

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien

RPMI (Blukulturmedium)	10,43 g RPMI 1640 Trockensubstanz 2,0 g Natriumhydrogencarbonat 15 % Fetales Kälberserum ad 1000 ml Aqua tridest. steril
TdR-Medium	100 ml RPMI 1 ml Antibiotika (Streptomycin, Penicillin) 20 ml FKS pro 100 ml RPMI + AB + FKS 1 ml 4mM TdR

2.1.2 Standardpuffer und Lösungen

Agarosegellösung	1g Agarose 100 ml 1x TBE Puffer 5µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
AGC-Mix	0,3 mM dATP Li-salt 0,3 mM dCTP Li-salt 0,3 mM dGTP Li-salt 300 mM Tris-HCl (pH 7,5) 30 mM MgCl ₂
Colcemid-Stammlösung (10 µg/ml)	Fertig bezogen
dTTP-Mix	1 µl 100 mM dTTP, Li-Salz 199 µl Nukleotid-Mix-Puffer
Dye	20 g Saccharose 0,125 g Bromphenolblau Ad 50 ml Aqua bidet.steril
FdU-Stammlösung	Fertig bezogen
Fixativ	Methanol : Eisessig = 3 : 1 v/v

Giemsa-Färbelösung	15 ml Giemsa ad 80 ml Phosphatpuffer
KCL-Stammlösung	20 g KCl ad 500 ml Aqua dest.
Kontroll-DNA-Mix	Spectrum Orange mit dTTP (1 mM) im Verhältnis 1:1 gemischt mit dTTP (1 mM)
Mastermix	20% Dextransulfat in 4 x SSC
10x Nick-Translationspuffer	500 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM MgCl ₂ 0,5 mg/ml nucleasefreies BSA
Nukleotid-Mix-Puffer	500 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM MgCl ₂
10x PBD-Puffer	14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ 10 ml IGEPAL
PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml Aqua dest.
Phosphatpuffer pH 6,88	11,13 g Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 8,5 g KH ₂ PO ₄ ad 500 ml Aqua dest.
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat-2-hydrat
2x SSC	Verdünnung 1:10 von 20x SSC mit Aqua dest.
0,4x SSC/0,3% IGEPAL (Waschlösung I)	100 ml 2x SSC 400 ml Aqua dest. 1,5 ml IGEPAL
2x SSC/0,1% IGEPAL (Wachlösung II)	50 ml 20x SSC 450 ml Aqua dest. 0,5 ml IGEPAL

0,4x SSC/0,3% NP-40 (pH 7,0-7,5)	20 ml 2x SSC 950 ml Aqua dest. 3 ml NP-40 ad 1000 ml Aqua dest.
2x SSC/0,1% NP-40 (pH 7,0-7,5)	100 ml 20x SSC 850 ml Aqua dest. 1 ml NP-40 ad 1000ml Aqua dest.
10 x TBE-Puffer (pH 8,3)	108 g Tris-HCl 55 g Borsäure 9,3 g Na ₂ EDTA 2 H ₂ O ad 100 ml Aqua dest.
TdR-Stammlösung	30 mM, Gebrauchslösung 4 mM
TE-Puffer (pH 8,0)	10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0 2 ml 0,5 M EDTA ad 1000 ml Aqua dest.
Test-DNA-Mix	Spectrum Green mit dTTP (1 mM) im Verhältnis 1:1 gemischt mit dTTP (1 mM)
Trypsin-Lösung (2,5%/0,9%)	25 g Trypsin 1:250 8,5 g NaCl/l

2.1.3 Reagenzien

Im Folgenden sind die Hersteller der verwendeten Reagenzien aufgelistet.

2.1.3.1 Chemikalien

Antifading	Vectashield
Aqua dest.	Braun
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Colcemid	Gibco
Cot-1 DNA	Gibco
DAPI	Sigma-Aldrich
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP	Promega

Dextransulfat	Merck
Eindeckmittel (Vitro-Clud, Vectashield)	Langenbrinck
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck
Ethanol 100%, 75%, 80%	Merck
Ethidiumbromid	Serva
FdU	Sigma
Fetales Kälberserum	Biochrom
Fluoreszenz-dUTP	Vysis
Formamid	Merck
Giemsa-Färbelösung (Azur-Eosin-Methylenblau/Phosphatpuffer; 4%)	Merck
Giemsa Stammlösung	Dr. K. Hollborn & Söhne
Glycogen	Boehringer Mannheim
HCl	Merck
IGEPAL	Sigma-Aldrich
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Lachssperm DNA	Sigma
Liquemin	Roche
Methanol	Baker J.T.
Methotrexat	Lederle
MgCl ₂	Merck
Natriumacetat	Sigma
NaCl	Merck
Na ₂ EDTA	Sigma
NaHCO ₃	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaOH	Merck
NP-40	Sigma
PCR-Puffer	Perkin Elmer
Penicillin	Biochrom
RPMI 1640	Gibco
Saccharose	Merck

20x SSC	Merck
Streptomycin	Biochrom
TdR	Sigma
Thymidin	Sigma
Tris	Gibco/BRL
WBS	Vysis
WCP DNA-Sonde	Vysis
WCP Hybridisierungspuffer	Vysis
YAC-DNA	Ressourcenzentrum des Max-Planck-Institutes

2.1.3.2 Enzyme

DNase	Sigma/Boehringer Mannheim
Rnase A	Boehringer Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Perkin Elmer
Trypsin	Gibco

2.1.3.3 Kits

Nick-Translations-Kit	Gibco/BRL
-----------------------	-----------

2.1.3.4 Weitere Materialien und Geräte

Agarose	Sigma
Brutschrank 37C°	Kötterman
CCD Kamera	Hamamatsu
Deckgläser	Menzel
DNA-Längenstandard	Gibco/BRL
Einmalglaspipetten, Pasteurpipetten, Glaspipetten	Brand
Elektrophoresekammer	Renner
Falcon-Kulturflaschen	Becton Dickinson
Fixogum	Marabu
Heizblock	Eppendorf
Hochspannungs-Netzgerät	Pharmacia

Inkubator	Bachofer
ISIS-Software	Metasystems
Magnetrührer	IKA-Labortechnik
Objektträger	Menzel
PCR-Gerät	Eppendorf
Photomikroskop	Zeiss Axioskop
Pipetten	Gilson Eppendorf
Pipettenspitzen	Gilson Eppendorf
Polaroid Land Packfilme Typ 667	Polaroid
Polaroid CU 5 Kamera	Polaroid
Probengefäße (0,5 ml)	Sarstedt
Safe-lock Tube 1,5 ml	Eppendorf
Schüttler IKA Vibrofix VF1	IKA-Labortechnik
Spannungsgeräte	Desaga; Biorad
Thermal-Cycler 480 (PCR-Gerät)	Perkin Elmer Cetus
Vortex	IKA-Labortechnik
Waagen	Sartorius
Wärmeblock	Eppendorf
Wärmeplatte	Medax
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen	Heraeus
Zentrifugenröhrchen	Greiner/Falcon

Zytogenetische Methoden

2.2 Zellverarbeitung

2.2.1 Verwendete Zellen

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Vollblut und Knochenmark von Kindern und Erwachsenen mit gesicherter Fanconi-Anämie, sowie mit Blut von gesunden Kontrollpersonen gearbeitet. Als Positivkontrollen dienten zusätzlich Knochenmarkszellen von Non-FA MDS- und AML-Patienten. Knochenmark und Blut wurden bei Fanconi Anämie Patienten in unterschiedlichen Phasen der Erkrankung entnommen und unmittelbar verarbeitet.

2.2.2 Kulturmethoden

2.2.2.1 Lymphozytenkultur (Vollblut)

Material:

Zentrifugenröhrchen (10 ml)

Falconflaschen (50 ml)

Methotrexat (10 µM)

Medium (RPMI ohne Zusätze)

TdR-Medium (8µg/ml)

Colcemid Stammlösung (10µg/ml)

Methode:

0,3 ml heparinisiertes Blut wurden mit 5 ml Blutkulturmedium vermischt und bei 37°C/5% CO₂ im Brutschrank für 72 h in Falconflaschen verschlossen kultiviert. 20 h vor Aufarbeitung wurden 45 µl Methotrexat hinzugegeben und erneut für 15 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Zellpellet vorsichtig resuspendiert und bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 5 ml RPMI hinzugefügt, erneut zentrifugiert, der Überstand erneut abgenommen und das Pellet mit 5 ml TdR-Medium vermischt. Es erfolgte eine weitere Kultivierung im Brutschrank für 4 h. Der Ansatz wurde nach dieser Zeit mit 25 µl Colcemid versetzt und nach Inkubation für 20 min erfolgte die Aufarbeitung (siehe 2.4).

2.2.2.2 Knochenmarkkultur mit 5-Fluordesoxyuridin

Material:

Heparinisiertes Knochenmark

Falconflasche (50 ml)

Medium (100 ml RPMI 1640 + 10 ml FKS + 1 ml Antibiotika (Streptomycin, Penicillin))

5-Fluordesoxyuridin (FdU) Stammlösung, Konzentration: 2 µg/ml

Thymidin (TdR) Stammlösung, Konzentration: 200 µg/ml

Colcemid Stammlösung, Konzentration: 10 µg/ml

Methode:

Durch Knochenmarkpunktion wurde heparinisiertes Knochenmark gewonnen, von dem 0,7 ml mit 6 ml Medium vermischt und bei 37°C/5%CO₂ im Brutschrank für 1h 50 min in Falconflaschen verschlossen kultiviert wurden. Es erfolgte die Zugabe von 100 µl FdU (2 µg/ml) und eine weitere Kultivierung im Brutschrank für 17 h. Dem Ansatz wurde nun 100 µl TdR (200 µg/ml) zugegeben und nach 1h 50 min folgten 25 µl Colcemid. 20 min danach erfolgte die Aufarbeitung (siehe 2.4).

2.2.2.3 Knochenmarkkultur mit Thymidin

Material:

Heparinisiertes Knochenmark

Falconflasche (50 ml)

Spritze

Blutkulturrohrchen (14 ml)

Medium (100 ml RPMI 1640 + 10 ml FKS + 1 ml Antibiotika (Streptomycin, Penicillin))

Thymidin TdR Stammlösung, Konzentration: 200 µg/ml

Colcemid Stammlösung, Konzentration: 10 µg/ml

Methode:

Von heparinisiertem Knochenmark wurden 0,7 ml mit 6 ml Medium vermischt und bei 37°C/5%CO₂ im Brutschrank für 1h 50 min in Falconflaschen verschlossen kultiviert. Es wurden 100 µl TdR (200 µg/ml) zugegeben und eine weitere Kultivierung für 17 h folgte. Die Kultur wurde in Blutkulturrohrchen umgefüllt und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und anschließend 6 ml frisches, auf

37°C vorgewärmtes Medium zugegeben. Nach 1 h 50 min Kultivierung im Brutschrank wurde der Kultur 25 µl Colcemid zugegeben und resuspendiert. 20 min danach erfolgte die Aufarbeitung (siehe 2.4).

2.2.3 Zellansatz für die Direktpräparationen

2.2.3.1 Direktpräparation von Blut

Material:

Heparinisiertes Blut

Medium (100 ml RPMI 1640 + 10 ml FKS + 1 ml Antibiotika (Streptomycin, Penicillin))

Methode:

Es wurden 0,5 ml heparinisiertes Vollblut mit 5 ml Medium verdünnt, danach erfolgte die Aufarbeitung (siehe 2.4).

2.2.3.2 Direktpräparation von Knochenmark

Material:

Heparinisiertes Knochenmark

Medium (100 ml RPMI 1640 + 10 ml FKS + 1 ml Antibiotika (Streptomycin, Penicillin))

Methode:

Die Direktpräparation von Knochenmark erfolgte auf die gleiche Weise wie die Direktpräparation von Blut.

2.2.3.3 Granulozytenpräparation

Material:

Heparinisiertes Blut

Medium (100 ml RPMI 1640 + 10 ml FKS + 1 ml Antibiotika (Streptomycin, Penicillin))

Methode:

0,5 ml Blut wurden mit 5 ml Medium verdünnt, die Aufarbeitung erfolgte sofort im Anschluss. Es wurde 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert, bis ca. 5 mm über dem Pellet der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet resuspendiert. Danach erfolgte gleich die Zugabe von 4°C kaltem Fixativ wie unter 2.4 beschrieben.

2.2.4 Blut- und Knochenmarkausstriche

Material:

Heparinisiertes Blut oder Knochenmark

Objektträger

Deckglas

Methode:

Es wurde ein Tropfen Blut oder Knochenmark auf einen Objektträger seitlich mittig aufgetragen und der Tropfen anschließend mit dem Deckglas berührt. Er wurde langsam von einer Seite zur anderen hin ausgestrichen, dabei lag das Material immer hinter dem Deckglas, um keine Zellen während des Ausstreichens zu zerstören. Vor der weiteren Verwendung wurden die Präparate für einige Tage gealtert.

2.3 Aufarbeitung der Kulturen und Direktpräparationen aus Blut und Knochenmark - Präparation von Metaphasechromosomen

Material:

Fixativ (Methanol : Eisessig = 3 : 1 v/v)

Hypotone Lösung (0,4% KCl)

Methode:

Die Proben wurden für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis ca. 5 mm über dem verbliebenen Pellet abgenommen. Nach Resuspendieren des Pellets erfolgte die Zugabe von 5 ml auf 37°C vorgewärmter hypotoner KCl und eine Inkubation für 10 min bei 37°C im Wasserbad. Im Anschluß an eine 10-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand erneut abgenommen und das Pellet resuspendiert. Daraufhin wurden 5 ml von 4°C kaltem Fixativ langsam zugetropft und durchmischt. Nach Inkubation für 10-15 min bei 4°C wurde 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Insgesamt wurde der Fixativ-Schritt 3-4 mal wiederholt, bis die Suspension milchig weiß erschien. Nach dem letzten Fixativ-Schritt wurde das Fixativ bis auf 1 ml abgenommen und die Zellen darin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf fettfreie Objektträger aufgetropft, für 10 sec über

Wasserdampf gehalten und zum Trocknen auf die Wärmeplatte bei ca. 60°C gelegt, bis alle Flüssigkeit verdampft war. Die Objektträger wurden für mindestens einen Tag bei Raumtemperatur gealtert. Aufbewahrt wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

2.4 Chromsomenfärbungen

Angefärbt wurden Präparate aus Lymphozyten- und Knochenmarkkulturen.

2.4.1 Giemsa-Standardfärbung

Material:

Giemsa-Färbelösung (Azur-Eosin-Methylenblau/ Phosphatpuffer; 4%)

Aqua dest.

Vitro-Clud (Eindeckmittel)

Deckgläser (76x26 mm)

Methode:

Zur Färbung der Metaphasechromosomen wurden die Präparate für 15 min in die Giemsa-Färbelösung getaucht. Anschließend wurden die Objektträger zweimal in Aqua dest. geschwenkt und getrocknet. Die Präparate wurden unter Verwendung eines Eindeckmittels mit einem Deckglas bedeckt.

2.4.2 Giemsa-Trypsin Banden (GTG)

Material:

Giemsa-Färbelösung (Azur-Eosin-Methylenblau/ Phosphatpuffer; 1,5%)

Trypsin-Lösung (Trypsin 2,5%; NaCl 0,9%)

Aqua dest.

Vitro-Clud

Deckgläser (76x26 mm)

Methode:

Für die Färbung wurden mindestens 24 h alte, luftgetrocknete Präparate 30 min auf einer Wärmeplatte bei 60°C inkubiert und nach kurzem Abkühlen für etwa 20 Sekunden in der Trypsinlösung bei 37°C geschwenkt, sofort gründlich mit Aqua dest. gespült und etwa 10 min in einer 1,5% Giemsalösung mit Phosphatpuffer, pH 6,88, gefärbt. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die luftgetrockneten Präparate mit Eindeckmittel und Deckgläsern bedeckt.

Molekulargenetische Methoden

2.5 Polymerase Kettenreaktion

Mitte der achtziger Jahre entwickelte K. Mullis die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) (Mullis et Faloona, 1987), einen Vorgang, mit dem es möglich ist, ein spezifisches DNA-Fragment, von dem die Sequenz der flankierenden Bereiche bekannt ist, in vitro enzymatisch exponentiell zu amplifizieren. Zwei Oligonukleotide werden synthetisiert, deren Sequenz jeweils zu einem Strang in einem flankierenden Bereich komplementär ist. Sie dienen als Primer für eine DNA-Polymerase, die den Bereich zwischen den Primern synthetisiert. Durch verschiedene Temperaturen können im Reaktionsgemisch unterschiedliche Reaktionen begünstigt werden und durch einen sich wiederholenden Zyklus kann so der von den Primern eingerahmte Bereich exponentiell vervielfältigt werden. Die Reaktion lässt sich automatisieren, indem man eine hitzestabile DNA-Polymerase wie die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Diese Polymerase arbeitet optimal bei 72°C und hat bei einer Denaturierungstemperatur von 94°C eine Halbwertszeit von ungefähr einer Stunde.

Die Reaktion aus aufeinanderfolgenden Zyklen besteht aus jeweils drei Schritten:

1. Denaturierung: Thermische Zerlegung der DNA in zwei Einzelstränge.
2. Annealing: Anlagerung der Primer an den jeweiligen komplementären DNA-Einzelstrang.
3. Extension: Polymerasereaktion.

Die in jedem Zyklus synthetisierten Produkte dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrize, so dass sich ihre Anzahl mit jedem Zyklus verdoppelt.

2.5.1 PCR-Markierung von Sonden-DNA (YACs)

Für die Interphase-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden Yeast artificial chromosomes (YACs) in zwei PCR-Schritten amplifiziert und mit fluoreszierenden Nukleotiden markiert. In der ersten Amplifikation erfolgt die Vermehrung der eingesetzten YAC-DNA, in der zweiten Amplifikation erfolgt die Vermehrung und die Markierung der YAC-DNA.

2.5.1.1 Erste Amplifikation

Material:

10x PCR-Puffer

dNTPs (10 mM)

DOP-Primer (200 pM)

YAC DNA

Aqua dest.

MgCl₂ (25 mM)

Taq-Polymerase

Methode:

Zur Vermehrung der YAC-DNA in der ersten Amplifikation wurde ein 50 µl Ansatz pro YAC und Leerwert verwendet. Der Mastermix wurde auf Eis angesetzt. 5 µl Puffer, 36,75 µl Aqua dest., 2 µl MgCl₂, 1 µl dNTPs, 4 µl DOP-Primer und 0,25 µl Taq-Polymerase wurden in der genannten Reihenfolge pro Ansatz nacheinander zusammenpipettiert. Es wurde kurz zentrifugiert, resuspendiert, wieder zentrifugiert und je 49 µl des Mastermixes in Reaktionsröhrchen mit jeweils 1 µl YAC-DNA bzw. Wasser (für den Leerwert) überführt. Die PCR-Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen:

5 Zyklen je:

- 95°C 5 min
- 94°C 1 min
- 30°C 1,5 min
- (30°C-72°C in 0,3°C/sec)
- 72°C 3 min

gefolgt von 35 Zyklen je:

- 94°C 1min
- 62°C 1 min
- 72°C 3 min
- (pro Zyklus +1sec)
- 72°C 10 min

Wie unter 2.5.2 beschrieben, wurde ein Aliquot von 5 µl jeder Probe mit 5 µl Wasser und 3 µl Dye auf einem Agarose-Gel (1%) für 1 h bei 95 Volt aufgetrennt. Als Kontrolle diente der Leerwert.

2.5.1.2 Zweite Amplifikation (Markierungs-PCR)

Material:

10x PCR-Puffer

dNTPs (10 mM)

Fluoreszenz-dUTP (1 mM), Spectrum Orange, Spectrum Green

DOP-Primer (100 pMol)

DNA

Aqua dest.

MgCl₂ (25 mM)

Taq-Polymerase (5 U/μl)

Methode:

In der zweiten Amplifikation erfolgte mittels PCR die Markierungsreaktion, also der Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide. Pro YAC und Leerwert wurde ein Ansatz von 25 μl verwendet. 2,5 μl PCR-Puffer, 16,6 μl Aqua dest., 1 μl MgCl₂, 0,5 μl dNTPs, 2 μl DOP-Primer und 0,125 μl Taq-Polymerase wurden zentrifugiert, gevortext, zentrifugiert und danach 1,25 μl Fluoreszenz-dUTP zugegeben. Zur Erlangung grün fluoreszierender Signale wurde hierbei Spectrum Green, zur Erlangung rot fluoreszierender Signale, Spectrum Orange eingesetzt. Bei Verwendung von Fluoreszenz-dUTP wurde auf die Abschirmung von Licht geachtet. Anschließend erfolgte die PCR-Reaktion unter folgenden Bedingungen:

5 Zyklen je:	95°C 5 min
	94°C 30 sec
	30°C 30 sec
gefolgt von 35 Zyklen je:	94°C 30 sec
	62°C 30 sec
	72°C 1,5 min

Die Produkte wurden wieder nach dem gleichen Verfahren wie unter 2.5.2 beschrieben, auf einem Agarose-Gel (1%) aufgetrennt.

2.5.2 Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung

Zur Darstellung von Nukleinsäurefragmenten und hochmolekularer DNA ist die Agarosegelelektrophorese die Standardmethode. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die DNA-Moleküle aufgrund ihrer elektrisch negativ geladenen Phosphatgruppen vom Kathoden-Ende auf die Anode zu. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei proportional zum Molekulargewicht einer Nukleinsäure, bzw. eines Nukleinsäurefragments. Nukleinsäuren mit niedrigem Molekulargewicht bewegen sich daher schneller durch das Gel als solche mit hohem Molekulargewicht. Große Fragmente bleiben in der Nähe des Auftragungspunktes, kleine Fragmente sind näher am Gelende zu finden. Weiterhin wandern alle Nukleinsäuren gleichen Molekulargewichts gleich schnell, d.h. sie reichern sich in sogenannten Banden an, welche nach einer gewissen Zeit dann als Bandenmuster im Gel durch Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt zudem von der Agarosekonzentration im Gel sowie der angelegten Spannung ab. Im Vergleich zu einem mitlaufenden DNA-Längenstandard können die DNA-Moleküle hinsichtlich ihrer Basenpaaranzahl identifiziert werden.

Material:

Agarosegellösung 1%: Agarose
 1x TBE-Puffer
 Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Gelladepuffer: 1x TBE

Methode:

1 g Agarose wird mit 100 ml 1x TBE-Puffer durch Erhitzen vollständig gelöst und mit 5 µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Nach einer Abkühlzeit von 25 min wird das Gel in einen Gelschlitten mit Gelkamm gegossen und nach weiteren 20 min das Gel in die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer überführt und die Gelkämme gezogen.

Je 5 µl der zu analysierenden Proben und 0,8 µl der DNA-Längenstandards (= Leiter) wurden jeweils mit 5 µl Wasser und 3 µl Dye versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Längenvergleich diente eine 123 Basenpaar-Leiter. Der Gellauf erfolgte mit einer Spannung von 5 Volt/cm über eine Stunde. Nach dieser Laufzeit wurde das Gel auf

einen Transilluminator gelegt und das Ergebnis der Auftrennung mit einer Polaroidkamera fotografisch dokumentiert.

Molekularzytogenetische Methoden

2.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Bei der *in situ* Hybridisierung (ISH) werden die Chromosomen mit chromosomenspezifischen DNA-Sonden mittels Hybridisierung an entsprechend komplementären DNA-Zielsequenzen sichtbar gemacht. Diese Technik wurde erstmals von Pardue und Gall (1969) sowie von John et al. (1969) unabhängig voneinander beschrieben (Übersichtsarbeiten: Leitch et al., 1994; Swiger und Tucker, 1996).

Als markierte Hybride können den Chromosomen fluoreszenzoptische Stoffe angelagert werden, um komplementäre DNA-Sequenzen zu detektieren (Baumann et al., 1980; Pinkel et al., 1986). Diese ermöglichen es, die Chromosomen als Signale im Fluoreszenzmikroskop auszuwerten (FISH=Fluoreszenz in situ Hybridisierung). Mit dieser Methode ist es möglich, eine Aussage bezüglich der Anzahl und Lage von Chromosomenbereichen zu treffen. Außerdem können auch ganze Chromosomen markiert werden (whole chromosome painting) sowie einzelne Gene oder Chromosomensegmente nachgewiesen werden mit Hilfe chromosomaler in situ Suppressions- (CISS-) Hybridisierung. (Cremer et al. 1988 ; Lichter et al. 1988).

In Abbildung 2.1 ist der Mechanismus der Fluoreszenz in situ Hybridisierung dargestellt. Bei dieser Technik wird die Sonden DNA durch Hitze denaturiert und mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Für die Hybridisierung muss auch die Ziel-DNA, die im Präparat erkannt werden soll, als Einzelstrang vorliegen. Dies wird durch chemische Denaturierung erreicht. Im folgenden Renaturierungsschritt wird die Ziel-DNA wieder zu einem Doppelstrang vereint, allerdings ist der Partner hierbei die oben schon genannte Sonden-DNA, die im Überschuss der Reaktion hinzugegeben wird. Diese Sonden-DNA muss zwei Charakteristika besitzen:

1. sie ist homolog zu dem DNA-Abschnitt, der markiert werden soll
2. es haben sich fluoreszenzoptische Stoffe angelagert.

Dadurch wird erreicht, dass sich nach der Hybridisierung (Bildung eines Hybrids aus Ziel- und Sonden-DNA) fluoreszierende Sonden-DNA im gewünschten Detektionsbereich

befindet. Der Nachweis der Hybridisierung erfolgt unter Anregung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht und der daraus resultierenden Emission von Licht einer spezifischen Wellenlänge.

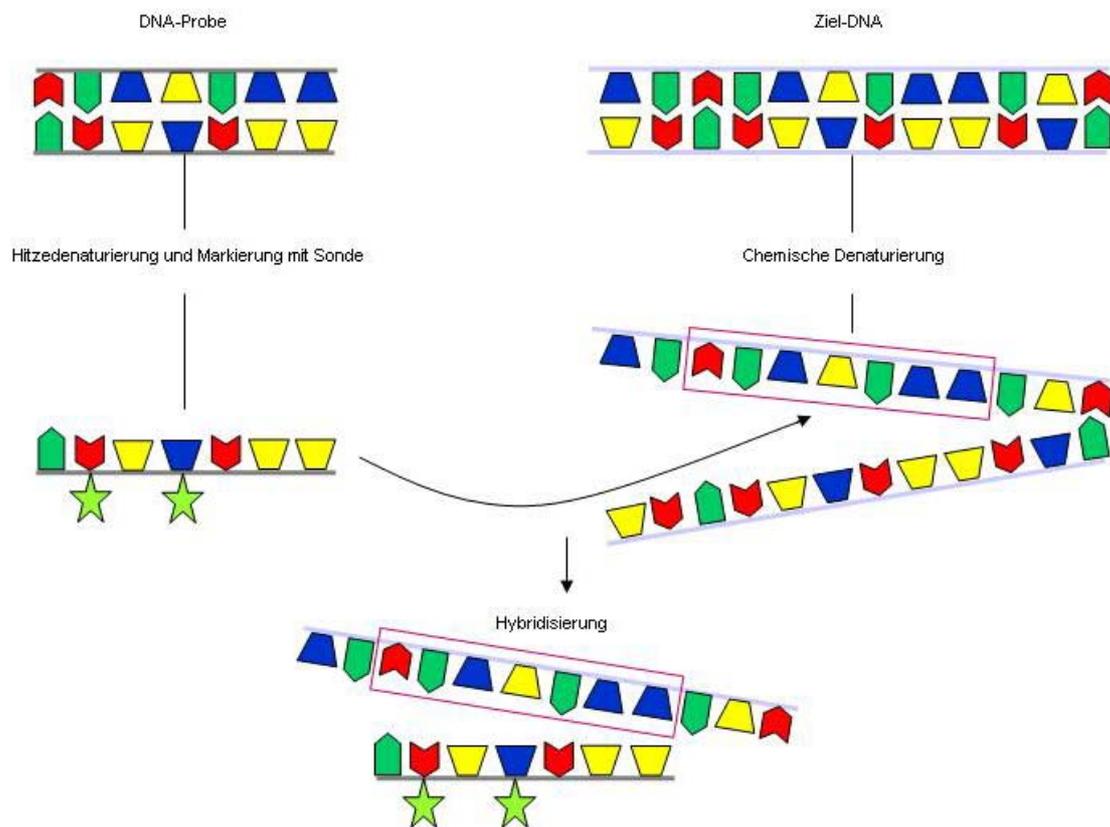


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der FISH

Mit der FISH-Technik ist es möglich, ein spezielles ganzes Chromosom (Einsatz von sogenannten whole chromosome painting-Sonden), das Zentromer eines bestimmten Chromosoms oder auch simultan alle Chromosomen eines Chromosomensatzes (sogenannte Zentromer-Sonden bzw. pan-zentromerische Zentromer-Sonden), Chromosomenenden (Telomer-Sonden) oder einzelne Abschnitte auf einem Chromosom (Gen-Sonden) zu lokalisieren. Mit der neuen Methode der Multi-Color-FISH ist es inzwischen sogar möglich geworden, alle 24 verschiedenen Chromosomen (1-22, X, Y) des menschlichen Karyotyps simultan anfärben zu können (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl mit gesamtgenomischer DNA als auch mit kleineren DNA-Sonden wie YACs (Yeast Artificial Chromosomes) gearbeitet.

2.6.1 Yeast artificial chromosome (YAC)

Bei einem YAC (yeast artificial chromosome) handelt es sich um ein künstliches Hefechromosom. Es dient als Vektor und erlaubt im Gegensatz zu den Cosmiden die Klonierung größerer, in diesem Fall humaner, Genomabschnitte. Die Entwickler des ersten YAC waren Murray und Szostak 1983. Mit Hilfe der YACs war es möglich, Genomabschnitte zu übertragen, die wesentlich größer waren als die, die mit Hilfe der Cosmide kloniert werden konnten.

Ein Fragment der DNA des menschlichen Genoms wird in eine Hefezelle eingefügt, diese repliziert das Fragment zusammen mit ihrer eigenen DNA. YACs sind charakteristischerweise zwischen 250 000 und 1 Million Basenpaaren groß und tragen einen jeweils spezifischen Genomabschnitt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden YACs mit Hilfe der PCR vervielfältigt, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und für die FISH verwendet. Meist wurde zusätzlich zu dem YAC der zu analysierenden Region mit einem zweiten YAC als Kontrolle gearbeitet. Die bei dieser Arbeit eingesetzten YACs sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

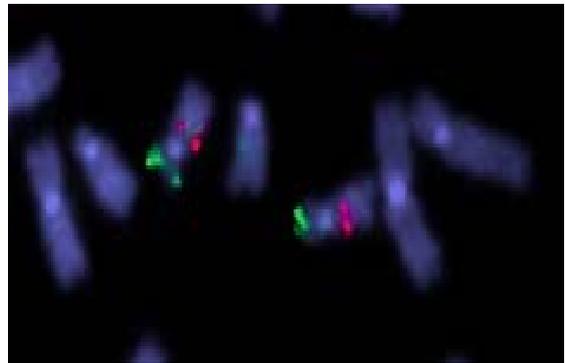


Abbildung 2.2: YAC in rot und grün.

Tabelle 2.1: Verwendete YACs mit den in der PCR jeweils markierten Fluoreszenzfarbstoffen.

	YAC-Bereich im p-Arm und Farbsignal	YAC-Bereich im q-Arm und Farbsignal
Chromosom 3	808b10 (3p14-21), rot	909d10 (3q27-28), grün
Chromosom 7	956e01 (7p13), grün	942g09 (7q36), rot
		WBS-Sonde (7q11.23), rot
		WBS-Sonde (7q31), grün

2.6.2 Chromosomen-Painting

Analog zu den Markierungen der Chromosomenabschnitte lässt sich auch ein gesamtes Chromosom spezifisch anfärben („chromosome painting“). Diese Anwendung ist sehr hilfreich bei der Abklärung von Strukturveränderungen der Chromosomen oder bei der Identifizierung sogenannter Markerchromosomen. Dazu wird die genomische DNA einzelner Chromosomen als markierte Sonde auf Metaphasechromosomen hybridisiert. Die genomischen DNAs der „chromosome painting“ Sonden werden durch Durchflusssortierung oder Mikrodissektion gewonnen und sind kommerziell erhältlich.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sonden handelt es sich um direkt markierte Sonden (WCP=whole chromosome paint). Es wurden Sonden für Chromosom 3, 7 und 10 eingesetzt.

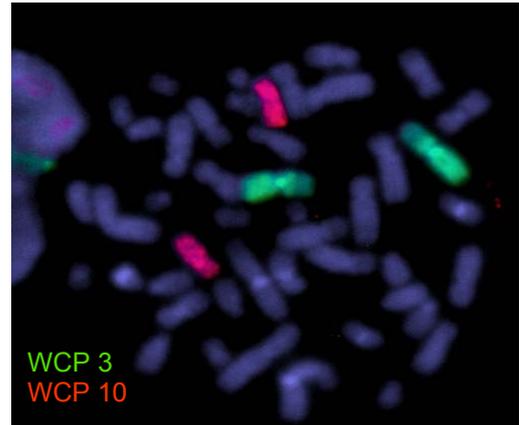


Abbildung 2.3: WCP an den Chromosomen 3 und 10.

2.6.3 FISH mit YAC-Sonden

2.6.3.1 Fällung und Denaturierung der DNA-Sonde zur Hybridisierung

Material:

Cot-1 DNA

Lachssperm-DNA (10 µg/µl)

Natriumazetat (3 M)

YAC-DNA

Ethanol 100%

Ethanol 70%

Deionisiertes Formamid

Mastermix (20% Dextranulphat/4x SSC)

Methode:

Die YAC DNA-Sonde wurde nach Zugabe von 1 µl gescherter Lachssperm-DNA, 1 µl 3 M Natriumazetat und 4 µl Cot-1 DNA zentrifugiert, gevortext und erneut zentrifugiert. 25 µl eiskaltes Ethanol wurden hinzugegeben und nach Zentrifugieren, Vortexen und Zentrifugieren mindestens eine Stunde bei -80°C präzipitiert und anschließend durch Zentrifugation für 25 min bei 14000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Dann wurde für 10 min bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Nach anschließender Trocknung bei 37°C im Wärmeblock für 3-4 min wurde die DNA-Sonde durch Zugabe von deionisiertem Formamid bei 37°C für 30 min gelöst und anschließend der Hybridisierungsmix durch Zugabe von 5 µl Mastermix vervollständigt. Für die Verwendung der fertigen Sonden für die I-FISH mussten die Sonden im Wasserbad bei 73°C für 6 min denaturiert werden.

2.6.3.2 RNase-Verdau der Chromosomenpräparationen

Zur Vermeidung von Hintergrundsignalen ist der Abbau von RNA mittels RNase ein wichtiger Vorbehandlungsschritt.

Material:

RNase A (995 µl Aqua dest. + 5 µl RNase)

2x SSC

Methode:

Die zuvor bei Raumtemperatur bzw. bei -20°C aufbewahrten Chromosomenpräparate wurden für 3 min bei RT in 2x SSC äquilibriert und anschließend mit 200 µl der frisch hergestellten RNase-Lösung (1:200-Verdünnung der RNase mit 2x SSC) unter einem Deckglas bei 37°C für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Deckgläser abgenommen und die überschüssige RNase-Lösung in drei aufeinander folgenden Waschschritten mit 2xSSC für je 5 min ausgewaschen. Direkt im Anschluss daran erfolgte die Denaturierung mit NaOH.

2.6.3.3 Denaturierung der chromosomalen Ziel-DNA

Um eine Bindung der Sonden-DNA an der chromosomalen DNA zu erreichen, muss auch diese zu zwei Einzelsträngen denaturiert werden.

Material:

Ethanol 100%, 70%, 50%, 30%

2x SSC

0,1x SSC

0,07 N NaOH (3,5 ml 2 N NaOH + 96,5 ml d H₂O)

Methode:

Nach dem RNase-Verdau wurden die Präparate zur Dehydrierung durch eine absteigende Ethanolreihe (100%, 70%, 50%, 30%) und anschließend durch 0,1x SSC RT für jeweils 1 min geführt. Danach wurden sie für 30 min in 2xSSC bei 70°C ins Wasserbad gestellt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur in 2xSSC auf 37°C abgekühlt. Für 1 min kamen sie in 0,1x SSC, worauf die Denaturierung der chromosomalen DNA für 1 min in 0,07 N NaOH erfolgte. Die Präparate wurden zum Äquilibrieren je 1 min durch 0,1x SSC 4°C und 2x SSC 4°C geführt und zum Schluss wiederum zur Dehydrierung für jeweils 1 min durch eine aufsteigende Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 100%). Die Präparate wurden bis zur Hybridisierung für 10 min bei 37°C getrocknet.

2.6.3.4 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden 20 µl der denaturierten Sonde auf ein großes Hybridisierungsfeld pipettiert, mit einem Deckglas (24 x 32 mm) versehen und mit einer Gummilösung (Fixogum) luftdicht verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 16-20 h in einer feuchten Kammer.

2.6.3.5 Waschschritte nach der Hybridisierung

Um überschüssige, nicht gebundene Sonden-DNA vom Objektträger zu entfernen und so störende Hintergrundsignale oder etwaige Artefakte ausschließen zu können, wurden die Objektträger nach der Inkubation gewaschen.

Material:

Waschlösung I (0,4x SSC 0,3% IGEPAL)

Waschlösung II (2x SSC 0,1% IGEPAL)

DAPI

Aqua dest.

Vectashield

Deckglas

Methode:

Die Gummilösung sowie das Deckglas wurden vorsichtig vom Objektträger entfernt und die Präparate für 2 min bei 73°C im Wasserbad in Waschlösung I gewaschen. Um letzte Reste von unspezifisch gebundener Sonden-DNA zu entfernen wurde bei RT für 1 min in Waschlösung II gewaschen und anschließend mit DAPI für 13 min gegengefärbt. Nach zweimaligem Waschen in destilliertem Wasser wurde der Objektträger mit einem Vectashield, das ein schnelles Ausbleichen der Signale verhindert, und einem Deckglas versehen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in einer dunklen Kammer, bis eine Betrachtung und Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte.

2.6.4 FISH mit WCP-Sonden**2.6.4.1 Denaturierung der WCP-Sonden zur Hybridisierung**

Die Denaturierung der WCP Sonden erfolgte für 5 min bei 73°C im Wasserbad, anschließend wurde die Probe für 5 min bis 2 h bei 37°C inkubiert.

2.6.4.2 RNase-Verdau der Chromosomenpräparationen

siehe 2.6.3.2

2.6.4.3 Probenvorbereitung und Hybridisierung**Material:**

70% Formamid/2x SSC

2x SSC

0,5x SSC

Ethanol (100%, 85%, 70%)

Methode:

Die Chromosomenpräparate wurden für 30 min bei 37°C in 2xSSC gestellt und nach jeweils 2 min Verweildauer in der aufsteigenden Alkoholreihe getrocknet. Anschließend wurden sie in auf 73°C vorgeheiztes Formamid/2x SSC für 2 min überführt und nach kurzem Waschen in 2x SSC für jeweils 2 min in der aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 85%, 100% Ethanol) dehydriert.

2.6.4.4 Hybridisierung

10 µl der denaturierten Sonde wurden auf das Hybridisierungsfeld aufgetragen, mit einem Deckglas (18x18mm) versehen und mit einer Gummilösung abgedichtet. Anschließend wurden die Präparate für 16-20 h bei 37°C inkubiert.

2.6.4.5 Waschschritte nach der HybridisierungMaterial:

0,5x SSC

1x PBD

DAPI

Aqua dest.

Vectashield

Methode:

Die Gummilösung und das Deckglas wurden vorsichtig von den Objektträgern entfernt und diese für 5 min in 0,5xSSC bei 73°C und 2 min in 1x PBD bei RT gewaschen. Nach 13 min Färbung in DAPI wurden die Präparate 2x mit destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet und nach Auftragen von Vectashield in einer dunklen Kammer bis zum Betrachten aufbewahrt.

2.6.5 Auswertung und Dokumentation der FISH-Ergebnisse

Die Objektträger wurden unter einem Axioskop Photomikroskop (Zeiss) betrachtet und Interphasekerne ausgewertet. Ziel war es, pro Analyse 1000 Interphasekerne zu analysieren. Bei jeder Analyse wurden repräsentativ einige Aufnahmen mit einer gekühlten CCD Kamera gemacht und digitalisiert und mit Hilfe der ISIS Software (MetasystemsTM) archiviert.

Folgende Kriterien mussten für eine Auswertung erfüllt sein:

1. Geringe Hintergrundsignale außerhalb der Interphasekerne
2. Eindeutige Hybridisierungssignale entsprechend der verwendeten Sonden
3. Gleichmäßige Hybridisierung
4. Keine Überlagerung der Interphasekerne

Gezählt wurde die Anzahl der verschiedenen Farbsignale rot (Spectrum Orange) und grün (Spectrum Green) in den Interphasekernen und prozentual ausgewertet. Dabei wurden Signale dann als getrennt voneinander vorliegende Signale gewertet, wenn zwischen zwei gleichfarbigen Signalen mindestens ein Signaldurchmesser Abstand auszumachen war. Dabei wurde ein Signal nur dann als Signal gewertet, wenn es im Vergleich zu den anderen Signalen der jeweiligen Analyse in etwa die gleiche Intensität und Größe hatte. Um die Signale besser analysieren zu können, wurde in verschiedenen Ebenen fokussiert. Abbildung 2.4 stellt die verschiedenen Farbsignale in Interphasekernen und deren entsprechende Auswertung dar.

Überschnitten sich rote mit grünen Signalen, wurden jeweils alle Signale gewertet. Es wurden alle gesehenen Signalkombinationen, die die obigen Kriterien erfüllten, in die Auswertung miteinbezogen. Als unauffällige Interphasekerne wurden jene mit jeweils 2 Signalen grün (Spectrum Green) und 2 Signalen rot (Spectrum Orange) gewertet. Für die Spezifikation der verschiedenen Filterkombinationen siehe Tabelle 2.2.

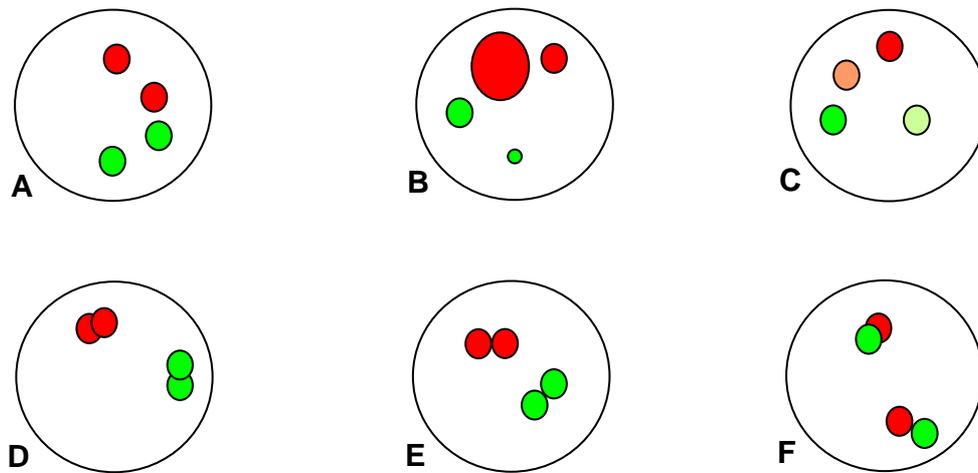


Abbildung 2.4: Darstellung verschiedener Farbsignale in Interphasekernen.

A: Unauffällige Signalkombination. Die Signale sind einen Signaldurchmesser weit voneinander entfernt, sie erscheinen alle gleich groß und gleich farbtensiv. Alle Signale werden als einzelne gewertet (RR/GG).

B: Unterschied in der Signalgröße. Diese Kerne werden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

C: Unterschied in der Signalintensität. Diese Kerne werden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

D: Die beiden Signale überschneiden sich jeweils, sie imponieren als jeweils ein Signal. Durch Fokussieren durch verschiedene Ebenen kann man jeweils zwei Signale unterscheiden.

E: Die beiden Signale berühren sich jeweils, haben keinen gemeinsamen Schnittpunkt. Hier können ebenso durch Fokussieren in verschiedenen Ebenen jeweils zwei Signale differenziert werden.

F: Überschneiden oder berühren sich rote und grüne Signale gegenseitig, werden sie als jeweils eigene Signale gewertet (RR/GG).

Tabelle 2.2: Spezifikation der verwendeten Filterkombinationen.

Fluoreszenzfarbstoff	DAPI	FITC/ Spectrum Green	TRITC/ Spectrum Orange
Filter-Nr.	01	10	15
Anregungslicht	UV	Blau	Grün
Anregungsfilter	365nm	450-490nm	546nm
Farbteiler	395nm	510nm	580nm
Sperrfilter	397nm	515-565nm	590nm
Farbe der Fluoreszenz	Blau	Grün	Rot

2.7 Comparative Genomic Hybridization (CGH)

Die Comparative Genomic Hybridization (CGH) ist eine molekular-zytogenetische Methode zur Analyse chromosomaler Imbalancen und erlaubt mittels eines Experimentes die Analyse des gesamten Genoms. Darüber hinaus ist es möglich, Aussagen über die Größe von Aberrationen und deren chromosomaler Zugehörigkeit zu machen (Stumm et al., 1999; Tönnies et al., 2001; Tönnies, 2002). Die CGH wurde erstmals 1992 von der Arbeitsgruppe Kallioniemi als ein neues Verfahren speziell für die Analyse von Tumorgenomen entwickelt (Kallioniemi et al., 1992).

Die Methode basiert auf der Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Test- und Kontroll- (Referenz-) DNAs auf normale menschliche Metaphasechromosomen. Dabei wird die zu untersuchende Test-DNA grün und die Kontroll-DNA rot markiert (Abbildung 2.5). Die Hybridisierung erfolgt als CISH Hybridisierung unter Zugabe von Cot-1 DNA und wird auf Metaphasechromosomen eines gesunden männlichen Spenders vorgenommen. Dabei konkurrieren die in Einzelsträngen vorliegende Test- und die Kontroll-DNA um die Bindungsstellen an der ebenso in Einzelsträngen vorliegenden chromosomalen Ziel-DNA. Liegt ein Überschuss einer bestimmten chromosomalen Region der Test-DNA vor, so werden entsprechende Abschnitte der chromosomalen Ziel-DNA häufiger von der Test-DNA als von der Kontroll-DNA hybridisiert. Mit Hilfe eines digitalen Bildanalyse-Systems können Fluoreszenz-intensitätsunterschiede erfasst und in Form eines Ratioprofils dargestellt werden. Dabei kann die Leuchtintensität der beiden Fluoreszenzfarbstoffe der Proben-DNA entlang der einzelnen Chromosomen bestimmt und die sich aus der Differenz der ergebenden Fluoreszenzprüfprofile für jedes Chromosom individuell berechnet werden. Die Summenprofile werden aus den Mittelwerten der Einzelprofile gebildet. Eine gleichstarke Fluoreszenzintensität von Test- und Referenz-DNA entspricht einem Wert von 1. Liegt ein Überwiegen von Test-DNA im Vergleich zur Referenz-DNA für eine chromosomale Region vor, so wird dies mit Summenwerten größer 1 angegeben, im umgekehrten Fall, das heißt bei Überwiegen der Referenz-DNA im Vergleich zur Test-DNA, liegen die Summenwerte kleiner 1. Dabei werden Ratioprofilverschiebungen nach rechts (Summenwerte größer 1) als „enhancement“ (engl. "enhancement", kurz „enh“), Verschiebungen nach links (Summenwerte kleiner 1) als „diminishing“ (engl. "diminishing", kurz „dim“) des Chromosomenmaterials bezeichnet. Die Schwellen für einen auffälligen Befund bei Fanconi Anämie Patienten wurden mit den Werten 0,85 und 1,17 festgelegt. Somit

können chromosomale Über- oder Unterrepräsentationen (z.B. unbalancierte Translokationen) analysiert werden. Allerdings muss die betroffene Region eine gewisse Mindestgröße besitzen. Einfache Duplikationen können erst ab einer Größe von 2 Millionen Basenpaaren, Deletionen ab einer Größe von 10-20 Millionen Basenpaaren nachgewiesen werden (Houldsworth und Chaganti, 1994).

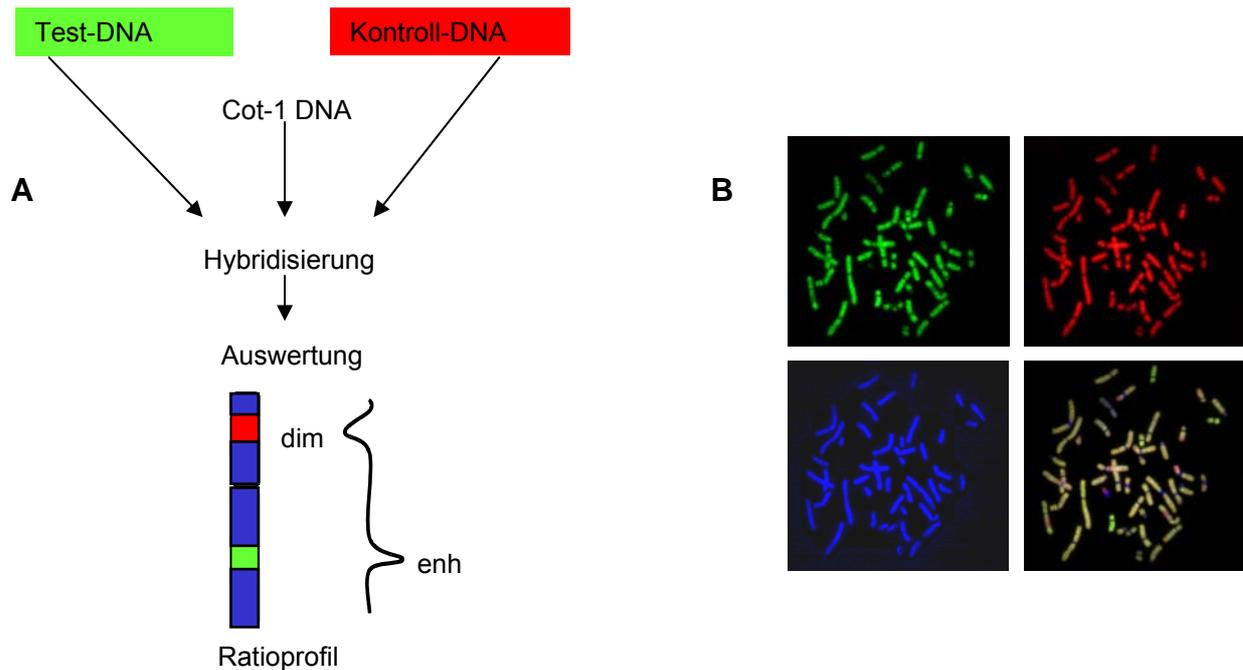


Abbildung 2.5: Comparative Genomic Hybridization (CGH).

A: Schematische Darstellung der CGH.

B: Darstellung der auf unauffällige menschliche Metaphasen hybridisierten Test-(grün) und Kontroll-(rot) DNAs und DAPI-Gegenfärbung (blau). Diese Bilder werden zusammengesetzt zu einem Gesamtbild.

2.7.1 Nick-Translation

Bei der Nick Translation (Rigby et al., 1977) werden bei der Test- und Kontroll-DNA jeweils einzeln durch die Verwendung der DNase I Einzelstrangbrüche (Nicks) in den DNA-Doppelstrang durch Spaltung der Phosphordiesterbrücke gesetzt, an denen sich die Polymerase I anlagert und Nukleotide an einer Seite des Doppelstrangs ersetzt. Da die Polymerase I Einzelstrangbrüche nicht überwinden kann, kommt es beim Zusammentreffen zweier Einzelstrangbrüche komplementärer Stränge zum Doppelstrangbruch und somit zur Entstehung kleinerer DNA-Fragmente, welche unter

optimalen DNase-Konzentrationen und bei Inkubation für ein definiertes Zeitintervall eine Länge zwischen 400-2000 Basenpaaren haben.

Material:

10x Nick-Translationspuffer:	500 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM MgCl ₂ 0,5 mg/ml nucleasefreies BSA
AGC-Mix:	0,3 mM dATP Li-salt 0,3 mM dCTP Li-salt 0,3 mM dGTP Li-salt 300 mM Tris-HCl (pH 7,5) 30 mM MgCl ₂
Test-DNA-Mix:	Spectrum Green mit dTTP (1 mM) im Verhältnis 1:1 gemischt mit dTTP (1 mM)
Kontroll-DNA-Mix:	Spectrum Orange mit dTTP (1 mM) im Verhältnis 1:1 gemischt mit dTTP (1 mM)
	1 Teil 0,3 mM dTTP-Mix + 2 Teile Aqua dest.
	DNA-Polymerase I (10 U/μl)
	Aqua dest.
	DNA

Methode:

Die Kontroll-DNA wurde mit Spectrum Orange und die Test-DNA mit Spectrum Green markiert. Die Markierungsreaktion von 1 μg gesamtgenomischer DNA erfolgte in Reaktionsansätzen von 50 μl Gesamtvolumen.

Pipettierschema der Nick-Translationen:

<u>Ansatz für Test-DNA</u>		<u>Ansatz für Kontroll-DNA</u>	
Aqua dest.	9,5 µl-X µl	Aqua dest.	19,5 µl-X µl
DNA (1 µg)	X µl	DNA (1 µg)	X µl
Spectrum Green	1,5 µl	Spectrum Orange	2,5 µl
10x NT-Puffer	5,0 µl	10x NT-Puffer	5,0 µl
AGC-Mix	10,0 µl	AGC-Mix	10,0 µl
dTTP-Mix	5,0 µl	dTTP-Mix	5,0 µl
DNA-Polymerase	8,0 µl	DNA-Polymerase	8,0 µl

Diese Ansätze wurden für 1 h 50min bei 15°C inkubiert und anschließend einige Minuten in 93°C überführt um die Reaktion zu stoppen. 8 µl jeder Probe wurden für 3 min bei 98°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Proben mit 3 µl Dye versetzt und die Probenlänge auf einem 1% Agarosegel bestimmt. Lagen die DNA-Längen zwischen 400-2000 bp, wurden die Proben weiterverarbeitet.

2.7.2 DNA-Fällung und Denaturierung der Sonden-DNA

Dem Reaktionsansatz aus Test- und Kontroll-DNA wird Cot-1 DNA hinzugefügt, um während der Hybridisierung die hochrepetitiven DNA-Sequenzen zu blocken.

Zur Fällung der DNA wird Ethanol hinzugegeben, hierdurch kann die DNA nicht in Lösung gehalten werden. Die Fällung erfolgt bei niedrigen Temperaturen, da die Löslichkeit der DNA hier geringer ist.

Um im Anschluss an die Fällung der DNA diese auf Metaphasepräparationen hybridisieren zu können, muss sie durch Hitze in Einzelstränge getrennt (denaturiert) werden. Je länger dabei die einzelnen DNA Fragmente sind, desto höher ist die Schmelztemperatur. Um diese zu senken, wird Formamid zugegeben. Es destabilisiert die Wasserstoffbrückenbindungen der komplementären Nukleotide und setzt mit jedem Prozentpunkt in der Lösung die Schmelztemperatur der DNA um 0,72°C herab. Dextransulfat wird dem Ansatz in gleicher Menge zugegeben. Dabei handelt es sich um ein hochmolekulares Polysaccharid-Polymer, das gut wasserlöslich ist. Das in Lösung befindliche Polymer erhöht sowohl die Hybridisierungsraten als auch die Hybridisierungsempfindlichkeit.

Material:

Test- und Kontroll DNA

Glycogen

Cot-1 DNA

Natriumacetat 3 M

Ethanol 70%

Formamid

Mastermix (4x SSC, 20% Dextransulfat)

Methode:

Je 200 ng (10 µl) Test-DNA und 200 ng (10 µl) Kontroll-DNA wurden mit 1 µl Glycogen, 10 µl Cot-1 DNA, 75 µl Ethanol und 3 µl Natriumacetat gemischt und bei -80°C für 1 Stunde gefällt. Nach 25 Minuten Zentrifugieren bei 14000 rpm wurde kurz mit 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 14000 rpm für 15 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 5 µl Formamid wurde das Pellet für 30 min bei 37°C gelöst und gevortext. Es folgte eine Zugabe von 5 µl Mastermix und Mischen der Probe. Anschließend wurde die Sonde bei 73°C für 6 min denaturiert.

2.7.3 RNase-Verdau der Chromosomenpräparationen

Siehe 2.6.3.2

2.7.4 Denaturierung der chromosomalen Ziel-DNA

Nach der Denaturierung der chromosomalen Ziel-DNA mittels Natriumhydroxid wird sie durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert um ihre Stabilität zu verringern.

Material:

Ethanol abs. (für aufsteigende Alkoholreihe: 30%, 50%, 70%, 100%)

2x SSC

0,1x SSC

0,07N NaOH (3,5 ml 2N NaOH + 96,5 ml Aqua dest.)

Methode:

Nach dem RNase-Verdau wurden die Objektträger für 30 min in 2x SSC bei 70°C überführt und anschließend bei Raumtemperatur auf 37°C abgekühlt. Nachdem sie für 1 min in 0,1x SSC getaucht wurden, erfolgte die Denaturierung der chromosomalen Ziel-DNA für 1 min bei 0,07N NaOH. Zum Äquilibrieren wurden die Präparate jeweils für 1 min durch 4°C kaltes 0,1x SSC und 2x SSC geführt und anschließend zur Dehydrierung durch die aufsteigende Ethanolreihe. Sie wurden für 10 min auf der Wärmeplatte getrocknet.

2.7.5 Hybridisierung

Die Hybridisierungsdauer beträgt zwischen 48-73 h, sollte diesen Zeitraum jedoch nicht überschreiten, da dies zum Austrocknen der Probe führen kann. Auf eine zuvor gekennzeichnete Fläche auf dem Objektträger wurden 14 µl der Sonde aufgetragen, mit einem Deckglas versehen und die Ränder mit Fixogum luftdicht verschlossen. So wurden die Objektträger bei 37°C hybridisiert.

2.7.6 Waschschritte nach der Hybridisierung

Material:

Waschlösung I (0,4xSSC/0,3% NP-40)

Waschlösung II (2xSSC/0,1% NP-40)

DAPI

Aqua dest.

Antifading

Methode:

Nach der Hybridisierung wurde das Fixogum vom Objektträger gelöst und das Deckglas vorsichtig abgezogen. Die Objektträger kamen für 2 Minuten in die auf 73°C vorgeheizte Waschlösung I und wurden anschließend kurz in die bei RT vorliegende Waschlösung II getaucht. Zur Gegenfärbung der Metaphasen wurden die Objektträger für 13 Minuten im Dunkeln mit DAPI-Färbelösung gefärbt. Nach Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Objektträger getrocknet, mit Antifading beschichtet und einem Deckglas versehen.

2.7.7 Auswertung

Die Auswertung der CGH erfolgte mit den gleichen Spezifikationen der Filterkombinationen wie unter 2.6.5 in Tabelle 2.2 beschrieben.

Die Metaphasen, die zur Analyse verwendet wurden, mussten folgende Kriterien erfüllen:

1. Intensive und gleichmäßige Hybridisierung
2. Keine Überlagerung der Chromosomen
3. Gleichmäßige Hintergrundfluoreszenz
4. Die Fluoreszenzintensität sollte in verschiedenen Metaphasen gleich stark sein

Geeignete Metaphasen wurden durch die verschiedenen Filter aufgenommen. Eine Karyotypisierung erfolgte anhand der DAPI-Färbung.

Nach der Karyotypisierung wurden die Chromosomen begradigt, die Zentromerposition bestimmt und die Metaphasen anschließend anhand des Bildverarbeitungsprogramms ISIS (MetasystemsTM) analysiert und Ratioprofile berechnet.

2.8 Statistische Methoden

2.8.1 Berechnung der Cut-Off-Level für Interphase-FISH

Der Cut-Off bezeichnet die Grenze, ab welchem Wert positiv ausgewertete Signale als richtig positive gewertet werden können. Den Cut-Off erhält man durch Analyse an gesunden Kontrollen, indem die falsch positiv ausgewerteten Signale zur Berechnung herangezogen werden. Aus ihnen ermittelt man die Standardabweichung, multipliziert sie mit drei und addiert sie zum errechneten Mittelwert.

$$\text{Cut - Off} = \text{Standardabweichung} \times 3 + \text{Mittelwert}$$

2.8.2 Berechnung der Hybridisierungseffizienz

Die Hybridisierungseffizienz gibt an, wie viele der durchgeführten Analysen ausgewertet werden konnten.

$$\text{Hybridisierungseffizienz} = \frac{\text{Anzahl der auswertbaren Versuche} \times 100\%}{\text{Versuche gesamt}}$$

2.8.3 Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein angewendeter Test bei einer kranken Person ein richtiges (d.h. positives) Ergebnis aufweist, die Spezifität ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine nicht erkrankte Person ein richtiges (d.h. negatives) Ergebnis erhält.

2.8.4 χ^2 -Test nach Pearson

Dieser Test wird angewendet zur Überprüfung der Signifikanz von Zusammenhängen zwischen zwei Variablen in Kreuztabellen durch Überprüfung der Unabhängigkeit von Variablen und damit indirekt der Zusammenhang der Merkmale. Es wird dabei die empirisch beobachtete Verteilung mit einer erwarteten Verteilung verglichen. Die erwartete Verteilung ist diejenige, die auftreten würde, wenn zu den beiden Variablen keine Beziehung bestünde, wenn sie also voneinander unabhängig wären.

2.8.5 Relatives Risiko

Das relative Risiko ist ein Zusammenhangsmaß zur Risikoeinschätzung in Kohortenstudien. Es gibt an, wie hoch gegenüber dem Durchschnitt das relative Risiko für eine bestimmte Gruppe ist, dass ein bestimmtes Ereignis eintritt.

2.8.6 Kaplan-Meier-Methode

Die Kaplan-Meier-Methode wird verwendet zur Berechnung von (kumulativen) Überlebenswahrscheinlichkeiten. Es werden Wahrscheinlichkeiten berechnet, mit welcher bestimmte Ereignisse im zeitlichen Verlauf auftreten oder nicht. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten der noch Lebenden werden immer dann, wenn für einen Fall das Ereignis eintritt, neu berechnet. Dabei werden auch diejenigen Fälle berücksichtigt, bei denen das Ereignis bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht eingetreten ist.