zellen in Kultur, die nach den entsprechenden Waschschritten ohne weitere Vorbehandlung auf Objektträger aufgebracht werden können. Lymphozyten und die fetalen Zellen hingegen wurden aus Blut isoliert, wobei ein Ficollgradient durchgeführt werden musste, um störende Zellfraktionen, insbesondere Erythrozyten, zu entfernen. Für eine erfolgreiche Durchführbarkeit des Ficollgradienten ist die Lagerungszeit des Blutes entscheidend, die bei dem hier verwendeten Nabelschnurblut nicht immer genau zu überprüfen war. Ist das Blut schon relativ lange (über 2 Tage) gelagert oder wurde bei der Blutabnahme kein Heparin zugegeben, so kommt es zu Zellverklumpungen, die ein vollständiges Entfernen der Erythrozyten extrem erschweren bzw. unmöglich machen. Auf einem Präparat vorhandene Erythrozyten lassen sich auch durch entsprechende Vorbehandlung nicht gänzlich entfernen und führen zu erhöhtem Hintergrund, was das Hybridisierungsergebnis verschlechtert.

Außerdem ist die Lagerungszeit auch für die Anzahl der NRBCs, die man nach Ficollgradient erhält, entscheidend (Prieto et al., 2001).

Weiterhin war die Intensität der Antikörperfärbung bei den verwendeten Zelltypen sehr unterschiedlich. Die Tumorzellen (K562) wiesen eine relativ schwache Färbung auf, während die Antikörperfärbung bei den fetalen Zellen extrem stark war. Dieser Unterschied könnte durch die Anzahl der Oberflächenmoleküle bedingt sein, gegen die der Antikörper gerichtet ist. Bei den fetalen Zellen, insbesondere nach Antikörperfärbung, war, im Vergleich zu den Tumorzellen eine extrem intensive Vorbehandlung notwendig. Der hier beobachtete Unterschied bezüglich Intensität der Antikörperfärbung und erforderlicher Vorbehandlung kann ein Grund dafür sein, dass sich M-FICTION bei Tumorzellen erfolgreich anwenden lässt. Ob diese Methode auch auf andere Zellsysteme übertragbar ist, müsste erst getestet werden.

Ein weiterer Grund dafür, dass die z.B. für normale Lymphozytenpräparate verwendeten Vorbehandlungsprotokolle nicht einfach auf die Cytospins übertragen werden konnten, liegt in der unterschiedlichen Fixierungsart. Bei den normalen Lymphozytenpräparaten wird für die Fixierung Methanol/ Eisessig eingesetzt, während hier für die Cytospins Formaldehyd verwendet wurde. Formaldehyd erwies sich hier als am besten geeignet, obwohl es zu einer gesteigerten Autofluoreszenz der Zellen führt. Wurde Methanol/Eisessig zur Fixierung und somit zu Beginn der Vorbehandlung eingesetzt, war zu beobachten, dass die Fixierung der Zellen so intensiv war, dass ein extrem starker Pepsinverdau notwendig war. Deshalb ist es empfehlenswert, die Methanol/Eisessig- Behandlung für eine zusätzliche Entfernung des Cytoplasmas als letzten Schritt der Vorbehandlung und nicht bereits vor dem Pepsinverdau durchzuführen.

Um eine gute Permeabilisierung der Zellen zu erreichen, eignete sich eine Inkubation in 2× SSC und eine Behandlung mit PBS/Tween. Bei den fetalen Zellen erwies sich eine Behandlung mit KCl als günstig, da gerade die NRBCs extrem dichte Kerne mit stark kondensiertem Chromatin aufweisen (Rodriguez de Alba et al., 1999; Prieto et al., 2001), was dadurch etwas aufgelockert wird und das Hybridisierungsergebnis verbessert (Seite 91, **Abb. 22**).

Ziel des in dieser Arbeit vorgestellten Konzeptes war es u.a. auch, die Aussagen der Interphase- FISH zu bestätigen und noch zu erweitern, indem zusätzlich noch eine Einzelzell- CGH durchgeführt wird.

Für die Zellgewinnung wurden zwei verschiedene Systeme verwendet und verglichen: das Laser Capture Microdissection System (LCM) von Arcturus und das Laser Pressure Catapulting System (LPC) von PALM. Für beide Systeme sind schon zahlreiche Anwendungen in der Literatur beschrieben (Simone et al., 1998; Schütze et al., 1998; Hahn et al., 2000).

Das LCM wird meist zur Isolierung von Zellen aus dem Gewebeverband verwendet (Emmert-Buck et al., 1996, Simone et al., 1998; Suarez-Quian et al., 1999), während für das LPC auch schon z.B. die Isolierung einzelner fetaler Zellen beschrieben ist (Hahn et al., 2000).

Bei einem Vergleich der beiden Systeme im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass das PALM-System für unseren Anwendungsbereich besser geeignet ist. Bei Gebrauch des Arcturus-Systems war das Isolieren einzelner Zellen extrem schwierig. Häufig waren die Präparate zu feucht, sodass sich die Zellen überhaupt nicht ablösen ließen oder es lösten sich auch zahlreiche Zellen aus der Umgebung mit ab. Es wurden unterschiedlichste Protokolle zur Herstellung der Präparate ausgetestet, es konnten aber keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden, was noch dadurch erschwert wurde, dass sich verschiedene Zellarten auch unterschiedlich leicht bzw. schwer ablösen.

Das PALM-System hingegen eignet sich sehr gut für das Katapultieren einzelner Zellen und für die Entwicklung standardisierter Protokolle. Ein Ablösen ungewünschter Zellen aus der Umgebung war hier nicht zu beobachten. Die Zellen sollten bei Verwendung dieses Systems auf Folie aufgebracht sein, da so gewährleistet wird, dass sie wirklich *vollständig* katapultiert werden. Dies stellte anfänglich ein sehr großes Problem für die Interphase-FISH dar.

FISH bei Zellen, die auf Folie aufgebracht sind, wurde noch nie zuvor durchgeführt, weshalb nicht auf etablierte Protokolle zurückgegriffen werden konnte. Die Hybridisierung gestaltete sich anfangs extrem schwierig, da die Standardprotokolle nicht einfach übertragen werden konnten. Zum Austesten wurden zunächst Centromersonden verwendet, da diese intensivere Hybridisierungssignale liefern als Regionen-spezifische Sonden. Es traten wesentlich mehr Signale als erwartet auf (Seite 95, Abb. **25a**), d.h., die verwendeten Centromersonden zeigten auf Folie extreme Kreuzhybridisierungstendenzen, was bei Zellen auf Glasobjektträgern nicht zu beobachten war. Das Hybridisierungsmuster entsprach dem reduzierter Stringenzbedingungen, da sich unspezifische Signale normalerweise beobachten lassen, wenn man die Formamidkonzentration erniedrigt bzw. die Dextransulfatkonzentration erhöht. Da jede Folie zusätzlich zu den angegebenen Bestandteilen noch Weichmacher enthält, die z.B. bei Erhitzen rausdiffundieren können, könnte es zu einer Milieuveränderung kommen, was vielleicht die Ursache für die veränderten Stringenzbedingungen ist. Durch die Zugabe von 1 µl Cot-1DNA zur Unterdrückung der Kreuzhybridisierungstendenzen ließ sich dieses Problem schließlich beheben (**Abb. 25b**).

Weiterhin ist auffällig, dass bei Zellen, die auf Folie aufgebracht sind, ein wesentlich intensiverer Pepsinverdau und eine intensivere Behandlung für die Permeabilisierung notwendig ist, um gute Hybridisierungssignale zu erhalten, als wenn sie sich auf einem normalen Glasobjektträger befinden. Dies könnte u.a. dadurch bedingt sein, dass die Zellen beim Aufschleudern auf die Folie teilweise tiefer einsinken und so das Pepsin eine kleine Angriffsfläche hat. Außerdem ist die PEN-Folie sehr hydrophob. Sie besitzt nur durch den

Zusatz von Naphthalat geringfügige hydrophile Eigenschaften. Aus diesem Grund kommt es während des Pepsinverdaus zu einem sogenannten „Grenzflächenphänomen“ zwischen hydrophiler Pepsinlösung und hydrophober Folie. Dadurch ist die Pepsinwirkung auf die Zellen deutlich verzögert und es ist eine wesentlich längere Einwirkzeit notwendig. Wenn das Grenzflächenphänomen hingegen überwunden ist, nimmt die Folie extrem stark Flüssigkeit auf, somit auch die Pepsinlösung. Daher ist es erklärbar, dass eine wesentlich intensiver Pepsinbehandlung erforderlich ist, damit das verbleibende Pepsin noch eine ausreichende Wirkung ausüben kann.

Im Laufe der Arbeit konnten die Protokolle für eine Vorbehandlung der verwendeten Zellsysteme, sowohl auf normalem Glasobjektträger als auch auf Folie aufgebracht, so etabliert werden, dass sie zu guten, reproduzierbaren Ergebnissen führten. Dies ist auch für die Kombination von Antikörperfärbung und Interphase-FISH der Fall.

Die etablierten Protokolle wurden noch an einem weiteren Testsystem angewandt, mit dem die natürliche Situation, d.h. Blutabnahme bei einer Schwangeren, nachgestellt werden sollte. Es wurden einige K562- Zellen, die positiv für den Transferrinrezeptor sind, weiblichem Blut untergemischt. Es zeigte sich deutlich, dass nur die K562- Zellen angefärbt und die Hybridisierungssignale in den AK- positiven Zellen sehr gut sichtbar waren (Seite 107, **Abb.37**).

Das hier vorgestellte Konzept für eine nicht- invasive Pränataldiagnostik beinhaltet zusätzlich noch, wie bereits oben erwähnt, die Durchführung der Einzelzell-CGH. Mit dieser Methode kann zum einen das Ergebnis der Interphase-FISH bestätigt werden, zum anderen werden hiermit aber auch noch die diagnostischen Möglichkeiten erweitert, da das gesamte Genom auf Aneuploidien hin untersucht werden kann. Eine zusätzliche wesentliche Option besteht darin, bei weiblichen Feten über Polymorphismen die Herkunft der Zellen zu bestimmen. Sowohl mit Interphase-FISH als auch mit den CGH- Analysen kann bei Vorliegen einer Schwangerschaft mit einem weiblichen Feten nicht zwischen maternalen und fetalen Zellen unterschieden werden. Um unabhängig von dem Geschlecht des Feten eine Unterscheidung zwischen fetalen und maternalen Zellen treffen zu können, kann man hoch polymorphe Marker einsetzen (von Eggeling et al., 1997; Samura et al., 2000; Vona et al., 2002). Dies ist auch im Rahmen des hier vorgestellten Konzeptes in Zukunft vorgesehen.

Insgesamt bestehen aber auf dem Gebiet der Einzelzell- CGH bisher noch relativ wenig Erfahrungen (Klein et al., 1999; Voullaire et al., 1999; Hahn et al., 2000).

Für die Einzelzell- CGH wurde zunächst das Protokoll nach Klein et al. verwendet, das uns anfangs vor unerwartete Probleme stellte und deshalb entsprechend adaptiert werden musste. Wurde das bei Klein et al., (1999) beschriebene Protokoll verwendet, so waren bei der Hybridisierung auf den Chromosomen häufig sogenannte „Streifenmuster“ zu beobachten, die sich in den CGH- Profilen dann als „Bäuche“ zeigten (Seite 114, **Abb.43**).

Bei diesem Streifenmuster zeigte sich, dass die DAPI- intensiven, AT- reichen Banden stärker angefärbt waren als die DAPI- hellen, GC- reichen Banden. Daraus ergibt sich, dass die GC- reichen Banden bei der PCR schlechter amplifiziert wurden. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Basen Guanin und Cytosin durch drei Wasserstoffbrücken verbunden sind, während die beiden Basen Adenin und Thymin lediglich über zwei Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft sind. Aus diesem Grund werden die Stränge an GC- reichen Stellen schlechter denaturiert als an AT- reichen Stellen. Dies kann durch die Zugabe von Formamid, das die Denaturierungstemperatur herabsetzt, ausgeglichen werden (z.B. Seite 117, **Abb. 47**). Dieses Problem wurde u.a. bereits zu Beginn der 90er Jahre bei Sarkar et al. (1990) beschrieben.

Unter Zugabe von Formamid lassen sich auch mit anderen PCR- Protokollen („DONNA-PCR“, Telenius- DOP) zur Amplifikation der DNA aus einzelnen Zellen gute Ergebnisse erreichen. Eine Markierung der DNA mittels Nicktranslation führte zu vergleichbar guten Hybridisierungsergebnissen wie mit dem Protokoll nach Klein et al., vor allem waren hier die Fluoreszenzintensitäten sehr hoch.

Das Austesten verschiedenster Protokolle, was letztendlich zu dem für unsere Anwendungen geeigneten Protokoll führte, wurde intensiv auch von Rainer Gangnus durchgeführt und ist in seiner Doktorarbeit genauer nachzulesen.

Insgesamt muss man sagen, dass die Ergebnisse der Einzelzell- CGH noch recht variabel sind. Dies gilt insbesondere für die Amplifikation der DNA aus nur *einer* Zelle. Wenn 5 bis 10 Zellen katapultiert werden, sind die Ergebnisse wesentlich reproduzierbarer. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben: die Zelle könnte an den Rand und nicht genau in die Mitte des Caps katapultiert werden und dadurch bei der weiteren Behandlung, z.B. schon beim Abzentrifugieren vor dem Proteinase K- Verdau, verloren gehen. Katapultiert man mehrere Zellen, so wird ein solcher Verlust ausgeglichen. Der Proteinase K- Verdau wurde im Laufe der Versuche verlängert und zusätzlich die Temperatur erhöht, was zu besseren Ergebnissen führte.

Wichtig ist außerdem, dass man versucht, jede mögliche Kontamination zu vermeiden. Tubes, Spitzen und Reagenzien sind deshalb am besten unter UV- Licht zu legen und es ist auch günstig, alles unter einer Sterilbank zusammenzupipettieren.

Eine solche Kontamination könnte neben PCR- oder Hybridisierungsartefakten die Ursache für gelegentlich zu beobachtende unerwartete Abweichungen im CGH- Profil sein.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Einzelzell-CGH zu guten Resultaten führen *kann*. Dies wurde anhand von unterschiedlichen Zellsystemen (Lymphozyten, RCC 26- Zellen, K562- Zellen, XYY- Zellen, Trisomie 21- Zellen) gezeigt. Das CGH- Profil der vier katapultierten K562- Zellen (Seite 116, **Abb.44**) stimmt z.B. sehr gut

mit dem Profil der gesamtgenomischen CGH der K562- Zellen überein und außerdem auch mit dem in der Arbeit von Naumann et al., (2001).

In Zukunft soll nun unter Berücksichtigung oben genannter Punkte versucht werden, auch mit einer katapultierten Zelle die Ergebnisse reproduzierbar zu machen.

Was die Pränataldiagnostik an fetalen Zellen aus mütterlichem Blut betrifft, wurde in dieser Arbeit bereits gezeigt, dass eine Einzelzell- CGH mit zwei oder drei fetalen Zellen zu guten Ergebnissen führt (Seite 120, **Abb.51**). Auch eine Diagnostik von Aneuploidien ist möglich: die durchgeführte CGH mit Trisomie 21- Zellen aus einer Chorionzottenbiopsie zeigt, dass die Überrepräsentation des Chromosoms 21 im Profil sichtbar wird (Seite 121, **Abb. 52**).

Gerade für den hier vorgestellten Anwendungsbereich ist es nicht unbedingt entscheidend, das CGH- Profil von nur einer einzigen Zelle zu erstellen. Antikörper-positive Zellen können gepoolt werden und dann mit dem Einzelzell- CGH- Protokoll untersucht werden.

Für eine Kombination von Interphase-FISH und Einzelzell-CGH, durchgeführt an ein und denselben Zellen, laufen bereits die ersten Versuche. Auf die hier noch zu lösenden Probleme soll unter Punkt 5 noch kurz eingegangen werden.

4.3 Chromosomenanalyse in Mensch- Maus- Hybridzelllinien

Mit Hilfe von Haplotypanalysen können Gene identifiziert werden, die bei multigenen Krankheiten von Bedeutung sind oder es können auch genetische Faktoren bestimmt werden, die bei der Prädisposition für eine bestimmte Krankheit eine Rolle spielen.

Eine neue Methode zur Identifizierung solcher Mutationen stellt die „Conversion-Technologie“ dar (Yan et al., 2000a, b), bei der Hybridzelllinien aus Patientenzellen und einer Nagerzelllinie hergestellt werden. Die Hybride enthalten nur eine statt zwei Kopien des gewünschten Chromosoms, d.h. der diploide Chromosomensatz wird mit Hilfe dieser Technik in einen haploiden umgewandelt. Dadurch ist es einfacher, bestimmte Mutationen zu identifizieren, da das mutierte Allel nicht mehr von der normalen Sequenz des Wildtypallels überdeckt wird.

Wichtig ist es bei dieser Technik, die Stabilität der Hybridzelllinien zu überprüfen. Dafür ist eine Gesamtanalyse der Chromosomen von Mensch und Maus notwendig. Hierfür eignet sich ein kombinierter Mensch- Maus-M-FISH-Mix, ein Analyseverfahren, das im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde.

Zunächst musste die Spezifität sowohl des Mensch- als auch des Maus-M-FISH- Mixes bei der Hybridisierung auf Hybridzelllinien getestet werden. Eventuelle Kreuzhybridisierungen, bedingt durch die Syntenie zwischen den beiden Genomen, würden eine eindeutige Klassifizierung unmöglich machen.

Eine Hybridisierung des humanen M-FISH-Mixes auf die Hybridzelllinien färbt spezifisch nur die menschlichen Chromosomen an (Seite 124, **Abb. 54**), allerdings zeigen aber zusätzlich alle Centromere der Mausechromosomen eine Anfärbung, insbesondere im Cy3- Kanal. Durch die Zugabe von Maus-Cot1- DNA wird eine Anfärbung der Centromere der Mausechromosomen verhindert, da so die repetitiven Sequenzen supprimiert werden. Hybridisiert man hingegen den Maus- M- FISH- Mix, werden ohne Zugabe von menschlicher Cot1- DNA die menschlichen Chromosomen unspezifisch angefärbt (Seite 125, **Abb. 55a**). Die Zugabe von menschlicher Cot1- DNA ist also hier für spezifische Signale wesentlich. Mensch- und Mausechromosomen weisen hohe Sequenzhomologien auf. Der Unterschied, dass bei Hybridisierung des menschlichen Mixes Maus- Cot nicht zwingend hinzugegeben werden muss, bei Hybridisierung des Maus-Mixes aber menschliche Cot, könnte damit zusammenhängen, dass die beiden Cot1- DNA- Fraktionen unterschiedliche repetitive Sequenzen supprimieren. Die Maus-Cot1-DNA würde dann eine bestimmte Fraktion repetitiver Sequenzen, die beim Menschen vorkommen, nicht abdecken.

Die Spezifität der Signale und der Klassifizierungsergebnisse wurde durch einen Vergleich mit dem DAPI- Bänderungsmuster verifiziert.

Nach Etablierung der geeigneten Hybridisierungs- und Stringenzbedingungen konnten Maus- und Mensch-M-FISH- Mix in Kombination auf die Hybridzelllinien hybridisiert werden (Seite 128, **Abb.57**). Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, wird eine Unterscheidung der Mensch- und Mausechromosomen, die teilweise die gleichen Fluorochromkombinationen aufweisen, durch die Zugabe menschlicher gesamtgenomischer DNA, markiert mit einem sechsten Fluorochrom, erreicht. Insgesamt wurden 45 verschiedene Sonden hybridisiert: 24 für die menschlichen und 21 für die Mausechromosomen. Da aber 45 Farben mit dem menschlichen Auge nicht einfach unterschieden werden können, wurde eine Darstellung der Mensch- und Mausechromosomen in getrennten Karyogrammen gewählt.

Mit dem kombinierten Mensch- Maus-M-FISH-Mix können sowohl numerische als auch strukturelle Aberrationen aufgeklärt werden. Dies wäre mit einer G-Bänderungsanalyse extrem schwierig bzw unmöglich. Insbesondere die Mausechromosomen lassen sich mittels G-Bänderung schlecht analysieren.

Der Vorteil der hier vorgestellten neuen Technik der simultanen Analyse von Maus- und menschlichen Chromosomen besteht darin, dass zum einen sowohl Qualität als auch Stabilität der Hybridzellen bestimmt werden können, zum anderen aber auch die Stabilität überprüft werden kann, mit der die menschlichen Chromosomen in die Tochterzellen weitergegeben werden.

Für diese Anwendung steht zur Zeit keine andere Methode zur Verfügung. Molekulargenetische Methoden z.B. sind extrem zeitaufwendig und außerdem kann nicht der gesamte menschliche Chromosomensatz analysiert werden. Interphasezytogenetik wäre

eine weitere Möglichkeit der Analyse. Mit dem Einsatz regionenspezifischer Sonden kann hier zwar die Kopienzahl bestimmter Chromosomen bestimmt werden, allerdings lässt sich nur eine genaue Aussage über den Bereich machen, der durch die eingesetzte Sonde abgedeckt wird.

Im Zuge der wachsenden Bedeutung von Haplotypanalysen leistet gerade diese Technik einen wichtigen Beitrag für genetische Untersuchungen. Die automatische Analyse aller in Hybridzelllinien enthaltenen Chromosomen stellt eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der Conversion-Technologie dar.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden drei verschiedene Themenkomplexe bearbeitet: Charakterisierung von Markerchromosomen, Analyse fetaler Zellen aus mütterlichem Blut und Chromosomenanalyse in Mensch- Maus- Hybridzelllinien.

Für eine schnelle und eindeutige Identifizierung von 80% aller Markerchromosomen wurde ein neuer Probenmix generiert, mit dem es möglich ist, eu- und heterochromatische Anteile simultan anzufärben. Mit einer parallel durchgeführten M-FISH- Hybridisierung lassen sich die restlichen 20% der Markerchromosomen bzgl. ihres Gehalts an Euchromatin untersuchen. Nach Etablierung von AkroM-FISH wurden im Rahmen vorliegender Arbeit 20 Markerchromosomen analysiert.

Eine weiterführende Diagnostik bei Vorhandensein eines Markerchromosoms könnte in einer molekulargenetischen Untersuchung bezüglich UPD bestehen, da Hinweise existieren, dass im Falle eines Markerchromosoms die Inzidenz der UPD erhöht ist. Insgesamt sind in der Literatur aber nur sehr wenige Fälle diesbezüglich beschrieben (Kotzot, 2002, in press). Die meisten Fälle sind in Zusammenhang mit Chromosom 14 bekannt. Da eine vorliegende UPD 14 phänotypische Auswirkungen hat und mit AkroM- FISH leicht feststellbar ist, ob sich der Marker von Chromosom 14 ableitet, wäre hier eine molekulargenetische Diagnostik sinnvoll.

Das zweite Thema dieser Doktorarbeit war ein neues Konzept für eine nicht- invasive pränatale Chromosomendiagnostik aus fetalen Zellen im mütterlichen Blut. Hier sollte eine Kombination von Zellanreicherung, Identifizierung fetaler Zellen mittels Antikörper, Interphase- FISH und Einzelzell- CGH ausgetestet werden.

Zunächst mussten geeignete Protokolle für Interphase- FISH auf Cytospins verschiedenster Zellsysteme, aufgebracht auf normalem Objektträger oder auch auf Folie, was eine noch nicht beschriebene Technik darstellt, etabliert werden. Weiterhin musste ein Protokoll entwickelt werden, das eine Kombination von Antikörperfärbung zur Identifizierung der fetalen Zellen und eine Diagnostik von Trisomien mittels Interphase-FISH ermöglicht. Hier stellte das Einstrahlen des FITC- gekoppelten Antikörpers in die benachbarten Kanäle für die Auswertung der FISH- Signale zunächst ein großes Problem dar, das aber durch eine geeignete Vorbehandlung der Zellen behoben werden konnte. Eine andere Möglichkeit wäre hier vielleicht, nicht einen FITC- gekoppelten, sondern einen AMCA- gekoppelten Antikörper zu verwenden, da dieser u.U. weniger stark in benachbarte Kanäle einstrahlt.

Für das Katapultieren einzelner Zellen für die Einzelzell-CGH wurden zwei verschiedene Systeme verglichen: das LCM von Arcturus und das LPC von PALM. Hier stellte sich im

Laufe der Versuche heraus, dass das LPC- System für unseren Anwendungsbereich besser geeignet war.

Weiterhin wurde die Technik der Einzelzell-CGH mit verschiedenen Zellsystemen ausgetestet. Hier musste das Protokoll nach Klein et al., (1999) für unsere Anwendungen entsprechend adaptiert werden. Für ca. drei und mehr Zellen erhält man reproduzierbare Ergebnisse, auch die Amplifikation von DNA aus einer einzelnen Zelle ist möglich, funktionierte jedoch für nachfolgende CGH- Experimente bisher noch recht variabel. Hier soll in Zukunft durch Arbeiten unter vollständig sterilen Bedingungen noch mehr auf Vermeidung einer Kontamination geachtet werden.

Was eine Kombination von Interphase-FISH und Einzelzell- CGH anbelangt, so laufen, nachdem sich die beiden Techniken inzwischen einzeln erfolgreich durchführen lassen, die ersten Versuche. Wichtig ist hier, systematisch auszutesten, ob oder inwieweit die Art der Fixierung, die Antikörperfärbung und die zuvor durchgeführte Interphase-FISH die Einzelzell-CGH beeinflussen. Weiterhin muss noch untersucht werden, ob auch nach Interphase-FISH, d.h. nachdem die DNA bereits denaturiert ist, der Mse I- Verdau durchgeführt werden kann, da beim Mse I- Verdau normalerweise die DNA doppelsträngig vorliegt. Ausgetestet ist bereits, dass ein vor der Interphase-FISH durchgeführter MseI- Verdau das Hybridisierungsergebnis nicht beeinflusst, was ansonsten eine Alternative darstellen würde. In einem weiteren Schritt sollen in Zukunft noch parallel zur Einzelzell- CGH DNA-Polymorphismen von der Mutter und vom Feten verglichen werden (Samura et al., 2000), um sicherzustellen, dass die Zellen nicht mütterlicher, sondern fetaler Herkunft sind. Dies ist insbesondere bei weiblichen Feten entscheidend, da hier eine Unterscheidung der Zellen anhand der FISH- Signale und auch der CGH- Analysen nicht möglich ist und keine 100 %-spezifischen Antikörper für fetale Zellen zur Verfügung stehen.

Im dritten Teil der Doktorarbeit wurde ein Sondensatz entwickelt, der eine automatische Analyse aller Chromosomen in Hybridzelllinien zulässt. Es handelt sich hier um ein 45-Farben- Experiment (24 Farben für die menschlichen und 21 Farben für die Mauschromosomen), mit dem die Qualität und die Stabilität dieser Zelllinien überprüft werden kann. Durch diese neu etablierte Methode wird ein effizienter Gebrauch solcher Hybridzellsysteme, die auch im Rahmen der Conversion- Technik verwendet werden, ermöglicht.

6. Literaturverzeichnis

Al-Mufti R., Lees C., Albaiges G., Hambley H., Nicolaides K.H. (2000) Fetal cells in maternal blood of pregnancies with severe fetal growth restriction. *Hum Reprod* 15: 218- 221

Azofeifa J., Fauth C., Kraus J., Maierhofer C., Langer S., Bolzer A., Reichman J., Schuffenhauer S., Speicher M.R. (2000) An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by 24- color FISH. *Am J Hum Genet* 66: 1684- 1688

Blennow E., Anneren G., Bui T.H., Berggren E., Asadi E., Nordenskjold M. (1993) Characterization of supernumerary ring marker chromosomes by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 53: 433- 442

Blennow E., Bui T.H., Kristoffersson U., Vujic M., Anneren G., Holmberg E., Nordenskjold M. (1994a) Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39105 consecutive prenatal diagnoses: Prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn* 14: 1019- 1028

Blennow E., Telenius H., de Vos D., Larsson C., Henriksson P., Johansson O., Carter N.P., Nordenskjold M. (1994b) Tetrasomy 15q: two marker chromosomes with no detectable alpha-satellite DNA. *Am J Hum Genet* 54:877-883

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

Bianchi D.W., Flint A.F., Pizzimenti M.F., Knoll J.H., Latt S.A. (1990) Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3279- 3283

Bianchi D.W., Shuber A.P., DeMaria M.A., Fougner A.C., Klinger K.W. (1994) Fetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 171: 922- 926

Bianchi D.W. (1994) Clinical trials and experience: Boston. *Annals N.Y.Ac. Sciences* 731: 92- 102

Bianchi D.W. (1995) Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J Pediatr* 127: 847- 856

Bianchi D.W., Williams J.M., Sullivan L.M., Hanson F.W., Klinger K.W., Shuber A.P. (1997) PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 61: 822- 829

Bianchi D.W. (1999) Review. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *British Journal of Haematology* 105: 574- 583

Brondum- Nielsen K., Mikkelsen M. (1995) A 10- year survey, 1980- 1990, of prenatally diagnosed small supernumerary marker chromosomes, identified by fish analysis. Outcome and follow- up of 14 cases diagnosed in a series of 12699 prenatal samples. *Prenat Diagn* 15: 615- 619

Buckton K.E., Spowart G., Newton M.S., Evans H.J. (1985) Fourty four probands with an „additional“ marker chromosome. *Hum Genet* 69: 353- 370

Callen D.F., Eyre H.J., Yip M.Y., Freemantle J., Haan E.A. (1992) Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes. *Am J Med Genet* 43: 709- 715

Cheung M.C., Goldberg J.D., Kann Y.W. (1996) Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nature Genet* 14: 264- 268

Choo K.H.A. (1997) Chromatin dynamics'97: centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet* 61: 1225- 1233

Crolla J.A., Long F.L., Rivera H., Dennis N.R. (1998) FISH and molecular study of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15 and 22. *Am J Med Genet* 75: 355- 366

Crolla J.A. (1998) FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature. *Am J Med Genet* 75: 367- 381

de Graaf I.M., Pajkrt E., Bilardo C.M., Leschot N.J., Cuckle H.S., van Lith J.M.M. (1999a) Early pregnancy screening for fetal aneuploidy with serum markers and nuchal translucency. *Prenat Diagn* 19: 458- 462

de Graaf I.M., Jakobs M.E., Leschot N.J., Ravkin I., Goldbard S., Hoovers J. (1999b) Enrichment, identification and analysis of fetal cells from maternal blood: Evaluation of a prenatal diagnosis system. *Prenat Diagn* 19: 648- 652

Depinet T.W., Zackowski J.L., Earnshaw W.C., Kaffe S., Sekhon G.S., Stallard R., Sullivan B.A., Vance G.H., Van Dyke D.L., Willard H.F., Zinn A.B., Schwartz S. (1997) Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet* 6: 1195- 1204

Djalali M. (1990) The significance of accessory bisatellited marker chromosomes in amniotic fluid cell cultures. *Ann Genet* 33:141- 145

Dunham I., Lengauer C., Cremer T., Featherstone T. (1992) Rapid generation of chromosome- specific alphoid DNA probes using the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 88: 457- 462

Eggeling F. von, Michel S., Günther M., Schimmel B., Claussen U. (1997) Determination of the origin of single nucleated cells in maternal circulation by means of random PCR and a set of length polymorphism. *Hum Genet* 99: 266- 270

Eils R., Uhrig S., Saracoglu K., Sätzler K., Bolzer A., Chassery J.M., Ganser M., Speicher M.R. (1998) An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex- FISH (M- FISH). *Cytogenet Cell Genet* 82: 160- 171

Elias S., Price J., Dockter M., Wachtel S., Tharapel, Simpson J.L., Klinger K.W. (1992) First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* 340: 1033

Emmert- Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D., Chuaqui R.F., Zhuang Z., Goldstein S.R., Weiss R.A., Liotta L.A. (1996) Laser Capture Microdissection. *Science* 274: 998- 1002

Fend F., Raffeld M. (2000) Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol* 53: 666- 672

Fauth C., Speicher M.R. (2001) Classifying by colors: FISH- based genome analysis. *Cytogenet Cell Genet* 93:1-10 Review

Gänshirt- Ahlert D., Pohlschmidt M., Gal A., Miny P., Horst J., Holzgreve W. (1990) Ratio of fetal to maternal DNA is less than 1 in 5000 at different gestational ages in maternal blood. *Clin Genet* 38: 38- 43

Gänshirt- Alert D., Burschik M., Garritsen H.S.P., Helmer E., Miny P., Horst J., Schneider H.P.G., Holzgreve W. (1992) Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 166: 1350- 1355

Gänshirt- Ahlert D., Börjesson- Stoll R., Burschik M., Dohr A., Garritsen H.S.P., Helmer E., Miny P., Velasco M., Walde C., Patterson D., Teng N., Bhat N.M., Bieber M.M., Holzgreve W. (1993) Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. *Am J Reprod Immunol* 30: 194- 201

Gänshirt D., Smeets F.W.M., Dohr A., Walde C., Steen I., Lapucci C., Falcinelli C., Sant R., Velasco M., Garritsen H.S.P., Holzgreve W. (1998) Enrichment of fetal nucleated red blood cells from the maternal circulation for prenatal diagnosis: Experiences with triple density gradient and MACS based on more than 600 cases. *Fetal Diagn Ther* 13: 276- 278

Gribble S.M., Roberts I., Grace C., Andrews K.M., Green A.R., Nacheva E.P. (2000) Cytogenetics of the chronic myeloid leukemia- derived cell line K562: Karyotype clarification by multicolor fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization and locus-specific fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 118: 1-8

Goldberg J.D. (1997) Fetal cells in maternal circulation: progress in analysis of a rare event. *Am J Hum Genet* 61: 806- 809

Haddad B.R., Schröck E., Meck J., Cowan J., Young H., Ferguson- Smith M.A., du Manoir S., Ried T. (1998) Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. *Hum Genet* 103: 619- 625

Hahn S., Sant R., Holzgreve W. (1998) Fetal cells in maternal blood: current and future perspectives. *Mol Hum Rep* 6: 515- 521

Hahn S., Zhong X.Y., Troeger C., Burgemeister R., Gloning K., Holzgreve W. (2000) Current applications of single- cell PCR. *Cell Mol Life Sci* 57: 96- 105

Hamada H., Arinami T., Kubo T., Hamaguchi H., Iwasaki H. (1993) Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 91: 427- 432

Hamada H., Arinami T., Sohda S., Hamaguchi H., Kubo T. (1995) Mid- trimester fetal sex determination from maternal peripheral blood by fluorescence in situ hybridization without enrichment of fetal cells. *Prenat Diagn* 15: 78- 81

Han J.Y., Lee Y.H., Sin S.D., Park J.I., Kim I.H., Je G.H., Rodgers G.P. (2001) Enrichment and detection of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood using liquid culture. *Prenat. Diagn* 21: 22- 26

Hastings R.J., Nisbet D.L., Waters K., Spencer T., Chitty L.S. (1999) Prenatal detection of extra structurally abnormal chromosomes (ESACs): new cases and a review of the literature. *Prenat Diagn* 19: 436- 445

Henegariu O., Bray- Ward P., Artan S., Vance G.H., Qumsyieh M., Ward D.C. (2001) Small marker chromosome identification in metaphase and interphase using centromeric multiplex FISH (CM- FISH). *Lab Invest* 81:475- 482

Herzenberg L.A., Bianchi D.W., Schroder J., Cann H.M., Iverson G.M. (1979) Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence- activated cell sorting: *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1453- 1455

Hook E.B. and Cross P.K. (1987) Extra structurally abnormal chromosomes (ESAC) detected at amniocentesis: frequency in approximately 75000 prenatal cytogenetic diagnoses and associations with maternal and paternal age. *Am J Hum Genet* 40: 83- 101

Huber K., Bittner J., Worofka B., Rosen A., Hafner E., Philipp K., Bauer K. (2000) Quantitative FISH analysis and in vitro suspension cultures of erythroid cells from maternal blood for the isolation of fetal cells. *Prenat Diagn* 20: 479- 486

Jallepalli P.V., Waizenegger I.C., Bunz F., Langer S., Speicher M.R., Peters J.M., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lengauer C. (2001) Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* 105: 445- 457

Jentsch I., Adler I.D., Carter N.P., Speicher M.R. (2001) Karyotyping mouse chromosomes by multiplex-FISH (M- FISH). *Chrom Res* 9: 211- 214

Klein C.A., Schmidt- Kittler O., Schardt J.A., Pantel K., Speicher M.R., Riethmüller G. (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4494- 4499

Kotzot D. (2002) Supernumerary marker chromosomes (SMC) and uniparental disomy (UPD) – Coincidence or consequence?- Lessons from the literature. *J Med Genet*, in press

Kuo P.L. (1998) Frequencies of fetal nucleated red blood cells in maternal blood during different stages of gestation. *Fetal Diagn Ther* 13: 375- 379

Labella T., Schlessinger D. (1989) Complete human rDNA repeat units isolated in yeast artificial chromosomes. *Genomics* 5: 752- 760

Langer S., Fauth C., Rocchi M., Murken J., Speicher M.R. (2001) AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosomes. *Hum Genet* 109: 152- 158

Langer S., Jentsch I., Gangnus R., Yan H., Lengauer C., Speicher M.R. (2001) Facilitating haplotype analysis by fully automated analysis of all chromosomes in human- mouse hybrid cell lines. *Cytogenet Cell Genet* 93: 11- 15

Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386: 623- 627

Levy B., Papenhausen P.R., Tepperberg J.H., Dunn T.M., Fallet S., Magid M.S., Kardon N.B., Hirschhorn K., Warbuton P.E. (2000) Prenatal molecular cytogenetic diagnosis of partial tetrasomy 10p due to neocentromere formation in an inversion duplication analphoid marker chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 91: 165- 170

Lo Y.M., Patel P., Wainscoat J.S., Sampietro M., Gillmer M.D., Fleming K.A. (1989) Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet II*: 1363- 1365

Lo Y.M., Patel P., Sampietro M., Gillmer M.D., Fleming K.A., Wainscoat J.D. (1990) Detection of single- copy fetal DNA- sequence from maternal blood. *Lancet* 335: 1463- 1464

Lo Y.M., Morey A.L., Wainscoat J.S., Fleming K.A. (1994) Culture of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood. *Lancet* 344: 264- 265

Loken M.R., Shah V.O., Dattilio K.L., Civin C. (1987) Flow cytometric analysis of human bone marrow. I. Normal erythroid development. *Blood* 69: 255- 263

Martin- Subero J.I., Chudoba I., Harder L. (2002) Multicolor- FICTION: Expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic and genetic single cell analyses. *Am J Pathol* 161: 413- 420

Mears A.J., el- Shanti H., Murray J.C., McDermid H.E., Patil S.R. (1995) Minute supernumerary ring chromosome 22 associated with cat eye syndrome: further delineation of the critical region. *Am J Hum Genet* 57: 667- 73

Mitelman F (1995) *ISCN: an international system for human cytogenetic nomenclature.* Karger, Basel

Mohandas T., Canning N., Chu W., Passage M.B., Anderson C.E., Kaback M.M. (1985) Marker chromosomes: cytogenetic characterization and implications for prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 20: 361- 368

Müller- Navia J., Nebel A., Oehler d., Theile U., Zabel B., Schleiermacher E. (1996) Microdissection and DOP- PCR- based reverse chromosome painting as a fast and reliable strategy in the analysis of various structural chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 16:915- 922

Naumann S., Reutzel D., Speicher M., Decker H.J. (2001) Complete karyotype characterization of the K562 cell line by combined application of G- banding, multiplex- fluorescence in situ hybridization, fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization. *Leuk Res* 25: 313- 322

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

Ogilvie C.M., Harrison R.H., Horsley S.W., Hodgson S.V., Kearney L. (2001) A mitotically stable marker chromosome negative for whole chromosome libraries, centromere probes and chromosome specific telomere regions: a novel class of supernumerary marker chromosome? *Cytogenet Cell Genet* 92: 69- 73

Oosterwijk J.C., Mesker W.E., Ouwerkerk- van Velzen M.C.M., Knepfle C.F.H.M., Wiesmeijer K.C., Beverstock G.C., van Ommen G.J.B., Tanke H.J., Kanhai H.H.H. (1998) Prenatal diagnosis of trisomy 13 on fetal cells obtained from maternal blood after minor enrichment. *Prenat Diagn* 18: 1082- 1085

Oosterwijk J.C., Mesker W.E., Ouwerkerk- van Velzen M.C.M., Knepfle C.F.H.M., Wiesmeijer K.C., Beverstock G.C., van Ommen G.J.B., Kanhai H.H.H., Tanke H.J. (1998b) Fetal cell detection in maternal blood: a study in 236 samples using erythroblast morphology, DAB and HbF staining and FISH analysis. *Cytometry* 32: 178- 186

Plattner R., Heerema N.A., Yurov Y.B., Palmer C.G. (1993a) Efficient identification of marker chromosomes in 27 patients by stepwise hybridization with alpha- satellite DNA probes. *Hum Genet* 91: 131- 140

Plattner R., Heerema N.A., Howard- Peebles P.N., Miles J.H., Soukup S., Palmer C.G. (1993b) Clinical findings in patients with marker chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 91: 589- 598

Price J.O., Elias S., Wachtel S. (1991) Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1731- 1737

Prieto B., Alonso R., Paz A., Candenias M., Venta R., Ladenson J., Alvarez F. (2001) Optimization of nucleated red blood cell (NRBC) recovery from maternal blood collected using both layers of a double density gradient. *Prenat Diagn* 21: 187- 193

Rauch A., Pfeiffer R.A., Trautmann U., Liehr T., Rott H.D., Ulmer R. (1992) A study of ten small supernumerary (marker) chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Clin Genet* 42: 84- 90

Reading J.P., Huffman J.L., Wu J.C., Palmer F.T., Harton G.L., Sisson M.E., Keyvanfar K., Gresinger T.H., Cochrane W.J., Fallon L.A., Menapace- Drew G.F., Cummings E.A., Jones S.L., Black S.H., Schulman J.D., Levinson G. (1995) Nucleated erythrocytes in maternal blood: quantity and quality of fetal cells in enriched populations. *Mol Hum Rep* 10: 2510- 2515

Rodriguez de Alba M., Palomino P., Jurado A. (1999) Prenatal diagnosis on fetal cells obtained from maternal peripheral blood: report of 66 cases. *Prenat Diagn* 19: 934- 940

Sachs E.S., van Hemel J.O., den Hollander J.C., Jahoda M.G.J. (1987) Marker chromosomes in an series of 10000 prenatal diagnoses. Cytogenetic and follow- up studies. *Prenat Diagn* 7: 81- 89

Samura O., Pertl B., Sohda S., Johnson K.L., Sekizawa A., Falco V.M., Elmes R.S., Bianchi D.W. (2000) Female fetal cells in maternal blood: use of DNA polymorphisms to prove origin. *Hum Genet* 107: 28- 32

Sarkar G., Kapelner S., Sommer S.S. (1990) Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acid Research* 18: 7465

Schinzel A., Schmid W., Fraccaro M., Tiepolo L., Zuffardi O., Opitz J.M., Lindsten J., Zetterqvist P., Enell H., Baccichetti C., Tenconi R., Pagon R.A. (1981) The "cat eye syndrome": dicentric small marker chromosome probably derived from a no. 22 (tetrasomy 22pter to q11) associated with a characteristic phenotype. Report of 11 patients and delineation of the clinical picture. *Hum Genet* 57:148-158

Schmorl G. (1893) Pathologisch- anatomische Untersuchungen über Pürperal- Eklampsie. Leipzig: Verlag von F.C.W. Vogel

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

Schütze K., Lahr G. (1998) Identification of expressed genes by laser- mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol* 16: 737

Sekizawa A., Farina A., Zhen D.K., Wang J.Y., Falco V.M., Elmes S., Bianchi D.W. (1999) Improvement of fetal cell recovery from maternal blood: Suitable density gradient for FACS separation. *Fetal Diagn Ther* 14: 229- 233

Sekizawa A., Samura O., Zhen D., Falco V., Farina A., Bianchi D.W. (2000) Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn* 20: 886- 889

Serlachius M., von Koskull H., Wessman M., Schröder J. (2000) The use of transferrin for enrichment of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn* 20: 407- 410

Simone N.L., Bonner R.F., Gillespie J.W., Emmert- Buck M.R., Liotta L.A. (1998) Laser- capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *TIG* 14: 272- 276

Simpson J.L., Lewis D.E., Bischoff F., Elias S. (1995) Isolating fetal nucleated red blood cells from maternal blood: the Baylor experience- 1995. *Prenat Diagn* 15: 907- 912

Snijders A.M., Nowak N., Segraves R., Blackwood S., Brown N., Conroy J., Hamilton G., Hindle A.K., Huey B., Kimura K., Law S., Myambo K., Palmer J., Ylstra B., Yue J.P., Gray J.W., Jain A.N., Pinkel D., Albertson D.G. (2001) Assembly of microarrays for genome- wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29: 263- 264

Slunga- Tallberg A., El- Rifai W., Keinänen M., Ylinen K., Kurki T., Klingler K., Ylikorkala O., Knuutila S. (1995) Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women. *Hum Genet* 96: 53- 56

Sohda S., Arinami T., Haamada H., Nakauchi H., Hamaguchi H., Kubo T. (1997) The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenat Diagn* 17: 743- 752

Speicher M.R., Ballard S.G., Ward D.C. (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi- fluor FISH. *Nature Genet.* 12, 368- 375

Suarez- Quian C.A., Goldstein S.R., Pohida T., Smith P.D., Peterson J.I., Wellner E., Ghany M., Bonner R.F. (1999) Laser capture microdissection of single cells from complex tissues. *Biotechniques* 26: 328- 335

Takabayashi H., Kuwabara S., Ukita T., Ikawa K., Yamafuji K., Igarashi T. (1995) Development of non- invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn* 15: 74- 77

Telenius H., Pelmeur A.H., Tunnacliffe A., Carter N.P., Behmel A., Ferguson- Smith M.A., Nordenskjöld M., Pfragner R., Ponder B.A.J. (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow- sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 257- 263

Thangavelu M., Pergament E., Espinosa R., Bohlander S. (1994) Characterization of marker chromosomes by microdissection and fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn* 14: 583- 588

Toricelli F., Pescucci C. (2001) Isolation of fetal cells from the maternal circulation: Prospects for the non- invasive prenatal diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 39: 494- 500

Towner D., Yang S.P., Shaffer L.G. (2001) Prenatal ultrasound findings in a fetus with paternal uniparental disomy 14q12- qter. *Ultrasound Obstet Gynecol* 18: 268- 271

Troeger C., Zhong X.Y., Burgemeister R., Minderer S., Tercanli S., Holzgreve W., Han S. (1999) Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol Hum Reprod* 5: 1162- 1165

Uhrig S., Schuffenhauer S., Fauth C., Wirtz A., Daumer- Haas C., Apacik C., Cohen M., Müller- Navia J., Cremer T., Murken J., Speicher M.R. (1999) Multiplex- FISH (M- FISH) for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* 65: 448- 462

Verschraegen- Spae M.R., van Roy N., de Perdigo A., de Paepe A., Speleman F. (1993) *Molecular cytogenetic characterization of marker chromosomes found at prenatal diagnosis.* *Prenat Diagn* 13: 385- 394

Viersbach R., Engels H., Gamerainger U., Hansmann M. (1998) Delineation of super- numerary marker chromosomes in 38 patients. *Am J Med Genet* 76: 351- 358

Vona G., Beroud C., Benachi A., Quenette A., Bonnefont J.P., Romana S., Munnich A., Vekemans M., Dumez Y., Lacour B., Paterlini- Brechot P. (2002) Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *AJP* 160: 51- 58

Voullaire L., Wilton L., Slater H., Williamson R. (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 19: 846- 851

Wachtel S., Elias S., Price J., Wachtel G., Philips O., Shulman L., Meyers C., Simpson J.L., Dockter M. (1991) Fetal cells in the maternal circulation: isolation by multiparameter flow cytometry and confirmation by polymerase chain reaction. *Hum Reprod* 6: 1466- 1469

Wachtel S., Sammons D., Twitty G., Utermohlen J., Tolley E., Phillips O., Shulman L.P. (1998) Charge flow separation: quantification of nucleated red blood cells in maternal blood during pregnancy. *Prenat Diagn* 18: 455- 463

Wald N.J., Watt H.C., Hackshaw A.K. (1999) Integrated screening for Down`s syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med* 341: 461- 467

Wang J.Y., Zhen D.K., Falco V.M., Farina A., Zheng Y.L., Delli- Bovi L.C., Bianchi D.W. (2000) Fetal nucleated erythrocyte recovery: Fluorescence activated cell sorting- based positive selection using anti- gamma globin versus magnetic activated cell sorting using anti- CD 45 depletion and anti- gamma globin positive selection. *Cytometry* 39: 224- 230

Warbuton D. (1991) De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 49: 995- 1013

Weber- Matthiesen K., Winkemann M., Müller- Hermelink A. (1992) Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem* 40: 171- 175

Yan H., Papadopoulos N., Marra G., Perrera C., Jiricny J., Boland R., Lynch H.T., Chadwick R.B., de la Chapelle A., Berg K., Eshleman J.R., Yuan W., Markowitz S., Laken S.J., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. (2000b) Conversion of diploidy to haploidy. *Nature* 403: 723- 724

Zhen D.K., Wang J.Y., Falco V.M., Weber W., Delli-Bovi L., Bianchi D.W. (1998) Poly-FISH: a technique of repeated hybridizations that improves cytogenetic analysis on fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn* 18: 1181- 1185

Zheng Y.L., Cater N.P., Price C.M., Colman S.M., Milton P.J., Hackett G.A., Greaves M.F., Ferguson-Smith M.A. (1993) Prenatal diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. *J Med Genet* 30: 1051- 1056

Zheng Y.L., Craigo S.D., Price C.M., Bianchi D.W. (1995) Demonstration of spontaneously dividing male fetal cells in maternal blood by negative magnetic cell sorting and FISH. *Prenat Diagn* 15: 573- 578

Zhong X.Y., Bürk M.R., Troeger C., Jackson L.R., Holzgreve W., Hahn S. (2000) Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn* 20: 795- 798

Zimmermann R., Reynolds T.M., John R., Spencer K., Bartels I., Coombes E., Trevor S. (1996) Age-independent indices in second-trimester serum screening for Down's syndrome are useless. *Prenat Diagn* 16: 79- 82

7. Anhang

Verwendete Reagenzien

SSC (20×): Natriumchlorid/Sodiumcitrat

3 M Natriumchlorid

0,3 M Natriumcitrat

Ansatz für 1 Liter:

175,3 g NaCl

88,2 g Natriumcitrat

mit Aqua bidest ad 1 Liter auffüllen

Lösung auf pH 7 einstellen

daraus wird 1×, 2× und 4× SSC hergestellt

4× SSC/ 0,2% Tween 20

Ansatz für 1 Liter:

200 ml 20× SSC

798 ml Aqua bidest

2 ml Tween

Lösung auf pH 7 einstellen

PBS (10×): Phosphate Buffered Saline

137 mM Natriumchlorid

2,7 mM Kaliumchlorid

4,3 mM Na₂HPO₄ × 7 H₂O

1,4 mM KH₂PO₄

Ansatz für 1 Liter:

80 g NaCl

2 g KCl

14,5 g Na₂HPO₄ × 7 H₂O

2,4 g KH₂PO₄

mit Aqua bidest auf 1 Liter auffüllen

Lösung auf pH 7 einstellen

daraus wird 1× PBS hergestellt

TAE- Puffer (50×): Tris/ Acetat/ EDTA

40 mM Tris Acetat

2 mM EDTA

daraus wird 1× TAE hergestellt

8. Publikationen

Sadoni N., Langer S., Fauth C., Bernardi G., Cremer T., Turner B.M., Zink D. (1999) Nuclear organization of mammalian genomes : polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* 146: 1211- 1226

Azofeifa J., Fauth C., Kraus J., Maierhofer C., Langer S., Bolzer A., Reichman J., Schuffenhauer S., Speicher M.R. (2000) An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by 24- color FISH. *Am J Hum Genet* 66: 1684- 1688

Langer S., Fauth C., Kraus J., Speicher M.R. (2001) Vielfarben- Fluoreszenz in situ Hybridisierung in der Kinderheilkunde. *Medizinische Genetik* 2: 191- 195

Jallepalli P.V., Waizenegger I.C., Bunz F., Langer S., Speicher M.R., Peters J.M., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lengauer C. (2001) Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* 105: 445- 457

Langer S., Fauth C., Rocchi M., Murken J., Speicher M.R. (2001) AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosomes. *Hum Genet* 109: 152- 158

Langer S., Jentsch I., Gangnus R., Yan H., Lengauer C., Speicher M.R. (2001) Facilitating haplotype analysis by fully automated analysis of all chromosomes in human- mouse hybrid cell lines. *Cytogenet Cell Genet* 93: 11- 15

9. Lebenslauf

Name	Sabine Langer	
Anschrift	Destouchesstr. 3 80803 München	
Tel privat	089/ 34019158	
Tel Arbeit	089/4140-6387	
geboren am	16.3.74; München	
Familienstand	ledig	
Schulen	1980- 1984	Grundschule an der Simmernstr.; München
	1984- 1993	Maximiliansgymnasium München
Studium	1993- 1994	Studium der Chemie; LMU München
	1994- 1999	Studium der Biologie; LMU München
Promotion	seit 16.8.1999	Doktorandin; Institut für Humangenetik TU München Leiter: PD Dr. M. Speicher

10. Danksagung

Bei Herrn Prof. Thomas Cremer möchte ich mich für die Möglichkeit, an seinem Institut die Doktorarbeit anzufertigen, bedanken und außerdem für die Übernahme des Gutachtens.

Ganz herzlich danke ich Herrn PD Dr. Michael Speicher für seine zahlreichen Anregungen bei der Durchführung der Experimente und beim Schreiben der Doktorarbeit und natürlich für seine fortwährende Unterstützung.

Herrn Dr. Stefan Braun und allen überweisenden Ärzten(innen) danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. Christian Sander für die Einführung in das Arcturus- System und an Herrn Dr. Stefan Thalhammer für seine gute Betreuung bei der Einarbeitung mit dem PALM- System.

Rainer Gangnus danke ich für die Einführung in die Einzelzell- CGH, Dr. Christine Fauth für ihre stetige Hilfe bei verschiedensten Fragen und Problemen, Christine Maierhofer für ihre Einführung in die Aufnahme von Z-Stapeln und natürlich ihre aufmunternden Worte, wenn mal wieder nichts funktionieren wollte.

Für die praktische Hilfe in der Zellkultur möchte ich Corinna Keri und Gaby Lederer danken.

Für die gute Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit im Labor danke ich außerdem Dr. Jürgen Kraus, Dr. Sabine Uhrig, Andreas Bolzer, Isabell Jentsch, Nina Weiland, Doris Sollacher, Carmen Meyer, Melanie Odenigbo und Burgis Cleve.