

Neue Fluoreszenzmethoden zur strukturellen
und funktionellen Genomanalyse
(Fish and Chips)

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Tanja Hardt
aus Seelbach

angefertigt am
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik
Berlin-Dahlem

Berlin, im Juli 2001

The most beautiful thing we can experience is the mysterious.
It is the source of all true art and science.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Grundlagen zur strahleninduzierten genomischen Instabilität	11
2.1	Strahleninduzierte Schäden der DNS	11
2.2	Auswirkungen genomischer Instabilität	13
2.2.1	Verzögerte Mutationsauslösung	13
2.2.2	Verzögerter Rückgang der Teilungsfähigkeit	14
2.2.3	Chromosomeninstabilität	16
2.2.4	Weitere Folgen genomischer Instabilität	20
2.3	Natur strahleninduzierter genomischer Instabilität	21
2.3.1	Einfluß von Strahlenqualität und Dosis	21
2.3.2	Genetische Faktoren	22
2.3.3	Mögliche Mechanismen der induzierten genetischen Instabilität	23
2.4	Strahleninduzierte genomische Instabilität und Krebsentstehung	24
2.5	Zusammenfassung	25
3	Methodische Grundlagen der modernen molekularzytogenetischen Analysen	27
3.1	24-Farben-Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	28
3.1.1	FISH	28
3.1.2	M-FISH und SKY	29
3.1.3	Neue Methoden der Vielfarben-FISH	31
3.1.4	„Bar-Kodierung“ von Chromosomen mit Vielfarben-FISH	33
3.1.5	SKY und Vielfarben-FISH in der strahlenbiologischen Forschung	35
3.2	Matrix-CGH	38
3.2.1	Chromosomale CGH (Comparative Genomic Hybridization)	38
3.2.2	DNS-Chiptechnologie	40
3.2.3	Matrix-CGH	44
3.3	Kombination von CGH und SKY zur Unterscheidung mütterlicher und väterlicher Chromosomen	47
3.3.1	genomische Prägung - „Imprinting“	47

3.3.2	Komparative Hybridisierung und SKY-Analyse	48
4	Material und Methoden	51
4.1	Sonden und Sondenherstellung	51
4.1.1	Genomische DNS	52
4.1.2	DOP-PCR-Produkte	53
4.1.3	CTA ₄ -DOP-PCR-Produkte	54
4.1.4	Inter-Alu-PCR-Produkte	54
4.1.5	C ₀ t-1 DNS	55
4.1.6	Inter-B1-PCR-Produkte der Maus	56
4.2	Chipherstellung	56
4.2.1	Sonden auf dem Chip	56
4.2.2	Spotten	57
4.3	Markierung	58
4.3.1	PCR-Markierung	58
4.3.2	„Nick-Translation“	62
4.3.3	Random Priming	62
4.4	Hybridisierung	65
4.4.1	Präparation der Objektträger	65
4.4.2	24-Farben-FISH	67
4.4.3	CGH auf Maushybridchromosomen	68
4.4.4	CGH auf Chips	68
4.5	SpectraCube und Spectral Karyotyping (SKY)	69
4.5.1	Zusammensetzung des SKY-Systems	70
4.5.2	Fourierspektroskopie	70
4.5.3	Klassifikation der Chromosomen mit SKY	72
4.6	Bestrahlung und Kultivierung von P3 Zellen	73
4.7	Auswertung der CGH-SKY Hybridisierungen	73
4.7.1	Spektrale Bildanalyse	73
4.7.2	Statistische Auswertung	75
4.8	Auswertung der CGH-Chips	75
5	Ergebnisse	79
5.1	Vielfarben-FISH und SKY	79
5.1.1	Analyse von komplexen Chromosomenaberrationen	79
5.1.2	FISH-Bandierung der Chromosomen 2 und X	85
5.2	Chromosomenaberrationen und genomische Instabilität nach Röntgenstrahlung	91
5.3	Matrix-CGH	99
5.3.1	Komparative Hybridisierung am Beispiel von Patienten mit multiplen X-Chromosomen	100
5.3.2	Komparative Hybridisierung weiblicher und männlicher gesamtgenomischer DNS	114

5.4	SKY und CGH zur Unterscheidung väterlicher und mütterlicher Chromosomen bei Maushybriden	126
5.5	Zusammenfassung der wichtigsten Methoden	135
6	Diskussion	137
6.1	Multicolor-FISH und Spectral Karyotyping	137
6.1.1	Analyse komplexer Chromosomenaberrationen	137
6.1.2	FISH-Bandierung der Chromosomen 2 und X	141
6.2	Chromosomenaberrationen und genomische Instabilität nach Röntgenstrahlung	143
6.3	Matrix-CGH	146
6.4	SKY und CGH zur Unterscheidung mütterlicher und väterlicher Chromosomen	150
7	Zusammenfassung	153
	Glossar	154
	Literaturverzeichnis	160
	Danksagung	176

Kapitel 1

Einleitung

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) bietet eine Vielzahl hochentwickelter Untersuchungsmethoden zur Analyse chromosomaler Veränderungen des Genoms. Dazu gehören u. a. die „Vergleichende Genomische Hybridisierung“ (Comparative Genomic Hybridisation, CGH) und die Vielfarben-FISH mit den zwei Methoden M-FISH (Multicolor-FISH) und SKY (Spectral Karyotyping, Spektrale Karyotypisierung).

Bei chromosomalen Veränderungen unterscheidet man zwischen strukturellen Chromosomenaberrationen, zu denen Austauschaberrationen (Translokationen) und Inversionen gehören und numerischen Veränderungen, die Verlust oder Gewinn eines ganzen Chromosoms beinhalten. Translokationen bezeichnet man als balanciert, wenn es sich um einen reziproken Austausch von Chromosomensegmenten handelt, bzw. als unbalanciert, wenn Chromosomenabschnitte verloren gehen. In der Humangenetik werden Chromosomenveränderungen, die in jeder Körperzelle auftreten, als konstitutionelle Chromosomenaberrationen bezeichnet, während man bei einzel auftretenden Veränderungen von erworbenen Chromosomenveränderungen spricht.

Mit 24-Farben-FISH lassen sich alle menschlichen Chromosomen durch kombinatorische Markierung mit nur fünf Fluoreszenzfarben unterscheiden. Dadurch wird eine spezifische Färbung jedes der 24 menschlichen Chromosomen in einem Hybridisierungsexperiment möglich. Diese Methode eignet sich insbesondere zur Untersuchung von Translokationen, da sich die ausgetauschten Segmente zweier Chromosomen durch ihre unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung leicht aufdecken lassen.

Die CGH deckt hingegen numerische Unterschiede, Deletionen und Amplifikationen einzelner Chromosomen oder Chromosomenabschnitte, auf. Durch vergleichende Hybridisierung verschiedenfarbig markierter Genome auf eine Kontrollmetaphase können genomische Imbalancen zwischen zwei Genomen detektiert werden. Deletionen und Amplifikationen werden durch Unter- bzw. Überrepräsentation einer Hybridisierungssonde auf den betreffenden Chromosomenregionen sichtbar. Ein limitierender Faktor der CGH ist die Notwendigkeit, komple-

xe Strukturen auszuwerten, da die Hybridisierung auf Chromosomenpräparaten stattfindet. Mit der Entwicklung der DNS-Chip-Technologie kann eine Vielzahl von DNS-Sonden auf kleinstem Raum aufgebracht werden. Diese Technik ermöglicht es, das Auflösungsvermögen der chromosomalen CGH um ein Vielfaches zu erhöhen. Der Chip ersetzt dabei die Chromosomenpräparate. Mit dieser Methode können ganze Genome in einem Hybridisierungsexperiment gleichzeitig auf Gewinn oder Verlust definierter DNS-Sequenzen (Sonden) untersucht werden. Die Hybridisierungsunterschiede werden statt auf den Chromosomen auf den „gespotteten“ DNS-Sequenzen festgestellt.

In dieser Arbeit wurden mehrere Methoden zur Detektion von strukturelle und numerischen Aberrationen etabliert. Die Möglichkeiten und Limitationen von SKY zur 24-Farben-FISH-Analyse wurde zunächst am Beispiel von Translokationsfällen demonstriert. Dabei wurde u. a. ein Patient mit Moebiusyndrom untersucht, der eine äußerst komplexe Translokation zwischen vier Chromosomen aufwies.

Eine neuartige Anwendung von SKY war die Untersuchung bestrahlter menschlicher Zellen zum Nachweis von Chromosomenaberrationen als Folge einer strahleninduzierten genetischen Instabilität. Strukturelle Chromosomenveränderungen sind seit langem Untersuchungsobjekt der biologischen Strahlenforschung. Mit der Methode der Spektralen Karyotypisierung (SKY) eröffnete sich die Möglichkeit, alle Chromosomen einer Zelle in einem Experiment auf Translokationen zu untersuchen und genomische Instabilität in bestrahlten Zellkulturen festzustellen. Strahleninduzierte genetische Instabilität gehört zu den aktuellsten und umstrittensten Themen der modernen Strahlenbiologie. Der experimentelle Ablauf und die Anwendung der SKY ermöglichen es, alle stabilen Translokationen zu registrieren und unmittelbar nach Bestrahlung ausgelöste Aberrationen von denen zu unterscheiden, die durch Instabilität hervorgerufen wurden.

Als Beispiel zur Erhöhung des Auflösungsvermögens der Vielfarben-FISH wurde eine Fluoreszenzbandierung verschiedener Fluoreszenzfarben individueller Chromosomen durchgeführt. Zur Untersuchung chromosomaler Imbalancen wird in dieser Arbeit die Etablierung einer Matrix-CGH vorgestellt. Diese Methode bedient sich der Chiptechnologie, um Sonden auf kleinstem Raum, auf einem Chip, aufzubringen. Als weitere Neuentwicklung zur Unterscheidung zwischen väterlichen und mütterlichen Chromosomen wird eine Kombination chromosomaler CGH und der SKY vorgestellt. Dabei wird eine herkömmliche CGH auf Metaphasechromosomen mit SKY-Systemen ausgewertet. Dadurch eröffnen sich neue technische Möglichkeiten zum Nachweis von genomischen Imprintingdefekten.

Durch das Humangenomprojekt steigt die Anzahl der zur Verfügung stehenden DNS-Sonden zur Analyse von Chromosomenaberrationen ständig an. Damit vervielfältigen sich die Anwendungsmöglichkeiten für moderne molekularzytogenetische Methoden (FISH und CHIPs).

Kapitel 2

Grundlagen zur strahleninduzierten genomischen Instabilität

2.1 Strahleninduzierte Schäden der DNS

Vor rund 70 Jahren (GATES [35]) wurden von erste Hinweise gefunden, daß die DNS (Desoxyribonukleinsäure) das primäre Ziel der Strahlenschädigung ist. In den Experimenten von TAYLOR *et al.* [147] wurde nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen eine Abnahme der Viskosität von DNS *in vitro* gefunden. Ein paar Jahre später veröffentlichte ALPER [2], daß Bakteriophagen, die zum größten Teil aus DNS bestehen, mit ansteigender Strahlendosis zunehmend inaktiviert werden. Eine Übersicht zur biologischen Strahlenwirkung findet man bei KIEFER [70].

Ionisierende Strahlung kann einen DNS-Schaden sowohl direkt durch Photonen bzw. Ionen auslösen, als auch indirekt durch Radiolyseprodukte des Wassers. Strahlung verursacht Ionisation ($\text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{OH}^-$) und Spaltung ($\text{H}_2\text{O} = \text{H}^\bullet + \text{OH}^\bullet$) des Wassers. Folgeprodukte dieser Reaktion sind u. a. freie Radikale und die hochreaktiven Produkte OH^\bullet , H^\bullet , sowie durch Rückreaktion entstandene Folgeprodukte H_2^- und H_2O_2 . Durch direkt und indirekte Schäden entstehen Veränderungen der DNS: Einzelstrangbrüche (ESB), Doppelstrangbrüche (DSB), Basenmodifikationen, Desoxyriboseveränderungen, Verbindungen innerhalb eines und zwischen verschiedenen DNS-Molekülen (inter- und intra-DNS-Strang-Crosslinks) sowie Verbindungen von DNS mit Proteinen (DNS-Protein-Crosslinks).

LET = „Linear-Energy-Transfer“, die lokal absorbierte Energie pro durchlaufener Wegstrecke, ist ein Maß zur Beschreibung der Strahlenqualität. Man unterscheidet im wesentlichen zwischen dünnionisierenden Strahlen mit niedrigem LET und dictionisierenden Strahlen mit hohen LET-Werten. Dünnionisierende Strahlung, wie Röntgen- und γ -Strahlung, löst ein Drittel der Schäden direkt durch Strahlung aus, der restliche Anteil durch indirekte Effekte. Bei dictionisierender Strahlung (hoher LET), bei α -Strahlen, die beispielsweise von Radon, Radonzerfallsprodukten und Plutonium-238 emittiert werden, oder schweren Ionen

Zeit [sec]	Strahleninduzierte Ereignisse
$10^{-16} - 10^{-13}$	Phys. und chem. Abläufe: Energiedeposition und Chemie freier Radikale Energieverlust sekundärer Elektronen und Rückgang zu thermischen Energien
10^{-9}	Hydroxyl-Radikale reagieren in der Zelle
10^{-3}	Freie Radikale reagieren mit Sauerstoff
10^0	Reaktion der freien Radikale ist abgeschlossen
Frühe biologische Reaktionen: genomische Instabilität wird etabliert	
$10^1 - 10^4$	Signaltransduktion Reparatur von DNS Schäden
$10^3 - 10^5$	Einleitung der genomischen Instabilität Veränderungen der Genexpression
$10^5 - 10^6$	Fortschreiten der genomischen Instabilität Zellzykluseffekte
Späte biologische Reaktionen: Konsequenzen der genomischen Instabilität	
$10^6 - 10^7$	Absterben der Zellen und Anstieg der Mutationen
$10^8 - 10^9$	Transformation und Krebsentstehung

Tabelle 2.1: Zeitlicher Ablauf strahleninduzierter Prozesse (aus LIMOLI *et al.* [81])

dominiert der Effekt der Schäden, die direkt durch Strahlung ausgelöst werden.

Der LET steht in Zusammenhang mit der RBW, der Relativen Biologischen Wirksamkeit. Diese wird bestimmt durch den Quotienten der Dosen einer Teststrahlung und Röntgen- oder γ -Strahlung als Referenz, die den gleichen Effekt auslösen. Der Zusammenhang zwischen LET und RBW ist darauf zurückzuführen, daß Strahlung eines höheren LETs einen gehäuften Schaden („cluster“) in einem kleinen Bereich und damit einen komplexen Schaden in dem betroffenen DNS-Abschnitt erzeugt.

Die durch ionisierende Strahlung verursachten DNS-Schäden bewirken im biologischen System u. a. Genmutationen, Chromosomenaberrationen, zelluläre Transformation und Zelltod. Die strahleninduzierten Schäden (Doppel- und Einzelstrangbrüche) führen durch Replikationen und durch falsche enzymatische Reparatur zu einer irreversiblen Veränderung des DNS-Moleküls. Diese Prozesse finden in den ersten Zellteilungen nach Bestrahlung statt und führen zu genetischen Veränderungen oder einem Absterben der Zelle. Die lange implizierte Rolle der Doppelstrangbrüche in der Ausbildung von chromosomaler Aberrationen wurde von NATARAJAN *et al.* [110] 1980 erstmals indirekt bestätigt.

Neben den unmittelbaren Schäden treten lange nach der Bestrahlung weitere Veränderungen auf, die auf eine strahleninduzierte genomische Instabilität zurückgeführt werden. Dieser Effekt wurde schon vor über 30 Jahren erwähnt (SINCLAIR [141], NIAS *et al.* [111] und WESTRA UND BARENDSEN [160]), fand aber erst in den letzten 10 Jahren gesteigertes Interesse. Grund dafür ist die

eine Korrelation zwischen genomischer Instabilität und Krebs. Der Verlust der Genomstabilität ist oft der erste Schritt bei der Krebsentstehung. Die strahleninduzierte genomische Instabilität kann mit den Kenntnissen der herkömmlichen Strahlenbiologie nur schwer bzw. nicht erklärt werden. Eine Übersicht zum zeitlichen Ablauf der strahleninduzierten Reaktionen in biologischem Gewebe, ausgehend von den physikalischen und chemischen Prozessen bis hin zur möglichen Karzinogenese, wird in Tabelle 2.1 wiedergegeben.

Im Folgenden werden die Auswirkung der genomischen Instabilität und die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen besprochen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der chromosomalen Instabilität mit der sich diese Arbeit beschäftigt. Außerdem wird versucht, die Natur dieser Instabilität genauer zu beleuchten, indem auf den Einfluß der Strahlenqualität und die möglichen Targets zur Induktion eingegangen wird.

2.2 Auswirkungen genomischer Instabilität

2.2.1 Verzögerte Mutationsauslösung

Für Mutationsanalysen benötigt man Modellsysteme, die es ermöglichen, Mutationen in einem Gen, z. B. dem Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (*HPRT*)-Locus, makroskopisch zu entdecken. Das *HPRT*-Gen kodiert für ein Enzym zur Wiederverwertung von Purin bei der Nukleinsäuresynthese. Das *HPRT*-Gen eignet sich für Mutationsuntersuchungen, da Nullmutanten im Gegensatz zum Wildtyp resistent sind gegenüber der Purinanaloge 6-Thioguanin (6-TG) und bei Anwesenheit von 6-TG überlebensfähig sind. Da das *HPRT*-Gen auf dem X-Chromosom liegt, genügt eine einzige inaktivierende Mutation, um einen 6-TG-resistenten Phänotyp zu erzeugen.

Spät auftretende Genmutationen nach Bestrahlung wurden von HARPER *et al.* [46] am Beispiel dieses *HPRT*-Modells untersucht. Die Proliferation von *HPRT*-defizienten Zellen wurde durch Einbau von Tritium-Thymidin nachgewiesen. In einem Autoradiogramm konnten Mutanten von Wildtypzellen unterschieden werden, und der Zeitpunkt des Auftretens der Mutation konnte durch die Anzahl der vorangegangenen Zellteilungen abgeschätzt werden. Nach α -, (Neutronen-) und Röntgenstrahlung wurde ein 5-facher Anstieg nicht klonaler Mutationen in den klonalen Nachkommen der bestrahlten Zellen beobachtet. Allerdings konnten mit dieser Methode keine Informationen zur molekularen Struktur der genetischen Veränderungen erhalten werden.

LITTLE *et al.* [89] [88] benutzten ebenfalls das *HPRT*-System, um strukturelle Veränderungen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Zunächst wurde die Anzahl der durch strahleninduzierte Instabilität ausgelösten Mutationen ermittelt. Während in den unbestrahlten Kontrollen 1% der Zellpopulation spontane Mutationen zeigte, fand man in 8-9% der zuvor bestrahlten Zellen *HPRT*-negative Mutanten. Über einen Dosisbereich von 2-12 Gy war keine Dosisabhängigkeit

nach Röntgenbestrahlung feststellbar. Die Anzahl der Mutationen bei 2 Gy α -Bestrahlung war vergleichbar häufig (9% instabile Klone). Bei der Analyse der molekularen Veränderungen der durch Instabilität erzeugten Klone wurden jedoch Unterschiede zu direkt durch Bestrahlung verursachten Mutationen deutlich. Mutationen, die direkt durch Bestrahlung (Röntgenstrahlung) gesetzt wurden, bestanden zu über 75% aus partiellen Deletionen, 20% Punktmutationen und einem kleineren Teil aus Deletionen des gesamten Gens. Das Mutationsspektrum der instabilen Klone glich dem spontaner Mutationen. Der Großteil (>80%) der Veränderungen waren Punktmutationen, der kleinere Teil partielle Deletionen und einige größere Deletionen. Im Gegensatz zu direkt induzierten Mutationen waren bei den Deletionen, die durch Instabilität verursacht wurden, regelmäßig 2 oder mehr nicht zusammenhängende Exons ausgefallen; dabei waren die Genenden auffallend häufig beteiligt.

DUBROVA *et al.* [27] brachten den Beweis, daß sich strahleninduzierte genetische Instabilität *in vivo* über zwei Generationen übertragen läßt. Männliche CBA/H Mäuse wurden mit Spaltneutronen bestrahlt und die Nachkommen in der F2 Generation auf Mutationen in den „Expanded Single-Tandem Repeat“ (ESTR)- Loci untersucht. Es zeigte sich ein 6-facher Anstieg der Mutationsrate in den Nachkommen der männlichen F1 Generation und eine 3,5-fache Erhöhung in den Nachkommen der weiblichen F1 Generation. Bei den Nachkommen der bestrahlten Mäuse hat offenbar eine Destabilisierung der ESTR- Loci stattgefunden. Die Mutationen könnten sehr früh bei der Entwicklung der Keimzellen aufgetreten sein und zu einer Mosaikbildung geführt haben, die sich in den Nachkommen dieser Mäuse ausprägt. Da die Mutationen von unabhängigen Spermazellen stammten, kann die erhöhte Mutationsrate der ESTR-Loci nicht durch *de-novo*-Mutationen in DNA-Reparatur-Genen entstanden sein. Also liegt der Schluss nahe, daß die Strahlung eine universelle Instabilität auslöste.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß nach Bestrahlung verspätet Mutationen auftreten, die nicht nur in Zellkultur nach mehreren Zellteilungen, sondern auch *in vivo* nach mehreren Generationen nachgewiesen werden können. Molekulare Untersuchungen haben gezeigt, daß es einen deutlichen Unterschied zu Mutationen gibt, die direkt durch Bestrahlung ausgelöst werden. Der Mechanismus der verspäteten strahleninduzierten Instabilität führt zu einer universale Destabilisierung des Genoms.

2.2.2 Verzögerter Rückgang der Teilungsfähigkeit

Schon in den 60er Jahren wurde festgestellt, daß Populationen, die von bestrahlten Zellen abstammen, ein verändertes Zellteilungsverhalten zeigen, das sich als verschlechtertes Wachstum und Ausbildung kleiner Kolonien bei einigen Zellen der Kultur bemerkbar machte (SINCLAIR [141], NIAS *et al.* [111] und WESTRA UND BARENDSEN [160]). HAEFNER UND STRIEBECK [43] bezeichneten die Beobachtung bei *E. coli* als lethale Segregation („lethal sectoring“). Dieses Phänomen

wurde zunächst durch strahleninduzierte Mutationen erklärt, die eine reduzierte Überlebensfähigkeit verursachen.

In neueren Untersuchungen von SEYMOR *et al.* [138], GORGOJO UND LITTLE *et al.* [38] und MENDOCA *et al.* [103] wurde das Phänomen des verspätet auftretenden Zelltodes gefunden. Dabei wurde das Zellüberleben („Plating Efficiency“) von Zellklonen nach akuter Bestrahlung analysiert. Es zeigte sich, daß das verzögert auftretende Zellsterben häufiger auftrat und länger andauerte als zuvor angenommen. Der verspätete Effekt auf das Zellüberleben wurde durch Mutationen in essentiellen Genen (Letalmutationen) erklärt.

Der Prozentsatz der betroffenen Zellen, die übertragbare Defekte zeigten, war allerdings zu groß (teilweise bis zu 50%), um durch Genmutation ausgelöst zu werden. CHANG UND LITTLE [17] diskutierten als Alternative einen verspätet auftretenden Zelltod. Experimente mit bestrahlten CHO-Zellen zeigten, daß DNS-Schäden in bestrahlten Zellen über viele Generationen weitergegeben werden können und sich durch schlechteres Wachstum und Verlust der Teilungsfähigkeit bemerkbar machen. In weiteren Untersuchungen demonstrierten sie, daß der verspätete Zelltod durch Doppelstrangbrüche und deren Reparatur ausgelöst werden kann [19]. Zellhybridisierungen der bestrahlten CHO Klone mit somatischen Zellen zeigten, daß es sich beim späten Zelltod um einen dominanten Phänotyp handelt [18]. Dies läßt auf epigenetische Vorgänge schließen.

Wie es schon für Mutationen beschrieben wurde, ist auch der verspätete Zelltod *in vivo* über mehrere Generationen übertragbar. In den Experimenten von WILEY *et al.* [162] wurden Embryonen im 4-Zellstadium der F1 und F2 Generationen γ -bestrahlter männlicher Mäuse mit Embryonen unbestrahlter Mäuse fusioniert. Die Zellen der Chimäre konnten durch Fluoreszenzfärbung eines Embryos ihrer Herkunft nach identifiziert werden. Die Proliferationsraten der Zellen verschiedenen Ursprungs wurden nach etwa 35 Stunden verglichen. Die Nachkommen bestrahlter Tiere zeigten für die F1 und F2-Generationen einen gleichbleibenden Nachteil in der Proliferation der embryonalen Zellen. Diese Beobachtung wurde als eine induzierte Streßempfindlichkeit der bestrahlten Mäuse interpretiert.

In den klonalen Abkömmlingen bestrahlter (Röntgen- und α -Strahlung) Zellen fand man eine ansteigende Rate apoptotischer Zellen (siehe KADHIM *et al.* [60] und JAMALI *et al.* [56]). Die lange nach Bestrahlung auftretende Apoptose ist sehr wahrscheinlich auf spät auftretende Schäden der DNS zurückzuführen. In Röntgenbestrahlten V79-Zellen wurde ein dosisabhängiger beständiger Anstieg der Apoptose bis zu zwei Wochen nach Bestrahlung festgestellt. JAMALI *et al.* [56] fand eine Dosisabhängigkeit bis zu 3-4 Gy mit anschließender Sättigung. Diese Dosisabhängigkeit gleicht der, die lange zuvor von SEYMOR *et al.* [138] beschrieben wurde.

2.2.3 Chromosomeninstabilität

Chromosomenaberrationen gehören zu den am häufigsten analysierten Endpunkten genomischer Instabilität und werden oft mit strahleninduzierter Krebsentstehung in Verbindung gebracht (siehe Kapitel 2.4). Vor ca. 15 Jahren konnte gezeigt werden, daß in bestrahlten menschlichen Fibroblastenzellen eine abnormale Klonbildung auftrat. Diese Beobachtung versuchte man mit altersbedingter Akkumulation genetischer Veränderungen zu erklären (KANO UND LITTLE 1985 [64]). PAMPFER UND STREFFER berichteten 1989 erstmals von einer übertragbaren strahleninduzierten chromosomalen Instabilität in embryonalen Mauszellen [115]. Seitdem wurden viele Studien veröffentlicht, die sich mit der chromosomalen Instabilität nach Bestrahlung beschäftigen. Der Mechanismus dieser induzierten Instabilität konnte bisher nicht geklärt werden.

Chromosomenveränderungen werden unterteilt in Chromatid- und Chromosomenaberrationen. Bei Chromatidaberrationen ist nur ein Chromatid eines Chromosoms an einer Veränderung beteiligt. Zu Chromatidaberrationen zählen Chromatidbrüche und Chromatidaustausche zwischen homologen Chromatiden (Schwesterchromatidaustausche) oder homologen Chromosomen. Strahleninduzierte Chromatidaberrationen sind auf eine Bestrahlung der Zelle in der Synthese- oder G₂-Phase zurückzuführen. Zu den Chromosomenaberrationen zählen Veränderungen, an denen beide Chromatiden eines Chromosoms in gleicher Weise beteiligt sind. Dazu gehören Deletionen, Chromosomentranslokationen und dizentrische Chromosomen. Chromosomenaberrationen entstehen durch eine Bestrahlung in der G₁-Phase oder aus Chromatidaberrationen nach einer Zellteilung. Die meisten Chromosomenaberrationen bleiben nach einer Zellteilung erhalten und sammeln sich im Genom an. Chromatidaberrationen sind charakteristisch für Aberrationen, die seit der letzten Zellteilung entstanden sind.

Die ersten Untersuchungen strahleninduzierter chromosomaler Instabilität wurden nach Hoch-LET-Bestrahlung vorgenommen. KADHIM *et al.* [61] führten Versuche an Knochenmarkzellen von CBA/H Mäusen durch. Nach dichtungisierender Bestrahlung mit α -Teilchen einer Plutonium-238-Quelle (LET 121keV/ μm^{-1}) konnten in den Nachkommen der exponierten Zellen chromosomale, nicht klonale Aberrationen gefunden werden. Dabei traten mehr Chromatidaberrationen als Chromosomenaberrationen auf. In parallel durchgeführten Experimenten mit Röntgenstrahlung wurde kein Effekt strahleninduzierter chromosomaler Instabilität registriert. Diese Beobachtungen wurden von SABATIER UND MARTIN [126] bestätigt. Sie wiederholten die Experimente mit menschlichen Fibroblasten und Hoch-LET-Bestrahlung über einen weiten LET-Bereich durch Bestrahlung mit drei verschiedenen Ionen (Neon: LET=386 keV/ μm^{-1} , Argon: LET=1207 keV/ μm^{-1} und Blei: LET=13600keV/ μm^{-1}). Während KADHIM *et al.* eine zufällige Verteilung der Chromosomenbruchpunkte beobachtete, stellten SABATIER UND MARTIN fest, daß die Telomerregionen überzufällig häufig an der Ausbildung von Aberrationen beteiligt sind. Folgeexperimente von KADHIM *et*

Strahlung	LET	Zellen	Aberrationen		Literatur
			C.-tid	C.-som	
γ - und Röntgenstrahlung	<1	Mausembryonen	++	++	WEISSENBORN UND STREFFER (1988) [159]
		Mausknochenmark (CBA/H)	-	-	KADHIM <i>et al.</i> (1992) [61]
		Maus-Brust-Epithel BALB/c	+++	+	PONNAIYA <i>et al.</i> (1997) [125]
		Maus-Brust-Epithel C57CL/6	-	-	PONNAIYA <i>et al.</i> (1997) [125]
		Mensch-Hamster Hybridzellen GM10115	+++	++	MARDER UND MORGEN (1993) [98] LIMOLI <i>et al.</i> (1997) [85]
		Mensch-Brust-Epithel MCF-10A	+++	+	PONNAIYA <i>et al.</i> (1997) [124]
		menschliches Knochenmark	+	++	KADHIM <i>et al.</i> (1995) [60]
		menschliche diploide Fibroblasten (HF12)	-	-	KADHIM <i>et al.</i> (1998) [62]
		menschliche diploide Fibroblasten (HF19)	++	+	KADHIM <i>et al.</i> (1998) [62]
		menschliche Lymphozyten	+	+++	HOLMBERG <i>et al.</i> (1993) [51]
2,2MeV Neutronen	20	menschliche diploide Fibroblasten (HF12)	-	-	KADHIM <i>et al.</i> (1998) [62]
		menschliche diploide Fibroblasten (HF19)	+++	+	KADHIM <i>et al.</i> (1998) [62]
1MeV Neutronen	57	Mausmilzzellen	-	-	BOUFFLER <i>et al.</i> (1996) [11]
0,43MeV Neutronen	75	Mensch-Brust-Epithel MCF-10A	+++	+	PONNAIYA <i>et al.</i> (1997) [124]

Tabelle 2.2: Übersicht zu Veröffentlichungen strahleninduzierter chromosomaler Instabilität (teilweise aus LIMOLI, 2000 [81] entnommen). Die Aberrationen sind unterteilt in Chromatid- (C.-tid) und Chromosomenaberrationen (C.-som). Der LET ist in $\text{keV}/\mu\text{m}^{-1}$ angegeben.

Strahlung	LET	Zellen	Aberrationen		Literatur
			C.-tid	C.-som	
3,3MeV α - Teilchen	120	Mausknochenmark (CBA/H)	+++	+	KADHIM <i>et al.</i> (1992) [61] LORIMORE <i>et al.</i> (1998) [90] WATSON <i>et al.</i> (1997) [157]
		Mausknochenmark (DBA/2)	+++	+	WATSON <i>et al.</i> (1997) [157]
		Mausknochenmark (C57BL/6)	+	-	WATSON <i>et al.</i> (1997) [157] [157]
		menschliches Knochenmark	+++	++	KADHIM <i>et al.</i> (1994, 1995) [59] [60]
		menschliche diploide Fibroblasten (HF12)	-	-	KADHIM <i>et al.</i> (1998) [62]
		menschliche diploide Fibroblasten (HF19)	+++	+	KADHIM <i>et al.</i> (1998) [62]
Eisen(1GeV)	146	Mensch-Hamster Hybridzellen GM10115	++	+	LIMOLI <i>et al.</i> [82]
Neon 10,7 MeV	386	menschliche Fibroblasten	?	++	SABATIER <i>et al.</i> 1992 [126] MARTINS <i>et al.</i> 1993 [99]
Argon 10,5 MeV	1207	menschliche Fibroblasten	?	++	SABATIER <i>et al.</i> 1992 [126] MARTINS <i>et al.</i> 1993 [99]
Gold(11GeV)	1450	Mensch-Hamster Hybridzellen GM10115	++	+	LIMOLI <i>et al.</i> [82]
Blei 9,5 MeV	136000	menschliche Fibroblasten	?	++	SABATIER <i>et al.</i> 1992 [126] MARTINS <i>et al.</i> 1993 [99]

Tabelle 2.3: Fortsetzung der Tabelle 2.2: Übersicht zu Veröffentlichungen strahleninduzierter chromosomaler Instabilität (teilweise aus LIMOLI, 2000 [81] entnommen). Die Aberrationen sind unterteilt in Chromatid- (C.-tid) und Chromosomenaberrationen (C.-som). Der LET ist in $\text{keV}/\mu\text{m}^{-1}$ angegeben.

al. [59] [60] mit menschlichen Knochenmarkzellen zeigten ähnliche Resultate für α -Bestrahlung. Zusätzlich konnte nach Röntgenbestrahlung ebenfalls eine Instabilität festgestellt werden, die sich in einer höheren Ausbeute an Chromosomen- statt Chromatidaberrationen äußerte [60].

Durch Röntgenstrahlung induzierte chromosomale Instabilität wurde von HOLMBERG *et al.* [51] [52] bei menschlichen T-Lymphozyten-Kulturen und von MARDER UND MORGAN [98] bei der somatischen Mensch-Hamster Hybridzelle GM10115 gefunden.

PONNAIYA *et al.* [124] führten die ersten Untersuchungen zur Auslösung von chromosomaler Instabilität mit Neutronen (0,43 MeV Neutronen) durch. Experimente mit menschlichen Epithelzellen MCF-10A zeigten, daß eine genomische Instabilität ausgelöst werden kann. Dabei wurden ähnlich wie in den mit γ -Strahlung durchgeführten Kontrollexperimenten mehr Chromatid- als Chromosomenaberrationen registriert. KADHIM *et al.* [62] führte vergleichbare Experimente mit menschlichen diploiden Fibroblasten zwei verschiedener Stämme (HF19 und HF12) durch. Dabei zeigte der HF19 Stamm bei allen Strahlenarten (2,2 MeV Neutronen-, Röntgen- und α -Strahlung) eine induzierte Instabilität, während beim HF12 Stamm keine Instabilität zu entdecken war.

Es zeigen also nicht alle Zelltypen nach Bestrahlung im gleichen Maße chromosomale Instabilität. Es gibt offenbar genetische Faktoren für die strahleninduzierte Instabilität eines Zelltyps. PONNAIYA *et al.* [125] demonstrierten in ihren Versuchen deutlich, daß der genetische Hintergrund für eine Auslösung genetischer Instabilität einen wesentlichen Einfluß hat. Brustepithel-Zellkulturen der beiden Mausstämme BALB/c und C57BL/6 wurden mit γ -Strahlung bestrahlt und die Chromatidbrüche nach bis zu 28 Verdoppelungen untersucht. Während die Zellen des BALB/c-Stammes einen Anstieg an Chromatidveränderungen aufgrund von Instabilität zeigten, verhielten sich die Zellen der C57BL/c Stammes wie unbestrahlte Kontrollzellen. Die Experimente von WATSON *et al.* zeigten bei der Untersuchung von Knochenmarkzellen des Mausstammes C57BL/6 nach α -Bestrahlung eine sehr geringe Instabilität (Chromatidaberrationen), während die Knochenmarkzellen von CBA/H und DBA/2 einen deutlichen Anstieg aufwiesen [157].

In vielen der aufgeführten Untersuchungen konnte keine eindeutige Dosis-Effektbeziehung gefunden werden, z. B. nach α -Bestrahlung von Mausknochenmarkzellen von LORIMORE *et al.* [90] und nach α - und γ -Bestrahlung einer menschlicher Keratinozyten Zelllinie von MOTHERSILL *et al.* [105]. Dagegen fanden MANTI *et al.* [97] nach Röntgen- und α -Bestrahlungen chinesischer Hamsterzellen V79 eine dosisabhängige Zunahme dizentrischer Chromosomen und Mikronuklei. Es ist wahrscheinlich, daß verschiedene Zellen unterschiedlich empfindlich für die Auslösung genomischer Instabilität sind. In den Experimenten von PONNAYIA *et al.* [124] und KADHIM *et al.* [62] fand man eine starke zeitabhängige Ausprägung der chromosomalen Instabilität.

LIMOLI *et al.* [86] untersuchten in ihrem Experiment am Beispiel der Mensch-

Hamster-Hybridzelllinie GM10115, ob DNA-Strangbrüche die Auslöser chromosomaler genomischer Instabilität sind. Bleomycin, Neocarzinostatin, Wasserstoffperoxid, Restriktionsendonukleasen und ionisierende Strahlung wurden auf ihre Wirkung untersucht, verspätet Chromosomenaberrationen hervorzurufen. Während eine Behandlung mit Restriktionsenzymen oder Wasserstoffperoxid, die einfache Läsionen der DNS verursachen, keine Instabilität hervorriefen, zeigten ionisierende Bestrahlung, Bleomycin und Neocarzinostatin vergleichbare Effekte bei der Auslösung chromosomaler Instabilität. DNS-Strangbrüche alleine lösen also keine Instabilität aus. Die Komplexität bzw. die Qualität der Strangbrüche trägt entscheidend zur Ausbildung genomischer Instabilität bei. LIMOLI *et al.* [84] zeigten in einer weiteren Arbeit, daß nach strangbruchinduzierender UV-Bestrahlung BRDU- und Hoechst 33258-behandelter Zellen Chromosomenaberrationen als Folgen genomischer Instabilität auftreten. Eine solche photochemische Behandlung kann folglich ebenfalls eine chromosomale Instabilität auslösen.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß chromosomale genomische Instabilität prinzipiell durch Hoch- und Niedrig-LET-Bestrahlung auslösbar ist. Unterschiede in der Expression strahleninduzierter Instabilität liegen im wesentlichen am genetischen Hintergrund der bestrahlten Zellen. Die Ausbildung chromosomaler Instabilität wird nicht alleine durch DNS-Strangbrüche sondern durch komplexen DNS-Schäden ausgelöst. Die Tabellen 2.2 und 2.3 geben eine Übersicht über relevante Publikationen zur chromosomalen genomischen Instabilität nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenarten und unterschiedlichem LET.

2.2.4 Weitere Folgen genomischer Instabilität

Neben Chromosomenaberrationen, Mutationen und Überleben, das als klonale Heterogenität oder geringe „Plating Efficiency“ erkennbar ist, gibt es weitere Endpunkte genomischer Instabilität. Beispielsweise der Anstieg von Mikronuklei, der von JAMALI UND TROTT [56] durch Röntgenbestrahlung und von MANTI *et al.* [97] durch Röntgen-, Neutronen- und α -Bestrahlung ausgelöst wurde. DUBROVA *et al.* [26] untersuchten erstmals die Instabilität der Minisatelliten zum Nachweis strahleninduzierter Instabilität in Mäusen. Ähnliche Arbeiten gibt es von PAQUETTE UND LITTLE [116] und von SADAMOTO *et al.* [129]. Im letzten Jahr konnten DUBROVA *et al.* [27] mit Minisatelliten eine Übertragbarkeit strahleninduzierter Instabilität über zwei Mausgenerationen nachweisen.

Während KENNEDY *et al.* [68] und MENDOCA *et al.* [102] den Aspekt der Transformation nach Bestrahlung untersuchten, quantifizierten andere Gruppen die Ausbildung von Schwesterchromatidaustauschen nach α -Bestrahlung (DESPHANDE *et al.* [24]). LIMOLI *et al.* [85] stellten nach Röntgenbestrahlung hingegen keinen Zusammenhang zwischen genomischer Instabilität und Schwesterchromatidaustauschen fest. Nach einer Bestrahlung von 10 Gy wurden chromosomal stabile und instabile Klone isoliert und auf weitere Endpunkte untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß chromosomale Instabilität mit abnehmender Platingeffizienz

effizienz und zunehmender Genamplifikation korreliert, nicht aber mit Mismatch-Reparatur-Genmutationen und Schwesterchromatidaustauschen. Möglicherweise ist die Wahl des Zellsystems und die Untersuchungsprozedur von entscheidender Bedeutung, um Korrelationen zwischen verschiedenen Endpunkten zu finden.

2.3 Natur strahleninduzierter genomischer Instabilität

2.3.1 Einfluß von Strahlenqualität und Dosis

Eine Vielzahl unabhängiger Untersuchungen konnten nach Hoch- und Niedrig-LET-Bestrahlung eine induzierte chromosomale Instabilität beobachten, die sich durch einen Anstieg der Chromatid- und Chromosomenaberrationen nach vielen Zellteilungen bemerkbar machte und über mehrere Generationen übertragbar war. Die Ergebnisse unterschiedlicher Gruppen sind in den Tabellen 2.2 und 2.3 zusammengefaßt und zeigen die Abhängigkeit der Chromosomen- und Chromatidaberrationen vom LET.

Die Arbeiten mit primären Mausknorpelmark und menschlichem Knochenmark deuteten auf eine Abhängigkeit der Aberrationen nach Bestrahlung unterschiedlichen LETs hin. KADHIM *et al.* [61], [59], [60] zeigten nach α -Strahlung einen stärkeren Anstieg der Chromatidaberrationen gegenüber den Chromosomenaberrationen. Nach Röntgenstrahlung konnten sie nur wenige oder keine Chromosomen- oder Chromatidveränderungen feststellen. In weiteren Röntgenbestrahlungsexperimenten mit menschlichen Fibroblastenzelllinien [62] wurde eine induzierte chromosomale Instabilität festgestellt, die abhängig vom Untersuchungszeitpunkt und der Zellteilungsanzahl war.

Untersuchungen mit Neutronenbestrahlung von Mausembryozellen (BOUFFLER [11]), menschlichen Epithel- (PONNAIYA *et al.* [124]) und Fibroblastenzellen (KADHIM *et al.* [62]) zeigten eine höhere Ausbeute an Chromatid- als an Chromosomenaberrationen und eine Abhängigkeit vom benutzten Zellsystem.

Diese Beobachtungen wurden von SABATIER und MARTIN [126] bestätigt. Sie wiederholten die Experimente mit menschlichen Fibroblasten und Hoch-LET-Bestrahlung über einen weiten LET-Bereich durch Bestrahlung mit drei verschiedenen Ionen (Neon: $\text{LET}=386 \text{ keV}/\mu\text{m}^{-1}$, Argon: $\text{LET}=1207 \text{ keV}/\mu\text{m}^{-1}$ und Blei: $\text{LET}=13600 \text{ keV}/\mu\text{m}^{-1}$).

Man kann zusammenfassen, daß genomische Instabilität durch Hoch- und Niedrig-LET-Bestrahlung ausgelöst werden konnte. Die Strahlenqualität hat einen Einfluß auf die Ausbildung genomischer Instabilität. In vielen Untersuchungen stieg die Anzahl der Chromosomenaberrationen mit steigendem LET. Das Untersuchungsobjekt und der genetische Einfluß hatten den wesentlichen Einfluß auf die Ausbildung genomischer Instabilität.

2.3.2 Genetische Faktoren

Während Strahlenqualität und Dosis bei der Ausbildung chromosomaler Instabilität eine untergeordnete Rolle spielen, zeigte sich in verschiedenen Experimenten, daß das untersuchte Zellsystem von entscheidender Bedeutung ist. Genetische Faktoren spielen bei der chromosomalen Instabilität eine große Rolle.

Die Experimente von PONNAIYA *et al.* [125] zeigten am Beispiel zweier primärer Mausepithelzelllinien von BALB/c und C57BL/6, daß im Laufe einer Vielzahl von Zellverdoppelungen nur in den Zellen der BALB/c-Maus ein Anstieg chromosomaler Veränderungen auftritt. Zu den gleichen Ergebnissen kamen WATSON *et al.* [158], die den genetischen Einfluß an Knochenmarkzellen von induzierbaren CBA/H und DBA/H und unempfindlichen C57BL/6 Mäusen untersuchten. In Nachkommen der CBA/H oder DBA/H und C57BL/6 konnte gezeigt werden, daß die Empfänglichkeit für strahleninduzierte genomische Instabilität rezessiv vererbbar ist. Die Zellen der F1 Generation dieser Mausstämmen zeigten keine induzierte genomische Instabilität. Bei Untersuchungen des spät auftretenden Zelltods in somatischen Zellhybriden vermuteten CHANG UND LITTLE [18], daß es sich dabei um einen dominanten Phänotypen handelt. Der genetische Einfluß auf die Expression strahleninduzierter genomischer Instabilität trifft auch für menschliche Zellen zu (KADHIM *et al.* [62]).

LIMOLI *et al.* [86] zeigten, daß DNS-Doppelstrangbrüche, die durch Restriktionsenzyme induziert wurden, keine genomische Instabilität auslösen (siehe auch Kapitel 2.2.3). UV-Strahlung dagegen ist in der Lage, eine genomische Instabilität zu verursachen. CHANG UND LITTLE erhielten dazu widersprüchliche Ergebnisse. Der spät auftretende Zelltod konnte durch Behandlung mit Restriktionsenzymen aber nicht durch UV-Bestrahlung induziert werden.

Experimente von LIMOLI *et al.* [83] lieferten Hinweise, daß die DNS das kritische Target bei der Auslösung von chromosomaler Instabilität ist. In Mensch-Maushybridzellen, in denen Thymidin in der DNS durch Bromdeoxyuridin (BrdU) ersetzt wurde, und die deshalb empfindlich für die Induktion von Strangbrüchen sind, wurde eine erhöhte chromosomale Instabilität beobachtet. Zur Unterscheidung, ob eine Bestrahlung der Membranen oder des Zellkerns der Initiator der chromosomalen Instabilität ist, wurden von KAPLAN UND MORGAN [65] Versuche durchgeführt, in denen vorzugsweise die Zellmembran oder der Zellkern bestrahlt wurden. Durch Einbau eines mit radioaktiven ^{125}I gekoppelten Proteins Succinyl-concanavalin A wurden hauptsächlich Plasmamembran und Zytoplasma bestrahlt, während ^{125}I -iododeoxyuridin die DNS schädigt. Nach Exposition der Membran trat keine chromosomale Instabilität auf. Die Bestrahlung des Zellkerns führte zur Instabilität.

Es liegt nahe, daß die DNS an der Auslösung der Instabilität beteiligt ist, aber der Mechanismus ist kompliziert und die verschiedenen Endpunkte der Instabilität hängen nicht in einfacher Weise zusammen [45].

2.3.3 Mögliche Mechanismen der induzierten genetischen Instabilität

Durch welche Mechanismen genomische Instabilität nach Bestrahlung ausgelöst wird, ist bisher nicht geklärt. Eine mögliche Ursache sind strahleninduzierte Veränderungen der DNS wie Basenpaarveränderungen, die erst später zu Schäden führen. Dies ist allerdings nicht vereinbar mit der Beobachtung, daß die Instabilität erst nach 20-40 Zellteilungen auftritt. In der Regel treten strahleninduzierte Veränderungen eines Genoms, z. B. Translokationen, direkt nach Bestrahlung auf. Ein Großteil dieser Rearrangements, z. B. dizentrische Chromosomen, sind nicht stabil und gehen normalerweise nach mehreren Zellteilungen verloren. Bei der induzierten genetischen Instabilität hingegen bildet sich eine Genominstabilität aus, wie sie aus Krebszellen bekannt ist. Da ein relativ hoher Prozentsatz der Zellen eine solche Instabilität zeigt, kann man ausschließen, daß durch Strahlung verursachte Veränderungen spezifischer Gene für dieses Verhalten verantwortlich sind (MURNANE [108]).

Vielmehr wird vermutet, daß durch epigenetische Veränderungen eine veränderte Genexpression ausgelöst wurde. Diese könnte möglicherweise durch Signaltransduktion nach Doppelstrangbruch-Reparatur bedingt sein (CHANG UND LITTLE [19]). Durch Bestrahlung oder Behandlung mit Chemikalien können sowohl DNS-Schäden (HOLBROOK UND FORNACE [49]) als auch Veränderungen in der Zellmembran (KARIN [66]) ausgelöst werden, welche die Genexpression beeinflussen. In den meisten Fällen sind diese Veränderungen der Genexpression temporär.

Es gibt aber auch permanente Änderungen der Genexpression durch epigenetische Veränderungen, wie die Methylierung von CpG-islands. CpG-islands sind CG-reiche Regionen im Genom, die größtenteils in Promoterbereichen von Genen liegen. Methylierung dieser Sequenzen führt zur Inaktivierung, d. h. die betroffenen Gene werden nicht mehr exprimiert. Man findet methylierte CpG-islands u. a. in Promoterregionen von Tumorsuppressorgenen. Es ist bekannt, daß stressinduzierte Hypermethylierung der CpG-islands zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt (KESHET *et al.* [69] und CEDAR [16]). Eine solche Methylierung der CpG-islands wurde auch nach ionisierender Bestrahlung (ISSA *et al.* [55]) beobachtet.

Induzierte genomische Instabilität könnte die Folge einer Kettenreaktion chromosomaler Rearrangements sein. Dieser Prozess würde direkt durch Strahlung oder durch eine enzymatische Reparaturantwort ausgelöst und zu einer initialen Chromosomenveränderung führen, die eine Kettenreaktion von Zellteilungen mit Chromosomenbrüchen und neuer Fusion getrennter Chromosomenenden nach sich zieht (MARDER UND MORGAN [98]). Durch diese sogenannten „bridge-breakage-fusion-cycles“ (MCCLINTOCK [101]) treten Chromosomenveränderungen in den nachfolgenden Generationen auf. Diese Zyklen wiederholender Chromosomenbrüche werden solange fortgeführt, bis es zu einer Fusion mit einem Chromosomen-

segment kommt, das telomerische Sequenzen an den Enden trägt und den Umbau stabilisiert. Diese Kettenreaktion wäre vereinbar mit der Beobachtung, daß Instabilität in Zellen auftritt, die direkt nach Bestrahlung schon Chromosomenveränderungen zeigen (HOLMBERG *et al.* [51]). Das Auftreten chromosomaler Instabilität in Tumoren und die Variabilität von Chromosomenaberrationen in einem Tumorgewebe werden von GISSELSSON *et al.* [37] ebenfalls auf diesen Mechanismus zurückgeführt. Denkbar wäre auch, daß eine initial nach Bestrahlung entstehende Chromosomenveränderung einen „Hotspot“ für Rekombinationsereignisse darstellt, weil instabile Chromatinstrukturen entstanden sind [107]. Die Untersuchungen von DESMAZE *et al.* [23] in menschlichen Zellen lassen vermuten, daß interstitielle telomerische Sequenzen zu spontanen Rearrangements neigen. Es bleibt zu prüfen, ob ähnliche Mechanismen auch im Hinblick auf strahleninduzierte Instabilität eine Rolle spielen.

2.4 Strahleninduzierte genomische Instabilität und Krebsentstehung

Während die Mechanismen, die zur strahleninduzierten Instabilität führen noch weitgehend im Unklaren liegen, verdichten sich die Erkenntnisse, daß die durch Strahlung ausgelöste genomische Instabilität eine entscheidende Funktion in der Auslösung von strahleninduziertem Krebs besitzt. Bisher ging man davon aus, daß durch die initiale Bestrahlung gleichzeitig mehrere genetische Veränderungen ausgelöst werden müssen, um zur malignen Entartung zu führen. Klassische Mutationsstudien haben gezeigt, daß Mutationen in relevanten Genen ein sehr seltenes Ereignis sind. Nach einer einmaligen Bestrahlung mit niedriger Dosis ist es sehr unwahrscheinlich, daß gleichzeitig Mutationen in mehreren relevanten Genen entstehen. Löst ionisierende Strahlung dagegen eine beständige Instabilität aus, können sich Mutationen im Lauf der Zeit ansammeln und die betroffene Zelle maligne transformieren (KRONENBERG [74]).

Eine Reihe von Beobachtungen deuten auf die initiierende Wirkung der strahleninduzierten genomischen Instabilität hin. SELVANAYAGAM *et al.* [137] berichteten von einer spät nach Bestrahlung auftretenden Mutation in p53 in bestrahlten Mausbrustepithelzellen, die anschließend transformierte. Dabei gilt die genomische Instabilität als Auslöser der Mutation in p53.

Weiterhin zeigten ULLRICH und PONNAIYA [153] in ihren Experimenten mit Mausepithelzellen, daß die Empfänglichkeit für strahleninduzierte zytogenetische Instabilität vererbbar ist und mit der Empfänglichkeit zur Transformation und Brustkrebsentstehung zusammenhängt. Mäuse, die resistent gegenüber der Transformation und Brustkrebsentstehung waren, zeigten keine strahleninduzierte Instabilität, während Mäuse, die empfindlich für Transformation und Krebsentstehung waren, auch eine Chromosomeninstabilität nach Bestrahlung aufwiesen. Damit wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen strahleninduzier-

ter Instabilität und Krebsentstehung hergestellt.

2.5 Zusammenfassung

In zahlreichen Experimenten wurde eine durch Strahlung induzierte genomische Instabilität festgestellt. Dabei handelt es sich um eine Veränderung des Genoms, die durch Strahlung verursacht und über mehrere Zellteilungen und Generationen übermittleit wird. Die Auswirkungen treten ca. 20-30 Zellteilungen nach der initialen Bestrahlung in Erscheinung. Diese genomische Instabilität kann sich durch verschiedene Endpunkte wie z. B. verzögerter Zelltod, spät auftretende Mutationen und chromosomale Instabilität äußern. Die bisherigen Untersuchungen mit unterschiedlichen Zell- und Modellsystemen und Strahlenarten verschiedener LET-Werte ergaben zum Teil widersprüchliche Resultate. Die genetische Instabilität nach Bestrahlung war in den meisten Fällen unabhängig von der applizierten Dosis, zeigte aber in vielen Untersuchungen eine Abhängigkeit vom LET der Strahlung. Zahlreiche Experimente bestätigten einen Einfluß des genetischen Hintergrunds der untersuchten Zellen. Die Mechanismen, die zur Ausbildung der Instabilität führen, konnten bisher nicht geklärt werden. Man geht davon aus, daß es sich um einen komplizierten Mechanismus handelt, bei dem die DNS zumindest ein Target darstellt.

Kapitel 3

Methodische Grundlagen der modernen molekularzytogenetischen Analysen

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit angewendeten Methoden, die zum Nachweis von strukturellen oder numerischen Veränderungen im Genom verwendet wurden. Die Verfahren sind mit zunehmender Auflösung aufgeführt.

Methode	Anwendung zur Aufklärung von:	Auflösung
SKY	strukturellen Chromosomenveränderungen, insb. Translokationen	2 Mb
chromosomale CGH	Deletionen oder Amplifikationen von ganzen Chromosomen oder Chromosomenabschnitten	15 Mb
klassische G-Bänder, SKY-Bandierung	strukturellen Chromosomenveränderungen, die eine Veränderungen der Bandierung verursachen, Translokationen und Inversionen	1-3 Mb
Matrix-CGH	Deletionen und Amplifikationen von genetisch/physikalisch definierten DNS-Sonden, die auf einem Mikroarray aufgebracht sind	1 kb-50 kb
CGH und SKY	Differenzierung von väterlichen und mütterlichen Chromosomen	1% Sequenzunterschied

3.1 24-Farben-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung - (FISH)

3.1.1 FISH

Als die *In situ*-Hybridisierungsmethode in den 60er Jahren entwickelt wurde, verwendete man radioaktiv markierte DNSn und RNSn als Sonden (PARDUE UND GALL [117]). Anfang der 80er Jahre wurden Nukleinsäuren erstmals enzymatisch mit Haptenen (kleinen Molekülen) markiert, die mit Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden können (LANGER *et al.* [76]). Die Verwendung fluoreszierender Sonden hat mehrere Vorteile gegenüber der herkömmlichen radioaktiven Markierung. Die Sonden sind sehr stabil und man erreicht eine hohe räumliche Auflösung. Außerdem können die Präparate direkt am Mikroskop ausgewertet werden. Man benötigt keine zeitaufwendige Autoradiographie wie bei der Detektion radioaktiv-markierter Sonden. Die Auswertung ist daher vergleichsweise schnell, und es entsteht kein radioaktiver Abfall. Ein weiterer wesentlicher Vorteil fluoreszierender Proben ist die Möglichkeit, mehrere verschiedene Sonden gleichzeitig hybridisieren und unterscheiden zu können.

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) hat sich in den letzten 10-15 Jahren zu einer weitverbreiteten und vielseitigen Methode in der Zytogenetik etabliert. Bei einer FISH werden spezifische DNS-Sequenzen (Sonden) direkt mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden oder indirekt mit Reportermolekülen (Haptenen) markiert und durch eine Hybridisierung auf einem Target lokalisiert. Bei den Targets handelt es sich um morphologisch erhaltene zytologische Präparate wie zum Beispiel Metaphasechromosomen, Interphase-Zellkerne oder ausgestreckte Chromatinfibrillen („Fiber-FISH“).

Das Prinzip der *In-situ*-Hybridisierung beruht darauf, daß zwei komplementäre einzelsträngige DNS-Sequenzen die Fähigkeit besitzen, sich spezifisch aneinander zu lagern und dabei einen DNS-Doppelstrang (Hybrid) bilden. Bei einem Hybridisierungsexperiment reassoziert die markierte Sonde mit den entsprechenden DNS-Sequenzen im Target. Sowohl die Target- als auch die Sonden-DNS müssen zunächst denaturiert (einzelnsträngig gemacht) werden, um dann miteinander zu hybridisieren. Gleichzeitig werden repetitive Sequenzen durch Suppressionshybridisierung mit genomischer DNS oder C₀t-1-DNS unterdrückt (LICHTER *et al.* [79], PINKEL *et al.* [120], siehe auch Kapitel 4.1.5). Genomische DNS enthält (interspergierte) zwischengelagerte repetitive DNS-Sequenzen (z. B. Alus), die mit ähnlichen Sequenzen in der DNS-Sonde hybridisieren. Dies erzeugt unspezifische Hybridisierungssignale, die das spezifische und auf Einzelgensequenzen beruhende Hybridisierungssignal überdecken können. Deshalb ist es notwendig, markierte repetitive DNS-Sequenzen möglichst vollständig aus der Sonde zu entfernen. Die repetitiven Fraktionen (C₀t-1-DNS) einer genomischen Sonde hybridisieren sehr schnell. Bei geeigneter Vorhybridisierung der Sonde bleiben größtenteils einzelsträngige Einzel-Kopie-Sequenzen übrig, die mit dem entsprechenden Target hy-

bridisieren. Unspezifische Hybridisierungen werden durch Waschschrirte entfernt und die Haptenmolekule anschlieBend detektiert. Spezifische Signale werden danach ausschlieBlich an den Orten der Hybridisierung sichtbar. Das DNS-Target einer *In situ*-Hybridisierung liegt im Interphasezellkern oder Metaphasechromosomen durch Histon- und Nichthiston-Proteine in einer hochkondensierten Form verpackt vor. Die individuellen Hybridisierungsbedingungen sind empirisch festgelegt.

Als Sonden dienen u. a. YACs (Yeast artificial chromosomes) und chromosomenspezifische Sonden, die durch Mikrodissektion (GUAN *et al.* [41]) oder DurchfluBzytomtrie (VOOIJIS *et al.* [155] und FERGUSON-SMITH [29]) gewonnen wurden. Wie schon erwahnt, erlaubt die FISH eine Untersuchung mehrerer Sonden in einem Experiment. Durch die Auswahl unterschiedlicher Fluoreszenzfarben und entsprechender Filterkombinationen lassen sich die unterschiedlich gefarbten Sonden aufgrund ihrer verschiedenen spektralen Eigenschaften einzeln betrachten und digital aufnehmen. Computerunterstutzte FISH-Systeme nehmen Graustufenbilder von den Emissionen einzelner Fluoreszenzfarben auf und ermoglichen anschlieBend eine Uberlagerung der Bilder zu einem Falschfarbenbild. Mit herkommlichen Filtersystemen konnen bis zu drei Farben (rot, grun und blau) diskriminiert werden.

In den letzten zehn Jahren haben fortschreitende technische Entwicklungen die Anwendungen der FISH beeindruckend erweitert. Bei der vergleichenden genomischen Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH) konnen genetische Ungleichheiten (Amplifikationen oder Deletionen) festgestellt werden, ohne daB eine Chromosomenpraparation des zu untersuchenden „Tester“- (Tumor- oder Patienten-) Genoms notwendig ist. Mit dieser Methode werden normale Kontroll-DNS und „Tester“-DNS unterschiedlich markiert und auf Metaphasechromosomen hybridisiert. Ungleichgewichte der beiden Genome werden als Intensitatsunterschiede der Hybridisierungssignale auf den betroffenen Chromosomenregionen sichtbar (siehe Kapitel 3.2.1). Eine weitere Methode ist die Vielfarben-*in situ*-Hybridisierung. Durch kombinatorische Markierung von Sonden mit nur funf Farbstoffen konnen alle (24) menschlichen Chromosomen differentiell markiert werden. Diese Methode erlaubt beispielsweise die Analyse stark rearrangierter Tumorkaryotypen (VELDMAN *et al.* [154]) und eine verbesserte Diagnostik von konstitutioniellen Chromosomenaberrationen (z. B. SCHRÖCK *et al.* [135] und UHRIG *et al.* [152]). Im folgenden wird auf die verschiedenen Methoden der Vielfarben-*in situ*-Hybridisierung eingegangen.

3.1.2 M-FISH und SKY

Ein lang angestrebtes Ziel in der Chromosomenforschung war es, alle Chromosomen in verschiedenen Farben darzustellen. Zwei Gruppen gelang unabhangig voneinander eine Entwicklung der 24-Farbenhybridisierung und verschiedenen Auswertungsmethoden: SPEICHER *et al.* [143] entwickelten M-FISH (Multicolor-

FISH, Vielfarben-FISH), SCHRÖCK *et al.* [134] SKY (Spectral Karyotyping, Spektrale Karyotypisierung). Der Ansatz zur FISH ist in beiden Fällen gleich und beruht auf einer kombinatorischen Markierung aller chromosomenspezifischen Sonden mit wenigen Fluoreszenzfarben. Dabei wird ausgehend von 5 Fluoreszenzfarben für jedes einzelne Chromosom eine individuelle Kombination an Farben gewählt. Insgesamt müssen 24 Chromosomen, d. h. 22 Autosomen, ein X- und ein Y- Chromosom unterschieden werden können. 5 Fluoreszenzfarben reichen aus, 24 verschiedenen Kombinationen herzustellen. Insgesamt sind $2^n - 1 = 2^5 - 1 = 31$ verschiedene Kombinationen möglich. Die Hybridisierung erfolgt nach einem herkömmlichen FISH-Protokoll mit Suppression der repetitiven Sequenzen durch Kohybridisierung von C₀t-1-DNS. Die Analyse der Präparate erfolgt bei M-FISH und SKY mit grundsätzlich unterschiedlichen Strategien:

Multicolor-FISH (M-FISH)

Die von SPEICHER *et al.* [143] etablierte Methode zur Untersuchung der 24-Farben-FISH, M-FISH, basiert auf der Verwendung hochspezifischer Filtersets. Jedes Filterset ist auf einen Farbstoff abgestimmt und besteht aus Anregungsfilter, dichromatischem Strahlenteiler, Emissionsfilter und ermöglicht die separate Aufnahme jedes einzelnen Fluoreszenzfarbstoffs. M-FISH benutzt Filtersets geringer Bandbreite (5-15 nm, herkömmliche Filter: 50nm) zur Anregung und zur Emission der Fluoreszenzmoleküle. Dabei werden die Fluorophore jeweils außerhalb ihrer Anregungs- und Emissionsmaxima angeregt und detektiert, um eine Überlagerung mit Spektren anderer Fluorophore auszuschließen. Die Emissionsbandbreiten werden so groß wie möglich gewählt, damit die bestmögliche Ausbeute erreicht wird. Die Fluoreszenz jedes einzelnen Fluorophors wird mit dem dafür gewählten Filterset und einer CCD Kamera aufgenommen. Die digitalen Bilder werden anschließend mit Hilfe einer Software überlagert, wobei Verschiebungen durch optische und mechanische Einflüsse ausgeglichen werden.

Spektrale Karyotypisierung (SKY)

Die von SCHRÖCK *et al.* [134] verwendete spektrale Analyse (SKY) arbeitet nach interferometrischem Prinzip. Bei dieser Methode wird die gesamte Fluoreszenz des mikroskopischen Objekts über ein Sagnac-Interferometer und eine CCD-Kamera aufgenommen. Das Interferogramm jedes Bildpunktes (Pixel) wird mit Fouriertransformation analysiert, um das Spektrum in jedem Bildpunkt zu ermitteln. Ausgehend von den ermittelten Spektren kann ein spektrales Falschfarbenbild hergestellt werden, das den spektralen Verteilungen des Originalbildes entspricht. Mit einem Klassifikationsalgorithmus können die Chromosomen unter Berücksichtigung der verwendeten Farbkombinationen einer Klassifikationsfarbe zugeordnet werden (MALIK *et al.* [96] und GARINI *et al.* [34]). Eine detaillierte Beschreibung des SKY-Systems befindet sich in Kapitel 4.5.1.

Vergleich von M-FISH und SKY

Mit beiden Methoden M-FISH und SKY können alle 24 menschlichen Chromosomen anhand ihrer Hybridisierungssignale eindeutig identifiziert werden. Die Vor- und Nachteile von M-FISH bzw. SKY ergeben sich aus den unterschiedlichen experimentellen Ansätzen.

Ein M-FISH-System ist verhältnismäßig kostengünstig, da jedes konventionelle Fluoreszenzmikroskop mit Spezialfiltern und spezialisierter Software ausgerüstet werden kann. SKY hingegen benötigt ein zusätzliches optisches Bauteil, das Spektrometer, zur computergesteuerten Aufnahme spektraler Bilder und ist daher kostspieliger in der Anschaffung. Bei M-FISH müssen die Bilder der einzelnen Filter elektronisch überlagert werden. Der resultierende „Pixelhft“ (örtliche Verschiebung der einzelnen Bilder gegeneinander beim Wechseln der verschiedenen Filter) muß bei jeder Aufnahme ausgeglichen werden. SKY nimmt in einer Aufnahme zu jedem Bildpunkt das gesamte Spektrum auf; es kommt zu keinen „Pixelshifts“. Die Aufnahme eines spektralen Bildes dauert aufgrund der interferometrischen Aufnahme-prozedur und Fouriertransformation bis zu mehreren Minuten und benötigt 3-6MB für die Datenspeicherung. Der Arbeitsspeicher des Rechners sollte nicht kleiner als 96MB sein. Um die Datengröße der Bilder und den Rechenaufwand bewältigen zu können, wird eine Kamera mit relativ geringer Auflösung bevorzugt. Mit M-FISH erzeugte Bilder sind nicht viel größer als ein herkömmliches FISH-Bild und entsprechend hochauflösend. Während mit SKY fast jedes Fluorophor benutzt werden kann, das sich in der Emission um wenige nm (die spektrale Auflösung des Systems beträgt 4 nm bei 400nm und 16nm bei 800 nm, siehe MALIK *et al.* [96]) unterscheidet, müssen bei der M-FISH Fluoreszenzmarker kombiniert werden, die sich mit den zur Verfügung stehenden Filtern unterscheiden lassen, d. h. sowohl in Anregung als auch Emission in einem Bereich nicht überlappend sind.

3.1.3 Neue Methoden der Vielfarben-FISH

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Strategien für Vielfarben-FISH: „Ratio Labelling“ (Verhältnis-Markierung) und „Combinatorial Labelling“ (Kombinatorische Markierung). Beim „Ratio Labelling“ werden für jedes Chromosom bis zu drei unterschiedlich markierte Sonden des Chromosoms benötigt. Die individuellen Fluoreszenzfarben entstehen durch unterschiedliche Mischverhältnisse der Ausgangsfluoreszenzfarben. Beim „Combinatorial Labelling“ werden die Chromosomen durch eine unterschiedliche Kombination von Farben verschieden markiert. Zur 24 Farbenhybridisierung werden 5 Fluoreszenzfarben benötigt. Vielfarben-FISH nach kombinatorischer Markierung läßt sich am einfachsten auswerten, da einzelne Farben entweder in der Sonde vorhanden sind, oder völlig fehlen. Das „Combinatorial Labelling“ hat sich in der Anwendung durchgesetzt.

Neue Kombinationen zur Markierung

Die exakten Grenzen der Auflösung bei der Erkennung von strukturellen Chromosomenveränderungen mit Hilfe der 24-Farben FISH sind noch nicht genau bestimmt worden. In dem Artikel von AZOFEIFA *et al.* [5] wird argumentiert, daß das Auflösungsvermögens dieser Methode stark von der Farbkombination der beteiligten Chromosomen abhängt, die an einer Austauschaberration beteiligt sind. Im folgenden Beispiel sind zwei Chromosomen 1 und 2 an einer Aberration beteiligt. Chromosom 1 ist mit den Fluorophoren A und B, Chromosom 2 nur mit A markiert. Ein Chromosomenaustausch der Chromosomen 1 und 2, bei dem ein genügend kleiner Teil des Chromosoms 2 an das größere Segment des Chromosoms 1 transloziert wird, ist bei dieser Wahl der Farbkombination nicht auflösbar. Da beide Chromosomen mit derselben Farbe A markiert sind und nur das größere Segment eine zusätzliche Farbe B enthält, überstrahlt diese Markierung (A und B) das kleine translozierte Segment (nur A). Und dieses Problem zu umgehen, stellten AZOFEIFA *et al.* eine optimierte Sondenkonstellation zusammen. Es wurde eine zusätzliche Fluoreszenzfarbe verwendet und die Kombinationen der sechs Farben so gewählt, daß zum einen die Komplexität des Sondenmixes möglichst gering bleibt und zum anderen die Wahrscheinlichkeit sinkt, daß schwer auflösbare Farbkombinationen bei Translokationen auftreten.

Entfernung repetitiver Sequenzen

Bei der Hybridisierung genomischer Sonden ist in der Regel eine Suppressionshybridisierung mit repetitiver C_{0t} -1-DNS erforderlich, um Kreuzhybridisierungen repetitiver Sequenzen in der Sonden-DNS mit im ganzen Genom vertretene ähnlichen Sequenzen zu verhindern (siehe Kapitel 3.1.1). Eine andere Möglichkeit ist die Entfernung repetitiver Sequenzen aus der DNS-Sonde bereits vor der Sondenmarkierung. Dazu wurde C_{0t} -1-DNS mit Biotin markiert und mit den Sonden hybridisieren lassen. Diese biotinylierten repetitiven Sequenzen wurden über Streptavidin-markierte Magnetkügelchen magnetisiert und von der restlichen Sonde getrennt, die dann mit stringenten PCR-Zyklen amplifiziert wurde (CRAIG *et al.* [22], BOLZER *et al.* [9], siehe Kapitel 4.1.3).

Kombinatorische Verhältnismarkierung (COBRA)

Eine neue Methode der Vielfarben-*in situ*-Hybridisierung ist COBRA (Combinatorial Ratio Labelling). COBRA ist eine Kombination von „Ratio Labelling“ und „Combinatorial Labelling“. Dabei handelt es sich um eine Erweiterung der M-FISH, indem die binäre und ausschließlich auf Kombination mehrerer Fluoreszenzfarben beruhende unterschiedliche Markierung erweitert wird. Bei der Verhältnismarkierung („Ratio Labelling“) werden zur Probenmarkierung zwei Farbstoffe in unterschiedlichen Mengen zugegeben (Verhältnis). Diese Verhältnismarkierung wird durch eine kombinatorische Markierung einer zusätzlichen

Farbe erweitert. Damit kann die Anzahl der unterschiedlichen Farben verdoppelt werden. TANKE *et al.* [146] stellt diese Methode zur 24 Farben-Markierung vor und verwendet dazu 4 unterschiedliche Fluoreszenzfarben. Mit 3 Farben konnten durch Einsatz unterschiedlicher Verhältnisse von DNS und markierten Nukleotiden bei einer Kombination von jeweils 2 Farben 12 unterscheidbare Sonden gebildet werden. Durch Zugabe einer vierten Farbe entstanden 12 weitere Sonden, also insgesamt 24 Sonden, die alle Chromosome unterscheiden konnten. Diese Methode ließe sich durch Hinzunahme weiterer binärer Farben jeweils verdoppeln und/oder durch Erhöhung der verschiedenen Verhältnisse erhöhen. WIEGANT *et al.* [161] erhöhten durch Hinzunahme einer zweiten binären Fluoreszenzfarbe die Anzahl unterschiedlicher Sonden auf 48 und konnten mit dieser Farbkombination alle Chromosomen und zusätzlich alle Chromosomenarme unterscheiden.

Die Verhältnismarkierung erweist sich in der Anwendung um ein Vielfaches komplizierter und fehleranfälliger als eine einfache kombinatorische Markierung und erfordert eine sehr genaue Bildanalyse. Unterschiede in der Intensität zweier Fluorophore müssen nicht ausschließlich auf unterschiedliche Verhältnisse bei der Markierungsreaktion zurückzuführen sein, sondern können auch durch die präferentielle Hybridisierung einer Sonde entstehen. Außerdem können physikalische Phänomene wie Energietransfer zwischen zwei Fluoreszenzmolekülen, die auf dem DNS-Molekülen eng benachbart liegen, die Intensität der Fluoreszenz beeinträchtigen .

3.1.4 „Bar-Kodierung“ von Chromosomen mit Vielfarben-FISH

Mit der Technik der Chromosomenbandierung vor über 30 Jahren durch CASPERSSON *et al.* [14] [15] begann eine neue Ära in der Zytogenetik. Durch fortschreitende Verbesserung konnten bald bis zu tausend Untereinheiten menschlicher Chromosomen unterschieden werden (YUNIS [164]). Das Auflösungsvermögen wird im wesentlichen durch die Chromosomenpräparation limitiert. Unter optimalen Bedingungen können Deletionen und Bruchpunkte an bandierten Chromosomen auf 10-20 Megabasen genau kartiert werden. Die klassischen (G-, R-, Q-, C-) Banden reflektieren die Chromosomenstruktur und sind inhärente Eigenschaften des Chromosoms. Sie sind u. a. abhängig von der Basenpaarkomposition und dem Kondensationsgrad. Die klassische Bänderung erzeugt also nicht die Banden, sondern macht sie nur sichtbar.

Durch die Methode der FISH eröffneten sich neue Untersuchungsmöglichkeiten in der molekularen Zytogenetik. Die FISH-Bandierung erzeugt fluoreszierende „Banden“, die nur von der Auswahl der Proben abhängen und nicht die Struktur des Chromosoms widerspiegeln. LICHTER *et al.* [80] demonstrierten mit genetisch verankerten Cosmidklonen die Anwendung der FISH zur schnellen und hochauflösenden Kartierung. Bei gleichzeitiger Hybridisierung mehrerer Cosmide konnte die physikalische Reihenfolge einzelner Gene auf den Chromosomen

eindeutig festgelegt werden.

LENGAUER *et al.* [77] [78] prägten den Begriff der „Barkodes“ zur Beschreibung fluoreszierender Chromosomenbanden. Sie verwendeten YACs (Yeast Artificial Chromosomes) zur Markierung von „artifiziellen“ Chromosomenbanden. Aufgrund der relativ großen menschlichen DNS-„Inserts“, (500kb-1Mb) markieren YACs oder YAC-Pools größere Bereiche eines Chromosoms.

Eine Anwendung der Barkodes wurden von HAAF UND BRAY-WARD beschrieben [42]. Sie verwendeten zytogenetisch und genetisch verankerte YACs zum Erstellen einer Bandierung des Chromosoms 2. Mit der Aufdeckung einer perizentrischen Inversion bei Gorilla und Orang-Utan konnte die Nützlichkeit der Fluoreszenzbandierung zur Untersuchung evolutionärer Chromosomenumbauten gezeigt werden.

Eine Vielfarbenbandierung über das gesamte Genom wurde von MÜLLER *et al.* [104] hergestellt, indem zwei Pools mit somatischen Zellhybriden zusammengestellt wurden. Die Zellhybride enthalten jeweils ein Gemisch oder verschiedene menschliche Chromosomenfragmente. Jeder Zellhybrid erzeugt ein komplexes Hybridisierungsmuster auf den Chromosomen. Die mit rot und grün markierten Pools resultierten in einer dreifarbigigen Bandierung, wobei die in beiden Pools vorhandenen Sonden eine gelbe Fluoreszenz zeigten. MÜLLER *et al.* demonstrierten das Potential dieser Methode durch ihre Anwendung in der Sondenkartierung, zur Untersuchung somatischer Zellhybride und in der komparativen Genetik zur Aufklärung evolutionärer Chromosomenumbauten.

CHUDOBA *et al.* [21] etablierten Sonden zur Chromosomenbandierung aus mikrodissidierten Sonden. Das Auflösungsvermögen dieser Bandierung hängt von den mikrodissidierten DNS-Fragmenten ab. Genetische Verankerung der Fluoreszenzbanden ist mit dieser Methode nicht gewährleistet und ist aus diesem Grund nicht direkt mit den Bandierungsmethoden kartierter Sonden wie YACs oder Cosmide vergleichbar.

Mit der Vielfarben-Chromosomenbandierung ergeben sich neue FISH-Anwendungen zur Aufklärung von Chromosomenveränderungen. Während die 24-Farben-FISH eine Unterscheidung aller Chromosomen und damit die Aufklärung von Chromosomenaustauschaberrationen ermöglicht und die CGH Deletionen und Amplifikationen im Genom unterscheiden kann, nutzt die FISH-Bandierung das Potential der hochauflösenden FISH-Kartierung genetisch verankerter Sonden. Mit einer Vielfarben-Hybridisierung ausgewählter Sonden können kleine Deletionen, intrachromosomale Veränderungen wie Inversionen, die der 24-Farben FISH und CGH verborgen bleiben, aufgedeckt werden. Gleichzeitig können bei Verwendung genetisch beschriebener Sonden die Bruchpunkte festgestellt werden.

Die Auswahl des SONDENSETS kann der Fragestellung entsprechend gewählt und angepasst werden. Zur Untersuchung des ganzen Genoms, wie es im Falle evolutionärer Fragestellungen benötigt wird, können größere Sonden, z. B. Zellhybride, zur Bandierung verwendet werden. Um spezifische Regionen mit medizinisch-genetischer Relevanz auf Mikrodeletionen, etc. zu untersuchen, können hochauf-

lösende FISH-Untersuchungen gemacht werden. Alle Barkodes haben gemein, daß die Bandierung nicht natürlich festliegt, wie es bei G- und R-Banden der Fall ist, sondern frei wählbar bleibt durch die Auswahl der verwendeten Sonden.

In dieser Arbeit wird die Etablierung einer Vielfarben-SKY Chromosomenbandierung der Chromosomen 2 und X vorgestellt. Zur möglichst gleichmäßigen Bandierung der Chromosomen wurden mit DOP-PCR amplifizierte YACs verwendet. Bei diesen CEPH-(Centre d'Etude du Polymorphisme Humain) YACs handelt es sich um zytogenetisch kartierte und genetisch verankerte Sonden, die im MPI für Molekulare Genetik zur Verfügung standen (WIRTH *et al.* [163], BRAY-WARD *et al.* [12]). Diese YACs mit STS (sequence tagged sites) wurden durch FISH-Experimente auf Chromosomen physikalisch kartiert. Bei STS handelt es sich um genetische Marker, die durch eine PCR-Reaktion in Klonen nachgewiesen werden können. Genetische Marker sind ausschließlich auf vererbte genetische Merkmale und deren Vererbungsverhalten in Familienstammbäumen zurückzuführen. Durch FISH-Hybridisierungen und physikalischer Kartierung von Klonen mit bekannten genetischen Markern lassen sich die genetische und physikalische Karte integrieren. Während physikalische Karten in der Einheit bp (Basenpaaren) erstellt werden, werden die Abstände genetischer Karten in cM (centi Morgan) geführt. Der Abstand von 1 cM zwischen zwei Markern auf einem Chromosom entspricht der Wahrscheinlichkeit von 1%, daß eine Rekombination zwischen diesen Bereichen in der Meiose stattfindet.

3.1.5 SKY und Vielfarben-FISH in der strahlenbiologischen Forschung

SKY wird nicht nur zur Aufklärung struktureller Chromosomenaberrationen in der Tumorgenetik oder der Humangenetik genutzt, sondern findet auch zunehmend Anwendungen in der strahlenbiologischen Forschung. Die Möglichkeit, alle Chromosomen eines Individuums in einem Experiment auf Translokationen zu untersuchen, macht die Methode zu einem geeigneten Werkzeug in der biologischen Dosimetrie und Epidemiologie. Translokationen gehören zu den stabilen Chromosomenveränderungen, d. h. sie bleiben nach einer Zellteilung und damit auch in einem Organismus erhalten. Strahlenbiologische epidemiologische Studien nutzen diese Chromosomenaberrationen zur Abschätzung von Dosis und Strahlenqualität. Durch FISH mit chromosomenspezifischen DNS-Bibliotheken wurden Chromosomenaberrationen nach dem Tschernobylunglück (SALASSIDIS *et al.* [131], [130]) oder nach dem Strahlenunfall in Gioana (Brasilien 1987, STRAU-
ME *et al.* [144]), nach einem Strahlenunfall mit Tritium (LUCAS *et al.* [93]) und bei chronischer Niedrigdosisexposition der Arbeiter des Kernkraftwerks von Sellafield (Großbritannien, TUCKER *et al.* [151]) oder der Langzeitbestrahlung von Uranbergarbeiter in Namibia (ZAIRE *et al.* [165]) quantifiziert.

Die 24-Farben-Analyse wurde auch zur Aufklärung von strukturellen Chromosomenaberrationen bei strahleninduziertem Krebs angewandt. Ionisierende

Strahlung kann Schilddrüsenkarzinome auslösen. Der Mechanismus der strahleninduzierten Karzinogenese ist bisher unklar. Nach dem Reaktorunglück in Tschernobyl trat eine dramatische Erhöhung von Schilddrüsentumoren bei Kindern auf (BAVERSTOCK *et al.* [6] und KAZAKOV *et al.* [67]). Es handelte sich dabei um papilläre Schilddrüsenkarzinome, die normalerweise bei Kindern sehr selten auftreten. Um einen Einblick in die strahleninduzierte Karzinogenese des Schilddrüsengewebes zu geben, wurden von ZITZELSBERGER *et al.* [166] Schilddrüsentumore von Kindern aus Weißrußland und sekundäre Schilddrüsentumore von Strahlentherapiepatienten untersucht. Neben den zytogenetischen Untersuchungen der G-Bandierung wurden CGH und SKY zur Analyse von stark veränderten Karyotypen benutzt. Außer den für strahleninduzierten Schilddrüsentumore bekannte Chromosomenbruchpunkte, z. B. in 10q11 (RET-Proto-onkogen), wurden mit diesen Methoden zusätzliche Chromosomenveränderungen festgestellt, die sowohl in den Tumoren der weißrussischen Kinder als auch in den sekundären Tumoren der Strahlentherapiepatienten auftraten. Durch SKY wurden Markerchromosomen und komplexe Chromosomenrearrangements aufgedeckt, die mit konventionellen FISH-Analysen nicht interpretiert werden konnten.

Eine ähnliche Anwendung von SKY wurde zur Untersuchung maligner Melanome eingesetzt. Karyotypen maligner Melanome zeigen einen stark veränderten Chromosomensatz. GREINERT *et al.* [39] diskutieren, daß UVA-Strahlung durch Induktion genetischer Instabilität in den verschiedenen Entwicklungsphasen des malignen Melanoms diese Umbauten bewirkt. Durch SKY wurden alle Chromosomen in verschiedenen Stadien des malignen Melanoms untersucht und die Ausbildung multipler Aberrationen beobachtet.

Vielfarben-FISH ist nicht ausschließlich auf die Untersuchung von Translokationen, also interchromosomalen Umbauten beschränkt. Verwendet man den Vielfarbenbarkode (siehe Kapitel 3.1.4), so ist die Analyse intrachromosomaler Aberrationen möglich. Eine alternierende Fluoreszenzbandierung mit mehreren Farben entlang eines Chromosoms läßt eine relativ genaue Analyse von Bruchpunkten zu, ohne daß eine G-Bandierung notwendig wäre. JOHANNES *et al.* [57] beschreiben die Vielfarbenbandierung (multicolor banding FISH (mBAND)) des Chromosoms 5 mit Mikrodissektionssonden zur Analyse strahleninduzierter Veränderungen. Verglichen mit den herkömmlichen 24-Farben-FISH-Methoden SKY und M-FISH können nicht nur interchromosomale sondern auch intrachromosomale Umbauten detektiert werden; z. B. perizentrische (NATARAJAN *et al.* [109] und LUCAS *et al.* [92]) und parazentrische Inversionen, interstitielle und terminale Deletionen.

In der Strahlenbiologie werden Chromosomenanalysen hauptsächlich zur biologischen Dosimetrie oder zur Risikoabschätzung bei Strahlentherapie und der Krebsentstehung angewendet. Ein weiteres Potential der FISH im Verbindung mit Strahlung liegt in der Aufklärung von Kernarchitektur und Chromatinstruktur sowie dem Zusammenhang zwischen DNS-Schaden und Ausbildung von Chromosomenaberrationen (SACHS [128]). Die Untersuchung der Chromosomenaber-

rationen nach Bestrahlungsexperimenten erlaubt Rückschlüsse auf die Anordnung der Chromosomen in der Interphase und auf die Mechanismen, die von einem DNS-Schaden zu einer Aberration führen. Die Rolle der DNS-Strangbruchreparatur bei der Aberrationsentstehung ist noch nicht vollständig geklärt [132]. Diskutiert werden das Bruch-Wiedervereinigungsmodell (breakage-and-reunion), bei dem zwei Strangbrüche durch Verbindung der offenen Enden (end-joining) zusammengeführt werden [28] und das Ein-Treffer- (one-hit) Modell, bei dem ein Bruch ausreicht, um durch Rekombination an einer homologen Stelle eine falsche Verbindung einzugehen. Die bisherigen Ergebnisse (bei SACHS [128] zusammengefaßt) deuten auf eine zufällige Doppelstrangbruchinduktion und Fehlreparatur (an unterschiedlichen Orten im Genom) hin, die das Verbinden von nicht-homologen Enden (end-joining) bewirkt. Monte-Carlo Computersimulationen konnten zeigen, daß die auftretenden Translokationsfrequenzen sich mit dem „breakage-reunion“-Modell vereinbaren lassen. Neueste Ergebnisse von NIKIFOROVA *et al.* [112] zeigen eine Abhängigkeit der strahleninduzierten Aberrationen von der Anordnung der DNS im Zellkern. Das RET-Gen, das in strahleninduzierten Schilddrüsentumoren auffallen häufig an Chromosomenumbauten beteiligt ist, transloziert auf im Zellkern benachbarte Chromosomenregionen. Desweiteren konnte bestätigt werden, daß sich Chromosomen in bestimmten Territorien aufhalten. Durch Wiedervereinigung der Enden desselben Chromosom entstehen relativ häufig Ringe, im Vergleich zu dizentrischen Chromosomen und Translokationen, an denen immer zwei Domänen beteiligt sind.

Durch Experimente mit dichtionisierenden Strahlen konnte nachgewiesen werden, daß diese relativ häufig komplexe Chromosomenaberrationen auslösen. Dichtionisierende Strahlung wie α -Strahlung oder Neutronen induzieren eine Vielzahl von DNS-Doppelstrangbrüchen entlang der Teilchenspur. Diese Konzentration der Doppelstrangbrüche in einem kleinen Zellkernbereich beeinflusst die Art der entstehenden Chromosomenaberrationen und begünstigt komplexe Aberrationen zwischen mehreren Chromosomen (GRIFFIN *et al.* [40]). Die Anzahl der komplexen Aberrationen nach dünnionisierender Strahlung ist im Vergleich geringer, da komplexe Aberrationen nur entstehen können, wenn von zwei unabhängigen Teilchen ausgekoste Doppelstrangbrüche eine komplexe Aberration eingehen. Bei dichtionisierender Strahlung genügt ein Teilchendurchgang, um mehrere Brüche auszulösen, die miteinander interagieren können. Der höhere Anteil komplexer Aberrationen nach dichtionisierender Bestrahlung kann als ein „fingerprint“, ein Fingerabdruck, dichtionisierender Strahlung registriert werden (ANDERSON *et al.* [3]). Untersuchungen zum „fingerprint“ dichtionisierender Strahlung sind bislang widersprüchlich.

Komparative genomische Hybridisierung auf Metaphasechromosomen

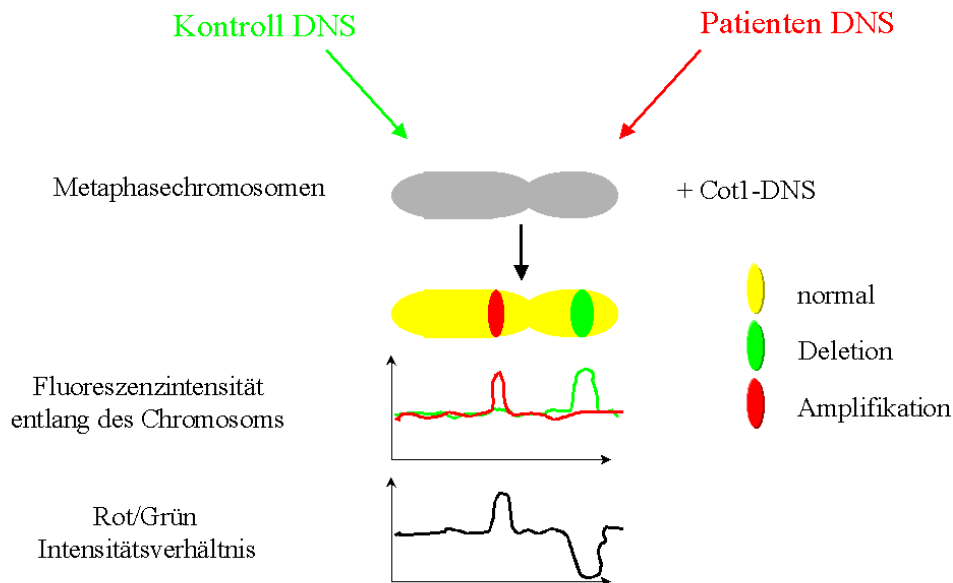


Abbildung 3.1: Schema der CGH auf Chromosomen. Die Patienten- und Kontroll-DNS werden mit rotem bzw. grünem Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf eine normale Metaphase hybridisiert. Numerische Unterschiede zwischen beiden Genomen zeigen sich als eine Über- oder Unterrepräsentation der roten Fluoreszenz auf den betroffenen Chromosomenbereichen. Deletionen im Patientenmaterial sind als grünes, Amplifikationen als rotes Fluoreszenzsignal zu erkennen.

3.2 Matrix-CGH

3.2.1 Chromosomale CGH (Comparative Genomic Hybridization)

Während M-FISH und SKY (Kapitel 3.1.2) strukturelle Chromosomenaberrationen wie Translokationen und andere interchromosomale Aberrationen detektieren, mißt die CGH-Methode (KALLIONIEMI *et al.* [63], DU MANOIR *et al.* [25]) die Ungleichgewichte zwischen zwei Genomen, die als Amplifikationen und Deletionen auftreten. Bei der chromosomalen CGH benötigt man keine Chromosomenpräparate und damit keine Zellkultur von den zu untersuchenden Patientenproben. Diese Methode spielt vor allem in der Tumorzytogenetik eine Rolle, da bei Tumoren die Chromosomenpräparation oft schwierig ist. Bei der CGH werden die zu untersuchende Patienten-DNS und eine Kontroll-DNS mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, beispielsweise die Patienten-DNS mit einem roten, die Kontroll-DNS mit einem grünen Farbstoff. Beide Sonden werden

gleichzeitig auf eine normale Metaphase hybridisiert. Anschließend können die Fluoreszenzintensitäten quantifiziert werden. Das Protokoll der Hybridisierung entspricht im wesentlichen dem einer herkömmlichen FISH. Ist die Kopienzahl einer DNS-Sequenz in Patienten- und Kontrollsonde identisch, so zeigt die Hybridisierung auf den Chromosomen an der entsprechenden Stelle ein ausgeglichenes Intensitätsverhältnis beider Fluoreszenzfarbstoffe, das im Mikroskopbild als gelbe Farbe zu erkennen ist. Liegt eine Deletion oder Amplifikation beim Patienten vor, so zeigt sich dies in einer Unter- oder Überrepräsentation der patientenspezifischen Hybridisierung. Der betroffene Bereich wird auf dem Chromosomenpräparat bei einer Amplifikation als mehr rotes oder bei einer Deletion als mehr grünes Signal sichtbar (siehe Abbildung 3.1). Die Auswertung erfolgt mit spezieller digitaler Bildanalysesoftware.

Die computergestützte Bildanalyse der vergleichenden genomischen Hybridisierung wurde ausführlich von PIPER *et al.* [122] und in einer etwas anderen Form von LUNDSTEEN *et al.* [94] beschrieben. Bei der digitalen Bildanalyse einer CGH nach PIPER *et al.* [122] wird zunächst eine automatisierte Segmentierung der Chromosomen vorgenommen. Anschließend werden die Hybridisierungsintensitäten der unterschiedlich markierten Sonden normalisiert. Die absolute Intensität wird durch viele variierende Parameter beeinflusst und trägt deshalb keine essentielle Information. Es wird eine Normalisierung eingeführt, bei der die medianen Intensitäten angeglichen werden. Gleichzeitig soll durch bestimmte Normierungsfaktoren ein Intensitätsverhältnis von 1 erreicht werden. Des Weiteren wird der lokale Hintergrund korrigiert, da in einem Hybridisierungsexperiment der fluoreszierende Hintergrund über eine gesamte Metaphase variieren kann. Danach können die Intensitäten gemessen werden. Dazu wird zunächst die Intensitätsprofile der Kontroll- und Testhybridisierung bestimmt, indem für beide Fluoreszenzen über Pixelwerte der einzelne Schnitte, die senkrecht zu der bestimmten Chromosomenachse stehen, integriert wird. Daraus lassen sich die Intensitätsverhältnisse an jedem Chromosomensegment bestimmen.

In dieser Arbeit wird eine Kombination der beiden Methoden SKY und CGH vorgestellt. Dabei wird eine CGH mit der spektralen Analyse des SKY-Systems ausgewertet (siehe Kapitel 3.3).

Mit CGH und SKY/M-FISH wurden im letzten Jahrzehnt zwei Methoden entwickelt, die die Möglichkeiten (Ausfösungsvermögen und Anwendungen) der molekularen Zytogenetik stark erweitert haben. Das Auflösungsvermögen von Deletionen und Amplifikationen der chromosomalen CGH ist im wesentlichen abhängig von der Qualität der Kontrollmetaphasen und wird weiterhin bestimmt von der Anzahl der Amplifikationen und der Größe der amplifizierten Region. Das theoretische Auflösungsvermögen wurde von PIPER *et al.* [122] auf ca. 2 Mb abgeschätzt, wenn es sich um ein Dosisverhältnis von 3:1 handelt; zur Detektion von 0,25 Mb (250 kb) großen Veränderungen müßte die Amplifikation 400% betragen. Damit liegt die Empfindlichkeit im gleichen Bereich, wie es zuvor von JOOS *et al.* [58] beschrieben wurde, der ein Auflösungsvermögen von 100 kb bei mindestens

20 facher Amplifikation angab. Für Deletionen gaben PIPER *et al.* ein Limit von mindestens 2 Mb für die Deletion eine Kopie und 1 Mb für Totaldeletionen an. PARENTE *et al.* [118] versuchten, das Detektionslimit im Experiment aufzuklären, indem unterschiedlich großer YACs in verschiedenen Mengen komparativ hybridisiert wurden. Dabei wurden 15 Mb als untere Detektionsgrenze für Amplifikationen bestimmt, also ca. 10 mal höher als theoretisch ermittelt. In diesen Experimenten wurde außerdem gezeigt, daß die Empfindlichkeit der komparativen Hybridisierung unabhängig vom betroffenen Ort auf dem Chromosom, aber abhängig von der Größe der hybridisierten Sonde ist. Die Empfindlichkeit geht bei abnehmender Größe zurück. In einem anderen Experiment von KRAUS *et al.* [73] konnten mit einer komparativen Hybridisierung von Cosmiden Dosisunterschiede auf ausgestreckten Chromatin-Fibrillen („DNA-fiber“), d. h. auf einzelnen DNA-Molekülen festgestellt werden.

Das Auflösungsvermögen der CGH auf Metaphasechromosomen liegt bei Verlust oder Gewinn einer Kope bei >10Mb, also im Bereich einer Chromosomenbande. Mit einer Weiterentwicklung der CGH zur Matrix-CGH, bei der die Chromosomen durch vereinzelt topographische Sonden ersetzt werden, könnte das Auflösungsvermögen dieser Methode erheblich erhöht werden. Die Matrix-CGH nutzt die Chiptechnologie, um Sonden auf einer möglichst kleinen Oberfläche aufzubringen. Durch eine komparative Hybridisierung zweier Genome werden Dosisunterschiede an den Sequenzen der aufgebrachten Sonden detektiert.

3.2.2 DNS-Chiptechnologie

Die DNS-Chiptechnologie beschäftigt sich mit der Miniaturisierung der Arraytechnologie auf Glasobjektträgern. Während bei der herkömmlichen Arraytechnologie Sonden auf Filtern in großem Umfang und in rasterartigem Muster roboterunterstützt aufgetragen werden, werden bei Mikroarrays die Sonden in kleineren Dimensionen auf Glasobjektträger aufgebracht und an der Oberfläche gebunden (MAIER *et al.* [95]). In Analogie zur Computertechnologie werden die Mikroarrays auch DNS-Chip oder Mikroarray-Chip genannt. Bei Filterarrays wird die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt. Die Mikroarrays erlauben eine Hybridisierung mit fluoreszierenden Sonden. Im Gegensatz zur radioaktiven Hybridisierung ist bei der fluoreszierenden Hybridisierung auf dem DNS-Chip eine Kohybridisierung zweier unterschiedlich markierter Sonden möglich. Die hybridisierten Chips werden zur Auswertung mit konfokalen Laserscannern ausgewertet.

In der Zwischenzeit werden Chips für die unterschiedlichsten Anwendungen benutzt. Zum einen gibt es Expressionschips, die aus cDNS oder Oligonukleotiden bestehen. Mit den Expressionschips kann im Hochdurchsatzverfahren die gleichzeitige Expression einzelner Gene und deren Zusammenhang untersucht werden („Expression-profiling“). Damit kann u. a. die Wirkung von Medikamenten auf ein Zellsystem analysiert werden. Außerdem gibt es Mikroarrays, die mit topogra-

phischen Markern als Sonden bestückt sind. Diese topographischen Chips ermöglichen mit der Matrix-CGH eine Analyse auf Genomebene. Mit der Verbreitung der Chiptechnologie ist gleichzeitig eine Entwicklung der computerunterstützten Datenverwaltung und Datenanalyse notwendig, um die gewaltige Menge an Information sammeln, bearbeiten und auswerten zu können. Diese neue Technologie besitzt ein beträchtliches wissenschaftliches und kommerzielles Potential, das viele Mittel in die Entwicklung und Anwendung fließen läßt. Durch das Human-Genom-Projekt sind viele Sequenzen entschlüsselt worden, deren Aufgaben und Zusammenhänge noch zu erforschen sind.

Chipherstellung - „Spotten“

Die mit Robotern durchgeführte Chipherstellung wird als „Spotten“ bezeichnet. Die Glasobjektträger dienen als Träger für die DNS-Sonden. Ihre Oberfläche ist beschichtet, um die Sonden für die nachfolgenden Prozessierung irreversibel zu binden. Die Beschichtung besteht beispielsweise aus einer Silanisierung oder anderen chemischen Veränderungen der Oberfläche (BEIER UND HOHEISEL [7]).

In einem Hochdurchsatzverfahren werden einige Nanoliter zuvor generierter Sonden aus Mikrotiterplatten auf beschichtete Glasobjektträger übertragen. Dies geschieht beispielsweise durch Metallstifte („Pens“), die entweder an der Spitze eingeschlitzt sind, um durch Kapillarkräfte die Sondenflüssigkeit einzusaugen und beim Aufsetzen auf die Glasoberfläche Flüssigkeit abzugeben, oder sie besitzen eine stumpfe Spitze, um in dieser Größe Spots auf dem Objektträger zu übertragen. Eine andere Methode des Spottens ist die Piezostrahltechnik, bei der die Sondenflüssigkeit auf den Glasobjektträger aufgesprüht wird. Der Tropfen ist dabei entgegengesetzt zum Objektträger geladen. Bei einer weiteren Methode wird ein kleiner Ring von der Sondenflüssigkeit umspannt. Eine sehr feine Nadel wird durch diesen Ring auf den Glaschip geführt und trägt damit die Sondenflüssigkeit auf. Mit der letztgenannten Methode lassen sich die kleinsten Spots und damit die dichtesten Mikroarrays erzeugen. Diese Methoden beruhen alle auf dem gleichen Prinzip, indem zuvor generierte Sonden mechanisch auf den Chip aufgebracht werden. Mit einem alternativen Verfahren der Firma „Affymetrix“ werden die Sonden mit einer photolithographischen Technik direkt auf dem Glaschip synthetisiert (beschrieben von PEASE *et al.* [119]). Die Glasobjektträger sind mit einer lichtempfindlichen Substanz beschichtet, die mit Masken abgedeckt werden kann, die ausgesuchte lichtdurchlässige Stellen besitzen. Nach Auflegen der Maske werden diese Stellen belichtet, die photolabile Schutzgruppe wird entfernt und das erste Nukleotid mit ebenfalls einer lichtempfindlichen 5'-OH Gruppe wird gebunden. Diese Prozedur wird mit allen Nukleotiden und verschiedenen Masken wiederholt, um spezifische Oligonukleotid-Sonden (Spots) zu generieren.

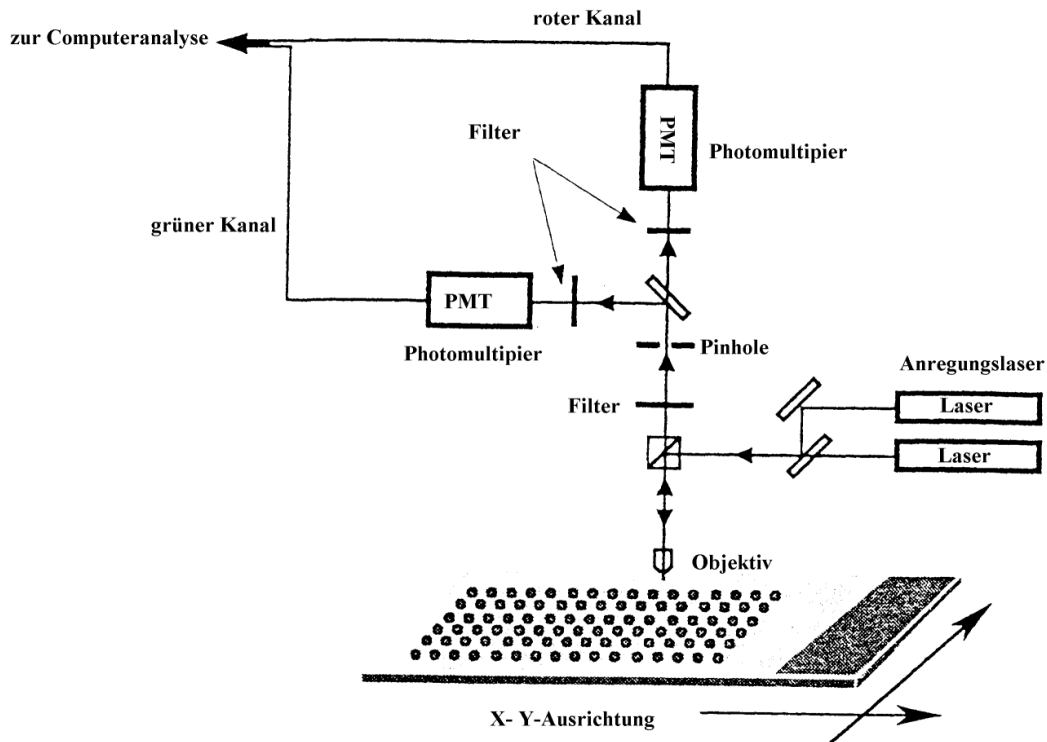


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Auswertung eines DNS-Arrays (modifiziert aus CHEN *et al.* [20])

Hybridisierung

Das zu untersuchende Target und ein bekanntes Vergleichstarget werden unterschiedlich fluoreszierend markiert und gleichzeitig unter stringenten Bedingungen auf den Chip hybridisiert. Die Hybridisierungsbedingungen sind dabei abhängig von der Beschaffenheit der gespotteten Sonden und des Targets. Gegebenfalls ist eine Suppressionshybridisierung repetitiver Sequenzen notwendig. Nach der Hybridisierung werden ungebundene Sequenzen, unspezifische Hybridisierungssignale und Salze durch Waschschritte entfernt.

Auswertung der Chips – „Scannen“

Die Auswertung der Mikroarrays erfolgt in der Regel mit einem konfokalen Laser-scanner. Zur Hybridisierung werden in den meisten Fällen zwei zu vergleichende, unterschiedlich fluoreszierend markierte Targets verwendet, die separat analysiert

werden. Abbildung 3.2 zeigt in einer schematische Darstellung wie ein DNS-Chip an mit einem konfokalen Laserscanner ausgelesen wird. Mit unterschiedlichen Lasern werden die Fluorezenzfarbstoffe in ihrem Anregungsbereich einzeln nacheinander angeregt und die Emissionen mit einem Photomultiplier gemessen. Da die auszuwertende Schicht eines Spots sehr dünn ist, verwendet man zur Auswertung einen konfokalen Laserscanner, der in der Ebene des Spots fokussiert wird. Das einfallende Laserlicht wird über einen Strahlenteiler weitergeleitet, durch eine Linse auf dem Chip fokussiert und induziert dort eine Fluoreszenz in alle Richtungen. Die Fluoreszenz in Richtung der Linse wird dort gebündelt und als paralleler Strahl weitergeleitet. Am Strahlenteiler wird der Teil des Anregungslichtes größtenteils zurück zur Lichtquelle reflektiert und das Fluoreszenzlicht kann passieren. Ein zusätzlicher Emissionsfilter mit geringer Bandbreite läßt nur einen Teil der Fluoreszenzlichtes durch, um das Anregungslicht völlig auszufiltern. Danach schließt sich eine Detektorlinse mit konfokalem „Pinhole“ an, bevor das Licht im Detektor gemessen wird. Mit diesem Element wird ausschließlich die Fluoreszenz aus der fokussierten Objektebene registriert. Mit der Methode des konfokalen Scannens wird eine Verfälschung des Signals durch die Hintergrundfluoreszenz aus einer anderen Ebene vermieden. Die Detektion wird mit Photomultipliern, den empfindlichsten Detektoren im sichtbaren Wellenlängenbereich, durchgeführt.

Anwendungen der DNS-Mikroarrays:

- **Expressionsuntersuchungen:**
Um die Expression einzelner Gene im Vergleich zu untersuchen, wird die mRNA von Kontroll- und Testzellen in cDNS umgeschrieben und verschieden markiert auf einen DNS-Chip hybridisiert. Dieser besteht aus cDNS-Klonen, meistens in Form von ESTs (Expressed Sequence Tags). Unterschiede in der Expression machen sich bei der komparative Hybridisierung durch Signalunterschiede auf den betroffenen Sonden bemerkbar.
- **Untersuchung von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms):**
SNPs (Einzelnukleotidpolymorphismen), gehören zu den häufigsten genetischen Variationen im menschlichen Genom. Etwa alle 1000 Basenpaare treten bei verschiedenen Individuen einer Population variable Basen auf. Diese Variabilität will man mit Prädispositionen für bestimmte Krankheiten assoziieren (Pharmakogenetik). Die SNPs wurden mit Mikroarrays auf synthetische Oligonukleotide typisiert (WANG *et al.* [156]). Die „Single Base Extension“-Methode untersucht SNPs, indem allelspezifische Primer auf einen Chip aufgebracht werden und in Anwesenheit von dNTPs und einem ddNTP (zum Abbrechen der Synthese) eine Amplifikation abläuft. Eine Kombination mit „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectroscopy“ (MALDI-MS) erlaubt es, die unterschiedlichen Massen und damit die Zusammensetzung der generierten Produkte auf dem Chip zu bestimmen.

- **Matrix-CGH:** Aufdeckung genomischer Unterschiede in einem Testergenom durch eine komparative Hybridisierung mit einem normalen Referenzgenom auf DNS-Chips. Deletionen und Amplifikationen sollen durch Intensitätsunterschiede auf den betreffenden Sonden auf dem Chip detektierbar sein.

3.2.3 Matrix-CGH

Im „Human Genome Project“ konnte ein Großteil des menschlichen Genoms mit kartierten Sonden abgedeckt werden. Diese Sonden eignen sich als topographische Marker, die das menschliche Genom mit einem Raster abdecken und als Matrix für Hybridisierungsexperimente dienen. Mit der Entwicklung der Chiptechnologie wurde die sogenannte Matrix-CGH ermöglicht. Dabei werden analog zur chromosomalen CGH zwei unterschiedlich markierte, zu vergleichende Genome auf einen Array von DNS-Sonden hybridisiert. Abbildung 3.3 zeigt schematisch das Prinzip der Matrix-CGH analog zur chromosomalen CGH (Abbildung 3.1). Die Kontrollmetaphasen der chromosomalen CGH werden durch spezifische, kartierte DNS-Sonden ersetzt. Diese Sonden werden in Form von „Spots“ in einem regelmäßigen Muster („Array“) auf beschichtete Glasobjektträger als „Matrix“ aufgetragen. Imbalancen zwischen den beiden hybridisierten Genomen sind als Intensitätsunterschiede auf den Spots meßbar.

In Analogie zu einer herkömmlichen FISH, bei der das zu untersuchende Chromosomenpräparat als Target (Genom) und die hybridisierte bekannte Probe als Sonde bezeichnet wird, werden bei der Matrix-CGH die auf dem Chip aufgetragenen DNS-Sequenzen als Sonden und das hybridisierte Testgenom als Target bezeichnet. Tabelle 3.1 vergleicht chromosomale CGH und Matrix-CGH.

Im folgenden sollen die wichtigsten Entwicklungsschritte der Matrix-CGH zur Analyse komplexer Genome auf Mikroarrays kurz zusammengefaßt werden. Von SHALON *et al.* [139] wurde 1996 ein Experiment vorgestellt, in dem komplexe Targets vergleichend auf einen DNA-Chip hybridisiert wurden. Dazu wurden genomische kartierte Hefe λ -Klone als Sonden gespottet und als Target wurden zum Vergleich zwei unterschiedliche Kombinationen aus isolierten genomischen YACs hybridisiert. SHALON *et al.* erwähnten die Möglichkeit, diese Methode zur genomweiten Kartierung und zu Expressionsstudien zu nutzen. Die aufgetretene falsch-negative Hybridisierung einzelner Klone wurde auf eine fehlerhafte PCR-Amplifikation der λ -Klone zurückgeführt.

SOLINAS-TOLDO *et al.* [142] etablierten 1997 eine Matrix-CGH mit ca. 75-130 kb großen P1, PAC-Klonen und Cosmiden aus Chromosomenbibliotheken als Sonden und genomischer Tumor-DNS als Hybridisierungstarget. Während auf den PAC-Sonden auch geringe Dosisunterschiede (z. B. 2:1) festgestellt werden konnten, war dies mit Cosmiden, die eine maximalen Größe von 40 kb besitzen nicht möglich. In ihrem Artikel wird das technische Problem angesprochen, das auftritt, wenn eine komplexes Target auf eine komplexe Sonde hybridisiert

wird. In beiden komplexen Proben sind viel repetitive Sequenzen vorhanden, die unterdrückt bzw. entfernt werden müssen.

PINKEL *et al.* [121] (1998) verwandten ebenfalls Cosmide, P1-, BAC-Klone und λ -Klone als Sonden, um die Empfindlichkeit von Klon-Arrays zu testen. Dazu wurden vor der Hybridisierung der genomischen Test- und Kontroll-DNS verschiedene Mengen 50 kb großer λ -Klone zugefügt. Dieses Modell simulierte das Verhalten Cosmid-großer Targets, die frei von repetitiven Sequenzen sind. Die Fluoreszenzverhältnisse waren proportional zu den relativen Mengen der λ -DNS in dem hybridisierten Target. Mit X-chromosomalen Sonden war das Intensitätsverhältnis zwar immer proportional zur DNS-Kopienzahl, wich aber vom optimalen Verhältnis ab. Dies wurde durch die Hybridisierung repetitiver Sequenzen, die nicht durch C_0t -1-DNA Sequenzen supprimiert werden, oder mit einer Kreuzhybridisierung verwandter Sequenzen erklärt. ALBERTSON *et al.* [1] (2000) nutzten die Matrix-CGH, um eine Amplikonstruktur in Tumoren quantitativ zu analysieren. Der Mikroarray enthielt BAC-Klone aus einem Contig von Chromosom 20. Ein Contig ist eine Zusammenstellung von kartierten Klonen, die teilweise überlappend eine Sequenz des ursprünglichen DNS-Stranges überspannt. Untersuchungen der Tumorzellen mit Matrix-CGH zeigten, daß einzelne Bereiche höher amplifiziert waren als andere und identifizierten das *CYP24*-Gen als Kandidaten-Onkogen in der Region 20q13.2.

POLLACK *et al.* [123] benutzten einen cDNA-Mikroarray mit ca. 1 kb großen Sonden zur CGH und hybridisierten genomische DNA. In ihren Experimenten konnten sie an einzelnen Klonen Genamplifikationen und Deletionen identifizieren und gleichzeitig Veränderungen auf genomischer (DNS-Sequenz) Ebene mit der Veränderung der Genexpression vergleichen.

GESCHWIND *et al.* [36] führten eine CGH an Mikroarrays zur Untersuchung der Gendosis in der X-chromosomalen pseudoautosomalen Region bei Patienten mit Klinefelter Syndrom durch. Als Sonden wurden inter-Alu-PCR-Produkte von Cosmiden aus dieser Region und BACs des Chromosoms 17 als Kontrolle verwendet. Als Target wurden inter-Alu-Produkte der zu untersuchenden DNS verwendet. Insgesamt wurden 61 Klone vom Chromosom X und 71 BACs vom Chromosom 17 generiert. Von allen Klonen zeigten in einem Kontrollexperiment weniger als 5% eine Abweichung vom erwarteten Intensitätsverhältnis.

Die Hybridisierung bei einer Matrix-CGH gleicht in den meisten Fällen der einer chromosomalen FISH. Zwei genomische DNSn werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und unter Suppressionsbedingungen zur Unterdrückung der repetitiven Sequenzen mit C_0t -1-DNA auf Klon-Arrays hybridisiert. Die Hybridisierung wird durch die Stringenz des Hybridisierungspuffers, Formamidgehalt und Salzkonzentration, Hybridisierungstemperatur und stringente Waschbedingungen gesteuert.

Ähnlich der chromosomalen CGH erfordert die Matrix-CGH eine digitale Bildanalyse und eine statistische Auswertung. Während chromosomale CGH an einem fluoreszenzmikroskopischen Bild analysiert wird, werden die Signale auf dem

Komparative genomische Hybridisierung auf dem Chip

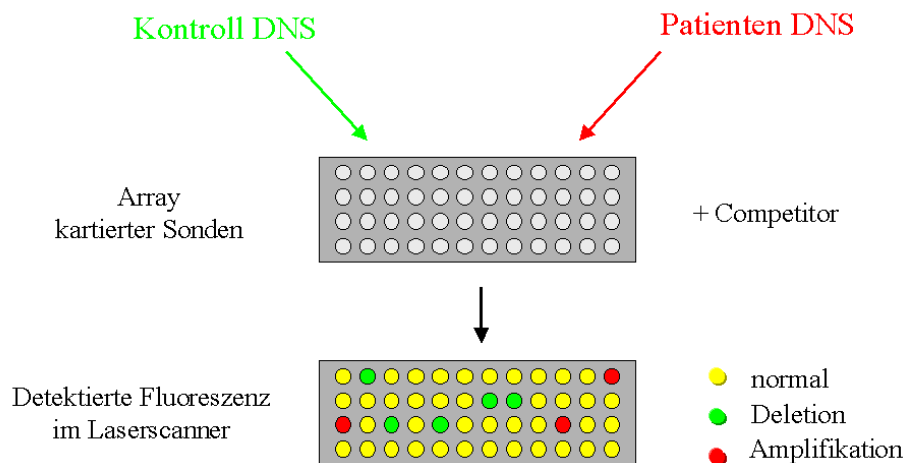


Abbildung 3.3: Schema der CGH auf einem DNS-Array: rot markierte Patienten-DNS und grün markierte Kontroll-DNS werden auf einen Array aus kartierten Klonen hybridisiert. Intensitätsunterschiede auf den Sonden werden durch Auslesen mit einem Laserscanner detektiert. Amplifikationen im Patientengenom werden als Verstärkte Rot-Fluoreszenz, Deletionen als vermehrte grüne Fluoreszenz repräsentiert.

DNS-Chip mit einem konfokalen Laserscanner aufgenommen. Nach Auswahl der hybridisierten und auswertbaren Spots wird der lokale Hintergrund subtrahiert. Die Fluoreszenzverhältnisse werden normalisiert, und ein Grenzwert zur Unterscheidung der Dosisverhältnisse wird festgelegt. Über- oder unterschreiten diese Intensitätsverhältnisse einen Grenzwert, wird eine Deletion bzw. Amplifikation der betroffenen Sequenz diagnostiziert. Bei der chromosomalen CGH werden die Ergebnisse mehrerer Metaphasen gemittelt. Bei der Matrix-CGH analysiert man die die Intensitätsverhältnisse mehrerer Spots mit identischen Sequenzen und/oder aus wiederholten Hybridisierungsexperimenten.

In dieser Arbeit wird die Etablierung einer Matrix-CGH basierend auf inter-Alu-PCR Produkten beschrieben. Es wird gezeigt, wie mit X-chromosomalen Sonden bei Patienten mit multiplen X-Chromosomen eine Dosisunterscheidung gelingt. Mit den etablierten experimentellen Bedingungen wurde ein 2:1 Dosisunterschied nachgewiesen.

	Chromosomale CGH	Matrix-CGH
Sonde	Genomische DNS, DOP-PCR-Produkte genomischer DNS	Genomische Klone: Cosmide, YACs, PACs ESTs, PCR-Produkte (inter-Alu etc.) von Klonen
Target	Metaphasechromosomen	Genomische DNS, PCR-Produkte genomischer DNS
Technische Ausstattung	Fluoreszenzmikroskop, CCD-Kamera, Software zur Aufnahme und Analyse der Bilder	Spotter, Scanner, Software zur Analyse der Intensitätswerte
Auflösung	15 Mb [118]	50 kb [121] / 1 kb [123]

Tabelle 3.1: Vergleich von chromosomaler CGH und Matrix-CGH

3.3 Kombination von CGH und SKY zur Unterscheidung mütterlicher und väterlicher Chromosomen

Bei SKY („Spectral Karyotyping“) (siehe Kapitel 3.1.2) und CGH („Comparative Genomic Hybridization“) handelt es sich um moderne zytogenetische Methoden, die vor allem in der Tumorforschung verwendet werden, um strukturelle bzw. numerische Chromosomenumbauten aufzudecken. Während SKY komplexe Translokationen in einem einzigen Hybridisierungsexperiment aufklärt, entdeckt CGH genomische Imbalancen. Ein weiteres lang angestrebtes Ziel, väterliche und mütterliche homologe Chromosomen in einer somatischen Zelle verschieden zu markieren und dadurch unterscheiden zu können, blieb bislang unerreicht. Diese Methode könnte dazu dienen, Chromosomenstörungen zu entdecken, die auf einem Ungleichgewicht von väterlichen und mütterlichen Erbanlagen beruhen.

3.3.1 genomische Prägung - „Imprinting“

Die „genomische Prägung“ (genomic imprinting) beschreibt das Phänomen, daß väterliche und mütterliche Erbanlagen funktionell nicht gleichwertig sind. Hierbei spielen epigenetische Mechanismen eine Rolle. Zur Entwicklung und Ausbildung eines normalen Phänotypen sind sowohl väterliche wie mütterliche Chromosomen erforderlich. Gene, die der „Prägung“ unterliegen, werden nämlich nur vom väterlichen bzw. mütterlichen Chromosom transkribiert. „Uniparentale Disomie“ liegt vor, wenn statt eines mütterlichen und eines väterlichen Chromosoms beide homolo-

ge Chromosomen von einem Elternteil auf das Kind übergegangen sind, während das Chromosom des anderen Elternteils verloren ging. Molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, daß geprägte Gene für eine normale Entwicklung und einen normalen Phänotyp wichtig sind. Beispiele einer genetischen Krankheit, die durch Imprintingstörungen beeinflusst wird, sind das „Prader-Willi-Syndrom“ und das „Angelman-Syndrom“. Obwohl in beiden Fällen eine Deletion im Chromosom 15, 15q11-13 zugrunde liegt, sind die resultierenden Syndrome vollkommen unterschiedlich. Während das Prader-Willi-Syndrom durch Entwicklungsverzögerungen, Verhaltensstörungen und Hypotonie gekennzeichnet ist, treten beim Angelman-Syndrom schwere geistige Behinderungen und Krampfanfälle in Erscheinung. Es stellte sich heraus, daß beim Prader-Willi-Syndrom das väterliche Chromosom von einer Deletion betroffen war, beim Angelman-Syndrom das mütterliche Chromosom. In einigen Fällen konnte keine Deletion dieses Bereichs im Genom festgestellt werden. In diesen Fällen lag jeweils eine uniparentale Disomie (UPD) vor. Während Patienten mit Prader-Willi-Syndrom zwei maternale Chromosomen 15 besaßen, stammten beim Angelman-Syndrom beide vom Vater. UPDn können bisher nur mit aufwendigen molekularen Techniken diagnostiziert werden. Ein langersehntes Ziel sind zytogenetische Methoden zur Unterscheidung von väterlichen und mütterlichen Chromosomen.

3.3.2 Komparative Hybridisierung und SKY-Analyse

Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Methode wurden die beiden zytologischen Techniken CGH und SKY kombiniert, um eine differentielle Markierung der elterlichen Chromosomen zu erreichen. Die Experimente wurden an Metaphasen der F₁ Hybride von *Mus musculus* (MMU) und *M. spretus* (MSP) durchgeführt. Die Genome von MMU und MSP sind in ihrer Entwicklung ca. 2-3 Millionen Jahre voneinander getrennt und der Sequenzunterschied beider Stämme beträgt insgesamt ca. 1%.

Komplexe DNS-Sonden der beiden Eltern wurden mit zwei unterschiedlichen und für den Emissionswellenlängenbereich spektral nicht überlappenden Fluoreszenzfarben Cy3 und Cy5 markiert. In der nachfolgenden Hybridisierung wurden die euchromatischen Chromosomenarme individuell markiert. Unterschiede der Sondenhybridisierung von MMU- und MSP- DNS zu den väterlichen und mütterlichen Chromosomen wurden durch Ermittlung des Quotienten der Intensitäten beider Farben auf den Chromosomenarmen festgestellt. Anders als bei herkömmlicher CGH wurde zur Ermittlung der Intensität über annähernd den gesamten Wellenlängenbereich beider Emissionsspektren integriert.

Genomische *In situ*-Hybridisierung wurde zuerst von SCHWARZACHER *et al.* [136] in der Pflanzenzytogenetik verwendet, um bei interspezifischen Hybriden die Chromosomen beider Eltern auseinanderzuhalten, oder um eine Integration fremder Chromosomen zu verfolgen. Die analysierten Pflanzengenome waren genetisch viel weiter voneinander entfernt als die unterschiedlichen Mausspezi-

es. Die Experimente dieser Arbeit sollen einen ersten Schritt zu Identifikation väterlicher und mütterlicher Chromosomen in der Säugetiergenetik aufzeigen.

Kapitel 4

Material und Methoden

4.1 Sonden und Sondenherstellung

Als Sonde wird im allgemeinen eine spezifische DNS-Sequenz oder ein Gemisch von Sequenzen bezeichnet, das an die komplementäre Sequenz des stationären Targets hybridisiert. In FISH-Experimenten kann es sich bei den Sonden u. a. um fluoreszierend markierte YACs oder chromosomenspezifische DNS-Bibliotheken handeln. Die Hybridisierungstargets können Metaphasechromosomen, Interphaspräparate etc. sein. Bei den Hybridisierungen auf die DNS-Arrays sind die sequenzspezifischen Sonden fest auf dem Glasobjektträger aufgebracht, während das komplexe Target markiert und hybridisiert wird. Im folgenden wird zunächst ein kurzer Überblick über alle verwendeten Sonden gegeben, bevor die unterschiedlichen Methoden im Detail erläutert werden. Für die Experimente wurden folgende Sonden eingesetzt:

- Genomische DNS
- DOP-PCR-Produkte
 - chromosomenspezifischer DNS-Bibliotheken
 - YACs
- CTA₄-PCR-Produkte
 - repeatfreier Chromosomenbibliotheken
- Inter-Alu-PCR-Produkte
 - genomischer DNS
 - YACs
- C₀t-1-DNS

- B1- und B2-PCR-Produkte der Maus
- inter B1 PCR-Produkte der Maus

Zur 24-Farben-FISH standen für 21 Chromosomen durchflußzytometrisch sortierte, chromosomenspezifische DNS-Bibliotheken zur Verfügung (FERGUSON-SMITH [29]). Diese wurden mit „Degenerated-Oligonucleotid-Primed-Polymerase-Chain-Reaction“ (DOP-PCR) amplifiziert und anschließend mit einem veränderten DOP-PCR-Protokoll fluoreszierend markiert. Für die restlichen 3 Chromosomen (Chromosomen 12, 14 und 22) konnten wir von Repeats befreite Sonden benutzen, die mit einer CTA₄-PCR vervielfacht und und markiert werden konnten. Diese wurden von M. R. Speicher (Institut für Anthropologie und Humangenetik, LMU München) hergestellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die in der Chromosomenbandierung verwendeten YAC-Sonden wurden nach Auftrennung durch Pulsfeldgelelektrophorese und Gel-Extraktion isoliert und mit dem herkömmlichen DOP-PCR-Protokoll amplifiziert.

Die YACs zur Bandierung der Chromosomen 2 und X wurden aus der FISH-kartierten YAC-Bibliothek des MPIs bezogen [163]. Um eine möglichst gleichmäßige Bandierung zu erhalten, wurde etwa alle 5cM ein YAC ausgewählt, und je drei bis fünf YACs bildeten einen Pool einer FISH-Bande.

Zur komparativen Hybridisierung der mausspezifischen Sonden wurde uns von R. Fundele genomische DNS der beiden Mausspezies *M. musculus* und *M. spretus* zur Verfügung gestellt. Die genomischen DNSn wurden direkt als Sonde, bzw. als Ausgangsmaterial zur Erzeugung von C₀t-1-DNS verwendet. Außerdem wurden sie zur PCR-Amplifikation von B1-Elementen, B2-Elementen und inter-B1-Sequenzen eingesetzt.

Zur CGH auf den Chips wurden die genomischen DNSn aus Zellpellets der Kontrollpersonen und Patienten extrahiert und zu Inter-Alu- oder DOP-PCR-Amplifikationen verwendet.

4.1.1 Genomische DNS

Die genomische DNS wurde mit einer phenolfreien DNS-Extraktionsmethode gewonnen. Das aufgetaute Zellpellet (ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen) wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 20 ml Lysierpuffer (0,4 M Tris HCl, pH 8,0, 0,06 M Natriumacetat, 0,15 M NaCl und 1% SDS) resuspendiert. Nach Zugabe von 32 μ l RnaseA-Lösung (50 μ g/ml) wurden die Zellen für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 5 ml 5 M Natriumperchlorat zugegeben und die Lösung wurde ca. 10 x geschüttelt. Nach Zugabe von 20 ml kaltem Chloroform wurde das Schütteln wiederholt und anschließend wurde das Gemisch 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert (Hettich-Rotant-Zentrifuge). Durch die Zentrifugation bildeten sich zwei Phasen. Die obere, DNS-enhaltende Phase wurde abgenommen und erneut, wie zuvor mit Chloroform ausgeschüttelt. Dieser letzte Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die obere Phase klar erschien und keine Proteinreste mehr enthielt.

Die klare Lösung wurde abgenommen und das gleiche Volumen an eiskaltem 100% Ethanol wurde zum Fällen der DNS zugegeben. Bei leichtem Schütteln des Gefäßes wurde der DNS-Faden sichtbar, der mit einer Impföse aufgenommen wurde. Dieses DNS-Pellet wurde zum Waschen kurz in 70%igem Ethanol getaucht und dann trocknen lassen. Die DNS konnte in 1 x TE gelöst werden.

4.1.2 DOP-PCR-Produkte

Der Großteil der chromosomenspezifischen Sonden und die YACs zur Chromosomenbandierung wurden mit DOP-PCR („Degenerate-Oligonucleotide-Primed-Polymerase-Chain-Reaction“) vervielfacht. DOP-PCR wird benutzt, um komplexe genomische DNS zu amplifizieren (TELENIUS *et al.* [148]). Der degenerierte Primer bindet etwa alle 300-3000 bp an genomische DNS. Durch PCR werden die Sequenzen zwischen zwei gebundenen Primern vervielfältigt. Es resultiert ein komplexes Gemisch von 200 bp bis 2 kb langen Fragmenten, die die genomische DNS repräsentieren. Die Amplifikation erfolgte in zwei PCR-Schritten und nach herkömmlichen PCR-Bedingungen. Alle DOP-PCR Schritte wurden mit dem Telenius 6MW-Primer mit folgender Sequenz durchgeführt: 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'. Für alle Reaktionen wurde die Perkin-Elmer 9600 PCR-Maschine verwendet.

Im ersten Schritt (DOP1-PCR) wurde in einem 5 μ l Reaktionsvolumen mit 1 x PCR-Puffer (Promega), 6 mM MgCl₂ (Promega), jeweils 0,25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Boehringer Mannheim), 2,5 pmol/ μ l DOP-Primer (MWG-Biotech), 2 U Taq-Polymerase und 2,3 μ l genomische DNA als Ausgangsmaterial die Amplifikation durchgeführt. Das Temperaturprofil der DOP1-PCR war wie folgt:

DOP1-PCR

75°C	5 min
94°C	1 min
30°C	1 min 8 Zyklen
74°C	2 min

Im zweiten Schritt (DOP2-PCR) wurde das 5 μ l Produkt der DOP1-PCR als Ausgangsmaterial für eine 50 μ l Reaktion mit 1 x PCR-Puffer, 0,25 mM je dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 0,5 pmol/ μ l DOP-Primer, 2,5 mM MgCl₂ und 2 U Taq-Polymerase benutzt.

DOP2-PCR

94°C	1 min
94°C	1 min
40°C	1 min 35 Zyklen
72°C	4 min
72°C	10 min

Das Produkt der DOP2-PCR erhielt ca. 100 ng/ μ l PCR-Produkt.

4.1.3 CTA₄-DOP-PCR-Produkte

Die von repetitiven Elementen freien chromosomenspezifischen Sonden der Chromosomen 12, 14 und 22 wurden von M. R. Speicher als CTA₄-Produkt zur Verfügung gestellt. In dem von BOLZER *et al.* [9] beschriebenen Protokoll wurden die „Repeatsequenzen“ des Ausgangsmaterials durch eine Hybridisierung mit biotinylierter C₀t-1-DNS gebunden. Mit Streptavidin-markierten Magnetkügelchen wurden die repetitiven Sequenzen in einer Affinitätschromatographie von den übrigen Sequenzen abgetrennt. Die ungebundene Sonde konnte nach Aufreinigung weiterverwendet werden.

Die so erhaltenen Sonden ohne repetitive Sequenzen konnten durch eine stringente DOP-PCR mit dem CTA₄-Primer (5'-CTA CTA CTA CTA CCG ACT CGA G-3') vervielfältigt werden. 100 ng des repeat-freien Ausgangsmaterials wurde mit 1 x Taq-Puffer, 2 mM MgCl₂, jeweils 2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1,7 μ M CTA₄-Primer und 5 U Taq-Polymerase in einem 50 μ l Volumen mit folgendem CTA₄-PCR-Profil amplifiziert:

CTA₄-PCR

95°C	5 min	
95°C	1 min	
53°C	1,5 min	36 Zyklen
72°C	1 min + 1 sec pro Zyklus	

Die amplifizierten Sonden konnten anschließend mit einer CTA₄-Markierungs-PCR fluoreszierend markiert, bzw. mit einer weiteren Runde CTA₄-PCR nochmal vervielfältigt werden.

4.1.4 Inter-Alu-PCR-Produkte

Zur Matrix-CGH wurden vorwiegend Inter-Alu-PCR-Produkte als Sonden und Targets verwendet. Repetitive Alu-Elemente sind etwa alle 5 kb im Genom vorhanden. Die Dichte von Alu-Elementen hängt aber von der Chromosomenregion ab; sie sind vermehrt in R-positiven Banden zu finden. Die Inter-Alu-Primer lagern sich in den Alu-Repeats an. Durch Inter-Alu-PCR werden Sequenzen zwischen eng benachbarten Alus (<5 kb) amplifiziert. Zur Sondenherstellung wurden YACs ausgehend von genomischer DNS in Mikrotiterplatten in PCR Maschinen (Perkin Elmer Gene Amp. 9700) amplifiziert. Von der DNS der YACs wurden je 200 ng in eine Reaktion eingesetzt; von gesamtgenomischer DNS der untersuchten Patienten und der Kontrollen wurden zwischen 500 ng und 1 μ g eingesetzt. Die PCR Reaktion wurde in einem 50 μ l Reaktionsvolumen mit 1 x PCR-Puffer (Perkin-Elmer), jeweils 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2 U Taq-Polymerase

und 0,8 pmol/ μ l Cl₂-Primer durchgeführt. Der Cl₂-Primer hat die Sequenz: 5'-CTG CAC TCC AGC CTG GG-3'. Für einige Sonden wurde ein Amino-Cl₂-Primer verwendet. Dabei handelt es sich um einen Cl₂-Primer, dessen 5'-Ende um eine NH₂-Gruppe verlängert ist. Mit dieser NH₂-Gruppe können die auf den Chip gespotteten Sonden mit der Oberfläche des Objektträgers gekoppelt werden. Zur Herstellung der Sonden wurden die YACs mit einem PCR-Protokoll mit 35 Zyklen vervielfältigt. Bei der Amplifikation der Target-DNS wurde darauf geachtet, daß die PCR-Reaktion eine lineare Vervielfältigung zuläßt. Um bei der Amplifikation der Target-DNS nicht in den kritischen Sättigungsbereich zu geraten, wurden die PCRs mit 20 Zyklen durchgeführt.

Inter-Alu-PCR

94°C	3 min
94°C	0,5 min
40°C	0,5 min 20 bzw. 35 Zyklen (Target/Sonden)
72°C	1,5 min
72°C	10 min

Zur Hybridisierung wurden jeweils 4 PCR-Ansätze der gesamtgenomischen Target-DNS gepoolt, um mögliche präferentielle Amplifikationen einzelner Sequenzen in einem Reaktionsvolumen auszugleichen.

Exonukleaseverdau

In den Alu-PCR-Produkten bestehen die Enden aus Alu-Primer-Sequenzen. Alu-Sequenzen hybridisieren unspezifisch mit genomischer DNS bzw. YAC-DNS. Um dies zu verhindern sollten möglichst wenige Alu-Sequenzen der hybridisierten Target-DNS vorhanden sein. Störende Alu-Sequenzen an den Enden der Target-Inter-Alu-Produkte wurden mit der Exonuklease Bal31 entfernt. Bal31 verdaut die Enden von DNS ab und entfernt so die Alu-Sequenzen.

Das Enzym Bal31 wurde in einem Puffer von 20 mM Tris-HCl, pH 8,1, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA und 50% Glycerol auf eine Konzentration von 0,1 U/ μ l verdünnt. Der Verdau von 5 μ g DNS wurde in einem 50 μ l Volumen bei 20 mM Tris-HCl, pH 8,1, 14,5 mM CaCl₂, 14,5 mM MgCl₂ und 600 mM NaCl mit 0,25 U Bal31 (Boehringer Mannheim) 10 min bei 30°C durchgeführt. Die verdaute DNS wurde anschließend durch Affinitätschromatographie über eine Quiagen-Säule von Puffer und Nukleotiden gereinigt.

4.1.5 C₀t-1 DNS

Die Bezeichnung der C₀t-1-DNS kommt aus der Reassoziierungskinetik denaturierter Doppelstrang-DNS. Die Definition der Abkürzung C₀t bedeutet:

$$C_0t = \text{Konzentration [Mole Nukleotide/Liter]} \times \text{Zeit [Sekunden]}$$

Ein nützlicher Parameter zur Beschreibung der Komplexität eines Genoms ist $C_{0t_{1/2}}=1/k$ (k =Reassoziationskonstante), wenn die Reassoziaton zur Hälfte vollendet ist. Säugetier-DNS zeigt 3 verschiedene Komponenten in ihrem Reassoziationsverhalten: eine schnelle, eine intermediäre und eine langsame Komponente. Die schnelle Komponente entspricht hochrepetitiver DNS, die ca. 10% des *M. musculus* Genoms betrifft; ungefähr 58% des Mausgenoms bestehen aus nichtrepetitiver DNS.

Zur Präparation repetitiver C_{0t} -1-DNS von *M. musculus* und *M. spretus* nach NISSON *et al.* [113] wurden je 1 mg genomische DNA in 500 μ l TE (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst, mit Ultraschall auf Fragmentlängen zwischen 200-1000 bp zerkleinert und bei 96°C denaturiert. Nach Zugabe von 100 μ l 0,3 M NaCl wurde die DNS für 200 s bei 63°C reassoziert. Dies entspricht einem bis C_{0t} -Wert von ungefähr 1. Anschließend wurde zum Verdau der übriggebliebenen einzelsträngigen DNS 600 μ l (400 U) S1 Nuclease (in 0,4 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat, pH 4,5, 2 mM ZnSO₄ und 1% Glycerin) für 20 Minuten bei 37°C zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 μ l 0,2 M EDTA gestoppt und auf Eis gestellt. Die renaturierte doppelsträngige DNS wurde von der verdauten einzelsträngigen DNS über eine Sephadex G50 Säule abgetrennt und zweimal mit TE-Puffer gespült. Die DNS Lösung wurde in 100 μ l Aliquots nach Durchlaufen der Säule gesammelt. Die Fraktionen, die den ersten DNS-Peak enthielten, wurden gepoolt und als C_{0t} -1-DNS verwendet.

4.1.6 Inter-B1-PCR-Produkte der Maus

Es wurden Sonden hergestellt, die aus einer Mischung komplexer, größtenteils Einzel-Kopie-DNS-Sequenzen bestehen. B1 und B2 sind, ähnlich wie die menschlichen Alus, interspegierte repetitive DNS-Sequenzen. Diese B1-Sonden wurden aus gesamt-genomischer DNS amplifiziert (beschrieben von HIMMELBAUER *et al.* [48]). Genomische Maus-DNS wurde in einem Gesamtvolumen von 60 μ l mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 125 μ M jedes dNTPs, und 1 μ g B1R Primer amplifiziert. Die Sequenz des B1R Primers lautet: 5'-AGT TCC AGG ACA GCC AGG GCT AYA CAG A-3'¹.

4.2 Chipherstellung

4.2.1 Sonden auf dem Chip

Für die vorgestellten Ergebnisse wurden 2 verschiedene Chips verwendet, die zum großen Teil identische Sonden trugen: Chip 1, der in den Varianten a und b vorlag und Chip 2. Auf Chip 1 wurden vorwiegend Inter-Alu-PCR-Produkte von YACs verwendet. Chip 1 setzte sich zusammen aus 158 subtelomerischen YACs,

¹R und Y ersetzen Purin- bzw. Pyrimidinbasen

ca. 4 Sonden pro Chromosomenende. Hinzu kamen weitere 97 autosomale YACs (davon 74 von Chromosom 13) und 63 YACs vom X. Also insgesamt 243 YACs von Autosomen und 73 vom X. Außerdem befanden sich auf Chip 1a DOP-PCR Produkte von subtelomerischen Cosmiden bzw. auf Chip 1b Inter-Alu-PCR Produkte von subtelomerischen Cosmiden und PACs (davon eine X-chromosomale Sonde).

Chip 2 bestand aus den gleichen 158 subtelomerischen YACs, den 63 X-chromosomalen YACs, einem X- und einem XY-chromosomalen PAC, außerdem 4 YACs und 2 PACs von Chromosom 2. Von diesen Sonden als Ausgangsmaterial wurden jeweils drei verschiedene Produkte generiert: Inter-Alu-PCR-Produkt, DOP-PCR-Produkt von Inter-Alu-PCR-Produkten und mit Exonuklease verdauter Inter-Alu-PCR-Produkte. Bei der Herstellung von Chip 2 wurden jeweils drei identische Spots von jedem Produkt auf den Chip aufgetragen.

Bei allen verwendeten YACs handelte es sich um Sonden, die bei der FISH-Kartierung keine chimärischen Hybridisierungssignale zeigten. Die DNS der einzelnen Sonden wurde in Mikrotiterplatten vorgelegt und, wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben, amplifiziert. Vor dem Spotten wurden die PCR-Produkte der Sonden in Mikrotiterplatten gefällt. Dazu wurden zu den 50 μ l PCR-Reaktionen jeweils 100 μ l eiskalter 100% Ethanol, 3 μ l 3 M Natriumacetat und 8 ng Glycogen hinzugegeben, für 1 h bei -80°C gefällt und 1 h bei 3000 rpm (Eppendorf-Kühlzentrifuge) bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Sonden mit je 50 μ l 70% Ethanol auf einem Schüttler mindestens 30 min gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgesaugt und das Pellet luftgetrocknet. Durch das Fällern wurden störende Primer und Nukleotide weitgehend aus den Sonden entfernt. Die Pellets wurden zum Spotten in 5 μ l 100 mM NaCO_3 gelöst.

4.2.2 Spotten

Als Spotten wird das automatisierte Aufbringen von Sonden auf Glasobjektträger verstanden. Die DNS-Arrays wurden alle mit einem Arrayer von Beecher hergestellt. Dabei werden die Objektträger, deren Vorbehandlung in Kapitel 4.4.1 beschrieben wird, durch eine Unterdruckpumpe auf einem Metalltisch immobilisiert. Der computergesteuerte Roboterarm wird in den 3 Ortskoordinaten bewegt, zur Ausrichtung der Nadeln auf den Objektträger in XY-Richtung und zum Aufsetzen der Nadeln sowie zum Eintauchen in die Sondenlösung in Z-Richtung. In diesen Experimenten wurden jeweils 2 Nadeln gleichzeitig verwendet. Die Nadeln wurden vor dem Wechseln zu einer neuen Sonde jedesmal gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Durch kurzes Eintauchen der Nadeln in die Sondenlösung wurden die Kapillare der Nadeln gefüllt, um dann bis zu 48 Objektträger mit der jeweiligen Sonde zu bestücken. Der automatisch gesteuerte Zwischenraum zwischen den einzelnen Spots beträgt in X- und Y-Richtung 400 μ m.

4.3 Markierung

Sonden und die Targets für die Chipexperimente wurden zur Hybridisierung enzymatisch markiert. Im wesentlichen unterscheidet man zwischen direkter und indirekter Markierung.

- **Direkte Markierung:** In die Markierungsreaktion werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Nukleotide eingebaut.
- **Indirekte Markierung:** Zur Markierung werden mit Biotin- und Digoxigenin- gekoppelte dUTPs verwendet, die nach der Hybridisierungsreaktion mit Avidin- bzw. Antidigoxigenin- konjugierten Farbstoffen detektiert werden. Mit Brückenantikörpern kann auch eine Signalamplifikation durchgeführt werden.

Beide Methoden besitzen Vor- und Nachteile. Bei der direkten Markierung tritt kaum Hintergrundfluoreszenz auf, da keine Sekundärreaktion (Entwicklung der Fluoreszenzsignale) auf den Objektträgern notwendig ist. Direkte Markierung ist wegen des schwierigen Einbaus der großen Fluoreszenzmoleküle in der Enzymreaktion weniger effizient. Manche Moleküle (z. B. Cy5) sind so groß, daß sie aus sterischen Gründen sehr schlecht oder überhaupt nicht in einen DNS-Strang eingebaut werden können. Indirekte Markierung gewährleistet einen guten Einbau der mit kleinen Moleküle (Biotin- oder Digoxigenin-) markierten Nukleotide und ist durch Einsatz verschieden fluoreszierender Sekundärreaktionen in der Detektion flexibel. Die Signale können bei Bedarf durch einen zusätzlichen Antikörper verstärkt werden („Sandwich“-Technik). Die Antikörperreaktion verursacht eine gewisse Hintergrundfluoreszenz, da die Antikörper nicht ausschließlich mit ihrem korrespondierenden Antigen reagieren, sondern auch unspezifische Bindungen eingehen. In Tabelle 4.1 sind die verwendeten Nukleotide und Antikörper mit ihren Herstellern aufgelistet. Für die direkt-markierten dUTPs und die fluoreszenzmarkierten Antikörper sind die Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe angegeben.

Zur direkten und indirekten Markierung wurden verschiedene enzymatische Methoden (PCR-Markierung, Nick Translation, Random Priming) benutzt, die im Folgenden beschrieben werden.

4.3.1 PCR-Markierung

DOP-PCR

DOP-PCR wurde zur Markierung von chromosomenspezifischen DNS-Bibliotheken und DOP-PCR amplifizierten Sonden der YACs benutzt. Das Protokoll entspricht im wesentlichen dem der herkömmlichen DOP-PCR-Amplifikation. Zur Markierung sind den „kalten“ Nukleotiden fluoreszenzmarkierte dUTPs zugefügt worden, die bei der DNA-Strang-Verlängerung statt dTTPs eingebaut werden.

Name	Hersteller	Emissionsmaximum
Cy3-dUTP	Amersham Life Science	570 nm
Cy5-dUTP	Amersham Life Science	670 nm
Texas Red-12-dUTP	Molecular Probes	610 nm
Spectrum Green-dUTP	Vysis	524 nm
Spectrum Orange-dUTP	Vysis	588 nm
monoklonal Anti-Digoxigenin	Sigma Bio Science	indirekt
Avidin-Cy5	Amersham Life Science	670 nm
FITC-Avidin	Dianova	520 nm
Cy3-Avidin	Dianova	570 nm
FITC-Antidigoxigenin	Dianova	520 nm
Cy3-Antidigoxigenin	Dianova	570 nm
anti-Maus-Cy5,5-IgG	Amersham Life Science	694 nm
Biotin-dUTP	Boehringer Mannheim	indirekt
Digoxigenin-dUTP	Boehringer Mannheim	indirekt

Tabelle 4.1: Eine Auflistung aller verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Die Avidin-gebundenen Farbstoffe wurden zur Detektion Biotin-markierter Nukleotide verwendet, die fluoreszierenden Antidigoxigenin-Antikörper zur Detektion Digoxigenin-markierter Nukleotide. Cy5,5-Antimaus-IgG wurde nach einem Zwischenschritt über Maus-Antidigoxigenin-Antikörper zur Fluoreszenzmarkierung Digoxigenin-markierter Nukleotide in der 24-Farben-FISH verwendet.

Wegen der Größe des Moleküls können die fluoreszierenden Nukleotide nicht an jeder passenden Stelle eingebaut werden. Daher müssen neben den markierten dUTPs auch unmarkierte dTTPs angeboten werden, um den enzymatischen Ablauf erhalten zu können. Da die Biotin- und Digoxigenin-gebundene Nukleotide kleiner sind als dUTPs mit Fluoreszenzfarbstoff, werden markierte:unmarkierte dUTPs je nach Kopplung in unterschiedlichen Mengenverhältnissen angeboten.

Markierung zur 24-Farben-FISH

Es wurden Sonden-pools aus den DOP-PCR-Produkten aller Chromosomen erstellt, die mit der gleichen Farbe markiert werden sollten. Die Fluoreszenzfarbstoffe Texas Red, Spectrum Green und Spectrum Orange wurden zur direkten Markierung, Cy5 (Biotin) und Cy5.5 (Digoxigenin) zur indirekten Markierung verwendet. Der Texas Red-Pool wurde aus den PCR-Produkten der Chromosomen 1, 5, 6, 7, 15, 16 und 18 zusammengestellt, der Spectrum Green-Pool aus den Chromosomen 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 16, 18, 21 und Y; der Biotin-Pool aus den Chromosomen: 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 15, 17, 19 und Y; der Spectrum Orange-Pool aus den Chromosomen: 3, 5, 9, 11, 13, 15, 18, 19, 20, und X; der Digoxigenin-Pool aus den Chromosomen 2, 3, 5, 6, 9, 10, 21, X und Y. Die Markierung der Chromosomensonden wurde in einem 100 μ l Ansatz durchgeführt mit 1 x PCR-Puffer (Promega), 2 mM MgCl₂, jeweils 0,1 mM dATP, dGTP und dCTP, 0,075 mM dTTP, 8 μ M DOP-Primer (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3') und 2 U Taq Polymerase. In eine Reaktion wurde ca. 800 ng DNS eines Pools und das entsprechende markierte Nukleotid (10 μ M Texas Red-dUTP (Molecular Probes), 10 μ M Spectrum Green-dUTP (Vysis), 10 μ M Spectrum Orange-dUTP (Vysis), 30 μ M Biotin-dUTP (Boehringer Mannheim) oder 30 μ M Digoxigenin-dUTP (Boehringer Mannheim)) eingesetzt. Die PCR wurde in einer PE 9600 PCR-Maschine nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

DOP-PCR-Markierung

94°C	5 min
94°C	1 min
56°C	1,5 min 30 Zyklen
74°C	2 min
72°C	10 min

Aus diesen Markierungsreaktionen resultieren die in Tabelle 4.2 aufgelisteten Fluoreszenz-kombinationen für die einzelnen Chromosomen.

Markierung der YACs

Die Markierung der YACs wurde ähnlich wie bei den chromosomenspezifischen DNS-Bibliotheken mit DOP-PCR durchgeführt. In einem 50 μ l Volumen wurden ca. 400 ng DOP-PCR Produkt der YACs mit 1x PCR-Puffer (Promega),

Chromosom	A Spectrum- Orange	B Texas Red	C Biotin (Cy5)	D Spectrum- Green	E Dig.- (Cy5.5)
1		X	X	X	
2					X
3	X		X	X	X
4			X	X	
5	X	X		X	X
6		X	X	X	X
8				X	
9	X			X	X
10			X		X
11	X		X	X	
12		X			X
13	X			X	
14		X			
15	X	X	X		
16		X	X		
17			X		
18	X	X		X	
19	X		X		
20	X				
21				X	X
22	X	X	X		X
X	X				X
Y			X	X	X

Tabelle 4.2: Die Farbkombinationen aller 24 menschlichen Chromosomen bei der SKY-Analyse

2 mM MgCl₂, jeweils 0,15 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,05 mM dTTP, 0,01 mM direkt oder indirekt markiertes dUTP, 8 μM DOP-Primer (5'- CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3') und 2 U Taq-Polymerase nach den oben genannten PCR-Bedingungen amplifiziert. In den Tabellen 4.3 und 4.4 sind die zur Bandierung markierten YACs der Chromosom 2 und X und deren Fluoreszenzmarker aufgeführt.

CTA₄-PCR

Zur Markierung der mit CTA₄-PCR generierten repeatfreien Chromosomenson- den der Chromosomen 12, 14 und 22 wurde für jedes Chromosom und jede Fluoreszenzmarkierung eine 50 μl PCR-Reaktion durchgeführt. Dabei wurden je 100 ng PCR Produkt mit 1x PCR-Puffer (Promega), 2 mM MgCl₂, 1,7 μM CTA₄-Primer, jeweils 0,1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,08 mM dTTP, 0,02 mM markiertes dUTP und 5 U Taq-Polymerase markiert. Dabei wurde das gleiche PCR-Programm wie zur Amplifikation der repeatfreien Sonden benutzt (siehe Kapitel 4.1.3).

4.3.2 „Nick-Translation“

Zur komparativen Hybridisierung auf den Maushybriden wurden die genomischen Sonden von *M. musculus* und *M. spretus* mit herkömmlicher Nick-Translation markiert. Bei der Nick-Translation setzt die DNase Einzelstrangeinschnitte (nicks) in die DNS. Die Polymerase I entfernt die alten Nukleotide und ersetzt dieser bei einer Synthesereaktion mit neuen markierten und unmarkierten Nukleotiden. In einem 50 μl Volumen mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 50 ng/ml BSA, 10 mM β-Mercaptoethanol, jeweils 50 nM dATP, dCTP, dGTP, sowie 37,5 nM dTTP und 12,5 nM mit digoxigenin-11 oder biotin-16 markiertes dUTP (beide Nukleotide von Boehringer Mannheim) wurden 1 μg DNS mit (3·10⁻⁴) U DNase I und 6,5 U DNA Polymerase I (beide Enzyme von Boehringer Mannheim) bei 15°C für 2 h markiert. Die *M. musculus*-DNS-Sonde wurde mit digoxigenin-11-dUTP, die *M. spretus*-DNS-Sonde mit biotin-16-dUTP markiert.

4.3.3 Random Priming

Das Random Priming erwies sich nach Vorversuchen als eine sehr effiziente Methode, Sonden zur Chip-Hybridisierung zu markieren. Beim Random Priming wird die DNS zunächst denaturiert. Dekanukleotid-Primer lagern sich zufällig an die einzelsträngige DNS an. Klenow synthetisiert den neuen DNS-Strang und baut dabei markierte und unmarkierte Nukleotide ein. Zur Markierungsreaktion wurden ca. 5 μg Inter-Alu-PCR-Produkt genomischer DNA in 5 x Decanucleotid Puffer (Fermentas, DecaLabelTM-Kit) 5 min bei 99°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Abkühlung wurde die Markierungsreaktion in einem

YAC	Chrom.-band	Flpter	cMpter	Markierung
765c05	p22.3	0.04-0.08	6	SO
Xa08098	p22.3,yp11.2	0.04-0.08	6	SO
225h10	p22.3	0.05-0.08		SO
388c8	p22.3	0.07-0.1		SO
749g10	p22	0.13-0.14	19	Cy5.5
743f07	p22.2-22.3	0.13-0.15	24	Cy5.5
810e01	p22	0.13-0.17	26	Cy5.5
iE10027	p22	0.13-0.14		Cy5.5
913a08	p22	0.14-0.2	26	Cy5.5
827e10	p22.1	0.15-0.17	33	SG
iB12039	p22	0.15-0.19	35	SG
911f03	p22-p21	0.16-0.18	40	SG
850g02	p22-p21	0.16-0.19	37-41	SG
933d05	p22-p21	0.16-0.20	41	SG
940c10	p21.1	0.21-0.26	47	TR
912b08	p21.1	0.21-0.27	49	TR
957f05	p21-p11.4	0.22-0.28	56	TR
949a07	p11.4	0.23-0.28	66	TR
781f04	p11.4	0.23-0.28	66	TR
779b08	p11.3	0.24-0.29	68	Cy5
749g05	p11.4	0.23-0.29	68	Cy5
958d12	p11.3	0.24-0.32	68	Cy5
964c07	p11.3	0.29-0.33	77	Cy5
iD01063	p11.3	0.3-0.33	80	Cy5
785b06	p11.3	0.3-0.35	85	SO
787f05	p11.2	0.34-0.39	85	SO
770f12	p11.3	0.3-0.35	85	SO
743c10	p11	0.35-0.4	(103cR)	SO
876h06	p11	0.37-0.49	85	SO
822d08	q11-q12	0.4-0.45	87	SO
693e08	q11	0.41-0.49	87	SO
921b10	q12-q13	0.42-0.55	95	Cy5.5
759f12	q11-q12	0.45-0.56	96	Cy5.5
910h01	q13	0.5-0.58	(197cR) 96	Cy5.5
753e10	q13-q21	0.56-0.62	96	Cy5.5
959h11	q13-q21	0.4-0.69	(197cR)	SG
hhmi15c4	q13	0.5-0.57		SG
748c04	q21	0.56-0.62	108	SG
851c09	q21	0.56-0.62	108	SG
933d12	q21-q22	0.62-0.67	(245cR)	SG
899f12	q21-q22	0.64-0.65	116/251	TR
746a10	q21-q22	0.64-0.72	116	TR
755g07	q21-q22	0.64-0.72		TR
853c08	q21-q22	0.64-0.73	117	TR
657e12	q22.3	0.68-0.7	119	TR
963b01	q25-q26	0.76-0.85	148	Cy5
916d01	q25-q26	0.76-0.85	148	Cy5
905e10	q27	0.88-0.96	159	SO
960c09	q27	0.89-0.94	164	SO
826b11	qq27	0.90-0.93	165	SO
948h11	q27	0.9-0.94	174	Cy5.5
742h05	q27-q28	0.91-0.95	180	Cy5.5
iG11138	q27-q28	0.93-0.96		Cy5.5
iG07092	q27-q28	0.93-0.99		Cy5.5
hhmi24D1	q27	0.88-0.96		SG
844b09	q28	0.95-1	190	SG
834d06	q28	0.95-1	190	SG
913h11	q28	0.95-1	190	SG
819e10	q28	0.97-1	192	SG
849e12	q28	0.97-1	192	SG

Tabelle 4.3: Liste der markierten YACs zur Bandierung des Chromosoms X. Centi Morgan [cM] ist die Einheit für den genetischen Abstand. 1cM entspricht einer 1% Wahrscheinlichkeit, daß eine Rekombination in der Meiose stattfindet, hier bezogen auf das Telomer am p-Arm (pter). 63

YAC	Chrom.-band	Flpter	cMpter	Markierung
935f04	p25.3	0.00-0.04	4	SG
800f09	p25	0.00-0.05	8/9	SG
955c11	p25	0.01-0.04	9/10	SG
695h07	p25.3	0.01-0.05	21/17	SG
833d03	p24	0.07-0.1	33	Cy5
916c07	p24	0.07-0.12	39	Cy5
968f09	p24	0.08-0.13	41/42	TR
969f09	p24-p23	0.08-0.16	48	TR
738a09	p22	0.09-0.11	52/54	TR
958d02	p22-p23	0.09-0.12	58	Cy5.5
761h06	p22-p23	0.11-0.14	64	Cy5.5
957b10	p22-p23		70	Cy5.5
913g04	p22	0.15-0.27	73	SO
919c10	p16	0.2-0.27	74	SO
797a03	p21-p16	0.2-0.24	77	SO
899f10	p16	0.21-0.3	77	SO
929f05	p16-p21	0.21-0.25	77	SO
692g04	p16-p14	0.24-0.29	81	SO
923e01	p13-p15	0.29-0.35	88	SG
635d07	p13	0.3-0.31	92	SG
744f07	p13	0.3-0.33	96	SG
898f04	p13	0.31-0.34	103	SG
918d11	p12	0.31-0.36	103	Cy5
856f04	p11-p12	0.35-0.37	108/110	Cy5
889e04	q11.2	0.39-0.45	116	Cy5
809c08	q11-q12	0.42-0.46	120	TR
770e10	q12-q13	0.44-0.5	125	TR
939f07	q12	0.44-0.51	126	TR
953h06	q12-q14	0.41-0.55	128/129	TR
821h09	q14	0.52-0.58	136	Cy5.5
918b04	q21	0.53-0.65	138	Cy5.5
858b06	q21	0.53-0.62	138	Cy5.5
691a03	q12	0.54-0.6	146	Cy5.5
856c07	q22	0.56-0.6	152	SO
748d06	q21	0.56-0.61	156	SO
702b05	q23	0.61-0.73	163	SO
882b09	q23-q24	0.61-0.71	166	SG
766g02	q24	0.63-0.72	167	SG
793b06	q22-q24	0.66-0.68	170	SG
960b12	q23-q24	0.65-0.7	170	SG
938b04	q24	0.63-0.64	175	SG
737d04	q24	0.66-0.74	181	Cy5
859d02	q31	0.72-0.8	190	Cy5
929d12	q31-q32	0.73-0.8	192	Cy5
918b05	q31	0.73-0.79	194	TR
855c04	q32	0.76-0.82	197	TR
849b12	q32	0.79-0.84	205	TR
941f02	q33	0.82-0.84	209/210	TR
819e06	q33	0.82-0.92	210/212	TR
812d08	q33	0.82-0.87	212	TR
956c06	q34	0.85-0.91	213	Cy5.5
678e01	q33-q34	0.87-0.91	222	Cy5.5
807e06	q36	0.93-0.95	229/228	Cy5.5
929g01	q36	0.9-0.95	236	SO
695g12	q37	0.91-0.99	242	SO
686f06	q35	0.89-0.96	247	SO
627d09	q36-q37	0.92-0.99	248	SG
764g08	q36-q37	0.93-0.97	253	SG
963g07	q37	0.98-1	253	SG

Tabelle 4.4: Liste der markierten YACs zur Bandierung des Chromosoms 2. Centi Morgan [cM] ist die Einheit für den genetischen Abstand. 1cM entspricht einer 1% Wahrscheinlichkeit, daß eine Rekombination in der Meiose stattfindet, hier bezogen auf das Telomer am p-Arm (pter).

50 μ l Reaktionsvolumen mit je 0,12 mM dATP, dGTP, dCTP, 0,06 mM dTTP (Boehringer Mannheim), 0,06 mM markierten Cy3-, bzw. Cy5-dUTP (Amersham) und 1 μ l Klenow (Fermentas) bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Bei Kohybridisierungen weiblicher und männlicher Sonden wurde die weibliche DNS mit Cy3 markiert, die männliche mit Cy5. Bei der Kohybridisierung der Patientensonden mit multiplen X Chromosomen wurde das Testgenom mit Cy3 und die Referenz-DNS mit Cy5 markiert.

4.4 Hybridisierung

4.4.1 Präparation der Objektträger

Metaphasechromosomen

Präparation und Vorbehandlung der Chromosomen war bei der der 24 Farben-FISH, der Vielfarben-YAC-FISH-Bandierung und der CGH auf die Maushybridchromosomen identisch. Die Chromosomenpräparation erfolgte nach einem Standardprotokoll. Um die Zellen in der Metaphase zu arretieren, wurden die Kulturen 1-2 h vor dem Abbruch mit dem Spindelgift Colcemid behandelt. Die geernteten Zellen wurden mit 50 mM KCl bei 37°C für 15 min bzw. mit 20% Natriumcitrat bei 37°C für 20 min (P3-Zellen) hypotonisch behandelt. Dadurch schwellen die Zellen an und die Chromosomen trennen sich voneinander. Dies dient der Spreitung der Chromosomen und ermöglicht die mikroskopische Analyse. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem 3:1 Methanol:Eisessig-Gemisch fixiert. Zur Präparation der Chromosomenobjektträger wurde ein Tropfen der Lösung auf einen gereinigten Glasobjektträger aufgetropft. Dieser Objektträger wurde kurz über heißen Wasserdampf gehalten und unter der Wärme einer Glühbirne getrocknet. Die Qualität der Chromosomenpräparation ist stark davon abhängig, wie schnell das Fixativ verdampft. Die Objektträger mit den Chromosomenpräparaten wurden vor ihrer Behandlung 2 h bei 65°C auf einer Heizplatte erhitzt, um das restliche Wasser zu entfernen und die Chromosomenmorphologie zu verbessern.

Vor der Hybridisierung wurden die Objektträger zunächst für 5 min in 2 x SSC gespült. Danach wurden sie mit 100 μ g/ml RNaseA in 2 x SSC für 60 min bei 37°C inkubiert. Die RNase-Behandlung ist notwendig um die RNS-DNS-Hybridbildung bei der FISH zu verhindern und den Hintergrund zu reduzieren. Danach wurden die Objektträger 3 x 5 min in 2 x SSC gewaschen. Zum Verdau chromosomaler Proteine wurden die Chromosomenpräparate für 10 min bei 37°C mit 0,01% Pepsin in 10 mM HCl behandelt und danach 2 x in 1 x PBS gewaschen. Um ein Ablösen der proteasebehandelten Chromosomen zu verhindern, wurden die Präparate nach 1 x Waschen (5 min) in 1 x PBS, 50 mM MgCl₂ mit 1 x Formaldehyd, 1 x PBS und 50 mM MgCl₂ 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 100%) dehy-

driert. Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung wurden die Objektträger in 70% Formamid, 2 x SSC (pH 7,0) unter einem Deckglas in einem Ofen bei 90°C 1 min denaturiert. Die Denaturierung ist ein entscheidender Schritt, sie ist notwendig um die chromosomale DNS einzelsträngig zu machen. Werden die Chromosomen zu wenig denaturiert, so findet keine oder eine ineffiziente Hybridisierung statt. Eine Überdenaturierung führt zu einer schlechten Chromosomenmorphologie. Für eine optimale Denaturierung muß ein Kompromiß gefunden werden. Direkt nach der Denaturierung wurden die Objektträger in einer eiskalten Alkoholreihe (70%, 85%, 100%) dehydriert, um eine Renaturierung der Chromosomen auszuschließen.

DNS-Chips

Zur Herstellung der DNS Chips wurden die Sonden auf Glasobjektträger gespottet. Als Objektträger wurden 2 verschiedene Arten verwendet, zum einen die mit Aminosilan GAPSTTM (Amino Silan Coated Slides) Objektträger von Corning, zum anderen die mit Polylysin beschichteten Objektträger von Perkin Elmer. Die mit Polylysin beschichteten Objektträger wurden am Tag vor dem Spotten aktiviert. Aufgrund dieser Aktivierung konnten die mit Amino-Enden versehenen Sonden anschließend chemisch auf dem Objektträger gebunden werden. Dazu wurden die Objektträger zunächst 10 min in Aceton gewaschen und danach 1 h im Exikator getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger 90 min in N,N-Dimethylformamid mit 0,2% Phenylendiisothiocyanat (PDC) und 10% Pyridin (>99,0%) inkubiert. Danach wurden die aktivierten Objektträger kurz mit Methanol und danach mit Aceton gewaschen und nach Abtropfen über Nacht im Exikator getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Sonden gespottet. Die Hybridisierung wurde ohne Vorhybridisierung oder Denaturierung der Objektträgern durchgeführt. Die DNS lag bereits einzelsträngig vor. Durch die Aktivierung der Objektträger wurde jeweils ein Strang der PCR Fragmente an die Oberfläche gebunden, und durch die Ladungsverteilungen der Objektträgeroberfläche vom anderen komplementären Strang getrennt.

Die beschichteten Corning-Objektträger wurden ohne weitere Vorbehandlung gespottet und nach dem Spotten 3 Stunden bei 50°C unter Luftfeuchtigkeit inkubiert, um die Oberfläche, die nicht mit den gespotteten Sonden reagiert hat, zu inaktivieren. Anschließend wurden sie bei 100°C für 15 min in einem Trockenofen gebacken und bis zur Hybridisierung im Dunkeln aufbewahrt werden. Die gespotteten Corning-Objektträger wurden für 45 min in einer auf 42°C vorgewärmten Prähybridisierungslösung (1% BSA, 6 x SSC, 0,5% SDS) vorbehandelt und danach 5 x 1 min in Wasser gewaschen. Die gebundenen Sonden wurden in 95°C heißem Wasser für 2 min denaturiert und danach luftgetrocknet. Danach waren die Objektträger fertig zur Hybridisierung. Experimente mit beschichteten Objektträgern von Corning lieferten im allgemeinen die besseren Ergebnisse und zeigten weniger Hintergrundfluoreszenz.

4.4.2 24-Farben-FISH

Aliquots (70 μ l) der fünf unterschiedlich markierten Sondenpools (Texas-Red-, Spectrum Orange-, Spectrum Green-, Biotin- und Digoxigenin-Pool) der chromosomenspezifischen DNS-Bibliotheken wurden mit jeweils 5 μ l der CTA₄-markierten Chromosomensonden gemischt. Die gesamte DNS-Menge wurde dann mit 50 μ g C₀t-1-DNS, 1 μ g Heringsperma-DNS, 33,6 μ l 3 M Natriumacetat und 924 μ l eiskaltem 100% Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt. C₀t-1-DNS dient als Competitor zu Suppression der Repeats, Heringsperma-DNS erleichtert die Fällung und fängt DNS-bindende Substanzen, die bei der Hybridisierung zur Verunreinigung führen könnte. Die Lösung wurde bei 14000 rpm in einer Hettich-Kühlzentrifuge 45 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 45 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde anschließend entfernt und das Pellet getrocknet. Mit 6 μ l deionisiertem Formamid wurde das DNS-Pellet für 3 h in einem Schüttler bei 37°C gelöst. Anschließend wurden 6 μ l 4 x SSC, 20% Dextransulfat zugegeben und nochmals 1 h bei 37°C schütteln lassen. Der Sondenmix wurde 10 min bei 80°C denaturiert und danach 30min bei 37°C prähybridisiert. Die Sonde wurde auf die vorbereiteten und auf 37°C vorgewärmten Objektträger aufgebracht, mit einem Deckglas (20 x 20 mm²) abgedeckt, mit Fixogum verschlossen und bei 37°C für 5 Tage hybridisiert. Formamid im Hybridisierungsmix erniedrigt die Hybridisierungstemperatur. Formamid und SSC dienen zur Einstellung der Stringenz. Eine hohe Formamidkonzentration bzw. eine niedrige Salzkonzentration erhöhen die Stringenz. Dextransulfat verringert das Volumen, in dem die Sonde gelöst ist und erhöht so die Sondenkonzentration in der Hybridisierungslösung.

Bei der Hybridisierung der YACs wurden ebenfalls alle einzelnen Sonden gepoolt und entsprechend dem vorangegangenen Protokoll mit 50 μ g C₀t-1-DNS und 1 μ g Heringsperma-DNS gemischt und gefällt. Alle weiteren Schritte wurden analog zur 24-Farben-FISH-Hybridisierung durchgeführt.

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger in 3 x 5 min in 50% Formamid, 2 x SSC bei 42°C gewaschen, danach 1 x 5 min in 2 x SSC bei 42°C und 1 x 5 min in 0,2 x SSC bei 65°C gewaschen. Die Stringenz der Waschlösungen ist abhängig von Formamid- und Salzkonzentration und von der Temperatur. Die Stringenz wird durch zunehmende Formamidkonzentration, abnehmende Salzkonzentration und zunehmende Temperatur erhöht. Die Waschschrte nach der Hybridisierung erfolgen unter stringenteren Bedingungen als die Hybridisierung, um locker gebundene Sonden zu entfernen und nur perfekt oder nahezu perfekt gepaarte Hybridmoleküle übrig zu lassen. Zu hohe Stringenz der Waschlösung kann zum Verlust des Hybridisierungssignals führen.

Die Antikörper Reaktionen wurden jeweils in 1% BSA, 0,2% Tween, 4 x SSC in einem 200 μ l Volumen je 20 min bei 37°C durchgeführt. Die erste Reaktion enthielt Avidin-Cy5 (Amersham Life Science) in einer Verdünnung 1:200 und Antidigoxigenin-Maus (Sigma) 1:500 verdünnt. Avidin (Vitamin H) bin-

det mit hoher Affinität an Biotin und koppelt die biotinylierte Sonde mit Cy5. Monoklonaler Maus-Anti-Digoxigenin-Antikörper bindet an Digoxigenin. Nach 3 x Waschen mit 0,1% Tween und 4 x SSC wurde die zweite Antikörperreaktion mit Antimaus-Cy5,5-IgG (von Evelin Schröck freundlicherweise zur Verfügung gestellt) (1:200) durchgeführt. Cy5.5 konjugierte Anti-Maus-IgG bindet an den Anti-Digoxigenin-Brückenantikörper und koppelt Cy5.5 an die digoxigenierte Sonde. Die direkt markierten Sonden müssen nicht mehr entwickelt werden. Nach 3 x Waschen mit 0,1% Tween, 4 x SSC wurden die Objektträger in einer Lösung mit 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in 2 x SSC 1 min gefärbt, mit destilliertem Wasser gespült und in Mounting Medium (2,3% Diazobiglycol-2,2,2-octane (DABCO) 20mM Tris-HCl, 90% Glycerol) eingedeckt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet an DNS. Die Chromosomen werden dadurch im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Das Mounting-Medium verringert das Ausbleichen der Präparate. Die Objektträger wurden im Dunklen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

4.4.3 CGH auf Maushybridchromosomen

Zur Komparativen Hybridisierung auf den Maushybridchromosomen wurden jeweils 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ biotinylierter *M. spretus* und digoxigenerter *M. musculus* DNA mit 500 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Heringssperma DNS präzipitiert und dann in 50% Formamid, 10% Dextransulfat und 2 x SSC gelöst. Nach 10 min Denaturierung bei 80°C wurde der Hybridisierungspuffer mit der Sonden-DNS auf die Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas verschlossen. Die Objektträger wurden 1-3 Tage bei 37°C zur Hybridisierung inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 3 x 5 min in 50% Formamid, 2 x SSC bei 42°C, 1 x 5 min in 2 x SSC bei 42°C und 1 x 5 min in 0,1 x SSC bei 65°C gewaschen. Die biotinylierten *M. spretus* Sonden wurden mit Cy5-Avidin (Amersham Life Science) und die digoxigenierten *M. musculus* Sonden mit Fluorescein-isothiocyanat konjugiertem anti-digoxigenin Antikörper (Dianova) detektiert. In einem Experiment wurde *M. musculus* DNA mit Cy3 und *M. spretus* DNA mit FITC (beide Dianova) gefärbt. Die Objektträger wurden mit 90% Glycerin, 100 mM Tris-HCl (pH8,0) und 2,3% DABCO eingebettet.

4.4.4 CGH auf Chips

Die Sonde zur Hybridisierung auf dem Chip enthielt jeweils 50 μl der beiden Cy3 und Cy5 markierten Target-DNSn. Als Targets wurden Inter-*Alu*-PCR Produkte oder DOP-PCR-Produkte von Inter-*Alu*-PCR Produkten von Patienten mit einer unterschiedlichen Anzahl an X-Chromosomen benutzt. Zur Hybridisierung wurden 24 μg C_{0t} -1-DNS und jeweils 1,2 μg Competitor- und Competitor-rev-DNS addiert. Bei Competitor-DNS und Competitor-rev-DNS handelt es sich um 50mer Oligonukleotide, die dem Abschnitt der *Alu*-Sequenz entsprechen, der bei

der Amplifikation durch den Cl_2 -Primer an den Enden der PCR-Produkte angefügt wird. Das Competitor-Oligo hat die Sequenz: 5'-AAC TCG AGC TGC ACT CCA GCC TGG GCG ACA GAG CGA GAC TCC GTC TCA AAA AAA AAA A-3', das komplementäre Competitor-rev-Oligo: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT GAG ACG GAG TCT CGC TCT GTC GCC CAG GCT GGA GTG CAG CTC GAG TT-3'. Diese Oligos sollen bei der Prähybridisierung die *Alu*-Sequenzen der Target-DNSn binden und so eine unspezifische Hybridisierung an den gespotteten Sonden vermeiden. Der Hybridisierungsmix wurde in einer Speedvac (Eppendorf) getrocknet und in 12 μ l 67% Formamid für 30 min bei 42°C gelöst. Es wurden 12 μ l 4 x SSC, 20% Dextransulfat zugegeben und nochmal 15min geschüttelt. Das Target wurde 5 min bei 94°C denaturiert und 1 h bei 42°C prähybridisiert. Danach wurde das Target auf den auf 42°C vorgewärmten Chip aufgetragen, mit einem 24 x 50 mm² Deckglas abgedeckt und in einer feuchten Hybridisierungskammer bei 42°C über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger zum Entfernen der unspezifischen Bindung 1 x 5 min in 50% Formamid, 2 x SSC bei 42°C und 1 x 3 min in 0,1 x SSC bei 65°C gewaschen und getrocknet. Die Chips wurden bis zur Auswertung im Dunkeln aufbewahrt.

4.5 SpectraCube und Spectral Karyotyping (SKY)

Mit dem SpectraCubeTM wurde eine Methode zur spektralen Bildanalyse entwickelt. Sie verbindet die ortsauflösende Bildanalyse einer Charge-Couple-Device-(CCD-) Kamera mit der spektralen Analyse einer Fourierspektroskopie. Mit dem SpectraCube-Gerät wurde als „Cube“ die dreidimensionale Intensität $I(x, y, \lambda)$ als Funktion der Ortskoordinaten x, y und der Wellenlänge λ aufgenommen. Diese Methode eignete sich zur Analyse der Vielfarben-Hybridisierung, da bei der Aufnahme eines mikroskopischen Bildes die gesamte spektrale Information in jedem Bildpunkt gesammelt wird. Mit der „Spectral-Imaging“ (SI) -Software wurden die spektralen Bilder aufgenommen. Mit den „Spectral Karyotyping“- (SKY) und „Spectral FISH“ (SPY) -Programmen wurden die Bilder der 24 Farben-FISH und der YAC-Bandierung ausgewertet. Die Algorithmen beider Bildanalyseprogramme werden zur Klassifizierung von Fluoreszenzsignalen benutzt. Dazu vergleicht die Software die Spektren der ausgewählten Bildpunkte mit Referenzspektren. Während SKY vorzugsweise zur Klassifikation von Chromosomen verwendet wird, ist SPY in der Lage, kleinere fluoreszierende Objekte zu klassifizieren.

Die Software SPCUB konnte ebenfalls zur Auswertung verwendet werden und ermöglichte zusätzlich die Auswertung der Fluoreszenzintensität, die von der SKY-Software nicht unterstützt wurde. Die Analysen mit SPCUB konnten den eigenen Anforderungen angepaßt werden. Das Programm wurde zur Auswertung der CGH-Hybridisierung auf den Maushybriden benutzt. Mit SPCUB ließen sich Intensitäten innerhalb selbst gewählter spektraler Bereiche bestimmen. Dazu wurde innerhalb eines ausgewählten Wellenlängenbereiches über das

Spektrum integriert.

4.5.1 Zusammensetzung des SKY-Systems

Ein SKY-System (Applied Spectral Imaging, ASI, Israel) setzt sich aus mehreren Einzelbausteinen zusammen. Es besteht aus einem Fluoreszenzmikroskop, einem optischen Kopf, der sich aus Interferometer und CCD-Kamera zusammensetzt, einem Computer und zwei vom Computer gesteuerten Controllern zur Bildaufnahme und Steuerung des Interferometers.

Das Fluoreszenzmikroskop (Firma Zeiss, Axioskop) ist mit einer 75W Xenonlampe (Osram-Zeiss), einem 63x Ölimmersions-Objektiv (Zeiss) und einem speziell entwickelten Filterset (Chromatechnology Brattleboro, VT) ausgestattet. Mit diesem Filterset ist eine gleichzeitige Anregung und Aufnahme aller Fluoreszenzfarben ohne eine Verschiebung des Bildes (Pixelshift) möglich. Das Mikroskop ist über den C-Mount-Adapter mit dem optischen Kopf verbunden. Dieser besteht aus einem Fouriertransformspektrometer und einer CCD Kamera (Princeton Instruments). Beide sind über Controller mit dem Computer verbunden und werden simultan gesteuert.

In Abbildung 4.1 wird der Strahlengang im SpectraCube schematisch dargestellt. Das Fluoreszenzlicht der Probe gelangt über eine Sammellinse (Mikroskop) zum optischen Kopf. Dort trifft das Licht auf ein Sagnac-Interferometer. Das entstandene Interferogramm wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen und über Fourieranalyse kann daraus das Spektrum ermittelt werden.

4.5.2 Fourierspektroskopie

Das Prinzip der Fourierspektroskopie besteht darin, daß durch ein Interferometer kohärentes Licht in zwei Strahlen geteilt und nach Durchlaufen unterschiedlich langer Wege zur Interferenz gebracht wird. Es entsteht ein Interferogramm, eine Funktion, die die Intensität in Abhängigkeit des Gangunterschieds beschreibt. Mit Fouriertransformation kann aus dem Interferogramm das Spektrum des einfallenden Lichts bestimmt werden.

Bei dem im optischen Kopf angebrachten Interferometer handelt es sich im wesentlichen um ein Sagnac-Interferometer, das aus zwei Spiegeln und einem Strahlenteiler besteht. In Abbildung 4.2 wird der Strahlengang im Sagnac Interferometer und am Strahlenteiler skizziert. Das einfallende Licht wird am Strahlenteiler in zwei Strahlen aufgeteilt, die beide den gleichen Weg über zwei Spiegel aber in gegengesetzte Richtung zurücklegen und sich am Strahlenteiler wieder überlagern (Abbildung 4.2a). Dabei kommt es zu Interferenzen, die abhängig sind von der Differenz der optischen Weglänge, (= Gangunterschied), die im Strahlenteiler zustande kommt (Abbildung 4.2b). Der Gangunterschied wird durch Rotation des Strahlenteilers bzw. durch Änderung des Winkels des einfallenden Lichts auf den Strahlenteiler verändert. Das Interferogramm, die resultierende Interferenzintensi-

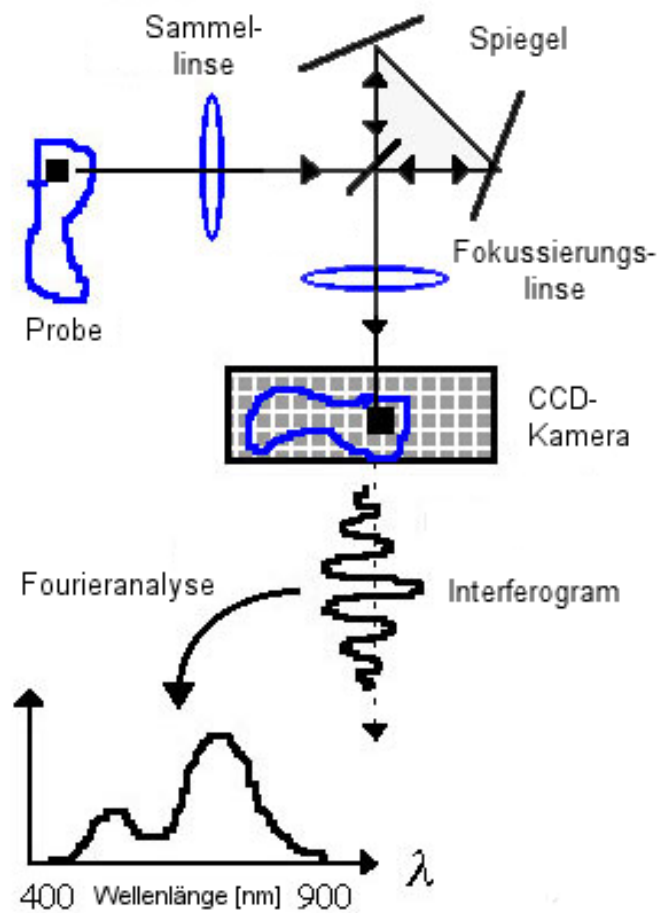


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des SpectraCubes (der Homepage von ASI entnommen [54])

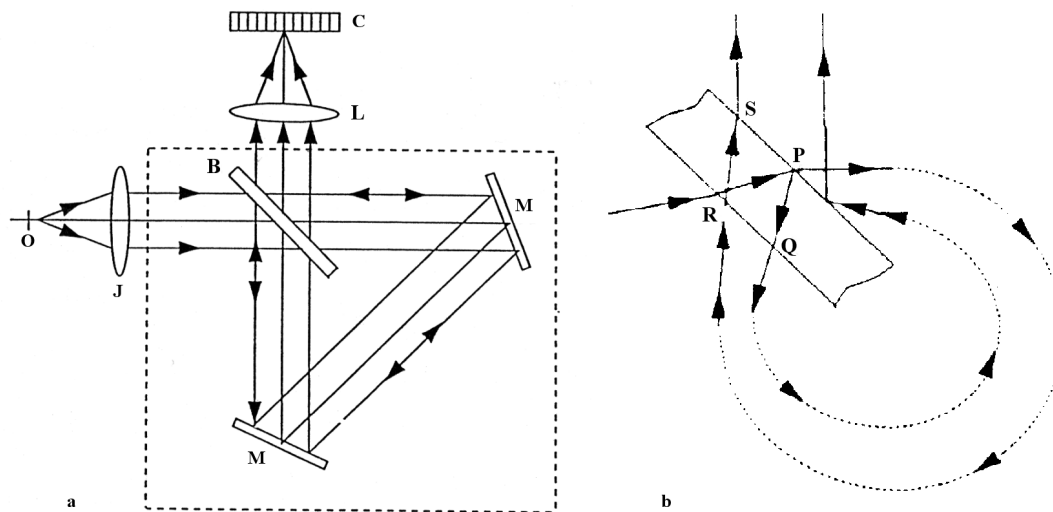


Abbildung 4.2: Sagnacinterferometer (a) und Strahlengang am Strahlenteiler (b) aus MALIK *et al.* [96]

tät als Funktion des Gangunterschieds, wird als ein sogenannter Cube (Würfel, da abhängig von 3 Koordinaten: x, y und λ) aufgenommen. Dazu wird mit der CCD-Kamera das Interferogramm jedes Bildpixels aufgenommen. Die einzelnen Kamerabilder der Intensitäten werden bei verschiedenen Gangunterschieden aufgenommen und zum Cube zusammengesetzt. Durch Fouriertransformation wird aus dem Interferogramm, der Überlagerungsfunktion identischer Spektren, die um einen Gangunterschied verschoben sind, das ausgehende Spektrum ermittelt.

Zur Wiedergabe eines spektralen Bildes des aufgenommenen Objekts am Bildschirm wird das Spektrum in 3 spektrale Bereiche aufgetrennt, die jeweils in einer anderen Farbe (rot, grün und blau) wiedergegeben werden. Die Intensität jeder Farbe ist proportional zur integrierten Intensität des entsprechenden spektralen Bereiches.

4.5.3 Klassifikation der Chromosomen mit SKY

Zur Software des SKY-Systems gehört die Ähnlichkeitsanalyse, mit der Spektren der aufgenommenen Bilder mit Referenzspektren verglichen werden (siehe GARINI *et al.* [34]). Ein Algorithmus vergleicht die Spektren des aufgenommenen Bildes mit den Referenzspektren. Dazu wird der minimale quadratische Fehler $S_{x,y,n} = \sum [I_{x,y}(\lambda) - I_n(\lambda)]^2$ für jeden Pixel errechnet. Dabei ist $I_{x,y}(\lambda)$ das normalisierte Spektrum an den Pixelkoordinaten x, y . $I_n(\lambda)$ repräsentiert das normalisierte Referenzspektrum für jedes Chromosom $n = 1, 2, \dots, 23(X), 24(Y)$. Nach Feststellung von $S_{x,y,n}$ für alle Referenzspektren, wird der kleinste Wert für S gewählt und die Klassifikation durchgeführt, indem jeder Pixel dem ähnlichsten

Referenzspektrum zugeordnet wird. Die Klassifikation wird durch Klassifikationsfarben auf den Chromosomenbild verdeutlicht. In einer anderen Methode wird das gemessene Spektrum $I_{x,y}(\lambda)$ als Linearkombination bekannter Fluoreszenzspektren bzw. Referenzspektren verarbeitet. Nach der letzteren Methode arbeitet die aktuelle SKY-Software.

4.6 Bestrahlung und Kultivierung von P3 Zellen

Zur Untersuchung der genomischen Instabilität nach Bestrahlung wurden die P3 Zellen als Untersuchungsobjekt ausgewählt. Die P3-Zelllinie ist ein Zellklon, der von HUBERMANN *et al.* [53] aus der Zelllinie eines menschlichen Ovarialkarzinoms isoliert wurde. Diese Zelllinie ist im Labor des Instituts für Biophysik der Justus-Liebig-Universität in Gießen etabliert und strahlenbiologisch ausführlich untersucht (HILL *et al.* [47], KOHLPOTH [72]). Die Zellen besitzen einen relativ stabilen Chromosomensatz mit einer stabilen Translokation der Chromosomen 15 und 20. Alle anderen Chromosomen sind normal. Aus vorhergehenden Untersuchungen kann man auf eine mittlere Strahlensensitivität schließen.

Die Röntgenbestrahlung und Aufzucht der Klone wurde am Institut für Biophysik in Gießen durchgeführt. Die Zellen wurden in Dulbecco-Medium (Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) bei 37°C, unter 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Anteil der Luft inkubiert. Vor der Bestrahlung wurden die Zellen auf Petrischalen überführt und im subkonfluenten Zustand bestrahlt. Die Röntgenbestrahlung wurde am Strahlencentrum in Gießen an einer Röntgenröhre des Typs MG300 (Müller, Hamburg) bei 250 kV mit einem Berylliumfenster durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in hoher Verdünnung auf Petrischalen ausgesetzt und im Brutschrank inkubiert. Nach 10 Tagen hatten sich aus den überlebenden Zellen Klone gebildet. Diese Klone wurden einzeln in Kulturflaschen überführt und weiterkultiviert. Mit diesen klonalen Kulturen wurden ca. 25 Tage nach Bestrahlung am MPI für Molekulare Genetik Chromosomenpräparationen nach dem Standardprotokoll durchgeführt (siehe 4.4.1).

Die Chromosomenpräparate wurden mit SKY auf Chromosomenaberrationen untersucht. Abbildung 4.3 zeigt schematisch den Ablauf der Experimente.

4.7 Auswertung der CGH-SKY Hybridisierungen

4.7.1 Spektrale Bildanalyse

Die Bilder wurden mit dem SD200 SpectraCube-System aufgenommen und mit der dazugehörigen Software SPCUB-Software analysiert. Nach Abzug des allgemeinen Hintergrunds wurden zur Auswertung der Fluoreszenzintensitäten auf einem Chromosom die Intensitäten auf Punkten mit einer Größe von 3x3 Pixel gemessen. Wir konnten nach Stichproben feststellen, daß sich bei einer Auswahl

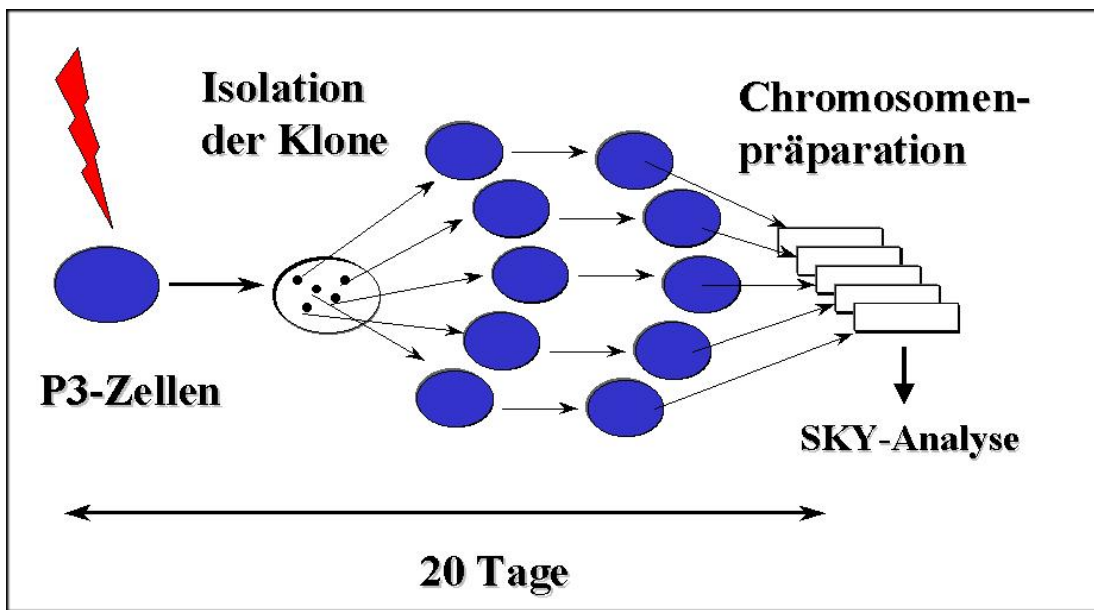


Abbildung 4.3: Experimenteller Ablauf zur Untersuchung der genomischen Instabilität nach Röntgenbestrahlung: P3 Zellen wurden im subkonfluenten Zustand mit Röntgenstrahlung bestrahlt, die Zellen wurden anschließend vereinzelt und inkubiert, damit sich Klone bilden konnten. Aus den klonalen Kulturen wurden Chromosomen präpariert und mit SKY analysiert.

von je 2 Punkten pro Chromosom die Intensitäten und das Spektrum der Fluoreszenzfarben und damit der Sonden genau bestimmen lassen. Spezifische Wellenlängenbereiche für beide Fluoreszenzfarben wurden festgelegt und Grenzen wurden gesetzt, die sich nicht überschneiden durften, um die Hybridisierungssignale von Cy5 (bzw. Cy3) und FITC zu unterscheiden. Die Intensitäten wurden ermittelt, indem innerhalb der festgelegten Grenzen über das Fluoreszenzspektrum integriert wurde.

4.7.2 Statistische Auswertung

Für jede Gruppe (MMU und MSP Chromosomen) wurde der Stichprobenumfang an untersuchten Chromosomen, der Mittelwert der Intensitätsverhältnisse, die Standardabweichung sowie der Standardfehler des Mittelwertes bestimmt. Der t-Test für unabhängige Stichproben wurde benutzt, um die Mittelwerte der Intensitätsverhältnisse der beiden Gruppen von *M. musculus* und *M. spretus* Chromosomen zu vergleichen. Um die Herkunft der Chromosomen vorauszusagen, wurde eine Diskriminanzanalyse durchgeführt. Die Diskriminanzanalyse generiert eine Funktion, die auf der linearen Kombination der vorausgesagten Variablen beruht, die die beste Diskrimination zweier Gruppen ermöglicht. Anschließend konnten die Fälle aufgrund dieser Funktion in zwei Gruppen unterteilt werden. Damit konnte man die Anzahl der korrekt klassifizierten Fälle und die Qualität der Diskriminanz bestimmen. T-Test und Diskriminanzanalyse wurden mit SPSS 9.0 für Windows durchgeführt. Um die relativen Häufigkeiten der einzelnen Fälle zu vergleichen, die mit der Diskriminanzanalyse klassifiziert wurden, wurde ein χ^2 -Test angewendet.

Jede komparative Hybridisierung wurde graphisch dargestellt. Dazu wurde jedes einzelne Chromosom in einem Diagramm, das auf den Achsen die Intensitäten der beiden verwandten Fluoreszenzen anzeigt, als Punkt abgebildet. Um die Hybridisierungsunterschiede zu verdeutlichen, wurde für *M. musculus* und *M. spretus* Chromosomen je eine lineare Regression über alle ausgewerteten Punkte berechnet. Die Regressionsanalyse wurde mit Microsoft Excel durchgeführt.

4.8 Auswertung der CGH-Chips

Alle Objektträger wurden mit einem konfokalen Laserscanner für Arrays der Firma Affymetrix (vormals GMS 418 Array Scanner) ausgelesen. Der Laserscanner verfügt über zwei Laser mit den Wellenlängen 532nm zur Anregung von Cy3 und 635nm zur Anregung von Cy5. Für die Auswertung einer komparativen Hybridisierung wurden die beiden Fluoreszenzfarben nacheinander mit dem entsprechenden Laserlicht angeregt und die Fluoreszenzen einzeln aufgenommen.

Die Auswertung der hybridisierten Chips wurde mit der Bildanalysesoftware IPLab und dem Statistikprogramm SPSS 9.0 (for Windows) durchgeführt.

Zur Analyse benötigt man ein sogenanntes GIPO-file, in dem durchlaufend alle gespotteten Sonden mit den Koordinaten der zum Spotten verwendeten Mikrotiterplatten gespeichert sind. Mit dieser Datei kann die Bildanalysesoftware die Spots spezifischen Sonden zuordnen.

Mit der Software IPLab wurden die zueinander gehörenden Graustufenbilder der Cy3 und Cy5 Emissionen einer Hybridisierung geöffnet und zunächst so ausgerichtet, daß die identischen Spots beider Bilder aufeinanderfallen. Entsprechend des Gipofiles und der Parameter beim Spotten (Anzahl der verwendeten Nadeln, Anzahl der Spots in X-Richtung und Anzahl der Spots in Y-Richtung) ließen sich Gitternetzlinien aufspannen, die manuell auf die Spots gelegt wurden, um jeden einzelnen Spot einzurahmen. Bei der anschließenden Analyse der IPLab-Software wurde für jeden eingerahmten Spot die Intensität ermittelt. Dabei wurde für jeden Spot der lokale Hintergrund abgezogen und ein Schwellenwert für die Anzahl der Pixel pro Spot festgesetzt. Spots (Signale) mit nur wenigen Pixeln wurden vernachlässigt, um Verunreinigungen auf dem Chip zu ignorieren. Die Auswertung der Intensitätsmessungen erfolgte mit einem von Roland Kirchner verfaßten Skript. Dabei wurden für jede Farbe die durchschnittlichen Intensitäten eines Spots (Intensität pro Spotfläche) ermittelt und das Cy3/Cy5 Intensitätsverhältnis berechnet. Das Ergebnis wurde in einer Datei zusammengefaßt, welche die Sondenbezeichnungen, die Cy3- und Cy5-Intensitäten, die Pixelgrößen und das berechnete Intensitätsverhältnis (Intensität im Cy3-Bild/Intensität im Cy5-Bild) für jeden Spot des Arrays beinhaltet.

Die weitere Datenanalyse wurde mit der Software SPSS 9.0 (for Windows) durchgeführt. Dazu wurde die Datenmenge reduziert auf die Spots, die in beiden Bildern, im Cy3- und im Cy5-Bild, eine auswertbare Hybridisierung zeigten.

Bei den komparativen Hybridisierungen wurden Targets verwendet, die sich nur in der Anzahl der Geschlechtschromosomen unterschieden (5X : XY, 4X : XY, 4X : 2X, 2X : XY). Die Anzahl der Autosomen war in allen Targets gleich. Daher konnte eine Normalisierung über alle autosomalen Sonden vorgenommen werden. Die Verteilung der Signalintensitätsverhältnisse auf den autosomalen Spots konnte außerdem als Qualitätskontrolle genutzt werden. Für die autosomalen Sonden wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der Intensitätsverhältnisse berechnet. Dieser Mittelwert $+2 \times$ Standardabweichung wurde als oberer Schwellenwert festgelegt.

Zur Auswertung der komparativen Hybridisierung weiblicher und männlicher DNS auf den auf den Objektträgern von Corning wurden alle Sonden 3mal gespottet. Die Auswertung dieser Objektträger (Chip2) wurde durchgeführt wie zuvor beschrieben. Es wurden alle Sonden aus der Auswertung ausgeschlossen, die nicht auf allen drei Spots eine Hybridisierung zeigten. Außerdem wurde jeweils über alle drei Spots einer Sonde gemittelt.

Zur Auswertung wurde die Anzahl der Sonden ermittelt, die ein Intensitätsverhältnis oberhalb dieses Schwellenwertes zeigten, sowohl die falsch positiven als auch die korrekten. Dies wurde für verschiedene Experimente und verschiedene

Hybridisierungstargets durchgeführt. Bei eindeutigen Fällen konnten die Dosisunterschiede durch Bilder im sogenannten „Targetlocator“ sichtbar gemacht werden. Der Targetlocator färbt die Graustufenbilder, die beim Auslesen der einzelnen Fluoreszenzfarben entstanden ein und überlagert sie. Die Spots erscheinen bei überschüssiger Cy3-Markierung rot, bei überschüssiger Cy5-Markierung grün und bei einem ausgeglichenen Verhältnis beider Markierungen gelb.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 Vielfarben-FISH und SKY

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SKY-Methode einschließlich der Sondenherstellung im Labor etabliert. Die Generierung der Hybridisierungs sonden umfaßte die PCR-Amplifikation durchflußzytometrisch sortierter Chromosomenbibliotheken und deren kombinatorische Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Um das Auflösungsvermögen und die Verlässlichkeit dieser Methode zu überprüfen, wurden Patienten mit bekannten Chromosomenaberrationen mit SKY nachuntersucht. Eine weiterführende Anwendung der Vielfarben-FISH ist die FISH-Bandierung einzelner Chromosomen (siehe Kapitel 3.1.4), die am Beispiel der Chromosomen 2 und X demonstriert wurde.

5.1.1 Analyse von komplexen Chromosomenaberrationen

Die 24-Farben-Hybridisierungen wurden mit der SKY-Software analysiert und klassifiziert. Eine gleichzeitige DAPI-Bandierung der Chromosomen diente zusätzlich zur Identifikation der Chromosomen. Die Abbildungen 5.1, 5.2, 5.4 und 5.6 zeigen die Karyotypen der untersuchten Patienten nach 24 Farben-Hybridisierung und SKY-Analyse. Die Chromosomen sind jeweils in den spektralen Falschfarben (A) und den Klassifikationsfarben (B) dargestellt. Die Falschfarbendarstellungen geben im Prinzip die wirklichen Fluoreszenzsignale (Spektren) der Metaphasechromosomen wieder.

In Tabelle 5.1 sind die Chromosomenumbauten der analysierten Patienten beschrieben. Patient 72 zeigt eine Austauschtranslokation der Chromosomen 10 und 14 mit Chromosomenbrüchen an 10q21 und 14q32. Bei Patient 309 ist eine Austauschaberration der Chromosomen X und 18 zu finden, dabei hat der Chromosomenbruch an Xp22.3 und 18q21 stattgefunden. Die SKY-Analyse erreichte in den Fällen der einfachen Austauschaberrationen der Patienten 72 (siehe Abbildung 5.1) und 309 (siehe Abbildung 5.2) im wesentlichen dasselbe Auflösungsvermögen wie die klassische Bänderungsanalyse. Bei Patient 309 konnte

Patient	Karyotyp
72	46,t(10;14)(q21;q32)
309	46,t(X;18)(p22.3;q21)
176	46,t(1;4;2;11)(q43;q13;p13;p14)
Moebius	46,XY,t(7,8,11,13)(q21.1;q21;14.3;q21.2)

Tabelle 5.1: Karyotypen (ISCN-Nomenklatur) der untersuchten Patienten

mit SKY das translozierte Fragment des Chromosoms X auf dem der(18) nicht in allen Metaphasen klassifiziert werden. Das Auflösungsvermögen von SKY hängt stark von der Qualität der Chromosomenpräparate ab und liegt im Bereich einer Chromosomenbande.

Bei Patient 176 konnte nach G-Bandierung eine komplexe Translokation zwischen vier Chromosomen aufgedeckt werden. Das Ideogramm in Abbildung 5.3 zeigt die Bruchpunktregionen auf den Chromosomen 1, 4, 2 und 11. Das kleine Chromosomenstück 1q43-qter war am der(4) zu finden, der distale lange Arm 4q13-4qter am der(2) und das Segment distal zu 2p13 am der(11). Der Chromosomenabschnitt 11p14-pter war am der(1) zu finden. Mit der SKY-Analyse (siehe Abbildung 5.4) konnten nur die Bruchpunkte an den drei Chromosomen 2, 4 und 11 aufgedeckt werden. Es war nicht möglich, das telomerische Stück des Chromosoms 1 auf dem der(4) zu detektieren und auch das Chromosom 11-Segment auf dem der(1) war nicht in allen Metaphasen zu klassifizieren. Das Chromosom 1-Material auf dem der(4) war zu klein, um mit SKY aufgelöst zu werden, während das Chromosom 11-Material auf dem der(1) sich nicht eindeutig von der Markierung des normalen 11ers unterschied. Der limitierende Faktor in diesem Falle war die Markierung der Bibliotheken für Chromosom 11 und 1 mit ähnlichen schwer unterscheidbaren Farbstoffkombinationen. Bei ähnlichen Fluoreszenzmarkierungen können nur relativ große Austausch mit SKY detektiert werden. Dies stellt sicherlich einen limitierenden Faktor dar.

Im Falle des Patienten mit Moebius-Syndrom handelt es sich um eine der komplexesten Chromosomenaberrationen, die bisher beschrieben wurden. Die Bruchpunkte waren in diesem Fall nach zytogenetischer Bandierungs- und FISH-Analyse mit YACs in folgenden Chromosomenbändern zu finden: 7q21, 8q21.3, 11p14.3 und 13q21.2. Abbildung 5.5 zeigt das Bild einer klassischen G-Bandierung einer Metaphase des Moebius-Patienten und das mit FISH-Kartierung erstellte Ideogramm der an der komplexen Translokation beteiligten Chromosomen. Die Aufklärung dieser Translokation mit klassischer Bänderungsmethode und konventioneller FISH war äußerst zeitaufwendig und nahm mehrere Monate in Anspruch. Mit der SKY-Analyse konnten wir in einem einzigen Hybridisierungsexperiment die Beteiligung der Chromosomen 7, 8 und 13 an dieser komplexen Chromosomenveränderung zeigen. Abbildung 5.6 zeigt das spektrale Falschfarbenbild sowie das klassifizierte Bild einer repräsentativen Metaphase, Abbildung 5.7 den dazu-



Abbildung 5.1: Patient 72 mit der Translokation $t(10;14)(q21;q32)$

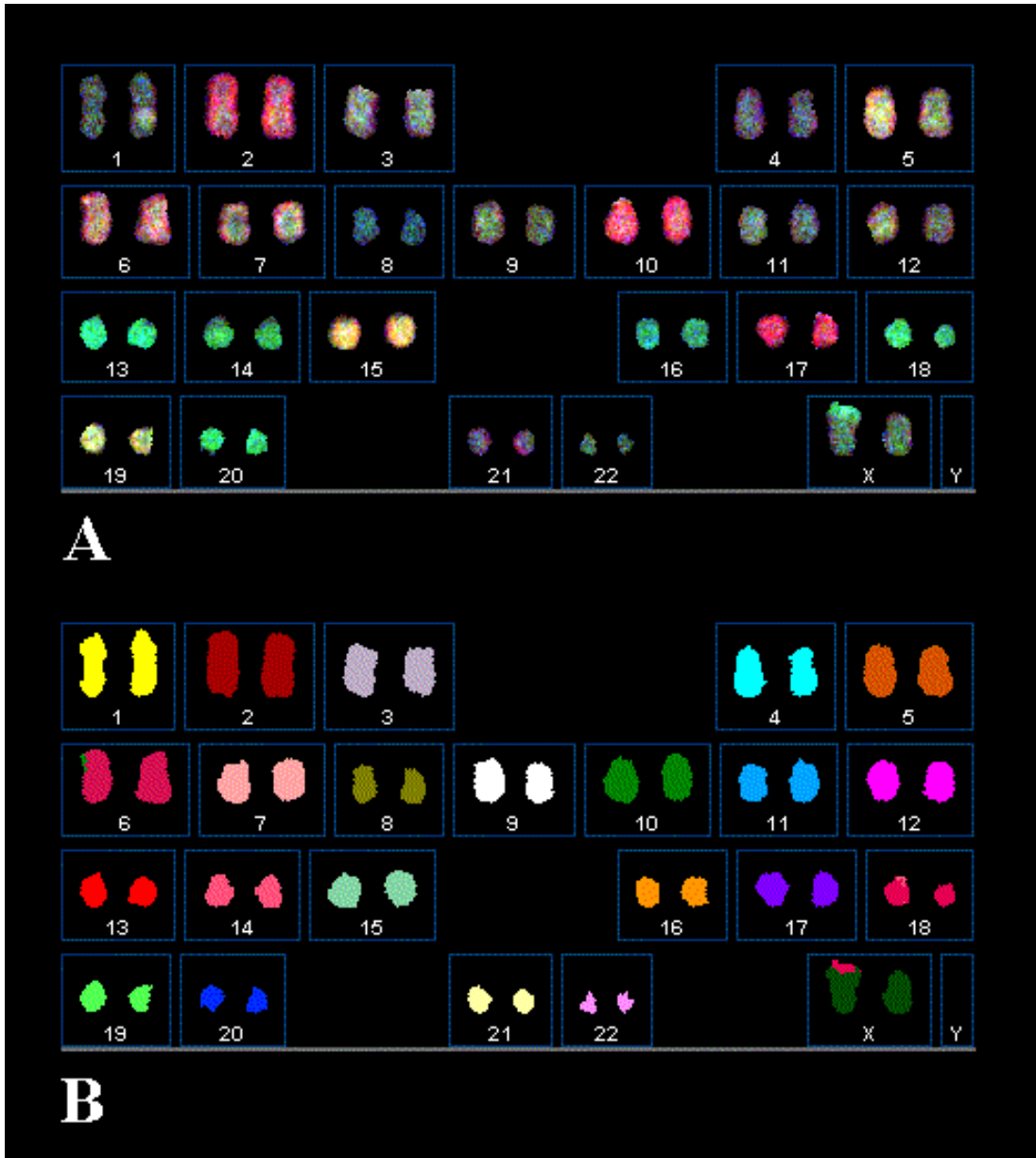


Abbildung 5.2: Patient 309 mit der Translokation $t(X;18)(p22.3;q21)$

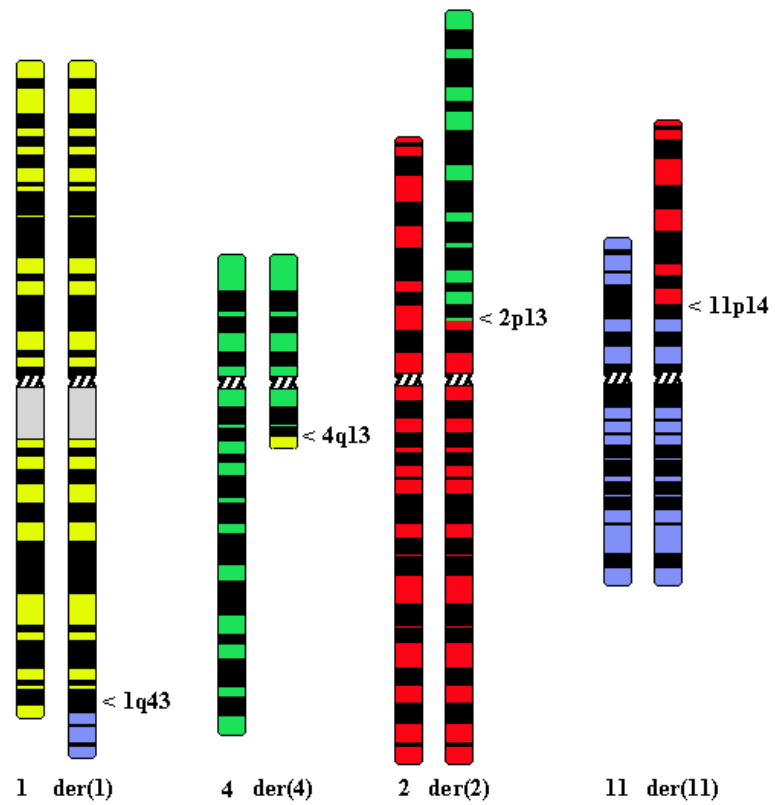


Abbildung 5.3: Ideogram des Patienten 176 komplexer Translokation. Die Bruchpunkte und translozierten Segmente wurden durch YAC-Hybridisierungen kartiert

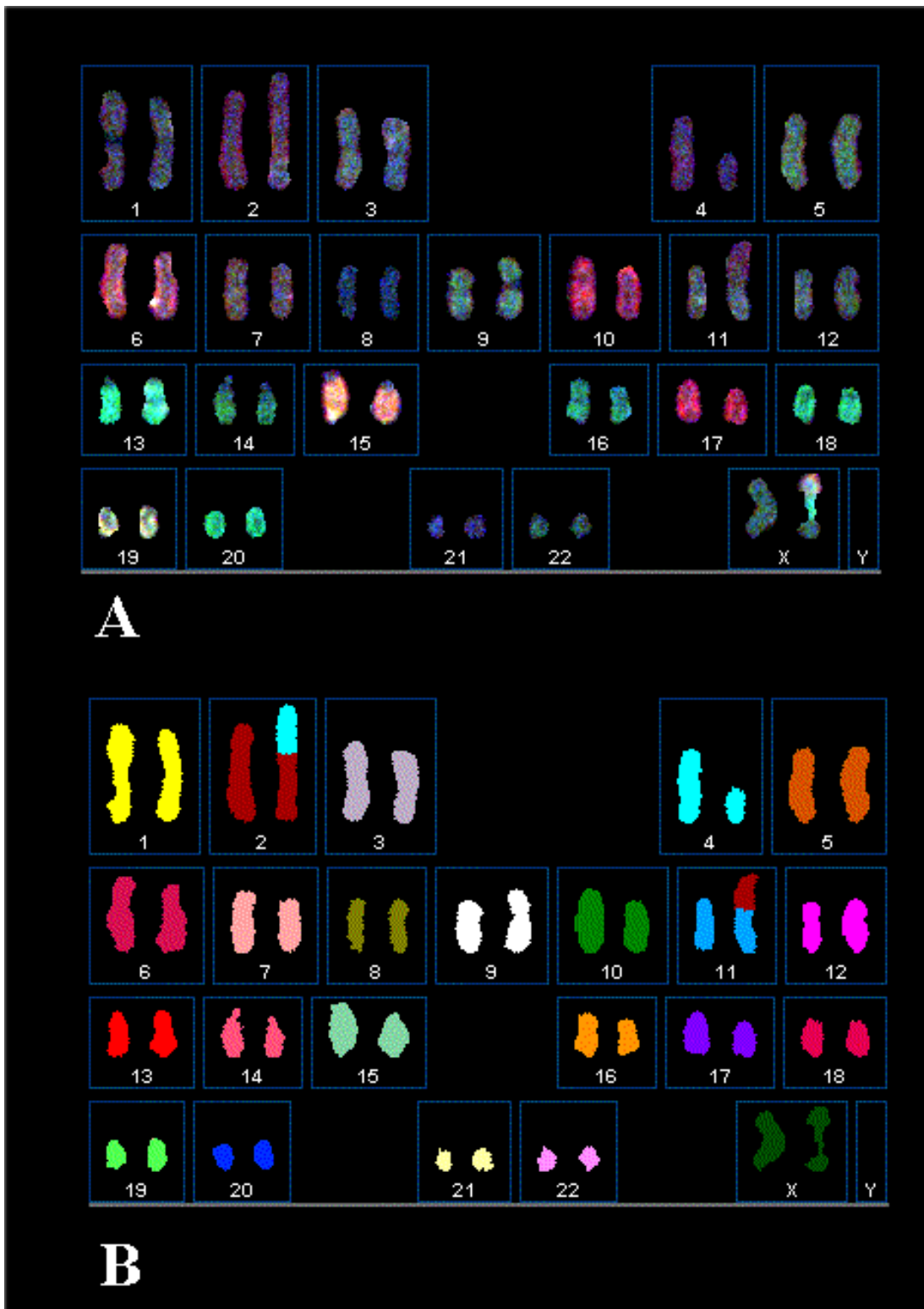


Abbildung 5.4: Patient 176 mit der komplexen Translokation nach SKY-Analyse

gehörigen Karyotyp. Das derivative kurze Chromosom 7 war einheitlich mit der Farbe der Chromosom 7-Markierung gefärbt. Das chromosomale Material distal zu 7q21 wurde auf der(8) und der(13) detektiert. Das distale Segment 8q21-qter war auf dem der(13) zu finden und das Segment 13q21-qter auf dem der(8). Die mit G-Bandierung erwartete Veränderung an Chromosom 11 konnte mit der SKY-Methode nicht aufgedeckt werden. In einigen untersuchten Metaphasen konnte mit SKY eine Insertion in 11p vermutet werden, eine chromosomale Herkunft konnte man jedoch nicht identifizieren. Die FISH-Kartierung mit YACs konnte zusätzlich eine Insertion von 11q14.3 am der(8) und eine weitere Insertion am der(11) von 8q21.3 und 7q21 aufdecken.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß SKY eine effiziente Nachweismethode von einfachen und komplexen Translokationen darstellt. Das Auflösungsvermögen liegt im Bereich einer Chromosomenbande. Bei ungünstigen Farbkombinationen ist die Auflösung deutlich schlechter. Zur genauen Charakterisierung von komplexen Translokationen muß SKY mit anderen Untersuchungen (G-Bandierung, YAC-FISH) kombiniert werden.

5.1.2 FISH-Bandierung der Chromosomen 2 und X

Zur Erstellung einer FISH-Bandierung für Chromosomen, auch „chromosomale Barkodierung“ genannt, wurden jeweils 5 YACs innerhalb eines 15 cM-Intervalls gepoolt und die verschiedenen Pools entlang eines Chromosoms mit 5 Fluoreszenzfarben alternierend markiert. In den Tabellen 4.3 und 4.4 wurden die Sonden, die zur Bandierung der Chromosomen X und 2 verwendet wurden, mit ihren Markierungen aufgelistet. Die Abbildungen 5.9 und 5.8 zeigen die in Falschfarben dargestellten spektralen Farben der Fluoreszenzbandierung, sowie die klassifizierte Banden, die mit dem Klassifikationsalgorithmus der Software SKY bzw. SPCUB bestimmt wurden.

Die Abbildungen 5.9 und 5.8 zeigen die FISH-Bandierungen der beiden Chromosomen im Vergleich mit den Ideogrammen der G-Bandierung und einer Auflistung der verwendeten YACs.

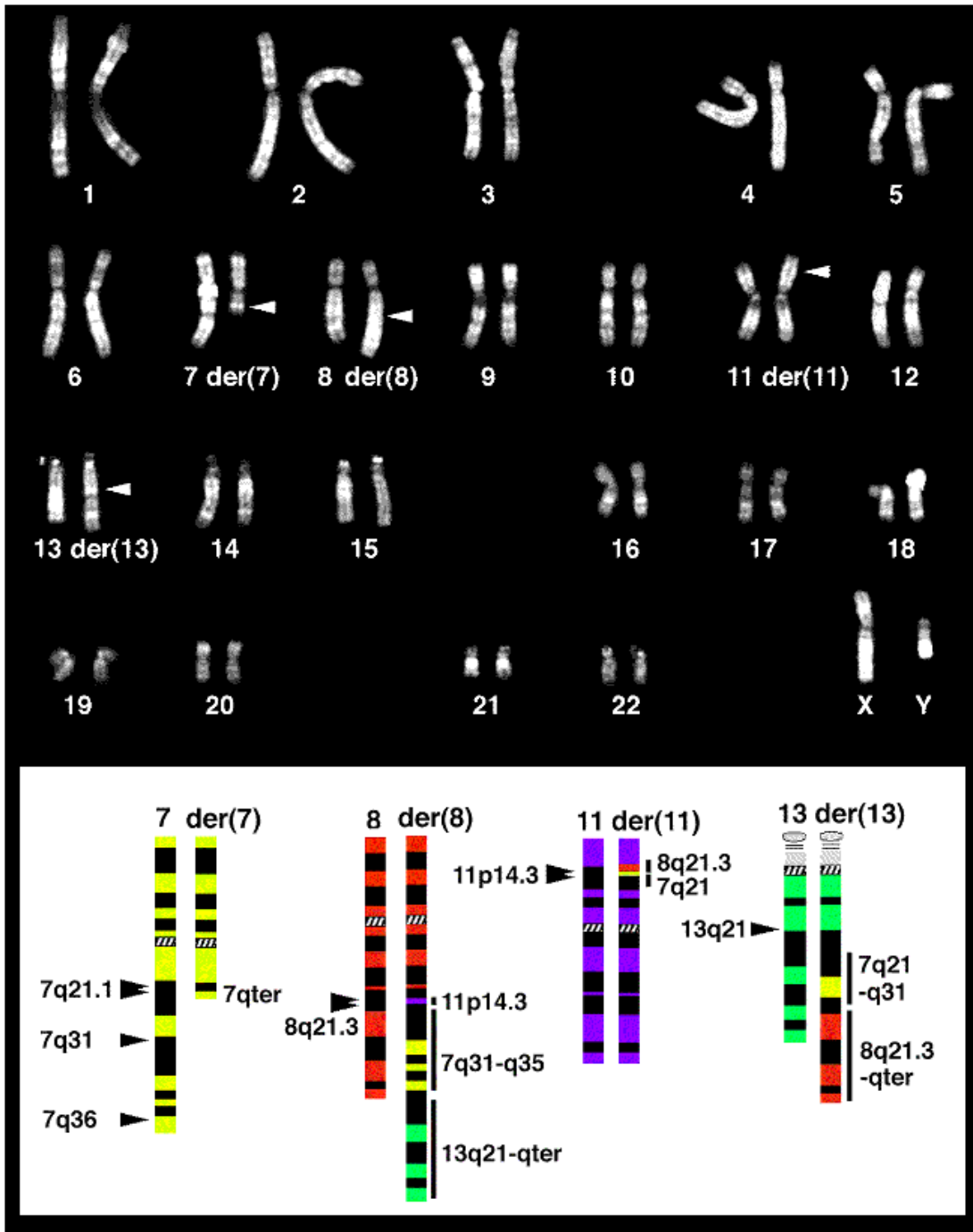


Abbildung 5.5: Karyotyp eines Moebiuspatienten nach Q-Bandierung und schematische Darstellung der an der komplexen Aberration beteiligten Chromosomen. Die Bruchpunkte und translozierten Segmente wurden durch YAC-Hybridisierung kartiert (BORCK *et al.* 2001 [10])

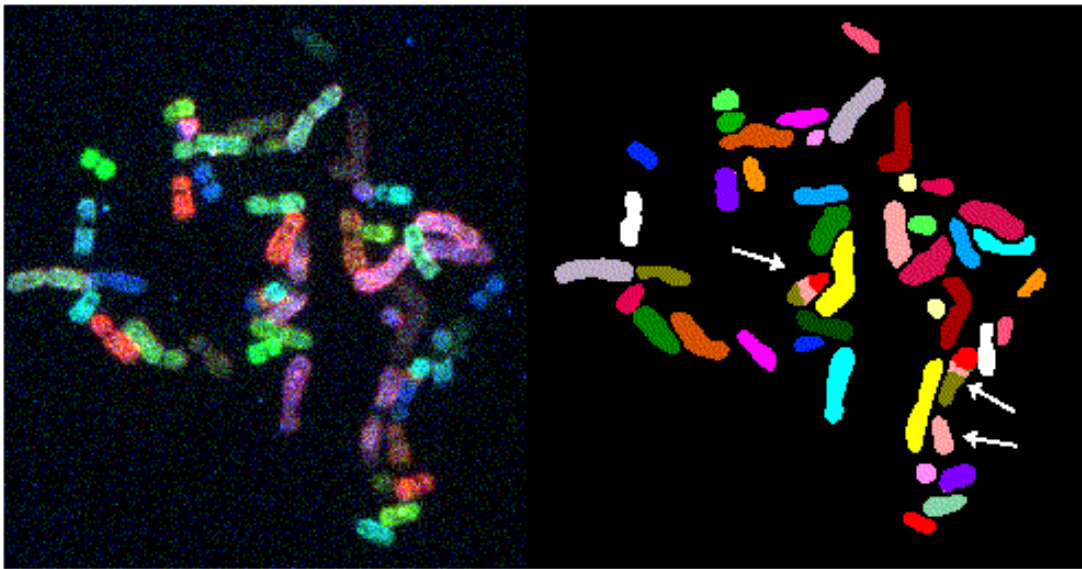


Abbildung 5.6: Abbildung einer Metaphase des Patienten mit Moebius-Syndrom. Die linke Seite zeigt das spektrale Bild, die rechte Seite die gleiche Metaphase in Klassifikationsfarben. Die Translokationschromosomen der(7), der(8) und der(13) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

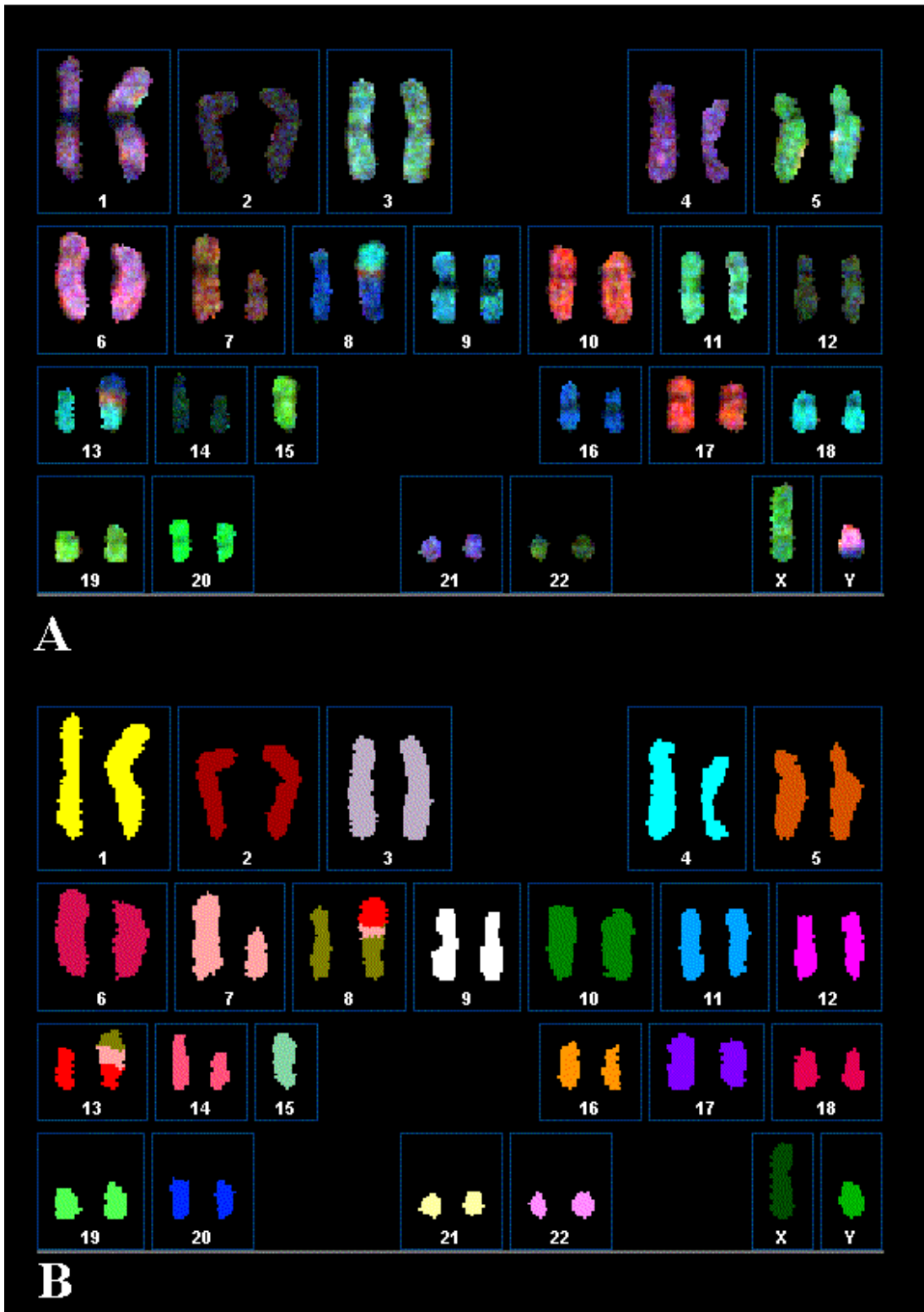


Abbildung 5.7: Karyotyp des Patienten mit Moebius-Syndrom in den spektralen Farben (A) und in den Klassifikationsfarben (B)

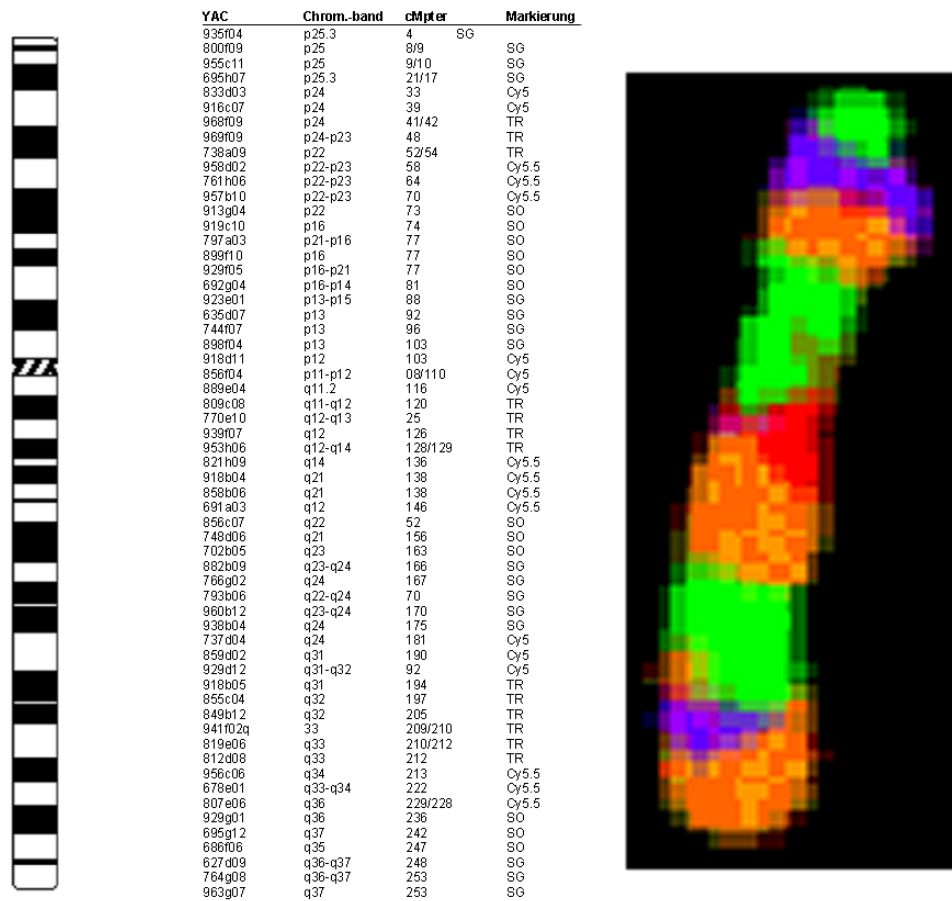


Abbildung 5.8: Fluoreszenzbandierung des Chromosoms 2. Neben dem Ideogramm sind die verwendeten YACs, die chromosomale Lokalisation (Bande und cMpter) und die Markierung der Pools (FISH-Banden) zu sehen.

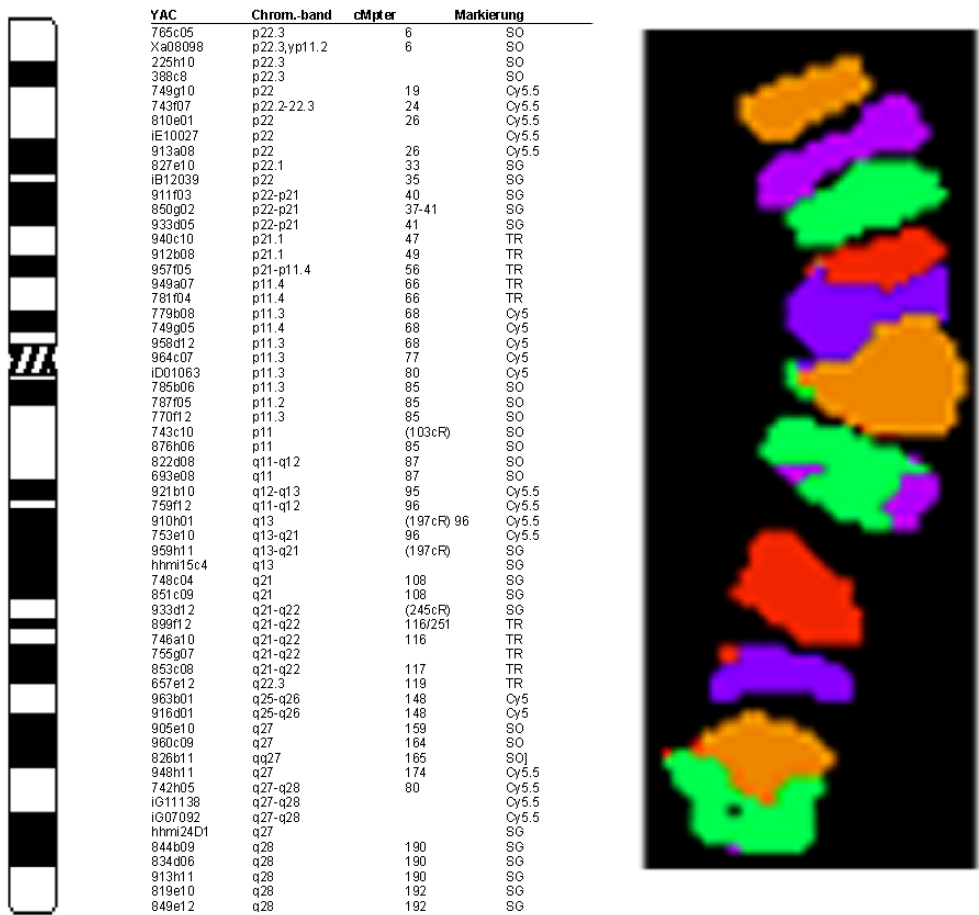


Abbildung 5.9: Fluoreszenzbandierung des Chromosoms X. Neben dem Ideogramm sind die verwendeten YACs, die chromosomale Lokalisation (Bande und cMpter) und die Markierung der Pools (FISH-Banden) zu sehen.

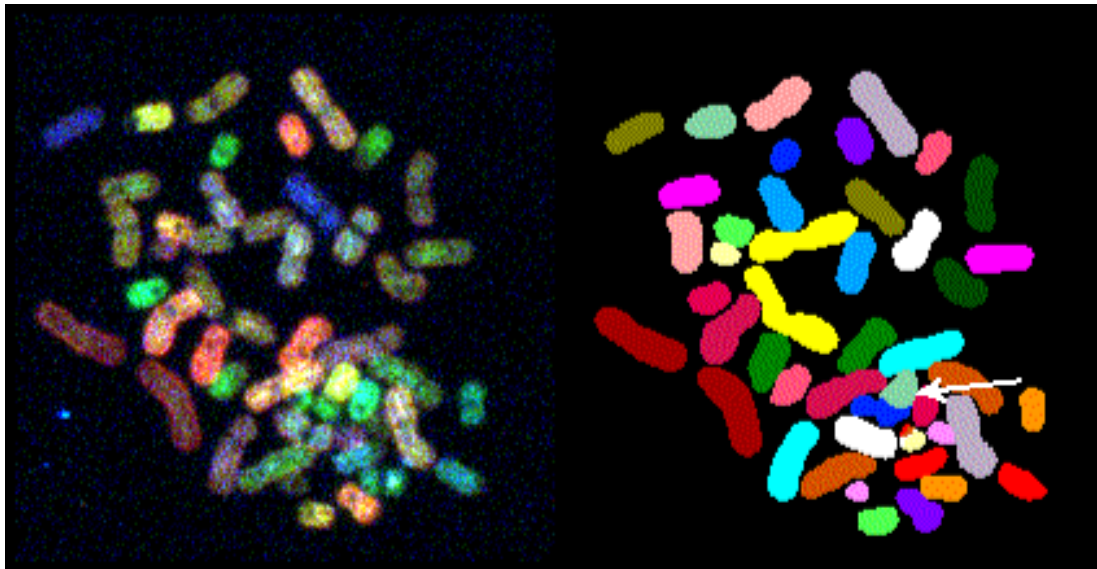


Abbildung 5.10: Spektrales und klassifiziertes Bild einer Metaphase der P3-Zellen. Der Pfeil zeigt auf die stabile Translokation $t(15;20)$.

5.2 Chromosomenaberrationen und genomische Instabilität nach Röntgenstrahlung

25 Tage nach Bestrahlung wurden von Klonen überlebender Zellen Chromosomenpräparate hergestellt. Diese wurden mit SKY auf Translokationen überprüft. Alle Bestrahlungsexperimente wurden mit der Tumorzelllinie P3 durchgeführt. Diese Zelllinie zeigt einen stabilen Chromosomensatz mit einer Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 20. In der Abbildung 5.10 ist eine Metaphase der P3-Zellen in spektralen und klassifizierten Farben dargestellt, Abbildung 5.11 zeigt den dazugehörigen Karyotyp.

Die aus bestrahlten P3-Zellen etablierten klonalen Zelllinien wurden auf das Vorhandensein von klonalen (stabilen) Translokationen und nicht-klonalen Translokationen untersucht. Andere Chromosomen- und Chromatidaberrationen sowie erkennbare Deletionen wurden ebenfalls registriert. Eine klonale Translokation liegt vor, wenn alle (10) untersuchten Metaphasen eines Klons dieselbe Translokation zeigen. Diese Translokation muß bereits kurz nach Bestrahlung in der Zelle entstanden sein und wurde bei der Zellteilung auf alle Zellen der nächsten Generation(en) vererbt. Solche klonalen Translokationen sind auf eine direkte strahleninduzierte DNS-Schädigung zurückzuführen. Sind dagegen nur in einem Teil der Metaphasen eines Klons oder einzelnen Zellen charakteristische Translokationen zu finden, müssen diese während der Expansion des Klons und nicht direkt nach Bestrahlung entstanden sein. Diese nicht-klonalen Translokationen sind sehr wahrscheinlich durch genomische Instabilität bedingt. Mit Hilfe von SKY



Abbildung 5.11: SKY- Karyotyp der P3-Zellen mit t(15;20)

Experiment	Dosis [Gy ⁻¹]	Anzahl der unters. Klone (Metaphasen)	Anzahl klonaler Aberrationen	Anzahl der Klone mit Instabilität
1	0	7 (71)	0	2
(0400)	2	4 (43)	0	2
	4	2 (21)	0	0
2	0	9 (89)	0	1
(0500)	2	6 (64)	0	1
	4	7 (74)	4	0
3	0	8 (75)	0	1
(1100)	2	10 (108)	2	0
4	0	6 (64)	0	0
(0101)	2	10 (101)	6	2

Tabelle 5.2: Experimente 1, 2, 3 und 4 wurden unabhängig voneinander durchgeführt. Aufgeführt sind die Bestrahlungsdosis mit Röntgenstrahlen, die Anzahl der untersuchten Klone, die Anzahl der klonalen (in allen Metaphasen eines Klons aufgetretenen) Translokationen und die Anzahl der Klone mit nicht-klonalen Translokationen (in einer oder weniger Metaphasen eines Klons). In der Regel wurden mindestens 10 Metaphasen pro Klon karyotypisiert.

Exp.	Dosis [Gy ⁻¹]	Klon	nicht-klonale Aberrationen im einzelnen
1	0	K18	t(6;20) in 1 von 11 idic(4)(q) (isodiz.) + Frag. von Chr. 4q in 1 von 11
		K13	del(2) in 1 von 10 Marker in 1 von 10
	2	202	der(13)t(10;13) in 2 von 11 del(6p) in 1 von 11 der(17;18)t(17;18) in 1 von 11
		205	der(7) und der(13) in 1 von 11
	4	-	-
2	0	K25	der(14)t(7;14) in 1 von 12
	2	221	del(12q) in 1 von 12
3	0	110021	ins(12), Insertion, in 1 von 9
	2	0	-
4	0		-
	2	0101 13	i(11)(q), Isochr. (G-Band.) in 1 von 12
	2	0101 30	inv(11), perizentr. Inversion (G-Band.) in 1 von 12

Tabelle 5.3: Häufigkeit von nichtklonalen Translokationen in den einzelnen Bestrahlungsexperimenten

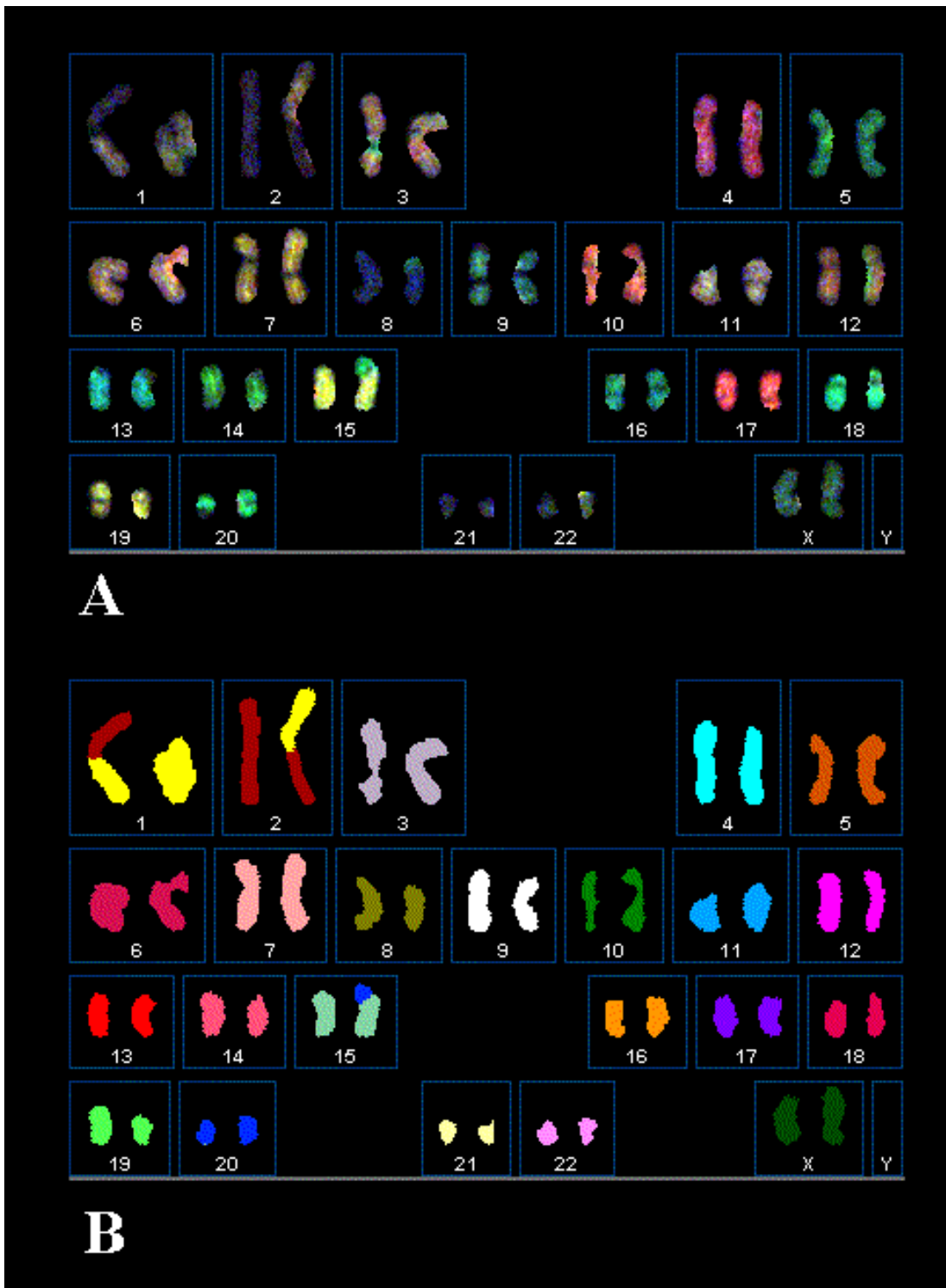


Abbildung 5.12: Klonale Translokation der Chromosomen 1 und 2 des bestrahlten Klons 0500p409



Abbildung 5.13: Klonale Translokation der Chromosomen 12 und 14 des bestrahlten Klon 0500p415

Referenz	Zellen	Bestrahlung	Tl.-frequenz
vorliegende Arbeit	P3	2Gy Röntgenstr. (250kV)	26,7%
		4Gy	44,4%
Diplomarbeit [44]	P3	2Gy Röntgenstr. (250kV)	24%
		4Gy	44%
FINNON <i>et al.</i> [31]	Lymphozyten	2Gy Röntgenstr. (250kV)	17,8%
		4Gy	64,6%
SCHMID <i>et al.</i> [133]	Lymphozyten	2Gy Röntgenstr. (220kV)	35,8%
FERNANDEZ <i>et al.</i> [30]	Lymphozyten	2Gy Röntgenstr. (100kV)	28,7%
		4Gy	94,5%
TUCKER <i>et al.</i> [150]	Lymphozyten	2Gy γ -Strahlung	17%
		4Gy	68,5%
TUCKER <i>et al.</i> [149]	Lymphozyten-Patient 1	2Gy γ -Strahlung	14,1%
		4Gy	47,1%
	Lymphozyten-Patient 2	2Gy γ -Strahlung	14,4%
		4Gy	64,6%

Tabelle 5.4: Eigene und publizierte Translokationsfrequenzen nach FISH-Experimenten mit der Lucas-Formel (LUCAS *et al.* [91]) auf das gesamte Genom extrapoliert, bzw. nach SKY

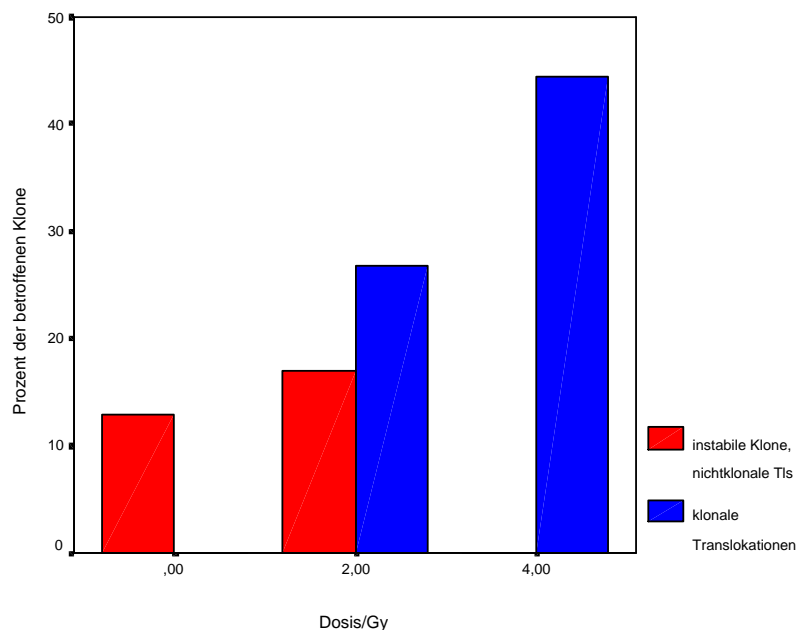


Abbildung 5.14: Anzahl der Chromosomenaberrationen in Prozent nach unterschiedlicher Bestrahlungsdosis. Die stabilen Translokationen sind in blau, die instabilen sind in rot dargestellt.

wurden in einigen analysierten Klonen Translokationen entdeckt. Die Abbildungen 5.12 und 5.13 zeigen Beispiele für stabile Translokationen nach Bestrahlung mit 4 Gy (Experiment 2). Abbildung 5.12 zeigt eine Translokation der Chromosomen 1 und 2, Abbildung 5.13 eine Translokation zwischen den Chromosomen 12 und 14. In allen analysierten Zellklonen war die stabile $t(15;20)$ Translokation nachweisbar und diente als interne Kontrolle für die SKY-Analyse.

Insgesamt wurden 4 unabhängige Experimente durchgeführt. In den ersten beiden Experimenten wurden Zellen parallel mit 2 Gy oder 4 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt, in den Experimenten 3 und 4 nur mit 2 Gy Röntgenstrahlung. In allen Experimenten wurden unbestrahlte Kontrollen mitgeführt. Mit den Kontrollen sollte die spontane Instabilität, die ohne den Einfluß ionisierender Strahlung in der Zellkultur auftrat, getestet werden.

Klonale Translokationen spiegeln die direkt durch Bestrahlung verursachten Chromosomenumbauten wider. Die Anzahl der Klone mit klonalen Translokationen läßt demnach Rückschlüsse auf die strahleninduzierte Translokationsfrequenz zu (Tabelle 5.2). Für die Klone nach 4 Gy Bestrahlung wurden eine Frequenz von 44,4% gefunden, für die Klone nach 2 Gy Bestrahlung 26,7%. Insgesamt wurden 8 klonale Translokationen in 30 untersuchten Klonen nach 2 Gy und 4 klonale Translokationen in 9 Klonen nach 4 Gy Röntgenstrahlung gefunden. Daraus erhält man eine Translokationsfrequenz von 11,1% (Translokationen pro Zelle pro Gray) ausgehend von den 4 Gy Klonen und 13,4% ausgehend von den 2 Gy Klonen. Zusätzlich wurden in zwei weiteren bestrahlten Klonen klonale Veränderungen gefunden, einmal ein zusätzliches Chromosom 6 in 10 von 12 ausgewerteten Metaphasen und einmal ein Chromosom 1 mit einer Duplikation im Bereich des p-Arms. Auch in diesen Fällen muß eine direkte Schädigung der Zelle die Ursache sein. Um die Ergebnisse mit den Literaturwerten, die sich ausschließlich mit Translokationen beschäftigen, vergleichen zu können, wurden diese Aberrationen nicht in der Liste der Translokationen aufgeführt.

Aus FISH-Experimenten mit einzelnen chromosomenspezifischen Sonden kann von Translokationsfrequenzen der analysierten Chromosomen auf die Translokationsfrequenz des gesamten Genoms mit der „Lucas-Formel“ extrapoliert werden (LUCAS *et al.* [91]). In meiner Diplomarbeit [44] wurden für einige publizierte Bestrahlungsexperimente an Lymphozyten Translokationsfrequenzen für das gesamte Genom ermittelt. Danach ergaben sich für 250 kV Röntgenbestrahlung bei FINNON *et al.* [31] eine Translokationsfrequenz von 17,8% nach 2 Gy und 64,6% nach 4 Gy; bei Bestrahlung mit 220kV Röntgenstrahlung bei SCHMID *et al.* [133] schon nach 2 Gy 35,8% und nach 100 kV Röntgenbestrahlung bei FERNANDEZ *et al.* [30] nach 2 Gy 28,7% und nach 4 Gy 94,5%. Experimente nach γ -Bestrahlung führten zu vergleichbaren Ergebnissen. TUCKER *et al.* [150] kamen nach Markierung eines Chromosoms und Bestrahlung mit 2 Gy auf 17% und einer Bestrahlung von 4 Gy auf 68,5%. In einer weiteren Veröffentlichung von TUCKER *et al.* [149] wurde mit zwei verschiedenen Patientenmaterialien gearbeitet. Hier waren die Translokationsfrequenzen für das gesamte Genom bereits in der Literaturstelle

angegeben, nämlich 14% bei 2 Gy bzw. 47% bei 4 Gy in Lymphozyten des einen Patienten und 14% bzw. 64,6% in Lymphozyten eines anderen Patienten.

Die Translokationsfrequenzen der P3-Zellen aus den vorgestellten Experimenten betragen 26,7% nach 2 Gy und 44,4% nach 4 Gy. Sie entsprechen im wesentlichen den Werten aus der Literatur, wobei die das Ergebnis für die hohe Dosis ein wenig unterhalb des durchschnittlichen Wertes liegt. Frühere Experimente mit denselben Zellen [44] und einer chromosomenspezifischen Sonde führten nach Extrapolation der Translokationsfrequenz auf das Genom zu vergleichbaren Werten, 24% für 2 Gy und 42% für 4 Gy. Die Translokationsfrequenzen aus den eigenen Experimenten und publizierten Referenzen sind in Tabelle 5.4 zusammengefaßt.

Um die Anzahl der Klone zu bestimmen, die eine chromosomale Instabilität aufweisen, wurde die Translokationsrate der „nichtklonalen“ Translokationen bestimmt. Die Translokationsfrequenz der nichtklonalen Aberrationen ergibt sich aus der Anzahl der untersuchten Klone, die eine Instabilität zeigen. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 5.2 aufgelistet. In Tabelle 5.3 werden die instabilen Klone im Detail dokumentiert.

Insgesamt wurden 30 unbestrahlte Kontrollklone und 39 bestrahlte Klone (30 mit 2 Gy und 9 mit 4 Gy) untersucht. Dabei wurden jeweils ca. 10 Metaphasen eines jeden Klons (auf einem Objektträger) ausgewertet. Für die Experimente 1 und 2 ergaben sich folgende Resultate: Während sich in den 9 untersuchten Klonen nach 4 Gy keine instabilen Klone zeigten, wurden nach 2 Gy Röntgenbestrahlung in 4 Klonen eine Instabilität festgestellt. Diese äußerte sich in mindestens einer strukturellen chromosomalen Veränderung, die nicht in allen Metaphasen dieses Klons gefunden wurde, bzw. in chromosomalen Aberrationen, die durch eine Veränderung der G-Bandierung im DAPI-Bild aufgedeckt wurden (siehe Tabelle 5.3). Dazu zählten größtenteils Folgeprodukte von Translokationen, sog. „derivativ“ Chromosomen, die mit SKY aufgedeckt werden konnten. Bei den „derivativen“ Chromosomen handelt es sich um Translokationen, bei denen ein Fragment eines Chromosoms verloren gegangen und nicht wie bei einer Austauschtranslokation an dem reziproken Chromosomen zu finden ist. Zum anderen gehörten dazu größere Deletionen, die mit DAPI-Bandierung aufgedeckt werden konnten, Markerchromosomen, ein isozentrisches Chromosom, sowie eine Insertion. In einem instabilen Klon wurde in 2 Metaphasen der(13) gefunden, außerdem in jeweils einer Metaphase eine Deletion von 6p und eine Translokation der(17,18)t(17,18), bei der das dazugehörige Gegenstück verlorengegangen war, sowie eine Deletion in Chromosom 6p. Bei einem weiteren Klon wurde in einer Metaphase ein der(7) und ein der(13) gefunden. In Experiment 2 war in einer Metaphase eines Klons eine Deletion von 12q zu finden.

In den Experimenten 1 und 2 wurden insgesamt in 3 Kontrollklonen nichtklonale Veränderungen gefunden. In zwei Klonen von Experiment 1 waren jeweils 2 unabhängige Veränderungen vorhanden, einmal eine Translokation t(6;20) und ein der(11), in dem anderen Klon ein der(2) und ein Markerchromosom. In einem Kontrollklon von Experiment 2 war ein der(14)t(7;14) zu finden.

Bei den Auswertungen der Experimente 3 und 4 handelte es sich um Versuche, bei denen zum Zeitpunkt der Auswertung die Exposition nicht bekannt war („Doppelblindversuch“). In den 20 mit 2 Gy bestrahlten analysierten Klonen wurden in 2 Klonen Instabilitäten gefunden, die beide nur durch Veränderungen der G-Bandierung aufgedeckt wurden. In einem Fall konnte in einer Metaphase eine perizentrische Inversion von Chromosom 11 gefunden werden, in einem anderen Fall ein iso11q, ein Chromosom, das aus zwei aneinanderhängenden q-Armen von Chromosom 11 besteht.

Insgesamt wurden in den 30 untersuchten Klonen, die mit 2 Gy bestrahlt wurden, 5 instabile Klone gefunden, d. h. in 17%. Bei den 9 mit 4 Gy bestrahlten Klonen konnten keine Instabilitäten entdeckt werden. Mit der Untersuchung der unbestrahlten Kontrollklone sollte die Hintergrundinstabilität der Zelllinie aufgedeckt werden, die ohne Bestrahlung bei einer Klonaufzucht auftritt. Dabei wurden insgesamt in 13% der unbestrahlten Klone eine Instabilität gefunden. Da es sich bei P3-Zellen um eine Tumorzelllinie handelt, könnten die Zellen ohne Bestrahlung eine Instabilität zeigen. Tatsächlich war die Anzahl der bestrahlten instabilen Klone nicht signifikant größer als die der unbestrahlten Klone. Abbildung 5.14 faßt die Ergebnisse zusammen und zeigt wieviel Klone nach Bestrahlung eine stabile Translokation zeigen und wieviele Klone mit Instabilitäten zu finden waren. Das bedeutet, daß die angewandte SKY-Methode zur Analyse von direkt strahleninduzierten Aberrationen und von strahleninduzierter Instabilität geeignet ist, die P3-Zellen aber möglicherweise nicht die optimale Zelllinie für solche Untersuchungen sind.

5.3 Matrix-CGH

Die Matrix-CGH detektiert genomische Dosisunterschiede durch komparative Hybridisierung auf Klon-Arrays. Ungleichgewichte zwischen Tester- und Referenzgenom entstehen durch Deletionen oder Amplifikationen einzelner Sequenzen im Testergenom. Um Deletionen in einem diploiden Genom detektieren zu können, muß die Matrix-CGH Unterschiede mit einem Dosisverhältnis von 2 : 1 auflösen. Die Empfindlichkeit der Methode wurde mit bekannten Targets auf ausgewählten Sonden getestet. Zur komparativen Hybridisierung auf Chips wurden genomische DNSn mit einer unterschiedlichen Anzahl an X-Chromosomen als Targets verwendet, die von Patienten mit multiplen X-Chromosomen (XXX, XXXX, XXXXX), sowie normalen weiblichen (XX) und männlichen (XY) Kontrollpersonen stammten. Als Sonden wurden autosomale und X-chromosomale Klone auf Chips gespottet. Da genomische Imbalancen der Chromosomenenden große medizinische Bedeutung haben (als Ursache für mentale Retardierung, MR), befanden sich auf den Chips zahlreiche Sonden aus den subtelomerischen Regionen. Ein „Telomchip“ könnte als wichtiges Hilfsmittel zur Differentialdiagnose der MR dienen.

Neben optimierten Hybridisierungsbedingungen ist die Auswahl von geeigneten Sonden und Target-DNS von entscheidender Bedeutung. Um die Komplexität der gesamtgenomischer Target-DNSn um einen Faktor 500 bis 1000 zu verringern und um die Hybridisierungseffizienz zu erhöhen, wurden Inter-Alu-PCR-Produkte von genomischen DNSn als Target und zum Teil Inter-Alu-PCR-Produkte vom YAC-Klonen als Sonden verwendet. Idealerweise sollten Target-DNSn und Sonden-DNSn dieselben DNS-Sequenzen enthalten, um wie Schloß und Schlüssel zueinander zu passen. Da aufgrund der Inter-Alu-PCR zur Verringerung der Komplexität sowohl die Sonden als auch die Targets für repetitive Alu-Sequenzen angereichert sind, wurde versucht, die unspezifische Hybridisierung durch Verwendung von speziellen Competitor-DNSn und den Verdau der Alu-Enden von den Target-DNSn zu verhindern.

Im folgenden werden zwei Stufen bei der Entwicklung der Matrix-CGH beschrieben, die eine Detektion von 5 : 1 bis 2 : 1 Dosisunterschieden ermöglichten. Als Untersuchungsmodell diente zunächst die genomische DNS mit 5 oder 4 X-Chromosomen, die mit weiblicher und männlicher DNS vergleichend hybridisiert wurde. In den CGH-Experimenten auf Chip 1 war es möglich, die Dosisunterschiede zwischen den beiden Targets auf einer Vielzahl X-chromosomaler Sonden zu detektieren. Nach Optimierung der Versuchsbedingungen wurde gezeigt, daß es bei komparativen Hybridisierungen auf Chip 2 möglich ist, Dosisunterschiede von 2 : 1 (männlicher und weiblicher DNS) festzustellen. Durch Verwendung anderer Objektträger, verbesserter Targets und Sonden wurde der zur Matrix-CGH geeignetste experimentelle Ansatz herausgefunden.

5.3.1 Komparative Hybridisierung am Beispiel von Patienten mit multiplen X-Chromosomen

In acht unabhängigen Experimenten wurde Patienten-DNS mit 5 und 4 X-Chromosomen mit normaler weiblicher oder männlicher DNS auf Chip 1a oder Chip 1b hybridisiert, die sich nur unwesentlich unterscheiden (siehe Kapitel 4.2.1). Auf beiden Chips waren Inter-Alu-PCR Produkte von YACs gespottet; Chip 1a trug zusätzlich DOP-PCR-Produkte telomerischer Cosmide, Chip 1b Inter-Alu-PCR Produkte telomerischer Cosmide und PACs. Alle Sonden wurden mit einem Klonindex in der Reihenfolge ihres Auftrags auf den Chip versehen. Klonindizes 1-379 repräsentierten YACs, alle Sonden mit größerem Klonindex Cosmide und PACs. In den Experimenten A1, A2, A3 und B1 wurde Chip 1a verwendet, in A4, C1, C2 und C3 Chip 1b. Diese Experimente unterschieden sich sonst nur unwesentlich in ihren Hybridisierungsbedingungen.

Abbildung 5.15 zeigt ein Falschfarbenbild einer komparativen Hybridisierung von Targets mit 5 (XXXXX) und 1 (XY) X-Chromosomen (Experiment A4) Auf dem Bild ist nur ein Ausschnitt des Chips gezeigt. Die X-chromosomalen Sonden sind mit einem roten Rahmen eingefäkt, eine Y-spezifische Sonde mit einem grünen Rahmen. Nicht alle Sonden produzieren ein Fluoreszenzsignal und

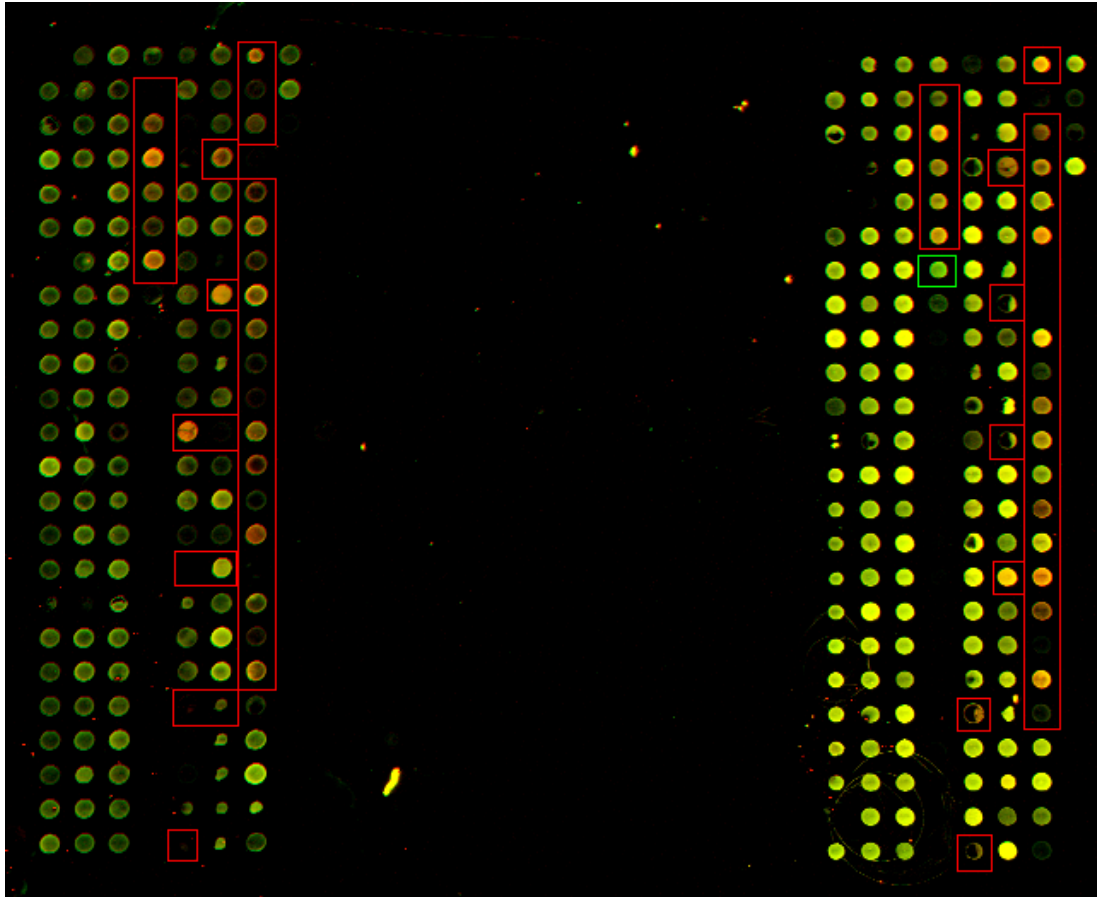


Abbildung 5.15: Falschfarbenbild eines Mikroarray-Ausschnitts (Experiments A4) nach komparativer Hybridisierung Cy3-markierter Patienten-DNS (49,XXXXX) und Cy5-markierter Kontroll-DNS (46,XY). Die X-chromosomalen Sonden auf dem Array sind mit einem roten Rahmen hervorgehoben, eine Y-chromosomale Sonde mit einem grünen Rahmen.

	Targets (Cy3:Cy5)	Anzahl der Sonden		durchschnittliches Fluoreszenz- verhältnis auf Autosomen \pm Stbw.	positive X- chromosomale Sonden	falsch- positive autosomale Sonden
		X- chromo- somal	auto- somal			
A1	XXXXXX : XY	56	253	0,55 \pm 0,15	37(66%)	13(5%)
A2	XXXXXX : XY	56	235	0,22 \pm 0,06	29(52%)	5(2%)
A3	XXXXXX : XY	58	268	1,09 \pm 0,19	34(59%)	8(3%)
A4	XXXXXX : XY	30	175	3,07 \pm 0,8	10(33%)	5(3%)
B1	XXXX : XY	42	193	0,88 \pm 0,31	24(57%)	5(3%)
C1	XXXX : XX	43	202	3,42 \pm 1,14	15(35%)	5(3%)
C2	XXXX : XX	49	266	1,31 \pm 0,35	26(53%)	11(4%)
C3	XXXX : XX	59	301	0,76 \pm 0,12	23(39%)	5(2%)

Tabelle 5.5: Zusammenfassung der acht komparativen Hybridisierungsexperimente mit verschiedenen Targets (multiple X-Chromosomen). Angegeben sind die Anzahl der in die Auswertung einbezogenen autosomalen und X-chromosomalen Sonden, das durchschnittliche Fluoreszenzverhältnis \pm Standardabweichung (Stbw.) auf den autosomalen Sonden und das Ergebnis der Klassifizierung. Die Anzahl der korrekt klassifizierten X-chromosomalen Sonden und die falsch-positiv klassifizierten autosomalen Sonden sind ein Maß für die „Verlässlichkeit“ der Chip-Diagnose.

konnten auch ausgewertet werden.

Die einzelnen Hybridisierungen sind in Tabelle 5.5 aufgeführt. In den Experimenten A1, A2, A3, A4 wurde DNS eines Patienten mit fünf X-Chromosomen (49,XXXXX) komparativ mit männlicher Kontroll-DNS (46,XY) hybridisiert, der Dosisunterschied betrug also 5 : 1. Im Experiment B1 wurde (48,XXXX)-DNS mit männlicher DNS (46,XY), also ein 4 : 1 Verhältnis, verwendet. In den Experimenten C1, C2 und C3 wurde (48,XXXX)-DNS mit einem weibliche Target (46,XX) komparativ hybridisiert, um ein Verhältnis 4 : 2 für die X-Chromosomen zu erhalten. In allen Experimenten war die Patienten-Probe mit Cy3 markiert, die Kontrolle mit Cy5. In den Abbildungen 5.17 - 5.23 sind aufeinanderfolgend die Ergebnisse der komparativen Hybridisierungen A1 bis C3 entsprechend Tabelle 5.5 aufgeführt. Dazu wurde für jede Sonde die relative Cy3/Cy5 Fluoreszintensität dargestellt. Die Auswertung bezog sich ausschließlich auf Sonden, die in beiden Farbkanälen (Cy3 und Cy5) ein auswertbares Signal (>30 Pixel) zeigten. Jede einzelne Sonde wurde im Diagramm als ein Punkt dargestellt. Die autosomalen Sonden sind in blau, die X-chromosomalen Sonden in rot abgebildet. Die wenigen Y-chromosomalen Sonden sind gelb markiert. Über alle autosomalen Sonden, die ein Verhältnis 2 : 2 zeigen, wurde ein Mittelwert mit Standardabweichung ermittelt. Als Grenzwert zur Detektion einer Über- bzw. Unterrepräsentation wurde der Mittelwert des Fluoreszenzverhältnisses \pm zweifache Standardabweichung für autosomale Klone gewählt. In den Diagrammen zeigen Referenzlinien, die die Y-Achse schneiden, das mittlere Fluoreszenzintensitätsverhältnis der Autosomen und die Grenzwerte der doppelten Standardabweichung an. X-chromosomale

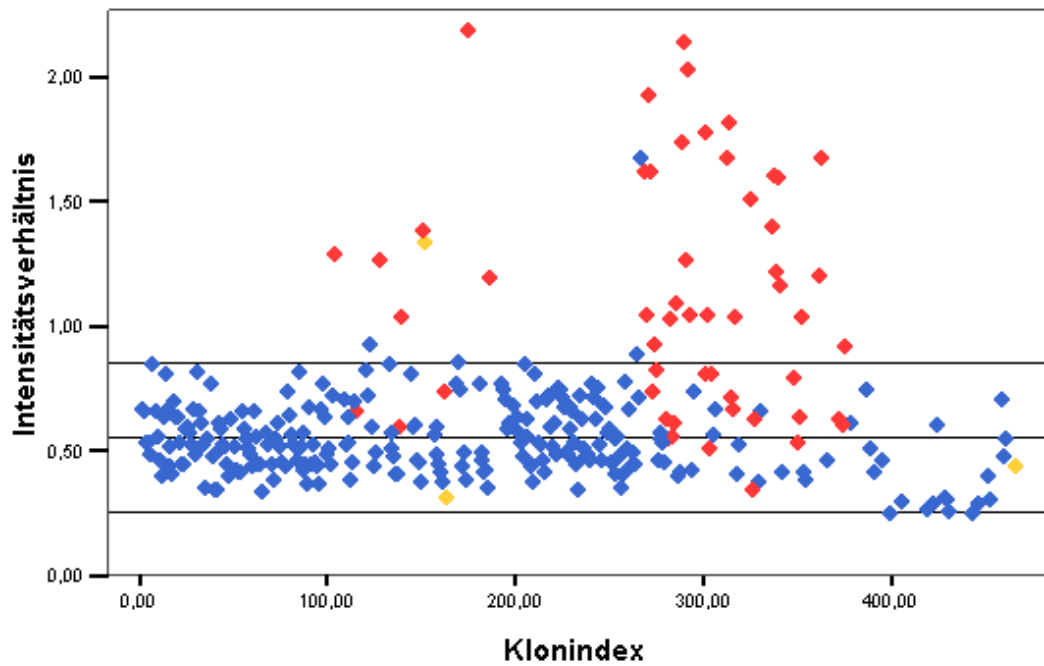


Abbildung 5.16: Cy3/Cy5-Intensitätsverhältnisse der gespotteten Sonden nach komparativer Hybridisierung von (49,XXXXX) und (46,XY) auf Chip 1a (Experiment A1). Autosomale Sonden sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt, das mittlere Intensitätsverhältnis der autosomalen Klone (Spots) beträgt 0,55. Als Targets wurden Inter-Alu-PCR-Produkte von genomischer DNS verwendet.

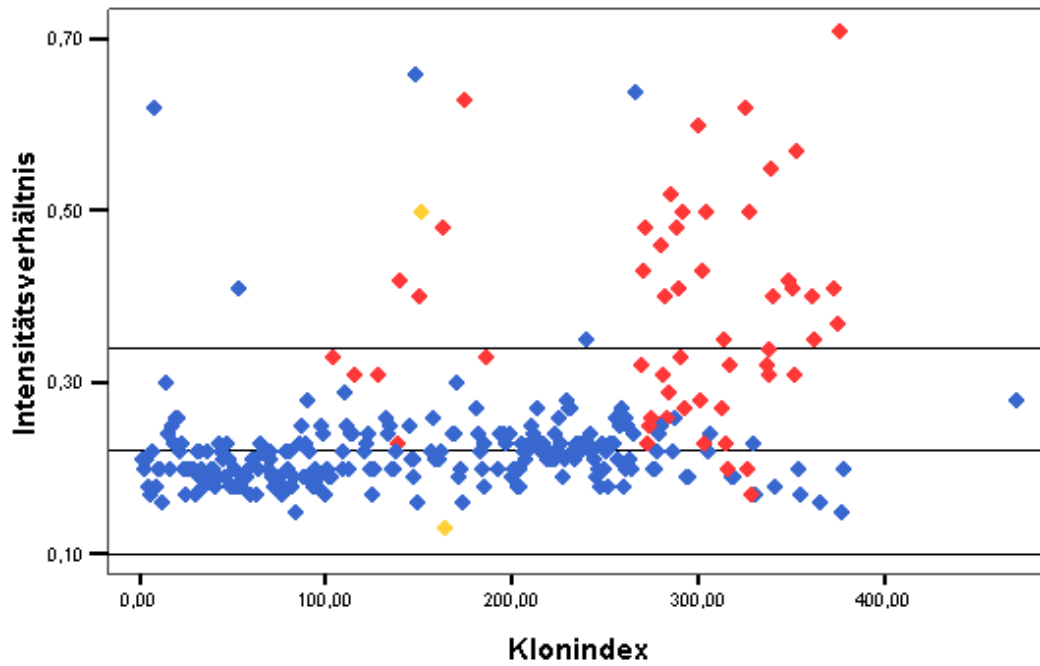


Abbildung 5.17: Cy3/Cy5-Intensitätsverhältnisse der gespotteten Sonden nach komparativer Hybridisierung von (49,XXXXX) und (46,XY) auf Chip 1a (Experiment A2). Autosomale Sonden sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt, das mittlere Intensitätsverhältnis der autosomalen Klone (Spots) beträgt 0,22. Als Targets wurden Inter-Alu-PCR-Produkte von genomischer DNS verwendet.

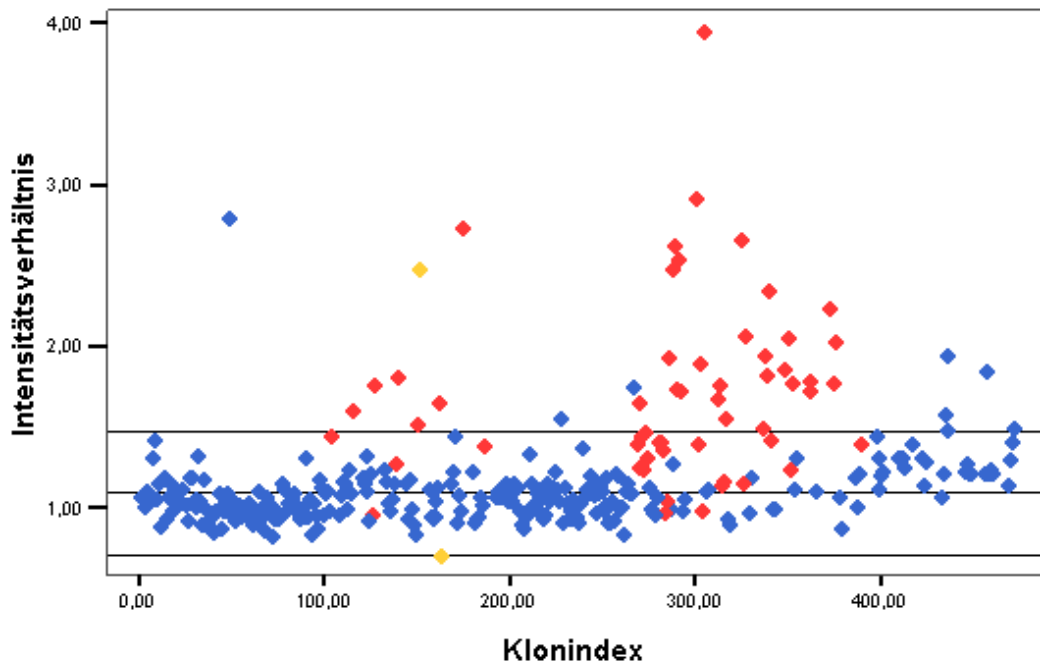


Abbildung 5.18: Cy3/Cy5-Intensitätsverhältnisse der gespotteten Sonden nach komparativer Hybridisierung von (49,XXXXX) und (46,XY) auf Chip 1a (Experiment A3). Autosomale Sonden sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt, das mittlere Intensitätsverhältnis der autosomalen Klone (Spots) beträgt 1,09. Als Targets wurden Inter-Alu-PCR-Produkte von genomischer DNS verwendet.

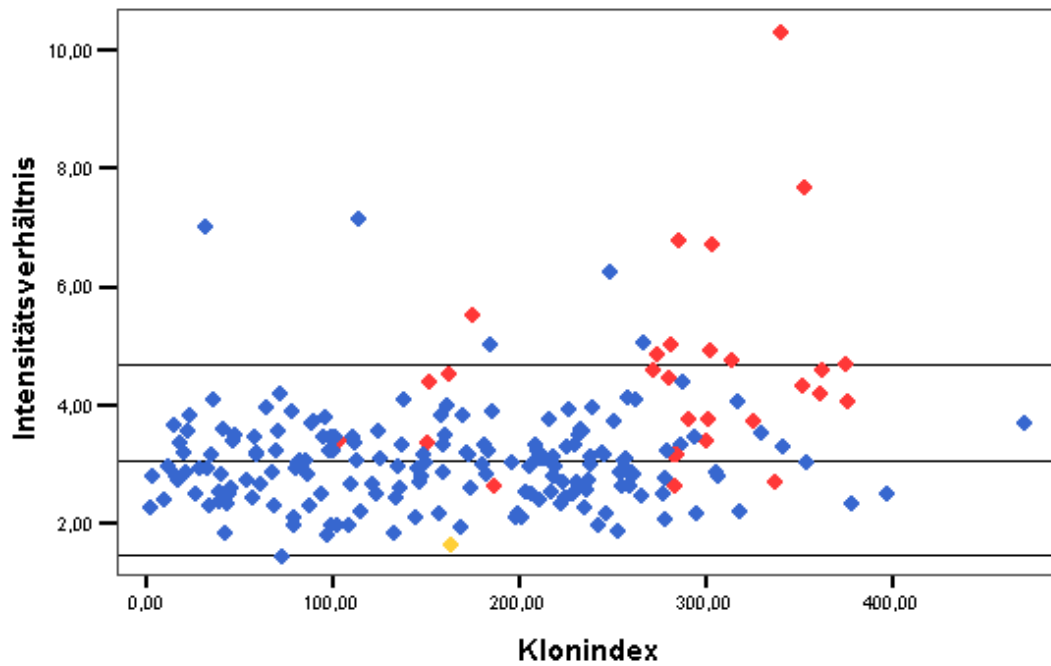


Abbildung 5.19: Cy3/Cy5-Intensitätsverhältnisse der gespotteten Sonden nach komparativer Hybridisierung von (49,XXXXX) und (46,XY) auf Chip 1b (Experiment A4). Autosomale Sonden sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt, das mittlere Intensitätsverhältnis der autosomalen Klone (Spots) beträgt 3,07. Als Targets wurden Inter-Alu-PCR-Produkte von genomischer DNS verwendet.

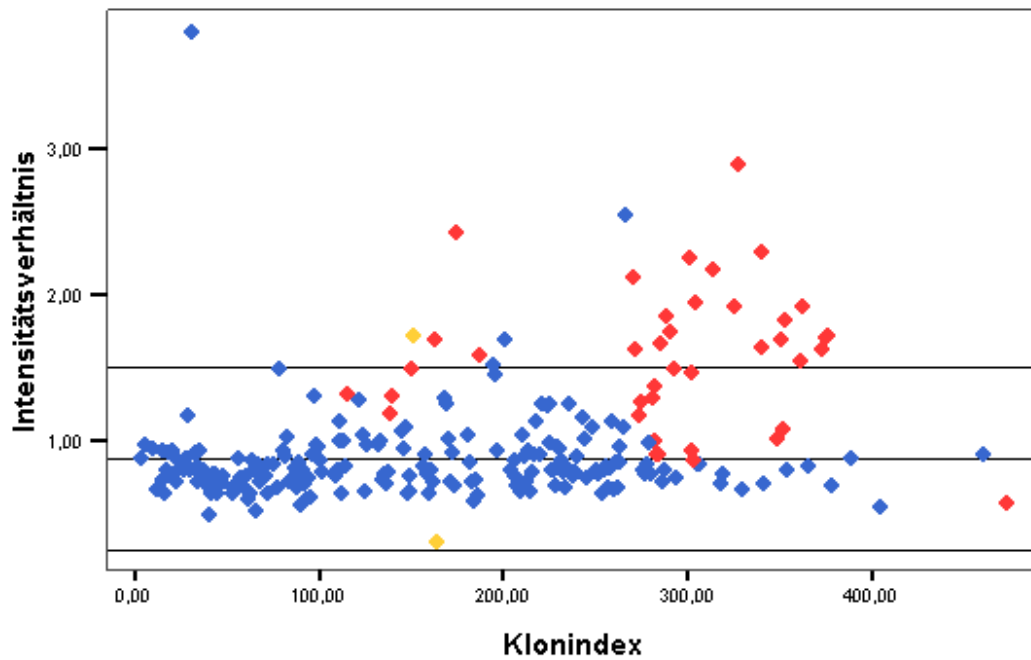


Abbildung 5.20: Cy3/Cy5-Intensitätsverhältnisse der gespotteten Sonden nach komparativer Hybridisierung von (49,XXXX) und (46,XY) auf Chip 1a (Experiment B1). Autosomale Sonden sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt, das mittlere Intensitätsverhältnis der autosomalen Klone (Spots) beträgt 0,88. Als Targets wurden Inter-Alu-PCR-Produkte von genomischer DNS verwendet.

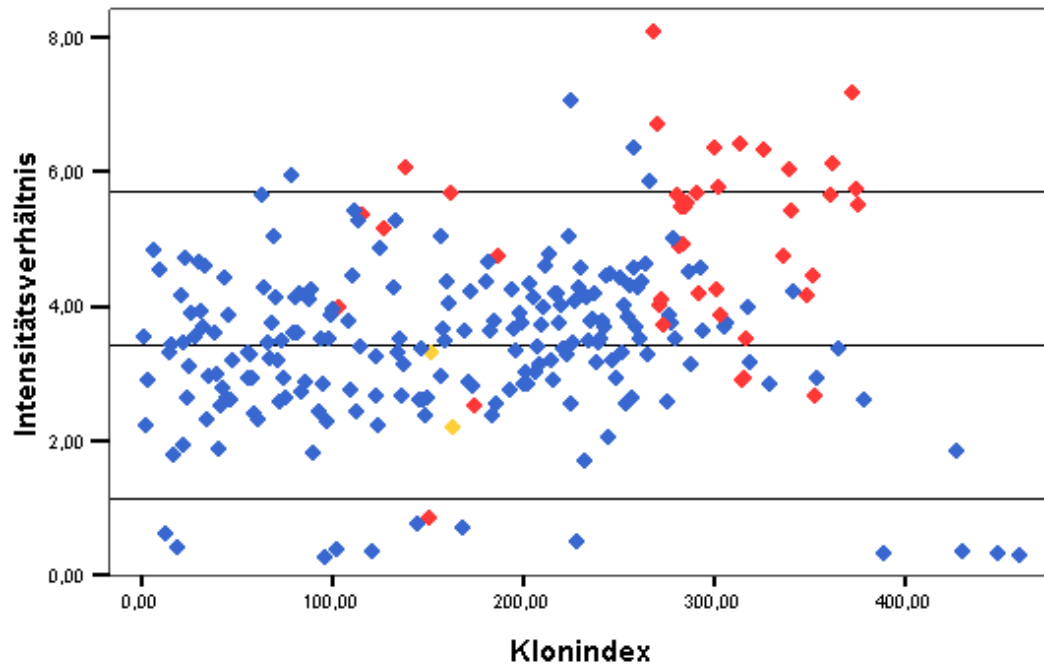


Abbildung 5.21: Cy3/Cy5-Intensitätsverhältnisse der gespotteten Sonden nach komparativer Hybridisierung von (49,XXXX) und (46,XX) auf Chip 1b (Experiment C1). Autosomale Sonden sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt, das mittlere Intensitätsverhältnis der autosomalen Klone (Spots) beträgt 3,42. Als Targets wurden Inter-Alu-PCR-Produkte von genomischer DNS verwendet.

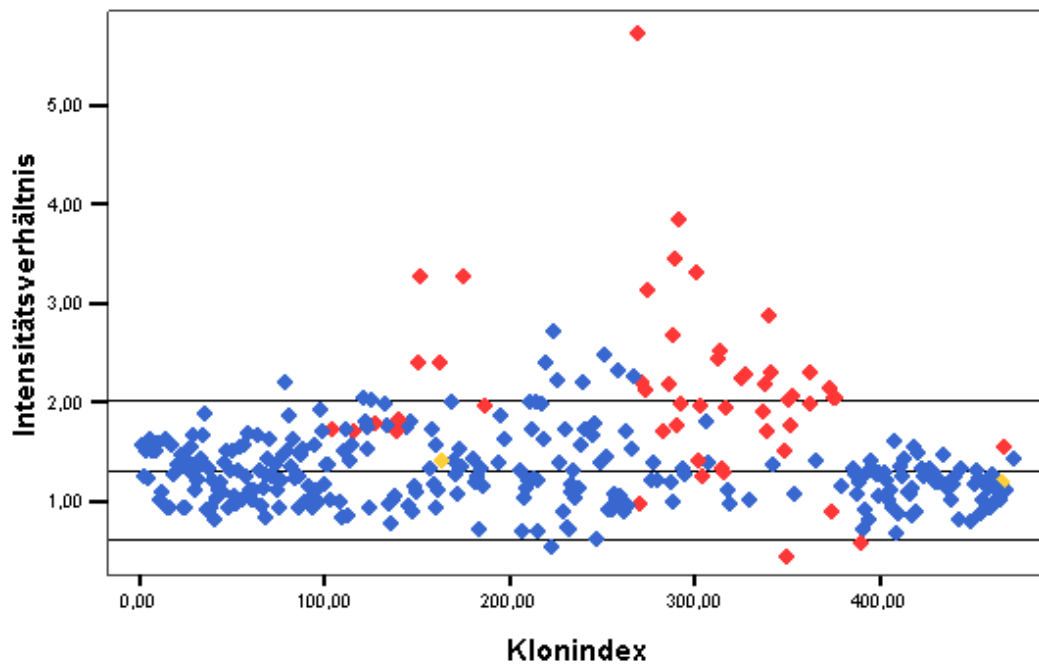


Abbildung 5.22: Cy3/Cy5-Intensitätsverhältnisse der gespotteten Sonden nach komparativer Hybridisierung von (49,XXXX) und (46,XX) auf Chip 1b (Experiment C2). Autosomale Sonden sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt, das mittlere Intensitätsverhältnis der autosomalen Klone (Spots) beträgt 1,31. Als Targets wurden Inter-Alu-PCR-Produkte von genomischer DNS verwendet.

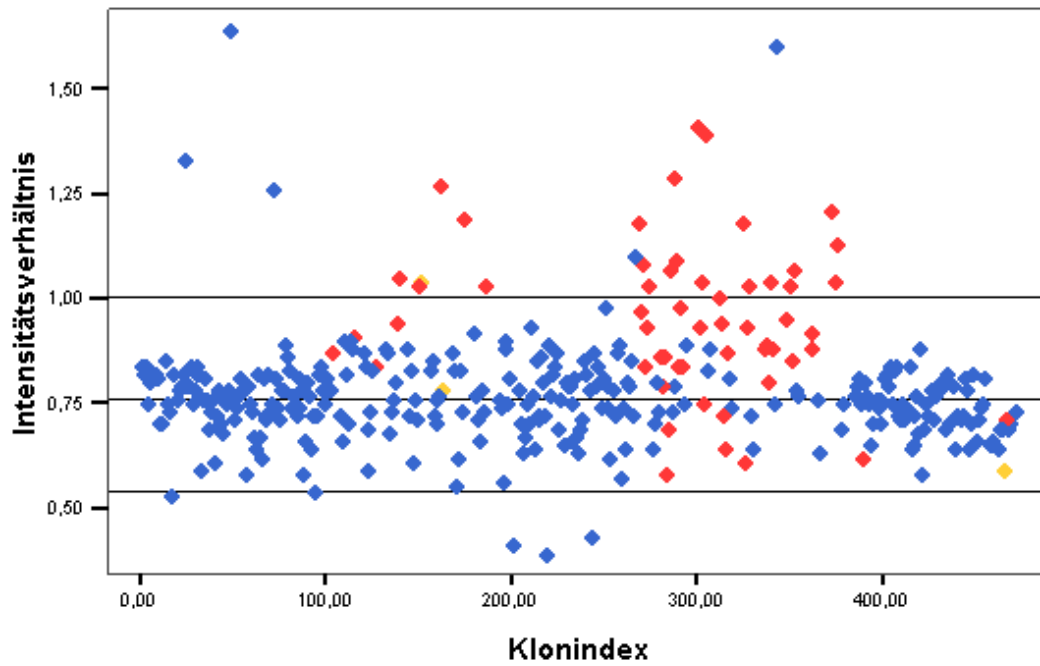


Abbildung 5.23: Cy3/Cy5-Intensitätsverhältnisse der gespotteten Sonden nach komparativer Hybridisierung von (49,XXXXX) und (46,XX) auf Chip 1b (Experiment C3). Autosomale Sonden sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt, das mittlere Intensitätsverhältnis der autosomalen Klone (Spots) beträgt 0,76. Als Targets wurden Inter-Alu-PCR-Produkte von genomischer DNS verwendet.

	Klonindex	Experiment							
		A1	A2	A3	A4	B1	C1	C2	C3
positive X-chromosomale Sonden	175	+	+	+	+	+	-	+	+
	187	+	-	-	+	+	-	-	+
	290	+	+	+	-	-	-	+	+
	291	+	-	+	+	+	+	-	-
	292	+	+	+	-	-	-	+	-
	303	+	+	+	+	-	+	-	+
	304	-	-	-	+	-	-	-	-
	305	+	+	+	-	+	-	-	+
	314	+	+	+	+	-	+	+	-
	341	+	+	-	+	+	-	-	-
X-chr. Sonde	267	+	+	+	+	+	+	+	+
falsch positive autosomale Sonden	49	-	-	+	-	-	-	-	+
	114	-	-	-	+	-	-	-	-
	123	+	-	-	-	-	-	-	-
	149	-	+	-	-	-	-	-	-
	170	+	-	-	-	-	-	-	-
	225	-	-	-	-	-	-	-	-
	228	-	-	+	-	-	-	-	-
	249	-	-	-	+	-	-	-	-
251	-	-	-	-	-	-	+	-	
X-und Y-Sonde	152	+	+	+	-	+	+	+	+
Y-chr. Sonde	164	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 5.6: Hybridisierungsverhalten zufällig ausgewählter Klone (Spots) in acht unabhängigen Chipexperimenten (A1-A4, B1, C1-C3). “ + “ bedeutet ein Intensitätsverhältnis oberhalb des Schwellenwertes, “ - “ ein Verhältnis unterhalb dieser Schwelle. Die positiven X-chromosomalen Klone zeigen in den einzelnen Experimenten überwiegend positive Verhältnisse, d. h. sie würden durchschnittlich in 5 von 8 Experimenten als positive klassifiziert. Die falsch positiven autosomalen Sonden liefern bis auf eine Ausnahme (Sonde 49) nur einmal ein Intensitätsverhältnis oberhalb des Grenzwertes. Bei Sonde 267 handelt es sich um eine X-chromosomale Sonde, die als autosomal notiert war, aber in allen Experimenten positiv erschien. Bei 164 handelt es sich um eine Y-chromosomale Sonde, deren Hybridisierungsverhalten nie positiv war. 152 ist eine Y-chromosomale Sonde aus der pseudoautosomalen Region, die folglich dasselbe Hybridisierungsmuster zeigt wie eine X-chromosomale Sonde.

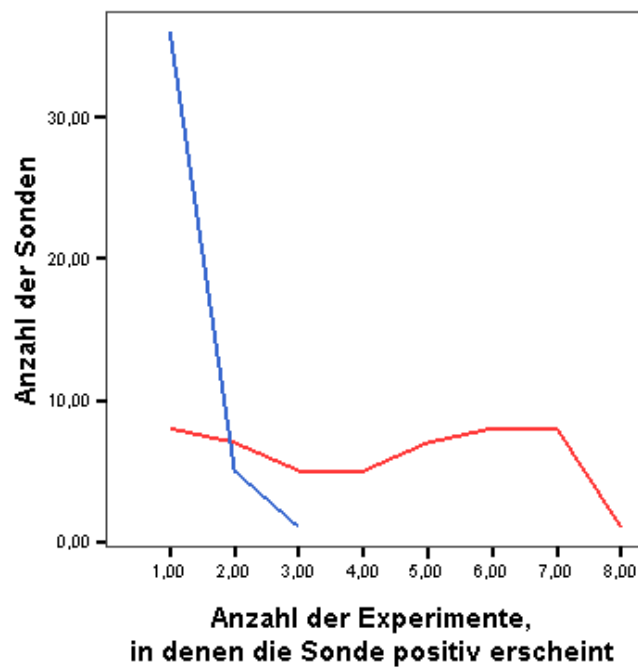


Abbildung 5.24: Anzahl aller Klone, die in einem und bis zu acht unabhängigen Experimenten ein Intensitätsverhältnis oberhalb des Schwellenwertes (für autosomale Klone) zeigten. Der blaue Graph repräsentiert autosomale Klone, der rote Graph X-chromosomale Klone.

Sonden, die in ihrem Fluoreszenzintensitätsverhältnis oberhalb des Grenzwertes lagen, wurden als positive Sonden (überrepräsentiert) registriert, autosomale Sonden oberhalb dieser Grenze sind falsch positive Sonden. In den Auswertungen wurde sich auf die Betrachtungen des oberen Grenzwertes und Abweichungen darüber beschränkt. In den Diagrammen lassen sich ebenfalls falsch negative Sonden unterhalb der Mittelwertes -2 Standardabweichungen erkennen, auf die hier nicht im Detail eingegangen wird. Y-Chromosom-spezifische Sonden wurden in gelb in den Diagrammen dargestellt und treten, wie erwartet, im unteren Bereich der Intensitätsverhältnisverteilung auf.

Tabelle 5.5 faßt die Ergebnisse zusammen. Neben der Anzahl der ausgewerteten Spots sind der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Intensitätsverhältnisse über die Autosomen, sowie die Anzahl der positiven X-chromosomalen und der falsch positiven autosomalen Sonden aufgeführt. Von den mindestens 74 X-chromosomalen Sonden auf dem Chip konnten durchschnittlich 50 Sonden pro Experiment ausgewertet werden. Ungefähr die Hälfte der analysierten X-chromosomalen Sonden zeigten ein Intensitätsverhältnis oberhalb der festgelegten Grenze, d. h. einen signifikant erhöhten Wert des Intensitätsverhältnis verglichen zu den autosomalen Sonden, und wurden korrekt als „überrepräsentiert“ klassifiziert. Von den autosomalen Sonden zeigten nur etwa 3% ein falsch positives Signal. Diese sind vermutlich durch Verschmutzungen auf dem Chip oder durch die große experimentelle Variabilität bei Chiphybridisierungsexperimenten verursacht worden.

Um die Reproduzierbarkeit der gemessenen Intensitätsverhältnisse zu testen, wurde das Hybridisierungsverhalten einer zufälligen Auswahl von Klonen in allen Experimenten verglichen. Es wurden 10 in mindestens einem Experiment positive X-chromosomale Sonden und 10 in einzelnen Experimenten falsch-positive autosomale Sonden ausgewählt. Tabelle 5.6 zeigt, daß die positiven X-chromosomalen Sonden in den meisten Experimenten richtig klassifiziert wurden. Durchschnittlich erzeugten diese Sonden in 5 von 8 Experimenten ein positives Signal oberhalb des festgelegten Schwellenwertes. Bei den falsch positiven wurde dagegen nur eine einzige Sonde, Klonindex 49, in 2 Experimenten falsch positiv detektiert. Die Sonde mit Klonindex 267 wurde in allen 8 Experimenten als falsch positiv registriert. Nachuntersuchungen ergaben, daß es sich dabei um eine X-chromosomale Sonde handelte, deren Herkunft falsch notiert wurde.

Um herauszufinden, wie verlässlich ein Klon richtige, bzw. falsch positive Signale liefert, wurde die Häufigkeit mit der ein X-chromosomaler bzw. ein autosomaler Klon oberhalb des Schwellenwertes liegt, ermittelt. In Abbildung 5.24 die Verteilung der autosomalen Sonden in blau, die der X-chromosomalen in rot dargestellt. Es fällt auf, daß die falsch positiven autosomalen Sonden bis auf wenige Ausnahmen nur in einem einzigen Experiment als positiv gewertet werden. Die X-chromosomalen Sonden erscheinen dagegen in mehreren Experimenten als positiv. Dies läßt den Schluß zu, daß es sich bei den falsch-positiven Signalen in der Regel um Artefakte handelte, während die Intensitätsverhältnisse der positiven

	Target DNS	Sonden	Anzahl der Sonden		durchschnittliches Fluoreszenz- verhältnis auf Autosomen±Stbw.	positive X- chrom. Sonden	falsch- positive autosomale Sonden
			X- chrom.	auto- somal			
D1	iA-Bal	iA+DOP	30	90	0,67±0,08	20(67%)	5(6%)
D2	iA-Bal	iA	24	90	0,72±0,12	16(67%)	3(4%)
D3	iA-Bal	+Bal	47	97	1,02±0,27	10(21%)	5(5%)
E1	iA+Bal	iA+DOP	21	83	0,65±0,07	13(62%)	4(5%)
E2	iA+Bal	iA	11	60	0,6±0,07	8(72%)	3(5%)
E3	iA+Bal	+Bal	32	86	1,11±0,34	4(13%)	3(3%)
F1	iA+DOP	iA+DOP	36	112	0,59±0,09	19(53%)	5(4%)
F2	iA+DOP	iA	11	70	0,69±0,1	6(55%)	3(4%)
F3	iA+DOP	+Bal	28	82	2,28±0,78	4(14%)	5(1%)

Tabelle 5.7: Komparative Hybridisierung unterschiedlich generierter Targets weiblicher (46,XX) Cy3-markierter DNS und männlicher (46,XY) Cy5-markierter DNS zum Vergleich auf verschieden generierten Sonden.

Sonden reproduzierbar war.

5.3.2 Komparative Hybridisierung weiblicher und männlicher gesamt-genomischer DNS

Während es in den bisher beschriebenen Experimenten möglich war, ein Dosisverhältnis von 5 : 1 (A1, A2, A3, A4), 4 : 1 (B1) und sogar 4 : 2 (C1, C2, C3) zu detektieren, gelang es noch nicht, bei einer komparativen Hybridisierung männlicher und weiblicher DNS-Targets das Verhältnis 2 : 1 auf den X-chromosomalen Sonden aufzulösen. Um die Empfindlichkeit der Matrix-CGH zu steigern und ein Auflösungsvermögen von 2 : 1 zu erreichen, wurden einige Veränderungen am Versuchsablauf vorgenommen. Statt der zuvor verwendeten modifizierten Objektträger von Perkin-Elmer wurden Objektträger von Corning verwendet. Die Corning-Objektträger besitzen eine sehr gleichmäßige (Gamma-Amino-Propyl-Silan-) Beschichtung von hoher Qualität, die zu gleichmäßiger Bindung der Sonden mit optimaler Morphologie an die Oberfläche und geringer Hintergrundfluoreszenz auf dem gesamten Objektträger führt. Dadurch konnte der Hintergrund, der durch unspezifische Anfärbung verursacht wurde, verringert und damit das Signal-Hintergrund-Verhältnis in allen Experimenten und über den gesamten Objektträger verbessert werden.

Als Sonden wurden wie in den Experimenten zuvor (Kapitel 5.3.1) 146 autosomale und 46 X-chromosomalen YACs verwendet, sowie 6 zusätzliche YAC-Sonden von Chromosom 21, telomerische PACs und Cosmide der Chromosomen 21, X und Y.

Diese **Sonden** wurden auf drei verschiedene Arten generiert:

- Amplifikation durch Inter-Alu-PCR mit NH₂-modifizierten Primern (iA)

- DOP-PCR Amplifikation mit NH₂-modifizierten DOP-Primern ausgehend von Inter-Alu-PCR-Produkten (iA+DOP). Die DOP-PCR entfernt die meisten Alu-Sequenzen von den Proben, verringert allerdings auch die Komplexität
- Exonuklease-verdaute Inter-Alu-PCR-Produkte (+Bal)

Von jeder Sonde wurden jeweils 3 identische Spots auf den Chip aufgetragen. Die Auswertung mehrerer Spots pro Klon in einem Hybridisierungsexperiment verringert die Variabilität von Experiment zu Experiment.

Es wurde jeweils Cy3-markierte weibliche genomische DNS mit Cy5-markierter männlicher DNS komparativ hybridisiert. Zur Auswertung wurden nur die Sonden berücksichtigt, die auf allen drei Spots eine Hybridisierung zeigten, womit durch Verunreinigungen (Fluoreszenzpartikel) bedingte falsch positive Signale weitgehend aussortiert werden konnten. Die Auswertung der Fluoreszenzverhältnisse wurde dann mit dem Mittelwert der Werte der drei Sonden weiterverfolgt.

Die **Targets** wurden ebenfalls variiert:

- Inter-Alu-PCR-amplifizierte Targets (unverdaute Enden) (ia-Bal) (D1, D2, D3)
- Inter-Alu-amplifizierte Targets, bei denen die Alu-Enden durch Exonuklease (Bal31) abverdaut wurden (iA+Bal) (E1, E2, E3)
- DOP-PCR-Produkte genomischer Inter-Alu-Produkt (ia+DOP) (F1, F2, F3). Die DOP-PCR von Inter-Alu-PCR-Produkten verringert zwar die Komplexität des Targets, entfernt aber die meisten Alu-Enden, die nicht mitamplifiziert werden.

Es war in diesen Experimenten erstmals möglich, durch komparative Hybridisierung männlicher und weiblicher DNS Intensitätsunterschiede zwischen autosomalen und X-chromosomalen Sonden festzustellen. In Tabelle 5.7 sind die Ergebnisse der einzelnen Hybridisierungen auf den verschiedenen Spots aufgeführt.

Die Hybridisierung von unverdauten (Experimente D1, D2, D3) und verdauten (Experimente E1, E2, E3) Inter-Alu-Targets auf den iA+DOP- und iA-Sonden lieferte vergleichbare Ergebnisse. Bei Hybridisierung mit den unverdauten Targets konnten von den X-chromosomalen Sonden 67% der iA-DOP-Sonden (D1, siehe Abbildung 5.25) und der gleiche Prozentsatz der iA-Sonden (D2, siehe Abbildung 5.26) richtig positiv detektiert werden. Bei Hybridisierung der verdauten Targets lagen 62% der iA-DOP- (E1, siehe Abbildung 5.28) und 72% der iA-X-chromosomalen Sonden (E2, siehe Abbildung 5.29) oberhalb des Grenzwertes. Der Bal31-Verdau der genomischen Targets scheint also nicht ausreichend, um Alu-Enden von den Inter-Alu-PCR-amplifizierten Sequenzen zu entfernen und die unspezifische Hybridisierung zu verringern. Betrachtet man die Diagramme

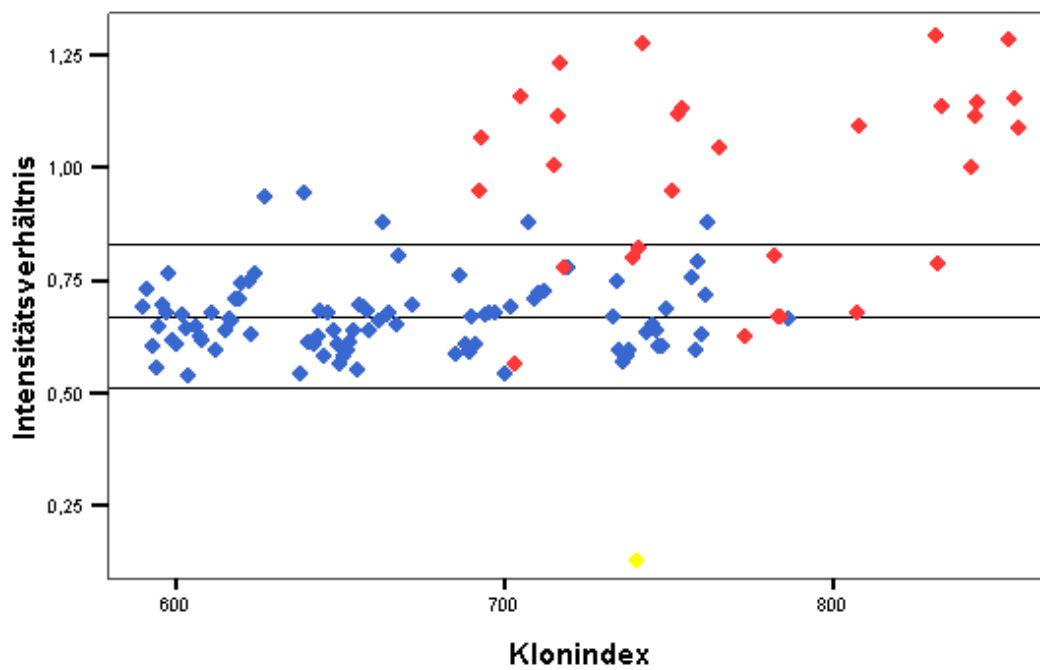


Abbildung 5.25: Experiment D1: Komparative Hybridisierung weiblicher (46,XX) und männlicher (46,XY) iA-DNS Targets auf Inter-Alu-DOP-PCR-Sonden amplifizierte Sonden. Autosomale Klone sind blau, Y- chromosomale gelb und X-chromosomale rot dargestellt.

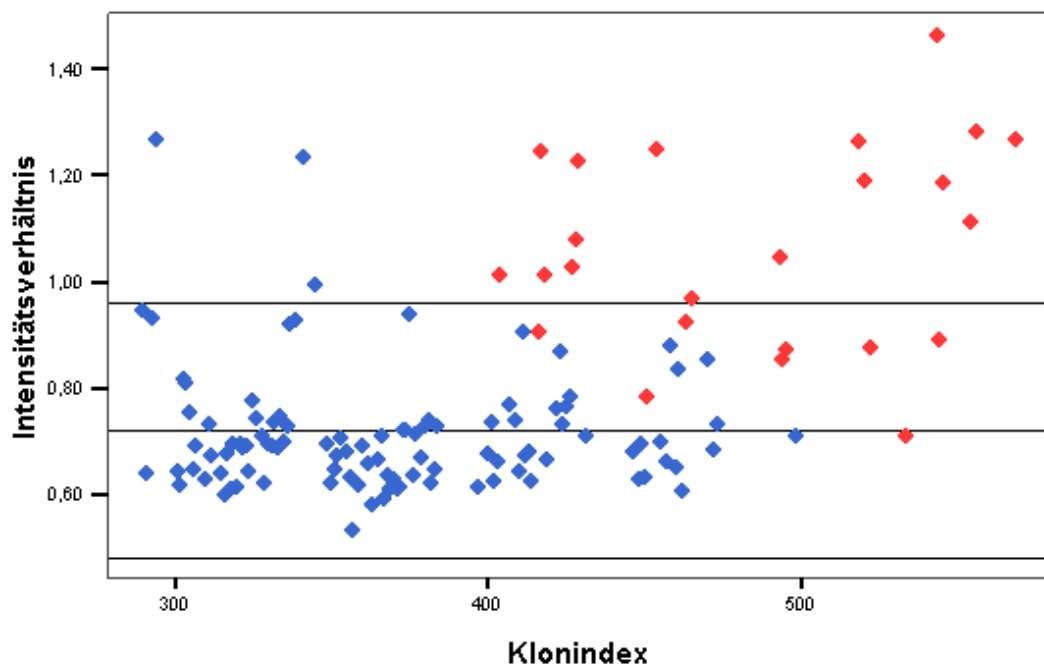


Abbildung 5.26: Experiment D2: Komparative Hybridisierung weiblicher (46,XX) und männlicher (46,XY) iA-DNS Targets auf Inter-Alu-PCR-Sonden. Autosomale Klone sind blau, Y- chromosomale gelb und X-chromosomale rot dargestellt.

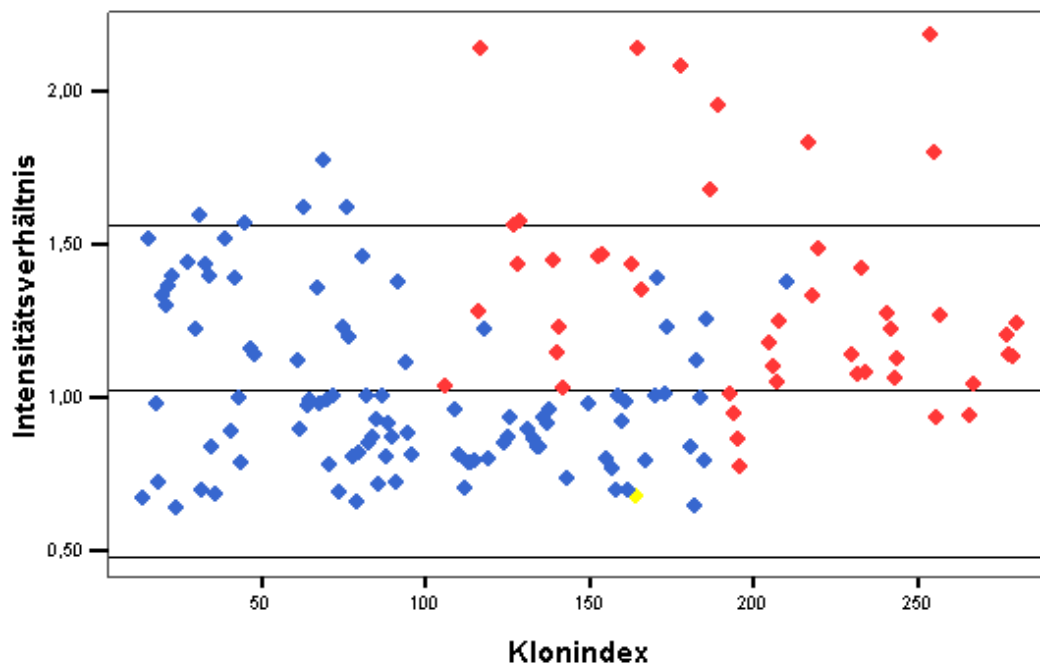


Abbildung 5.27: Experiment D3: Komparative Hybridisierung weiblicher (46,XX) und männlicher (46,XY) iA-DNS (nicht Bal31-verdaut) Targets auf Bal31-verdauten Inter-Alu-PCR-Sonden. Autosomale Klone sind blau, Y-chromosomale gelb und X-chromosomale rot dargestellt.

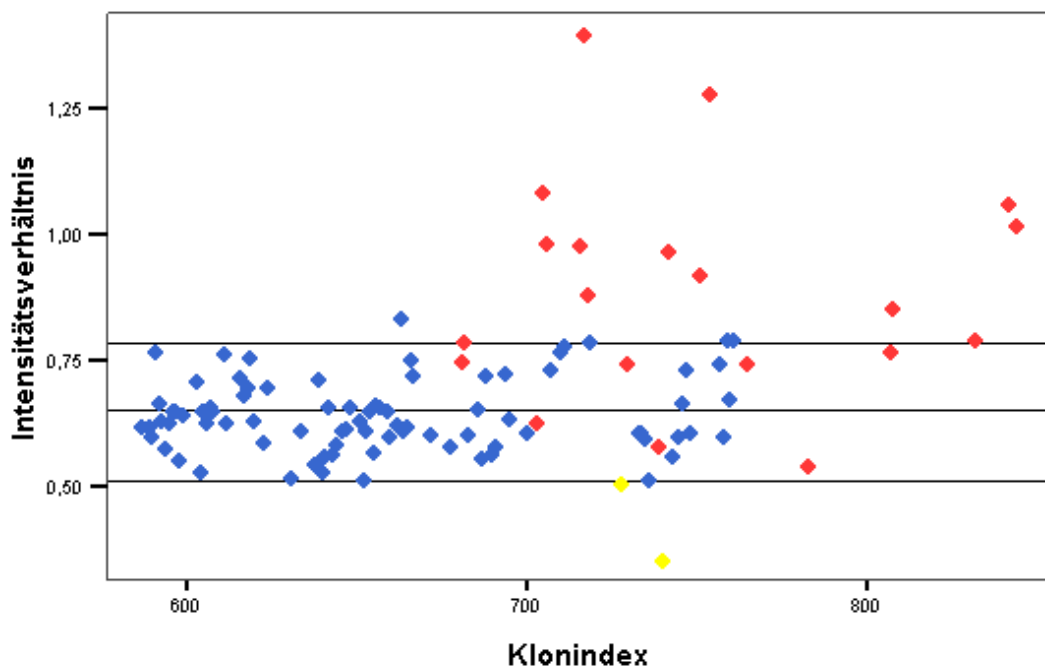


Abbildung 5.28: Experiment E1: Komparative Hybridisierung weiblicher (46,XX) und männlicher (46,XY) Bal31-verdauter iA-DNS Targets auf nicht verdauten Inter-Alu-DOP-PCR-Sonden. Autosomale Klone sind blau, Y- chromosomale gelb und X-chromosomale rot dargestellt.

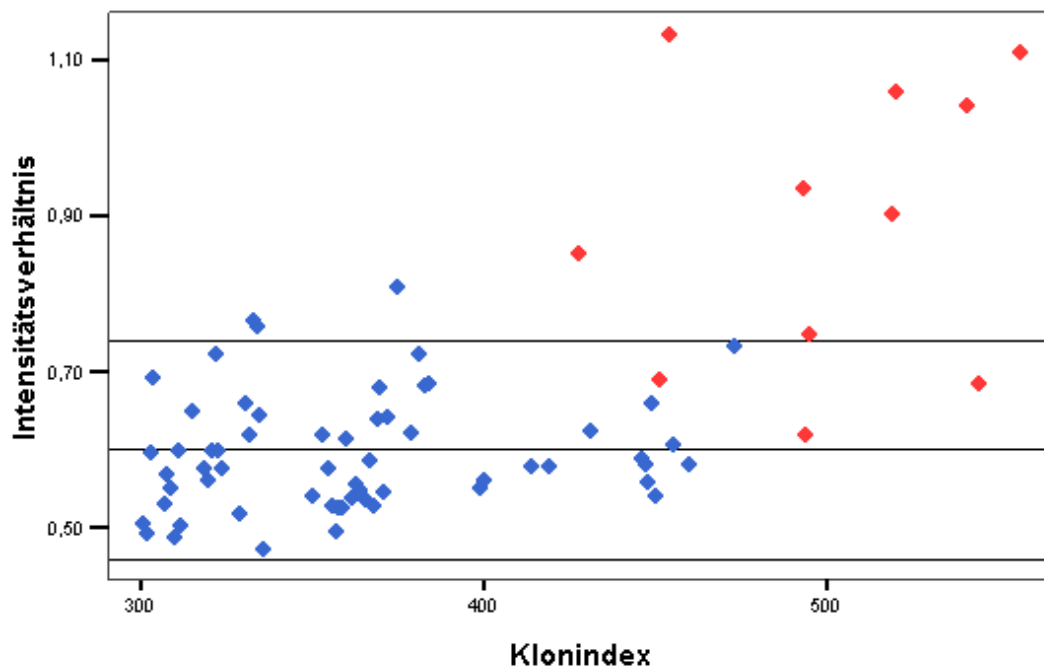


Abbildung 5.29: Experiment E2: Komparative Hybridisierung weiblicher (46,XX) und männlicher (46,XY) Bal31-verdauter iA-DNS-Targets auf Inter-Alu-PCR-Sonden. Autosomale Klone sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt.

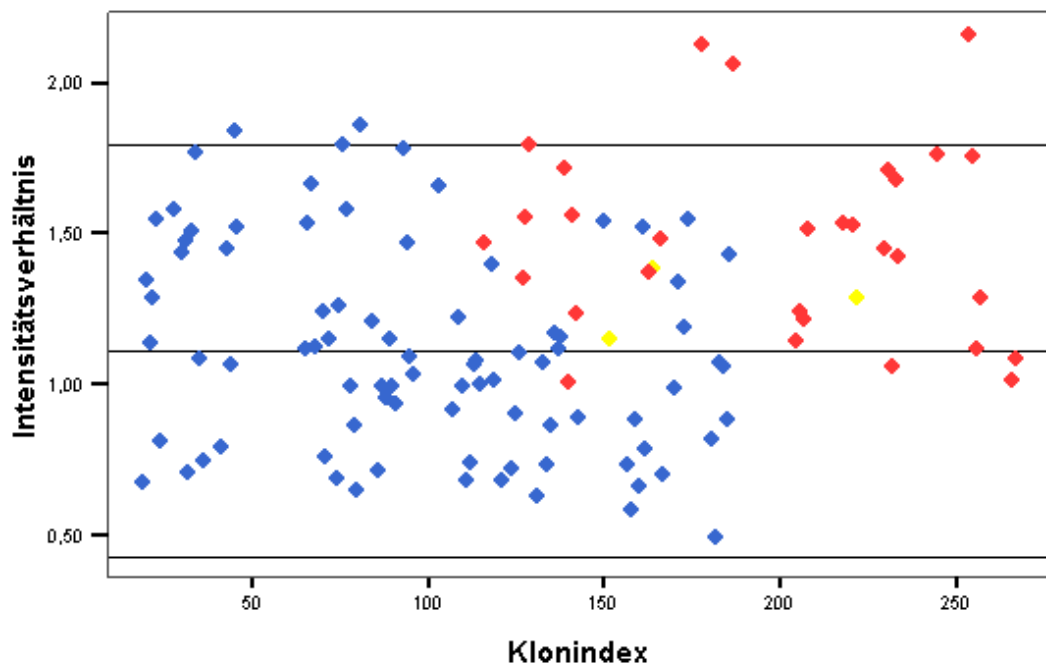


Abbildung 5.30: Experiment E3: Komparative Hybridisierung weiblicher (46,XX) und männlicher (46,XY) Bal31-verdauter iA-DNS-Targets auf Bal31-verdauten Inter-Alu-PCR-Sonden. Autosomale Klone sind blau, Y- chromosomale gelb und X-chromosomale rot dargestellt.

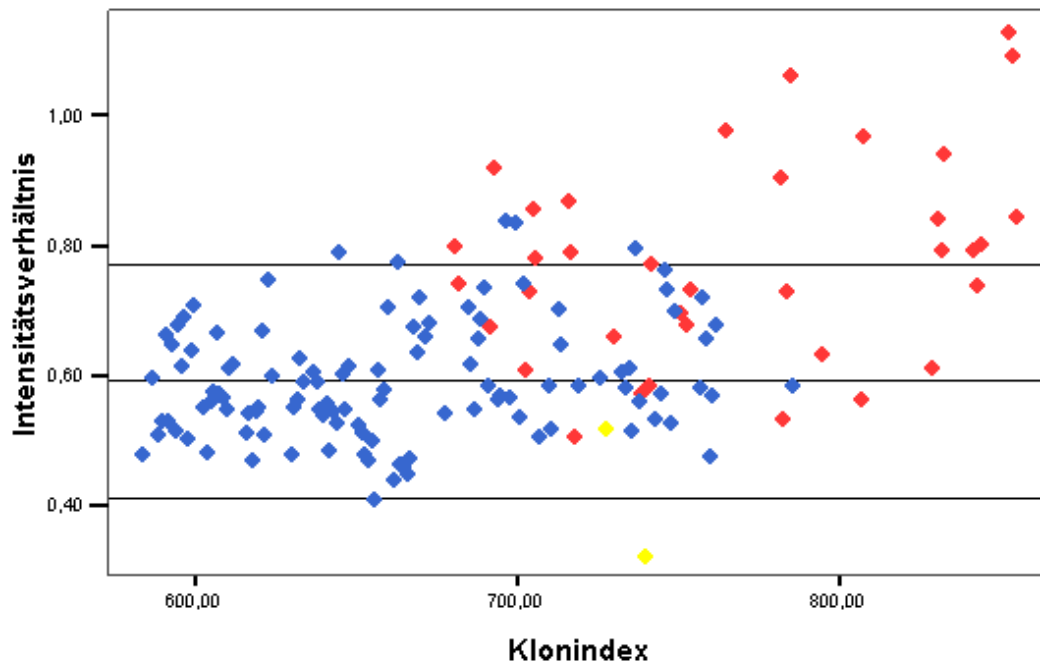


Abbildung 5.31: Experiment F1: Komparative Hybridisierung weiblicher (46,XX) und männlicher (46,XY) Inter-Alu-DOP-DNS Targets auf Inter-Alu-DOP-amplifizierte Sonden. Autosomale Klone sind blau, Y- chromosomale gelb und X-chromosomale rot dargestellt.

der Intensitätsverhältnisse bei Hybridisierung auf verdauten Sonden der Experimente D3 und E3 (siehe Abbildungen 5.27 und 5.30), so läßt sich erkennen, daß sich die autosomalen und X-chromosomalen Sonden kaum unterscheiden. Nur 21% bzw. 13% der X-chromosomalen Sonden konnten im Experiment mit unverdauten (D3) und Bal31-verdauten Targets (E3) als positiv registriert werden. In allen Fällen zeigten ca. 5% der autosomalen Sonden ein falsch positives Signal.

Die Unterschiede bei Verwendung verdauter oder unverdauter Sonden sowie Inter-Alu- oder Inter-Alu-DOP-PCR-Produkte als Hybridisierungstarget führten zu keinen signifikanten Veränderung der Anzahl positiver oder falsch-positiver Sonden. In den Experimenten mit Exonuklease-verdautem Target (D3, E3) konnte man feststellen, daß die Anzahl positiver X-chromosomaler Signale stark zurückging. Außerdem konnte man dort insgesamt einen leichten Rückgang auswertbarer Sonden beobachten. Wahrscheinlich wird durch den Bal31-Verdau die Spezifität der Sonden-DNS so stark verringert, daß keine effiziente Hybridisierung zwischen Target und Sonde mehr möglich ist.

Nachdem bei Hybridisierung auf DOP-PCR amplifizierte Inter-Alu-PCR-Sonden eine Diskriminierung männlicher und weiblicher Targets möglich war, wurde in einem weiteren Experiment die iA-Target-DNS durch ein DOP-PCR am-

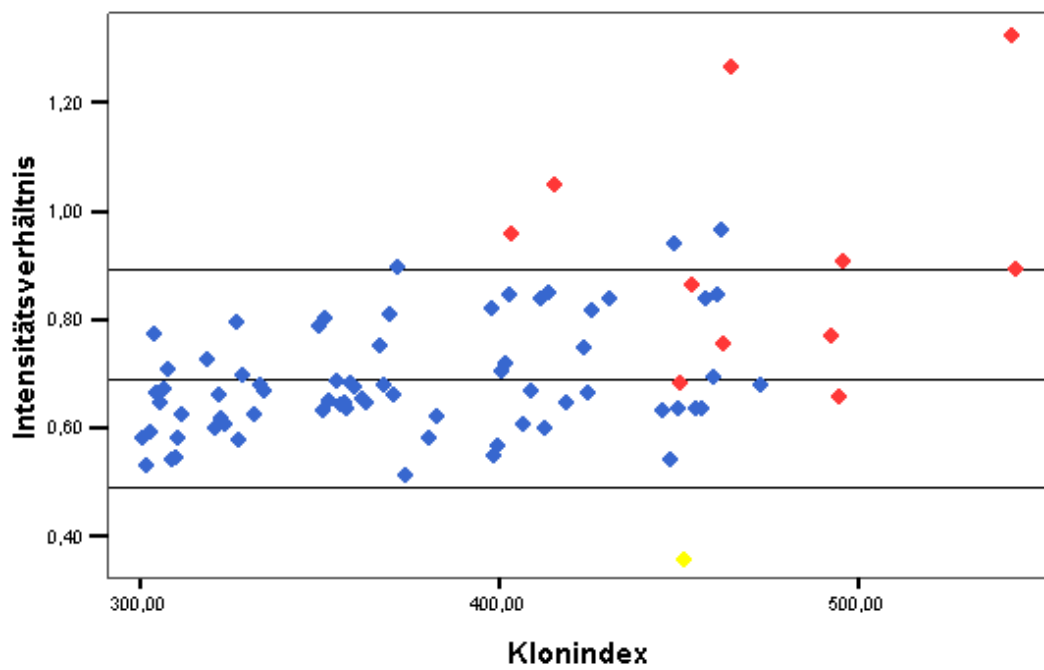


Abbildung 5.32: Experiment F2: Komparative Hybridisierung weiblicher (46,XX) und männlicher (46,XY) Inter-Alu-DOP-DNS Targets auf Inter-Alu-PCR-Sonden. Autosomale Klone sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt.

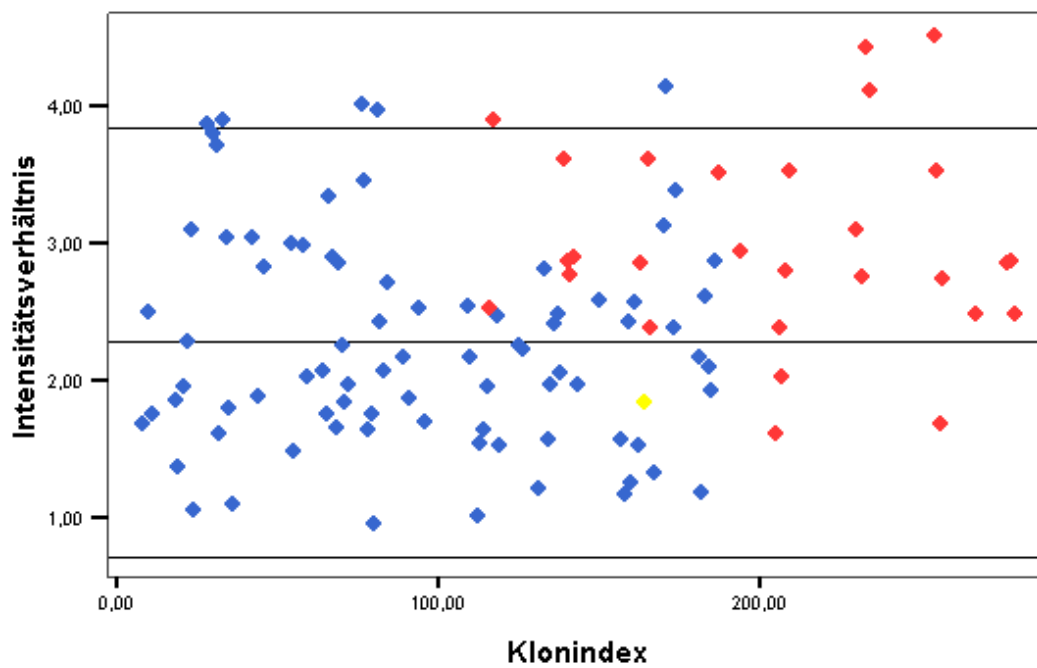


Abbildung 5.33: Experiment F3: Komparative Hybridisierung weiblicher (46,XX) und männlicher (46,XY) Inter-Alu-DOP-DNS Targets auf Bal31-verdauten Inter-Alu-PCR-Sonden. Autosomale Klone sind blau, Y- chromosomale gelb und X- chromosomale rot dargestellt.

plifiziertes iA-Produkt ersetzt (iA+DOP). Durch den zusätzlichen DOP-PCR-Schritt in der Amplifikation des Targets sollten die Alu-Sequenzen, die aufgrund der Inter-Alu-PCR in Proben und Target angereichert werden, entfernt werden. Nachteilig wirkt sich aus, daß man die Komplexität des Targets nochmals reduziert. Da die DOP-PCR im Gegensatz zur Inter-Alu-PCR keine definierten, sondern relativ zufällig ausgewählte DNS-Sequenzen amplifiziert, ist nach DOP-PCR von Sonde und/oder Target nicht mehr gewährleistet, daß Sonden- und Targetsequenzen 100%ig komplementär zueinander sind. Die Hybridisierungsergebnisse mit DOP-PCR-Produkten von Inter-Alu-PCR-Sequenzen sind in Tabelle 5.7 als Experimente F1, F2, F3 aufgelistet. In den CGH-Experimenten konnten sowohl auf iA-Sonden (siehe Abbildung 5.31) als auch auf iA-DOP-Sonden (siehe Abbildung 5.32) ca. 50% der X-chromosomalen Sonden mit einem positiven Signal registriert werden. Wie in den Experimenten zuvor waren auch hier kaum Unterschiede zwischen Bal31-verdauten autosomalen und X-chromosomalen Sonden zu sehen (siehe Abbildung 5.33). Insgesamt waren nur 14% der X-chromosomalen Klone positiv, und 1% der autosomalen Sonden falsch positiv. Aus der abnehmenden Anzahl der positiven X-chromosomalen Sonden im Experiment F verglichen mit den Experimenten D und E kann man schließen, daß ein iA-DOP-Target zu keiner Verbesserung des CGH-Experimentes, sondern zu einem leichten Rückgang der positiven Sonden führt.

Abschließende Experimente, die mit reinem DOP-PCR Produkt aus genomischer DNS als Target durchgeführt wurden, zeigten keine Dosisunterschiede zwischen autosomalen und X-chromosomalen Signalen. Diese Versuche wurden hier nicht weiter ausgeführt. Wahrscheinliche Ursache ist die zu geringe Komplementarität zwischen Sonde und Target nach zufälliger (DOP)-PCR Amplifikation.

Die Y-chromosomalen Sonden zeigten in den Experimenten D1, E1, F1 und F2 (siehe Abbildungen 5.25, 5.28, 5.31, 5.32) in den meisten Fällen Intensitätsverhältnisse unterhalb des durchschnittlichen Wertes. In einigen Experimenten waren die Y-chromosomalen Klone nicht auswertbar. Höchstwahrscheinlich war im Cy3-Kanal (Markierung der weiblichen DNS) die gemessene Fluoreszenzintensität zu gering, um in die Auswertung miteinbezogen zu werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß es durch die Verwendung der Corning-Objektträger möglich war, Dosisunterschiede von 2 : 1 festzustellen. Die Hintergrundfluoreszenz war minimal und die Bindung der Sonden auf dem Chip sehr gut. Bei der Verwendung von DOP-PCR-Produkten von Inter-Alu-PCR-Produkten (D1, E1) und Inter-Alu-PCR-Produkten (D2, E2) als Sonden wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ein Exonukleaseverdau der Sequenzenden verschlechterte das Ergebnis: X-chromosomale und autosomale Sonden zeigten keine signifikanten Unterschiede bei komparativer Hybridisierung der männlichen und weiblichen genomischen DNS (D3, E3). Insgesamt ist die Anzahl der auswertbaren Sonden nach Hybridisierung mit unverdauter Target-DNS (Inter-Alu-PCR-Produkt) (D1, D2, D3) höher als nach einer Hybridisierung mit Bal31-verdauter Inter-Alu-DNS. Der Verlust der SONDENSIGNALE kann daran liegen, daß manche

Targetsequenzen nach dem Verdau nicht mehr vorhanden waren. Da es ohne Exonukleaseverdau des Targets keinen wesentlichen Anstieg falsch-positiver Signale gibt, kann man davon ausgehen, daß repetitive Sequenzen, die durch einen Exonukleaseverdau entfernt werden, im Hybridisierungsexperiment nicht stören und wahrscheinlich schon durch den Kompetitor effizient unterdrückt werden.

5.4 SKY und CGH zur Unterscheidung väterlicher und mütterlicher Chromosomen bei Maushybriden

Die F1-Hybride zwischen Labormaus *M. musculus* (MMU) und der Wildmaus *M. spretus* (MSP) werden häufig für genetische Studien benutzt. Durch einfache DAPI-Färbung lassen sich die Chromosomen der Eltern aufgrund unterschiedlicher Markierung der Zentromere unterscheiden. Während die von der Mutter (MMU) stammenden Chromosomen ein stark fluoreszierendes Signal am Zentromer zeigen, ist auf den homologen väterlichen (MSP) Chromosomen ein solches Signal nicht zu sehen. Die starke Fluoreszenz der MMU-Zentromere beruht auf einer spezifischen Klasse von AT-reichem Heterochromatin (major satellite-DNA), an das DAPI bevorzugt bindet. Heterochromatische Regionen enthalten keine kodierenden DNS-Sequenzen (Gene) und können sich im Lauf der Evolution sehr rasch ändern. Man nimmt an, daß Satelliten-DNSn strukturelle Aufgaben haben, z. B. bei der Ausbildung des Zentromers für die Chromosomensegregation. Diese AT-reiche Satelliten-DNS ist in den Zentromeren der MSP-Chromosomen nicht oder nur in geringer Menge vorhanden. Die Unterschiede in Sequenz und Kopienzahl von hochrepetitiven Satelliten-DNS-Sequenzen in den Zentromerregionen (MATSUDA UND CHAPMAN [100]) lassen sich durch komparative Hybridisierung von genomischen DNSn beider Elternteile zytologisch eindrucksvoll darstellen. Hybridisiert man FITC-markierte MMU-DNS zusammen mit Cy5-markierter MSP-DNS gleichzeitig auf Chromosomen der F1 Hybride, sind die Chromosomen der beiden Mausspezies im Mikroskopbild leicht zu unterscheiden. Während die MMU Zentromere fast ausschließlich ein leuchtendes FITC Signal zeigen, erkennt man auf den MSP Zentromeren eine fast reine Cy5-Fluoreszenz. Im Gegensatz zu den Zentromeren zeigen die euchromatischen Chromosomenarme keine erkennbaren Unterschiede der Hybridisierungssignale. Das Euchromatin enthält neben repetitiven und regulatorischen Sequenzen die Protein-kodierenden Gene und unterliegt bei Sequenzveränderungen einem starken evolutionären Druck, der den Status quo bevorzugt. Diese unterschiedliche Zentromerfärbung der Zentromere wurde in allen nachfolgenden Experimenten als interne Kontrolle benutzt, um die elterliche Herkunft der einzelnen Chromosomen eindeutig zu bestimmen. Abbildung 5.34 zeigt ein Falschfarbenbild zweier Metaphasen eines MMU x MSP Maushybrids nach einer komparativen Hybridisierung mit FITC-markierter ge-

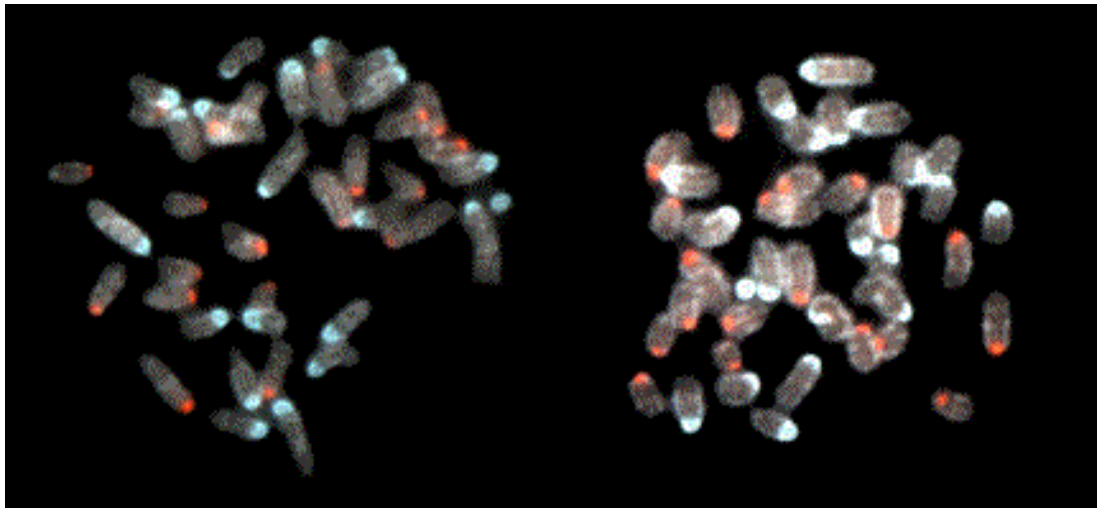


Abbildung 5.34: Das Falschfarbenbild zeigt zwei Metaphasen eines MMU x MSP Maushybrids nach komparativer Hybridisierung mit väterlicher und mütterlicher DNS. Die Chromosomen von *M. musculus* erkennt man an den hell gefärbten Zentromeren (FITC-Fluoreszenz), die von *M. spretus* an den roten Zentromeren (Cy5). An den Chromosomenarmen sind mit dem Auge keine offensichtlichen Hybridisierungsunterschiede zu sehen.

nomischer MMU- und Cy5-markierter genomischer MSP-DNS.

Die Sequenzunterschiede zwischen den beiden Mausspezies MMU und MSP beschränken sich nicht auf die zentromerische Satelliten-DNS, sondern sind in einem geringeren Maße auch im restlichen Genom vorhanden. Man nimmt an, daß sich die euchromatischen Sequenzen von MMU und MSP um etwa 1% unterscheiden. Zum Vergleich, verschiedene Individuen innerhalb einer Spezies unterscheiden sich in etwa um 1 Promille (Prinzip der genetischen Variabilität). D. h. die Maushybride sind ein gutes Modell, um experimentelle Bedingungen zu entwickeln, die es letztendlich ermöglichen, homologe Chromosomen innerhalb einer Spezies aufgrund von Sequenzunterschieden zu diskriminieren. Um Hybridisierungsunterschiede in euchromatischen Chromosomenarmen beider Spezies nachzuweisen, wurde die CGH-Fluoreszenz mit SKY ausgewertet. Dazu wurden auf jedem Chromosom je 2 Punkte mit einer Größe von 3 x 3 Pixel ausgewählt, insgesamt also 18 Bildpixel, über die gemittelt wurde. Stichproben bestätigten, daß diese 2 ausgewählten Punkte die Intensitätsverteilung entlang des gesamten Chromosoms angemessen repräsentieren.

Die mit dem SpectraCube aufgenommenen Bilder beinhalten die Information des gesamten Spektrums, d. h. die von der Wellenlänge abhängige Intensitätsverteilung in jedem einzelnen Bildpixel. Um die Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlich markierten Sonden zu messen, wurde das Spektrum über die für die Emissionen Cy3 bzw. Cy5 spezifischen (nicht überlappenden) Wellenlängenbereiche integriert. Das Hybridisierungssignal der MMU-DNS wurde durch Integration

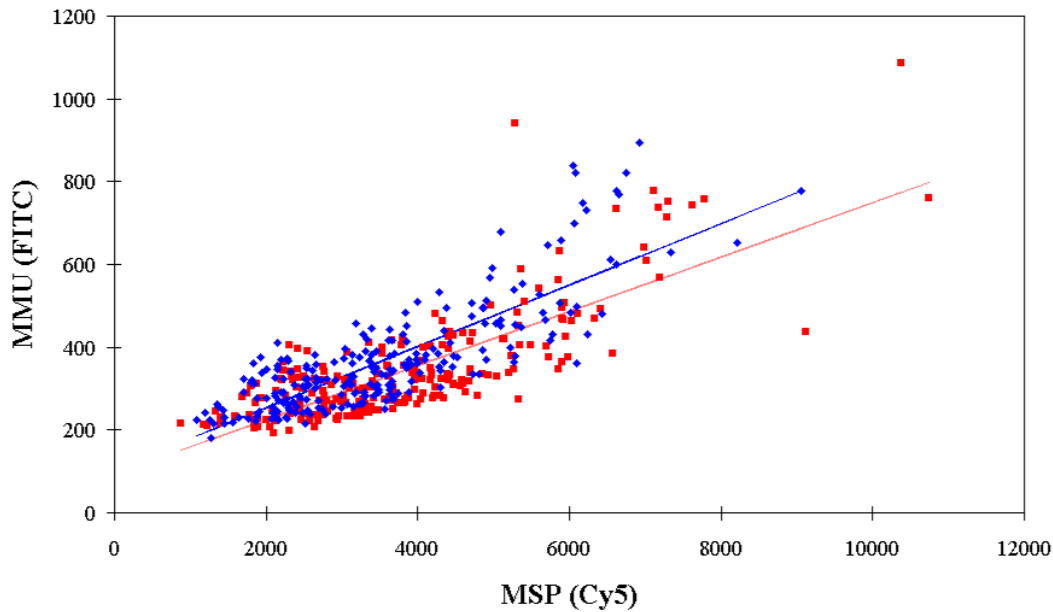


Abbildung 5.35: Experiment 1: Vergleichende Hybridisierung FITC-markierter genomischer MMU-DNS und Cy5-markierter genomischer MSP-DNS auf Metaphasen eines MMU x MSP Maushybrids. Die blauen Rauten markieren MMU Chromosomen, die roten Quadrate MSP Chromosomen. Die farbigen Linien beschreiben die dazugehörigen Regressionsgeraden für die Verteilung der Intensitätsverhältnisse auf MMU- und MSP-Chromosomen.

der Fluoreszenz im Bereich der FITC-Emission von 481 nm bis 618 nm bestimmt, die MSP-spezifische Fluoreszenz durch Integration der Fluoreszenz im Bereich der Cy5 Emission von 628 nm bis 741 nm. In einem Experiment wurde MMU-DNS mit Cy3 und MSP-DNS mit FITC markiert. Die Integration erfolgte hier über die Bereiche von 661 nm bis 794 nm für Cy3 und 493 nm bis 579 nm für FITC.

In jedem Experiment wurden aus 10 bis 20 Metaphasen jeweils mindestens 10 MMU und 10 MSP Chromosomen ausgewertet. Die Anzahl der analysierbaren Chromosomen war dadurch begrenzt, daß nur Chromosomen ohne Überlagerungen ausgewertet werden konnten und die limitierte Bildgröße oft nur den Ausschnitt einer Metaphase zeigt. Alle komparativen Hybridisierungen wurden grafisch dargestellt, wobei jedes einzelne Chromosom durch einen Punkt im Diagramm abgebildet wurde (siehe Abbildungen 5.35 bis 5.38). In den Diagrammen sind die absoluten Intensitäten der Fluoreszenzfarben auf den Chromosomen aufgetragen, der väterlichen Sonde auf der X-Achse und der mütterlichen Sonde auf der Y-Achse.

In Abbildung 5.35 ist die komparative Hybridisierung FITC-markierter gesamtgenomischer MMU-DNS und Cy5-markierter gesamtgenomischer MSP-DNS aufgetragen. Jedes Chromosom erhält seine Position im XY-Diagramm aufgrund

Spezies (Markierung)	N	MW	Stdbw	Standard- fehler	t-Test	Mit Diskriminanzanalyse bestimmte Herkunft	
Experiment 1						MMU (FITC)	MSP(Cy5)
MMU (FITC)	241	0,111	0,029	0,002	P<0,001	51,5%	48,5%
MSP (Cy5)	235	0,097	0,029	0,002		28,9%	71,1%
Experiment 2						MMU (Cy3)	MSP(FITC)
MMU (Cy3)	128	1,259	0,157	0,014	P<0,001	66,4%	33,6%
MSP(FITC)	137	1,103	0,176	0,015		25,5%	74,5%
Experiment 3						MMU (FITC)	MSP(Cy3)
MMU (FITC)	112	0,726	0,087	0,008	P<0,001	72,3%	27,7%
MSP(Cy3)	118	0,611	0,082	0,008		21,2%	78,8%
Experiment 4						MMU (FITC)	MSP(Cy3)
MMU (FITC)	143	0,3	0,072	0,072	P>0,1	46,2%	53,8%
MSP(Cy3)	149	0,292	0,067	0,067		37,6%	62,4%

Tabelle 5.8: t-Test und Diskriminanzanalyse der Fluoreszenzverhältnisse auf den Chromosomenarmen nach komparativer Hybridisierung mit gesamt-genomischer DNS (Experimente 1 und 2), C₀t-1 DNS (Experiment 3) und inter-B1-PCR-Produkten (Experiment 4). N bezeichnet die Anzahl der analysierten Chromosomen, MW den Mittelwert der Fluoreszenzverhältnisse, Stabw. die Standardabweichung, Standardfehler den Standardfehler des Mittelwertes. Die Diskriminanzanalyse wurde benutzt, um die Chromosomen aufgrund ihrer Fluoreszenzverhältnisse einem Elternteil zuzuordnen. Die Zuordnung der Chromosomen wird in Prozent angezeigt. Der Prozentsatz korrekt identifizierter Chromosomen ist fett gedruckt.

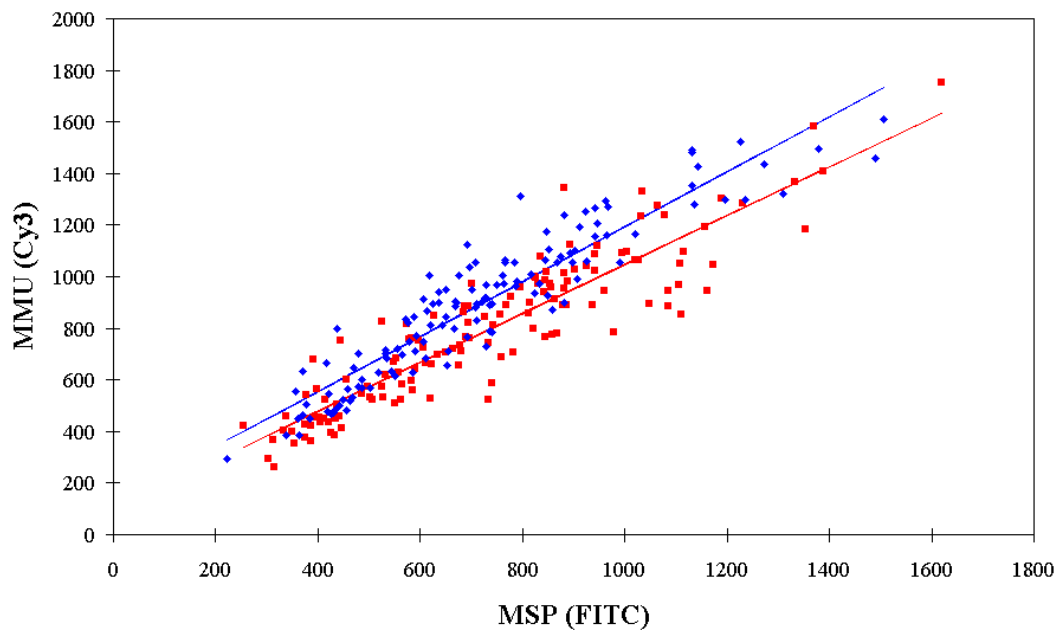


Abbildung 5.36: Experiment 2: Vergleichende Hybridisierung Cy3-markierter genomischer MMU-DNS und FITC-markierter genomischer MSP-DNS. Die MMU Chromosomen sind als blaue, die MSP-Chromosomen als rote Punkte mit den jeweils entsprechenden Regressionsgeraden dargestellt.

der Hybridisierungsintensität der beiden Sonden. Die MSP-Chromosomen sind als rote Punkte dargestellt, die MMU-Chromosomen als blaue Punkte. Da man von einer zufälligen Hybridisierung der maternalen und paternalen Sonde ausgehen kann, läßt sich eine lineare Regression für die ansteigenden FITC und Cy5 Intensitäten berechnen. Die absoluten Intensitäten beider Signale auf verschiedenen Chromosomen können aufgrund unterschiedlicher Hybridisierung oder Bildaufnahme stark voneinander abweichen. Daher ist das Intensitätsverhältnis der entscheidende und aussagekräftige Parameter, der unabhängig von den experimentellen Bedingungen sein sollte. Zur Dokumentation wurden für väterliche und mütterliche Chromosomen jeweils separate Regressionen für die Intensitätsverhältnisse eingetragen, rot für die väterlichen Chromosomen, blau für die mütterlichen Chromosomen. Beide Regressionen sind eindeutig unterschiedlich. Man erkennt, daß die Regressionslinie der väterlichen Chromosomen weiter auf Seite der X-Achse liegt und damit eine bevorzugte Hybridisierung der gesamt genomischen MSP zu den väterlichen Chromosomen anzeigt und umgekehrt die mütterlichen Chromosomen eine erhöhte Intensität der mütterlichen MMU-DNS zeigen.

Zur Auswertung wurde für jede Gruppe (MMU und MSP Chromosomen) der Mittelwert der Intensitätsverhältnisse, die Standardabweichung sowie der Standardfehler des Mittelwertes bestimmt. Für die FITC-markierten MMU Chromo-

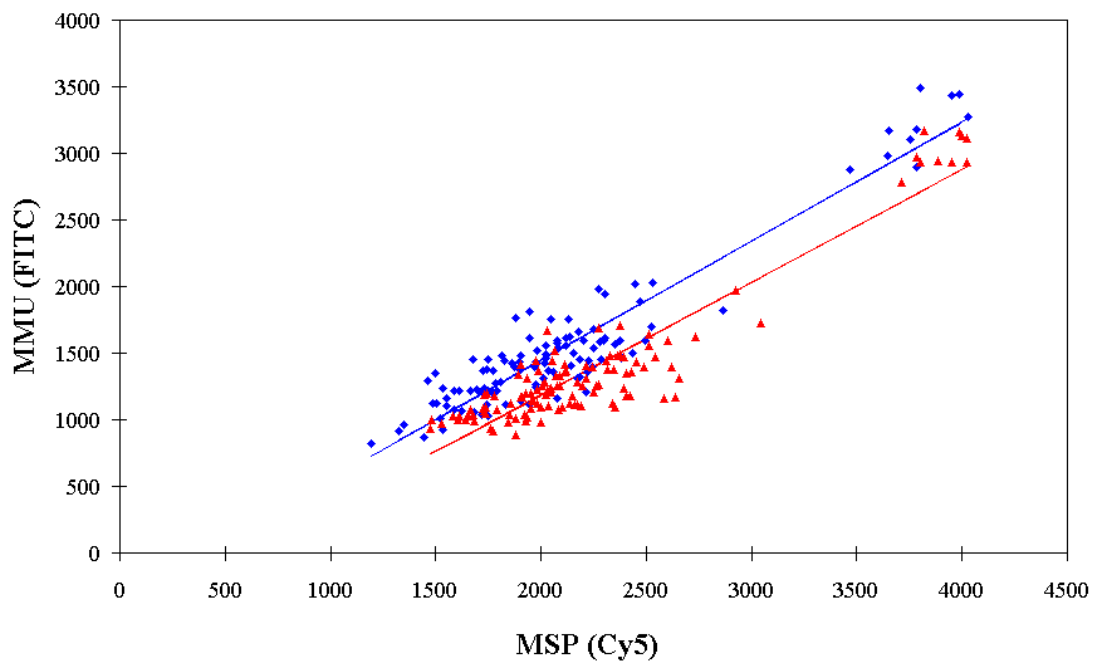


Abbildung 5.37: Experiment 3: Vergleichende Hybridisierung FITC-markierter MMU-C₀t-DNS und Cy5-markierter MSP-C₀t-DNS. Die Regressionsgeraden für die Intensitätsverhältnisse auf den väterlichen MSP (rot) und mütterlichen MMU Chromosomen (blau) sind deutlich voneinander verschieden.

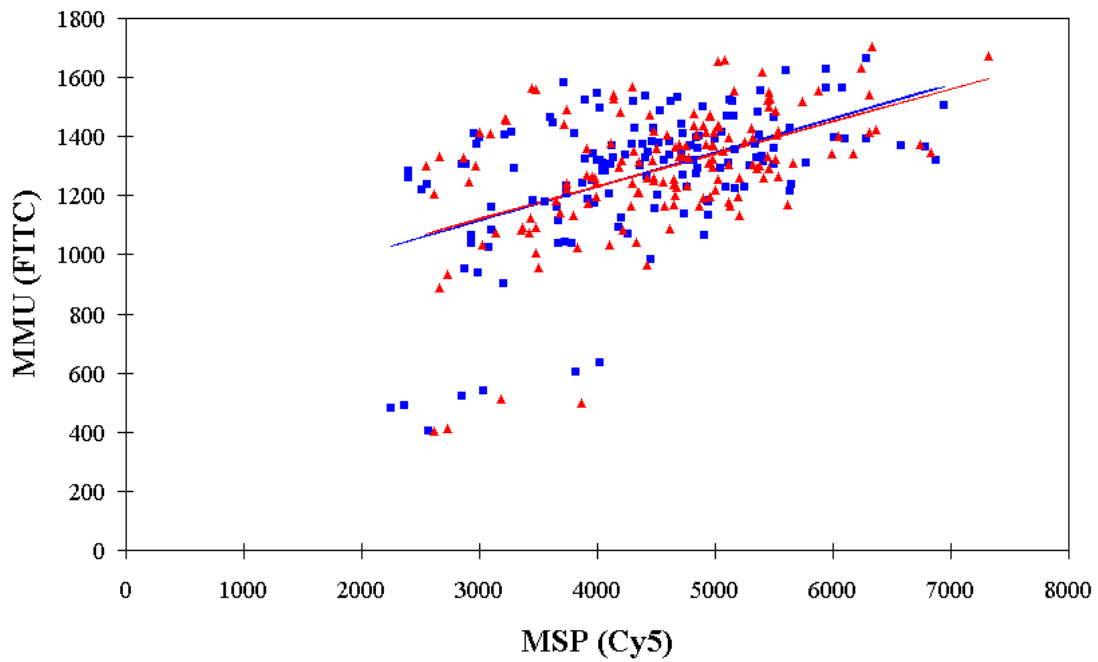


Abbildung 5.38: Experiment4: Vergleichende Hybridisierung FITC-markierter inter-B1-Produkte genomischer MMU-DNS und Cy5-markierter inter-B1-Produkte von MSP-DNS. Die Regressionsgeraden der MSP und MMU Chromosomen fallen aufeinander. Die Verhältnisse der Hybridisierungsintensitäten sind zufällig verteilt. Es lässt sich kein Hybridisierungsunterschied der Sonden erkennen.

somen wurde im Durchschnitt ein Intensitätsverhältnis von $0,111 \pm 0,029$ (Stbw.) ermittelt, für die Cy5 markierten MSP $0,097 \pm 0,029$ (siehe Tabelle 5.8 Experiment 1). Ein t-Test zeigte, daß die Unterschiede der Intensitätsverhältnisse für die väterlichen und mütterlichen Chromosomen höchst signifikant ist ($P < 0,001$). Mit der Diskriminanzanalyse können nun die Chromosomen aufgrund ihrer Intensitätsverhältnisse der beiden Fluoreszenzen als mütterliche (MMU) oder väterlichen (MSP) identifiziert werden. In Experiment 1 wurden 51,5% der mütterlichen und 71,1% der väterlichen Chromosomen ihrer Herkunft nach richtig zugeordnet. Ein Teil der fehlerhaft klassifizierten Chromosomen ist durch stark unterschiedliche (absolute) Intensitäten der beiden Fluoreszenzen bedingt. Der fast 10-fache Intensitätsunterschied könnte zum einen durch unterschiedliche Mengen an Sonden DNS begründet sein. Der Überschuß der genomischen DNS eines Elternteils führt zur Sättigung der Hybridisierung und damit zu ungleichen Hybridisierungsbedingungen für beide Sonden. Zum anderen könnten die Unterschiede durch verschiedene Intensitäten der verwendeten Fluoreszenzmarker zustande kommen. Um letzteres Problem zu umgehen, wurde das Experiment mit gleicher Sonden-DNS, aber anderen Fluoreszenzfarbstoffen wiederholt. In Experiment 2 (siehe Abbildung 5.36) wurden die Farbstoffe Cy3 und FITC zur Markierung genomischer MMU- und MSP-DNS verwendet. Der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten betrug hier $1,259 \pm 0,157$ für die Hybridisierung auf die väterlichen, $1,103 \pm 0,176$ für die Hybridisierung auf die mütterlichen Chromosomen (siehe Tabelle 5.8 Experiment 2). Der Unterschied beider Genome war in diesem Versuch ebenfalls hochsignifikant (t-Test; $P < 0,001$). Mit Diskriminanzanalyse konnten 66,4% der mütterlichen MMU und 74,5% der väterlichen Chromosomen richtig identifiziert werden.

Um herauszufinden ob repetitive oder Einzelkopie-Sequenzen für die Hybridisierungsunterschiede verantwortlich sind, wurden weitere komparative Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Zunächst wurde repetitive C_{0t} -1-DNS aus genomischer DNS der beiden Mauspezies hergestellt, mit FITC (MMU) und Cy5 (MSP) markiert und auf MMU x MSP Metaphasen hybridisiert. Mit diesen für repetitive Elemente angereicherten Sonden wurden die Hybridisierungsunterschiede auf den homologen Chromosomen vergrößert. Mütterliche (MMU) Chromosomen zeigten ein Intensitätsverhältnis von $0,726 \pm 0,087$, väterliche $0,611 \pm 0,082$ (t-Test, $P < 0,001$). Die Diskriminanzanalyse ergab eine korrekte Klassifizierung für 72,3% der MMU Chromosomen und für 78,8% der MSP Chromosomen (siehe Tabelle 5.8, Experiment 3 und Abbildung 5.37). Die Zuordnung in Experiment 3 war signifikant besser als nach komparativer Hybridisierung gesamtgenomischer DNS. Dies legt die Vermutung nahe, daß die im Euchromatin vorhandenen (mittel-) repetitiven Sequenzen für die unterschiedliche Hybridisierung der beiden Genome in den euchromatischen Chromosomenbereichen verantwortlich sind.

In einem anderen Experiment wurden von den beiden elterlichen Mausgenomen Sonden hergestellt, die hauptsächlich Einzelkopiesequenzen enthalten. Einzelgensequenzen zwischen repetitiven B1-Elementen wurden mit einer inter-B1-

PCR aus genomischer MMU- und MSP-DNS amplifiziert, unterschiedlich markiert und komparativ hybridisiert. In Abbildung 5.38 erkennt man, daß die Regressionsgeraden für MMU- und MSP-Chromosomen fast aufeinander fallen. Die Hybridisierung beider Sonden war zufällig verteilt und zeigte keine präferentielle Hybridisierung zu MMU- oder MSP-Chromosomen. Ein t-Test der Mittelwerte (Steigung) zeigte eine fast gleiche Verteilung der Intensitätsverhältnisse auf MMU- und MSP-Chromosomen ($P > 0.1$, siehe Tabelle 5.8, Experiment 4) .

Ein χ^2 -Test zeigte einen signifikanten Unterschied ($P < 0,001$) zwischen den Prozentsätzen korrekt klassifizierter Chromosomen nach komparativer Hybridisierung von genomischer DNS, Cot-DNS und inter-B1-PCR-Produkten. Aus den Experimenten kann man schließen, daß man mit den komparativen Hybridisierungen mütterliche und väterliche Chromosomen in Maushybriden, die sich in 1% ihrer Sequenz unterscheiden, identifizieren kann. Für das unterschiedliche Hybridisierungsverhalten zweier homologer Chromosomen sind interspergierte repetitive Sequenzen und keine Einzelkopiesequenzen verantwortlich.

5.5 Zusammenfassung der wichtigsten Methoden

- **Fluoreszenzmarkierung von DNA**

Mit enzymatischen Methoden (Nick-Translation, PCR, Random-Priming) werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Nukleotide in eine doppelsträngige Proben-DNS eingefügt.
- **FISH**

Die doppelsträngige DNS von Metaphasechromosomen wird denaturiert. Die einzelstränge DNS hybridisiert mit den ebenfalls denaturierten und mit Fluoreszenzfarbstoffen (direkt) oder mit Reporter-molekülen (indirekt) markierten Sonden. Dabei lagern sich unter optimalen Hybridisierungsbedingungen ausschließlich komplementäre Sequenzen von Chromosomen und Sonden aneinander. Bei einer indirekten Markierung werden die Reporter-moleküle mit immunzytochemischen Methoden detektiert. Spezifische Sequenzen auf den Metaphasechromosomen lassen sich mit dieser Methode fluoreszierend markieren und mit dem Fluoreszenzmikroskop auswerten.
- **Hybridisierung von klonierten DNS-Fragmenten (YACs, BACs)**
 - **Prinzip:** Fluoreszierend markierte Klone werden als Sonde auf zu untersuchende Metaphasechromosomen hybridisiert und lokalisiert.
 - **Anwendung:** Feinkartierung einer definierten Chromosomenregion (z. B. Translokationsbruchpunkte)
 - **Auflösung:** 1-3 Mb
- **Vielfarben-FISH (SKY, M-FISH und Cobra)**
 - **Prinzip:** DNS-Bibliotheken der 24 verschiedenen menschlichen Chromosomen werden jeweils mit einer unterschiedlichen Kombination von Fluoreszenzfarben markiert. In einem einzigen Hybridisierungsexperiment können alle menschlichen Chromosomen individuell gefärbt werden.
 - **Anwendung:** Untersuchung chromosomaler Austauschaberrationen im gesamten Genom (Tumordiagnostik, Aufklärung komplexer konstitutioneller Aberrationen) in einem einzigen Hybridisierungsexperiment.
 - **Auflösung:** ca. 2 Mb
- **SKY**

Die spektrale Analyse arbeitet nach interferometrischem Prinzip. Mit einem Sagnac-Interferometer und Fourieranalyse wird für jeden Bildpunkt (Pixel) ein Spektrum ermittelt. Vielfarben-FISH-Aufnahmen können mit Hilfe einer Software ausgewertet werden.

- **CGH auf Chromosomen**

- **Prinzip:** Mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte genomische Tester- und Referenz-DNS werden gleichzeitig auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert. Deletionen oder Amplifikationen einzelner Regionen des Testergenoms werden als Unter- oder Überrepräsentation der Fluoreszenzintensität der Tester-DNS (im Vergleich zur Referenz-DNS) auf den betroffenen Chromosomenregionen sichtbar.
- **Anwendung:** Aufklärung von Deletionen und Amplifikationen des gesamten Genoms ohne Notwendigkeit einer aufwendigen Chromosomenpräparation von Tester.
- **Auflösung:** 15 Mb

- **Matrix-CGH**

- **Prinzip:** Sonden werden als „Spots“ auf einen Glasobjektträger aufgebracht (Mikroarray). Mit unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffen markierte Tester- und Referenz-DNS werden gleichzeitig auf den Mikroarray hybridisiert. Deletionen oder Amplifikationen einzelner Regionen werden als Unter- oder Überrepräsentation der Fluoreszenzintensität der Tester-DNS (im Vergleich zur Referenz-DNS) auf den betroffenen Sonden sichtbar.
- **Anwendung:** Detektion von Deletionen und Amplifikationen definierter Bereiche (Sonden) verteilt über das gesamte Genom (topographische Chips); Vorteile sind eine hohe Auflösung, Miniaturisierung und Automatisierung.
- **Auflösung:** 1 kb-50 kb

- **SKY und CGH auf Chromosomen**

- **Prinzip:** Unterschiedlich fluoreszenzmarkierte väterliche (MSP) und mütterliche (MMU) genomische DNSn werden auf Metaphasechromosomen der F1-Nachkommen (MMUxMSP Maushybrid) hybridisiert. Auf den homologen Chromosomen findet man eine bevorzugte Hybridisierung der mütterlichen MMU-DNS auf dem mütterlichen Chromosomen und eine bevorzugte Hybridisierung der väterlichen DNS auf dem väterlichen Chromosom.
- **Anwendung:** Unterscheidung der väterlichen und mütterlichen Chromosomen zum Nachweis von UPDs (uniparentale Disomien).
- **Auflösung:** zur Zeit 1% Sequenzunterschied

Kapitel 6

Diskussion

6.1 Multicolor-FISH und Spectral Karyotyping

6.1.1 Analyse komplexer Chromosomenaberrationen

Anwendungen und Methoden der 24-Farben-FISH

Mit den herkömmlichen Bandierungsmethoden wie G-Bandierung und R-Bandierung können Chromosomen aufgrund ihrer unterschiedlichen Muster (helle und dunkle Banden) entlang ihrer Länge eindeutig identifiziert werden (CASPERSSON *et al.* [14]). Diese Methode dient seit vielen Jahren der Charakterisierung von Chromosomenveränderungen in der Pränatal-, Postnatal- und Tumordiagnostik. Handelt es sich jedoch um kompliziertere Veränderungen, die mehrere Chromosomen involvieren (komplexe Aberrationen) und/oder unterhalb des Auflösungsvermögens (10-30 Mb) der klassischen Zytogenetik liegen, reicht die klassische Bandierungsmethode nicht aus. Außerdem fordert die Chromosomenbänderungsanalyse geschultes und erfahrenes Personal und ist weiterhin äußerst zeitintensiv.

Die Etablierung der 24-Farben-FISH erlaubt mit der kombinatorischen Fluoreszenzmarkierung durchflußzytometrisch-sortierter Chromosomenbibliotheken eine Unterscheidung aller Chromosomen anhand ihrer Farbmuster. Mit der Durchflußzytometrie lassen sich einzelne Chromosomen unterscheiden und sortieren. Aus der gewonnenen DNS können durch DOP-PCR-Amplifikation chromosomenspezifische Bibliotheken hergestellt werden. Durch kombinatorische Fluoreszenzmarkierung der Chromosomenbibliotheken lassen sich alle Chromosomen aufgrund ihrer Farbmuster unterscheiden. Mit dieser Methode lassen sich alle Chromosomen schnell und einfach identifizieren, ohne auf das Bandenmuster angewiesen zu sein.

Die 24-Farben-FISH bietet die Möglichkeit, das gesamte Genom auf Chromosomenumbauten zu untersuchen und auch komplexe Austausche zwischen mehreren Chromosomen einfach und ohne zeitaufwendige Bandierungsanalyse zu identifizieren. Dieses Verfahren erleichtert insbesondere die Tumordiagnostik, da hier

die Morphologie der Chromosomenpräparate oft sehr schlecht ist und zahlreiche Umbauten vorliegen. Die 24-Farben-FISH liefert auch auf Chromosomen schlechter Morphologie noch gute Ergebnisse. Zum anderen läßt sich durch die Fluoreszenzmarkierungen die Herkunft von „Markerchromosomen“ aufklären, die sich oft aus verschiedenen Chromosomen zusammensetzen. In Kombination mit klassischen Bandierungsmethoden erreicht die 24-Farben-FISH eine bis dahin nie erreichte Genauigkeit bei der Interpretation von Tumorkaryotypen (VELDMAN *et al.* [154]). Eine andere Anwendungsmöglichkeit ist die Analyse von komplexen konstitutionellen Chromosomenumbauten (SCHRÖCK *et al.* [135], UHRIG *et al.* [152] und Kapitel 5.1.1 in dieser Arbeit) und die Rekonstruktion von Chromosomenumbauten in der Evolution (BEST *et al.* [8]).

Bei der einheitlichen Markierung eines Chromosoms mit einer DNS-Bibliothek läßt sich die Stelle eines Chromosomenbruchs nicht exakt bestimmen. Deshalb wird mit Hilfe einer invertierten DAPI-Fluoreszenz zusätzlich zu den Hybridisierungssignalen ein G-Banden-ähnliches Muster auf den Chromosomen erzeugt. Es ist also an denselben Chromosomen sowohl eine Bänderungsanalyse als auch eine 24-Farben-FISH möglich.

Die Analyse der Vielfarben-Hybridisierung kann durch zwei verschiedene Methoden, M-FISH und SKY realisiert werden. Während die Auswertung bei M-FISH, ähnlich wie in einem herkömmlichen FISH Experiment, auf der Aufnahme einzelner Bilder mit verschiedenen Filter basiert, wird bei SKY ein interferometrisch aufgenommenes spektrales Bild analysiert. Beide Methoden werden im Kapitel 3.1.2 ausführlich beschrieben und verglichen.

Auflösung einfacher und komplexer konstitutioneller Austauschaberrationen mit SKY

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse der SKY-Hybridisierung mit Ergebnissen aus YAC-FISH-Untersuchungen verglichen, um das Auflösungsvermögen der SKY-Methode abschätzen zu können. Durch FISH-Hybridisierungen einzelner YACs können die Orte der Chromosomenbrüche auf 1 Mb genau detektiert werden. Die YACs sind durch ihre genetischen Marker eindeutig im Genom verankert und ihre Reihenfolge auf dem Chromosom ist deshalb bekannt (siehe auch Kapitel 6.1.2). Durch FISH-Analysen mit YACs können die Bruchpunkte von Austauschaberrationen auf relativ kleine Intervalle eingengt werden.

Die Hybridisierungssonde der 24-Farbenhybridisierung besteht hingegen aus chromosomenspezifischen DNS-Bibliotheken, die durch Durchflußzytometrie oder Mikrodissektion gewonnen wurden. Diese Sonden haben den Vorteil, daß sie individuelle Chromosomen relativ einheitlich markieren. Durch die Suppression repetitiver Sequenzen werden heterochromatische Bereiche, z. B. die Zentromerregionen, mit diesen Sonden nicht markiert. Besonders auffällig ist die fehlende Markierung bei der 24 Farbenhybridisierung in den perizentromerischen Regionen der Chromosomen 1 und 9. Gelegentlich sind auch schwächere Hybridisierungs-

signale an den telomerischen Bereichen bemerkbar.

Während sich die ausgetauschten Chromosomensegmente mit Hilfe der 24-Farben-FISH leicht erkennen und sich die beteiligten Chromosomen aufgrund ihrer Markierung schnell und eindeutig identifizieren lassen, ist zur genauen Lokalisation der Bruchpunkte eine G-Bandierung (invertierte DAPI-Markierung) und/oder eine YAC-FISH notwendig. Die 24-Farben-FISH ist also ein Screening-Verfahren zur raschen Identifizierung von Translokationen und Interpretationen von komplexen Chromosomenumbauten, aber nicht für eine hochauflösende Karyotypanalyse geeignet.

Die Auflösung der 24 Farben-FISH mit SKY wird mit ca. 2Mb (SCHRÖCK *et al.* [134]) angegeben. Es ist zu beachten, daß das Auflösungsvermögen der 24 Farben-FISH von vielen Kriterien abhängt. Dazu gehört zum einen die Chromosomenpräparation, welche die Länge und Morphologie der Chromosomen bestimmt. Zum anderen hat die Komplexität der verwendeten DNS-Bibliotheken und deren Markierung einen Einfluß auf die Qualität der Hybridisierung und das Auflösungsvermögen dieser Methode. Aber auch die spezifische Farbstoffkombination der an einer Translokation beteiligten Chromosomen und die Größe eines ausgetauschten Segments bestimmen das Auflösungsvermögen. Chromosomen, die durch ähnliche Farbstoffkombinationen markiert sind, lassen sich nur schwer unterscheiden.

Am Beispiel des Patienten 176 und des Patienten mit Moebius-Syndrom war es möglich, die Grenzen des Auflösungsvermögens mit SKY festzustellen. Liegt die Größe des translozierten Stücks unter 2Mb, kann es in den meisten Fällen nicht mehr detektiert werden. Die 2Mb große Insertion im Chromosom 11 beim Moebius-Syndrom wurde mit SKY nicht detektiert, da das eingesetzte Material der Insertion von 2 verschiedenen Chromosomen stammt. Mit spezifischen YACs konnte die Insertion dagegen eindeutig nachgewiesen werden. Umbauten im Bereich der Chromosomenenden sind mit 24-Farben-FISH schwer detektierbar. Beispielsweise konnte bei Patient 176 das subtelomerische Segment von Chromosom 1 auf dem der(4) nicht gezeigt werden. Sequenzenden der Chromosomen sind in DNS-Bibliotheken (Hybridisierungssonden) häufig unterrepräsentiert. Außerdem werden die Repeat-reichen telomerischen und zentromerischen Regionen bei der Suppressionshybridisierung unterdrückt und sind deshalb nur schwach markiert.

Zu den Faktoren, die das Auflösungsvermögen der SKY-Analyse beeinflussen, gehört die Farbstoffkombination der an der Austauschaberration beteiligten Chromosomen. Im Fall des Patienten 176 konnte das Segment von Chromosom 11 auf dem der(1) nicht festgestellt werden, da Farbstoffkombinationen dieser beiden Chromosomen sehr ähnlich sind. Außerdem war das translozierte Chromosomenstück verhältnismäßig klein.

Vor- und Nachteile, sowie Ausblick zu SKY

Die 24-Farben-SKY Methode eignet sich zur Aufklärung von Chromosomenaberrationen, insbesondere bei komplexen Fällen. Sie verschafft einen schnellen Überblick über die am Umbau beteiligten Chromosomen und die ungefähre Lokalisation der Bruchpunktregionen. SKY ist eine hilfreiche Methode zur biologischen Dosimetrie. Alle strahleninduzierte chromosomalen Translokationen einer Zelle lassen sich damit schnell und einfach detektieren. In der Tumordiagnostik, sowie in der prä- und postnatalen Chromosomendiagnostik, bietet diese Methode im Gegensatz zu zeitaufwendigen Bandierungsanalyse eine wertvolle Alternative. Es können auch Metaphasen sehr schlechter Qualität, z. B. von Tumoren, ausgewertet werden, die bei der Bänderungsanalyse keine vernünftigen Ergebnisse liefern. Detaillierte Aufklärung erfordert zusätzlich FISH-Untersuchungen mit YAC-Sonden oder molekularbiologische Methoden.

Vorteile der 24-Farben-FISH:

- Untersuchung aller Chromosomen in nur einem Hybridisierungsexperiment
- Hybridisierungen auf Chromosomen schlechter Morphologie (z. B. Tumormetaphasen)

Nachteile der 24-Farben-FISH:

- Aufgrund der vielen fluoreszenzmarkierten Sonden ist eine Hybridisierung relativ teuer
- Auflösung (10-30 Mb) ist durch die chromosomenspezifischen DNS-Bibliotheken beschränkt

Bei Routineanwendung muß sichergestellt sein, daß die Sonden- und Markierungsqualität gleichbleibend gut sind. Das Auflösungsvermögen von SKY ist zwar durch die Verwendung der chromosomenspezifischen Sonden beschränkt, könnte aber durch die Verwendung einer hochauflösenderen Kamera noch gesteigert werden. Da alle Bilder interferometrisch aufgenommen werden und ein enormer Rechenaufwand damit verbunden ist, wäre gleichzeitig ein größerer Arbeitsspeicher des SKY-Systems hilfreich. Mit einer hochauflösenderen Kamera wäre auch eine verbesserte Auflösung der DAPI-Banden und damit eine höhere Ortsauflösung möglich. Mit dem neuen SKY-System ist es möglich, DAPI-Bilder ohne den dazwischengelagerten optischen Kopf des Interferometers aufzunehmen. Die Auflösung wird erhöht, da ein unnötiger zusätzlicher Strahlengang wegfällt und gleichzeitig eine hochauflösendere Kamera verwendet werden kann. Dieses neue System erlaubt die Wahl, das mikroskopische Bild mit oder ohne die interferometrische Einheit aufzunehmen. Daher kann man wählen, ein Bild auf die SKY-Methode mit spektraler Information aufzunehmen, oder wie in einer herkömmlichen FISH ausschließlich durch einen Filter.

Die SKY-Methode ist jedoch nicht auf eine Vielfarbandarstellung von ganzen Chromosomen beschränkt. Auch andere Sonden wie beispielsweise zentromer-spezifische α -Satelliten-Sonden können kombinatorisch markiert werden. Alpha-Satelliten ergeben in der Interphase ein diskretes Hybridisierungssignal und werden deshalb häufig benutzt, um die Kopienzahl eines interessierenden Chromosoms zu bestimmen. Dies ermöglicht den Nachweis von Aneuploidien in sich nicht teilenden Tumorzellen, Spermien oder Präimplantationsembryonen. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung kartierter Sonden zur Fluoreszenzbandierung von Chromosomen.

6.1.2 FISH-Bandierung der Chromosomen 2 und X

Bei der FISH-Bandierung wird mit Hilfe von physikalisch und genetisch kartierten Sonden ein vielfarbig fluoreszierendes Bandenmuster auf den Chromosomen erzeugt. Dabei sollte das Auflösungsvermögen der FISH-Banden an das der klassischen Bandierungsmethoden (G, C- und R-Bandierung) heranreichen und dieses erhöhen. Vorteil der FISH-Bandierung ist, daß sie je nach Fragestellung variiert werden kann und unabhängig von der Chromosomenstruktur und Basenkomposition ist.

Während die 24-Farben-FISH mit chromosomenspezifischen DNS-Bibliotheken nur interchromosomale Aberrationen detektiert, lassen sich durch Vielfarbenbandierungen entlang eines Chromosoms auch intrachromosomale Umbauten wie Inversionen und Deletionen aufdecken. Die Verwendung von Sonden mit definierten genetischen Markern ermöglicht eine gleichzeitige Lokalisierung der Bruchpunkte.

In dieser Arbeit wurde eine Vielfarbenbandierung mit SKY am Beispiel der Chromosomen 2 und X entwickelt. Die zur Bandierung benutzten YAC-Sonden waren mehr oder weniger gleichmäßig über die betreffenden Chromosomen verteilt, wobei für das X-Chromosom mehr Sonden zur Verfügung standen als für das Chromosom 2. Dies zeigt sich auch in den Fluoreszenzbildern. Die Bandierung des Chromosoms 2 weist relativ große Lücken auf, in denen keine Hybridisierungssignale sichtbar sind. Durch Zusammenstellung von Pools mit mehr YACs ließen sich diese Lücken schließen. Die FISH-Bandierung für das X-Chromosom erreicht bereits das Auflösungsvermögen klassischer Bandierungsverfahren.

Die Auflösung der einzelnen Banden ist auf lang ausgestreckten Chromosomen am besten. Bei starker Chromosomenkondensation überlagern sich die Fluoreszenzfarben der einzelnen Banden. Prinzipiell ließe sich eine solches Überstrahlen nebeneinanderliegender Sonden nutzen, um durch die Mischfarbe der Fluoreszenzen zusätzliche Banden zu erhalten.

Eine Verbesserung der FISH-Bandierung ist durch feinere Sondenpools entlang der Chromosomen möglich. Wichtig ist es, durch geeignete Auswahl von Sonden möglichst gleichmäßige Fluoreszenzintensitäten für alle Banden zu erhalten. Da die Auflösung des bisherigen SKY-Systems aufgrund der beschränkten Auflösung der Kamera limitiert ist, läßt sich mit diesem System die mit FISH-

Sonden maximal erreichbare Auflösung nicht in jedem Falle darstellen. Da die FISH-Bandierung eine möglichst hochauflösende Aufnahme benötigt, wäre die Verwendung einer Kamera mit höherer Auflösungskapazität nötig. Wahrscheinlich ist M-FISH das geeignetere System für diese Anwendung. Die Methode der Fluoreszenzbandierung kann auch auf Interphasechromosomen angewendet werden.

Eine weitere Möglichkeit zur fluoreszierenden Bandierung ist die Verwendung mikrodissertierter Sonden (CHUDOBA *et al.* [21] und JOHANNES *et al.* [57]). Aus Mikrodissektionsbibliotheken können homogen fluoreszierende Sonden hergestellt werden, die entlang des Chromosoms eine Bandierung und durch Übertrahlung benachbarter Banden zusätzliche Inter-Banden erzeugen. Während die Mikrodissektionsbibliotheken den Vorteil einer homogenen Hybridisierung auf Chromosomenbanden besitzen, haben YAC-Sonden den entscheidenden Vorteil, daß sie in der genetischen und zytogenetischen Karte verankert sind und somit eine genaue chromosomale Kartierung ermöglichen. Jeder YAC ist durch polymorphe genetische STS-Marker gut charakterisiert. Mit diesen Sonden können also zytogenetisch und genetisch verankerte FISH-Bandierungen entlang des Chromosom erzeugt werden. Veränderungen, die mit diesen Sonden aufgedeckt werden, lassen sofort Rückschlüsse auf genaue physikalische und genetische Lokalisation der beteiligten Region zu.

Die Methode der Vielfarben-FISH-Bandierung ist z. Z. noch nicht in der Routine einsetzbar. Eine weitere Verbesserung der Sondenauswahl ist notwendig, um hochauflösende und reproduzierbare Bandenmuster zu erzeugen.

Zur gleichzeitigen Untersuchung zahlreicher YAC-Sonden kann die in dieser Arbeit beschriebene Chiptechnologie verwendet werden. Bei der Matrix-CGH sind die Sonden, die bei einer Vielfarbenbandierung auf Chromosomenpräparate hybridisiert werden, auf Glasobjektträger aufgebracht. Das zu untersuchende Genom wird mit einer Kontrolle auf diese Matrix hybridisiert. Intensitätsunterschiede der Test- und Kontrollhybridisierung auf den Sonden identifizieren Dosisunterschiede zwischen den beiden hybridisierten Genomen. Ein Vorteil dieser Methode verglichen zur FISH-Bandierung auf Chromosomen ist, daß hier nur zwei Markierungen nötig sind, die der Patienten- und der Kontroll-DNS, die eine vergleichbare Qualität besitzen sollten. Zur Bandierung mit Vielfarben-FISH ist eine gleichstarke Markierung der Sonden aller FISH-Chromosomenbanden nötig, was in der Praxis oft schwierig zu erreichen ist und die Methode fehleranfälliger macht. Weiterhin ist bei der Matrix-CGH eine Automatisierung der Auswertung möglich. Die Intensitätsunterschiede werden auf den Sonden ermittelt, die computergestützt ausgewertet werden. Bei einer Hybridisierung der Bandierungs-sonden auf unterschiedliche Chromosomen ist man bei der Auswertung immer auf das Urteil des Betrachters angewiesen. Auch in Zukunft werden Chromosomenpräparate wegen der komplexen Strukturen nicht automatisch ausgewertet werden können.

Mit Hilfe der Matrix-CGH kann bei Verwendung von mehreren tausend Son-

den das gesamte Genom untersucht werden. Dabei handelt es sich um eine sehr schnelle miniaturisierbare und automatisierbare Methode, die wahrscheinlich weitaus weniger aufwendig und störanfällig ist, als eine hochauflösende FISH-Bandierung des gesamten Genoms. Bei Bandierungen des gesamten Genoms ist die mikroskopische Auswertung von Austauschaberrationen und Deletionen sehr zeitaufwendig. Der entscheidende Nachteil der Matrix-CGH gegenüber der chromosomalen FISH-Bandierung ist, daß mit Array-CGH nur Dosisunterschiede, also Deletionen oder Amplifikationen analysierbar sind, nicht aber balancierte Austauschaberrationen. Außerdem ist die Chipherstellung mit einem hohen technischen Aufwand verbunden.

6.2 Chromosomenaberrationen und genomische Instabilität nach Röntgenstrahlung

Die Aufzucht klonaler Kulturen nach Bestrahlung ermöglichte eine Detektion spät auftretender chromosomaler Veränderungen. Chromosomale Abweichungen von der Ursprungszelle infolge einer induzierten Instabilität wurden als Inhomogenität in der Kultur erkennbar. Gleichzeitig war mit der Methode eine Quantifizierung von direkt durch Bestrahlung induzierten Translokationen möglich.

In Pilotexperimenten (1 und 2) zeigte sich nach Bestrahlung mit 2 Gy in einigen Kulturen eine Instabilität. Die Häufigkeit der Instabilität dieser bestrahlten Klone unterschied sich aber nicht signifikant von der in unbestrahlter Kontrollklone. Anschließende Experimente (3 und 4) nach 2 Gy Bestrahlung wurden in Blindversuchen durchgeführt.

Faßt man die Experimente 1 bis 4 zusammen, entspricht die Anzahl der direkt durch Bestrahlung auftretenden Translokationen bei der höheren 4 Gy Dosis der Translokationsfrequenz aus der Literatur (hier 44,4%, in früheren Experimenten 43% [44]). Dasselbe gilt für die Bestrahlung mit 2 Gy: die Translokationsfrequenz der direkt durch Bestrahlung induzierten Translokationen beträgt hier 26,7% (früher 23% [44]). Es wurden insgesamt sehr wenige nichtklonale Translokationen gefunden, die einen Indikator für chromosomale Instabilität darstellen. Außerdem wurden weitere Chromosomenaberrationen, wie Deletionen und Chromosomenbrüche, die während der SKY-Analyse durch die DAPI-Bandierung detektiert wurden, in die Auswertung miteinbezogen.

Translokationen als Folge induzierter Instabilität sind relativ seltene Ereignisse. Chromosomenfusionen und Chromosomenbrüche treten als direkte Folge eines DNS-Schadens häufig auf und werden von der Zelle nicht weitervererbt. Translokationen sind eine Folgeerscheinung (Fehlreparatur) dieser Schäden und entstehen weniger häufig. Die 24-Farben-FISH ist im wesentlichen darauf ausgelegt, Translokationen zwischen verschiedenen Chromosomen zu detektieren, während andere Chromosomenveränderungen häufig übersehen werden.

Die Tatsache, daß nur wenige instabile Klone beobachtet wurden, könnte

durch eine Selektion für stabile Klone bedingt sein. Es besteht die Möglichkeit, daß bei der Isolation der Klone, die zwei Wochen nach Bestrahlung durchgeführt wird, vitalere Zellen mit größeren Kolonien ausgewählt werden. Es ist bekannt, daß Zellen, die eine genomische Instabilität aufweisen, ein verschlechtertes Zellwachstum zeigen und einen verzögerten Zelltod. Es ist möglich, daß instabile Klone zu dem Zeitpunkt der Klonisolation schon eine Instabilität exprimierten und deshalb wenige proliferierende Zellen (kleinere Kolonien) aufwiesen. Beschränkt man sich bei der Wahl einzelner Klone auf große Kolonien, wird möglicherweise gegen instabile Klone selektiert.

Eine andere Erklärung wäre, daß die untersuchte Zelllinie aufgrund ihres genetischen Hintergrunds wenig Instabilitäten zeigt. Es handelt bei der P3 Zelllinie um eine Tumorzelllinie. Viele Tumorzellen zeigen eine genomische Instabilität. Da sich die Expressionen genomischer Instabilität nach Bestrahlung und bei Tumorzellen ähneln, werden bereits gemeinsame Mechanismen vermutet. Die P3 Zelllinie zeigt einen für eine Tumorzelllinie relativ stabilen Karyotyp, d. h. sie neigt nicht zur spontanen Entstehung von genomisch instabilen Klonen, was auch durch meine Kontrollexperimente bestätigt wurde. Leider zeigten die P3-Zellen auch nach Bestrahlung keine genomische Instabilität. Eine ähnliche Resistenz gegen die Entstehung instabiler Klone ist bereits in menschlichen Fibroblastenzelllinien (KADHIM *et al.* [62]) und Mauszelllinien (PONNAIYA *et al.* [125], WATSON *et al.* [157]) beobachtet worden.

Prinzipiell eignet sich SKY zur Analyse von stabilen Translokationen nach Bestrahlung und von strahleninduzierter Chromosomeninstabilität. Allerdings ist für solche Untersuchung ein besseres Zellsubstrat als P3-Zellen notwendig. Ideal wäre eine Zelllinie, die einfach zu klonieren ist, gute Metaphasepräparationen liefert und nach Bestrahlung zu Instabilität neigt. Selbstverständlich kann mit SKY auch die Instabilität in Tumorzellen untersucht werden.

Die strahleninduzierte genomische Instabilität bleibt aus mehreren Gründen ein interessantes Untersuchungsobjekt. Zum einen wurde das Phänomen der strahleninduzierten Instabilität und das damit verbundene Risiko zur spät auftretenden Krebsentstehung nach Bestrahlung nicht in den Strahlenschutzbestimmungen berücksichtigt. Bestärken sich die Hinweise, daß Strahlung genomische Instabilität auslösen kann, müssen auch die Strahlenrisiken auch im Hinblick auf die Strahlentherapie neu abgeschätzt werden. Diese beschränken sich bisher ausschließlich auf die direkten Strahleneffekte.

ULLRICH UND PONNAIYA [153] zeigten, daß ein direkten Zusammenhang zwischen strahleninduzierter Instabilität und Krebsentstehung existiert und daß die Empfänglichkeit für strahleninduzierte zytogenetische Instabilität vererbbar ist. In ihren Experimenten gab es empfindliche und resistente Zelllinien, die nach Bestrahlung eine Instabilität aufwiesen bzw. keine Veränderungen zeigten. Hier wurde nochmal deutlich, daß der genetische Hintergrund einen entscheidenden Einfluß auf die Ausbildung genomischer Instabilität hat. DUBROVA *et al.* [27] demonstrierten an Mäusen, daß sich strahleninduzierte Instabilität sogar über meh-

rere Generationen übertragen läßt. Nachkommen der F1-Generation bestrahlter männlicher Mäuse wiesen eine erhöhte Rate an Mutationen in Minisatelliten auf.

Zum anderen sind Verursachung und die Übertragungsmechanismen der Instabilität noch immer unklar. Die Beobachtungen zur strahleninduzierten Instabilität lassen sich größtenteils nicht mit den klassischen Vorstellungen der Strahlenwirkung erklären. So zeigten Experimente mit verschiedenen Chemikalien, daß DNS-Strangbrüche alleine kein Auslöser für genomische Instabilität sind, sondern daß Komplexität und Qualität der Strangbrüche von entscheidender Bedeutung sind (LIMOLI *et al.* [86]). Während ionisierende Strahlung, Bleomycin und Neocarzinostatin in der Lage waren, genomische Instabilität zu verursachen, konnte nach Behandlung mit Restriktionsenzymen und Wasserstoffperoxid keine genomische Instabilität festgestellt werden.

Die Inaktivierung von Schlüsselgenen für die DNS-Reparatur, z. B. ATM, APC, MLH1, MSH2 etc., erzeugt chromosomale Instabilität, die extreme Formen annehmen kann („chromosomal catastrophe“). FODDE *et al.* [33] zeigten, daß embryonale Mausstammzellen ohne APC-Aktivität zahlreiche strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen aufweisen. APC ist ein Kinetochorprotein, das für die ordnungsgemäße Segregation der Chromosomen in der Mitose notwendig ist. Es wird allerdings argumentiert, daß die Anzahl der von Instabilität betroffenen Zellen nach Bestrahlung (ca. 10%) zu hoch ist, um durch eine Veränderung einzelner Gene ausgelöst zu werden. Als möglicher Übertragungsmechanismus werden deshalb auch epigenetische Faktoren diskutiert, die sich beispielsweise als genomweite Methylierungsstörungen auswirken können. Eine Methylierung von CpG-islands wurden von ISSA *et al.* [55] nach ionisierender Bestrahlung festgestellt.

Es gibt auch Hinweise, daß *de novo* (z. B. strahleninduzierte) Chromosomenaberrationen den Karyotyp destabilisieren können und die Entstehung zusätzlicher Chromosomenumbauten induzieren (siehe MURNANE [108]). Eine Kettenreaktion wäre vereinbar mit der Beobachtung, daß instabile Zellen auch initial nach Bestrahlung verursachte Chromosomenaberrationen tragen (HOLMBERG *et al.* [51]). Die initialen Chromosomenrearrangements könnten auch Hotspots für Rekombination sein, z. B. aufgrund von Kombinationen unstabiler Chrommatinstrukturen (MURNANE [107]).

Weiterhin ist eine Induktion genomischer Instabilität durch Reparatureffekte und deren Signalübertragung denkbar (MARDER UND MORGAN [98]). Der Effekt einer enzymatischen Reparaturantwort kann nicht nur Auswirkungen auf die nachfolgenden Zellgenerationen der bestrahlten Zellen haben, sondern kann auch unbestrahlte Zellen in der gleichen Kultur beeinflussen („Bystander-Effekt“). In diesem Zusammenhang überlappen die Phänomene Bystander-Effekt und strahleninduzierte genomische Instabilität. Unter dem Bystander-Effekt bezeichnet man im Zusammenhang mit Bestrahlungsexperimenten die Effekte unbestrahlter Zellen, die vermutlich durch die Bestrahlung und Reparaturantwort benachbarter Zellen ausgelöst und übertragen werden. Von einigen Autoren wird spekuliert,

daß der Bystander-Effekt in der Lage ist, die strahleninduzierte genomische Instabilität auszulösen (MOTHERSILL UND SEYMOUR [106]).

In einer aktuellen Veröffentlichung von BRENNAN UND SCHIESTL [13] wird eine strahleninduzierte genomische Instabilität an der Hefe demonstriert, die sich als dosisabhängiger Anstieg intrachromosomaler Rekombination in bestrahlten Zellen lange nach Bestrahlung bemerkbar machte. Die Hefe könnte ein geeignetes Untersuchungsobjekt für strahleninduzierte genomische Instabilität sein, da Hefezellen sich schneller und leichter kultivieren lassen als Säugetierzellen. Zudem kann die Hefe leicht genetisch verändert werden und somit als ein gutes einfaches Modell zur Untersuchung dienen.

Um die offenen Fragen im Zusammenhang mit strahleninduzierter genomischer Instabilität abzuschätzen, sind weitere Nachforschungen notwendig. Diese sind im Zusammenhang mit dem Strahlenschutz und der Strahlentherapie unerlässlich. Viele Beobachtungen zur strahleninduzierten Instabilität versprechen eine neuartige Zellantwort auf Strahlung, deren Charakter noch nicht geklärt ist.

6.3 Matrix-CGH

Aktueller Stand der Methode

Während die 24-Farben-Hybridisierung im wesentlichen zur Aufklärung von Chromosomenaustauschaberrationen dient, erlaubt die CGH auf Metaphasechromosomen die Aufdeckung von Dosisunterschieden zwischen zwei unterschiedlichen Genomen. Die Matrix-CGH ist eine Weiterentwicklung der chromosomalen CGH, wobei die Chromosomen durch Sonden auf einem Chip ersetzt werden. Dadurch können Deletionen und Amplifikationen kleiner genomischer Bereiche, die durch die gespotteten DNS-Klone definiert werden, anhand der Intensitätsunterschiede auf den Spots systematisch detektiert werden.

Die Motivation zur Etablierung einer Matrix-CGH war zum einen das verbesserte Auflösungsvermögen und die Möglichkeit zur Automatisierung. Zum anderen stehen durch das Humangenomprojekt zahlreiche gut charakterisierte Klone für die Herstellung von topographischen DNS-Chips zur Verfügung.

Die Matrix-CGH wurde mit Hilfe von X-chromosomalen Sonden und genomischen Targets mit einer unterschiedlichen Anzahl an X-Chromosomen etabliert. Als Sonden auf den Chips wurden weniger komplexe Sonden, nämlich Inter-Alu-PCR-Produkte von YACs, verwendet. Mit der Inter-Alu-PCR wurden spezifische DNS-Sequenzen (zwischen Alu-Repeats) amplifiziert, sowohl von den YAC-Sonden als auch vom genomischen Target. Inter-Alu-PCR verringert die Komplexität der genomischen DNS um einen Faktor 1000 und erleichtert deshalb die Hybridisierung zwischen Target und Sonde. Idealerweise enthält das Target Inter-Alu-Sequenzen, die 100% identisch mit den gespotteten Inter-Alu-YAC-Sequenzen sind. Nachteil der Methode ist, daß sowohl Sonde als auch Target mit repetitive Alu-Sequenzen angereichert sind. Mit diesen Sonden war es möglich,

Dosisunterschiede im Verhältnis 2 : 1 zwischen zwei Genomen aufzulösen. Als Targets können sowohl Exonuklease-verdaute als auch unverdaute Inter-Alu-PCR-Produkte von genomischer DNS bei gleichzeitiger Suppressionshybridisierung der Alu-Sequenzen verwendet werden. Die Suppression mit „Competitor“ und „Competitor rev“, die aus Sequenzen (ca. 20 bp Oligonukleotide) des Alu-Primers mit den PolyA-komplementären Sequenzen bestehen, verhindert weitgehend die unspezifischen Kreuzhybridisierungen zwischen Sonden- und Target-DNS.

Da in den durchgeführten vorliegenden Experimenten nur die DNS männlicher und weiblicher Personen, bzw. von Patienten mit multiplen X-Chromosomen als Targets benutzt wurde, konnten bisher nur Dosisdifferenzen für geschlechtschromosomalen Sonden nachgewiesen werden. Man kann allerdings davon ausgehen, daß Dosisunterschiede in autosomalen Regionen auf die gleiche Weise nachgewiesen werden können. In den vorgestellten Experimenten wurden bekannte Dosisunterschiede aufgeklärt. Deshalb war es möglich, Sonden, die in einem Dosisverhältnis 1 : 1 auftreten, als einen Standard zur Normierung zu benutzen. In meinen Experimenten dienten die Intensitätsverhältnisse auf den autosomalen Sonden als die Kontrolle, um eine Über- oder Unterrepräsentation auf anderen Sonden aufzudecken. Bei Aufdeckung unbekannter Dosisunterschiede müssen alternative Strategien entwickelt werden, z. B. die Mittelwertbildung über alle Klone. Bei der Detektion von Deletionen/Amplifikationen sind in der Regel nur wenige der gespotteten Klone über- oder unterrepräsentiert.

Strategien zur Verbesserung von topographischen Mikroarrays

In den Experimenten zur Quantifizierung der X-Chromosomen produzierten 50-90% der 320 autosomalen und 60 X-chromosomalen Sonden auswertbare Fluoreszenzsignale auf den Chips. Von den X-chromosomalen Sonden zeigten wiederum 60-70% das erwartete positive Signal. Die meisten dieser Sonden waren in mehreren Experimenten positiv. Falsch-positive autosomale Sonden traten in der Regel nur in einzelnen Experimenten auf.

Das völlige Ausfallen der Hybridisierung einer Sonde in mehreren Experimenten, kann daran liegen, daß kein ausreichend komplexes Inter-Alu-PCR-Produkt dieser Sonde amplifiziert wurde, oder die DNS-Präparation des Klons nicht in Ordnung war. Wenn eine X-chromosomale Sonde falsch-negative Signale zeigt, wurden in der Inter-Alu-PCR der Sonden nicht genügend spezifische Einzelgen-Sequenzen, sondern vorwiegend repetitive DNSn amplifiziert, die bei der Suppressionshybridisierung unterdrückt werden. Der Anteil repetitiver Sequenzen in einem YAC-Klon ist abhängig von der Chromosomenregion und kann von 10-90% variieren. D. h. für manche Chromosomenregionen wird es sehr schwierig sein, geeignete Sonden für die Chipanalyse zu finden. Falsch-negative Signale können auch auf Klonverwechslungen beruhen (z. B. X-chromosomaler Klon 267, der als autosomal notiert war, Kapitel 5.3.1). Erfahrungsgemäß liegt bei 10-20% der Klone, die im Ressourcenzentrum des Humangenomprojekts bestellt werden, ei-

ne Verwechslung vor. Eine andere Möglichkeit, warum kein Hybridisierungssignal entsteht, könnte im Fehlen der entsprechenden Sequenz in der Target-DNS liegen. Die Amplifikation von Inter-Alu-Sequenzen von einem YAC (1-2 Mb) ist sehr viel effizienter als von gesamtgenomischer DNS.

Zur Optimierung des CGH-Chips können X-chromosomale und autosomale Sonden, die wiederholt keine Hybridisierung zeigten, entfernt werden. Ebenso sollten Sonden aussortiert werden, die ein falsch-negatives Signal zeigen, z. B. X-chromosomale Sonden, die wiederholt kein positives Signal erzeugten.

Es konnte gezeigt werden, daß positive X-chromosomale Signale in mehreren Experimenten verifizierbar waren, während falsch-positive autosomale Signale nur einmalig auftraten. Es empfiehlt sich daher, mehrere identische Experimente durchzuführen und dann über die Ergebnisse zu mitteln, und/oder jeden Klon mehrmals auf einen Chip zu spotten und über diese Spots zu mitteln. Letzteres hat den Vorteil, daß die Hybridisierungsbedingungen für jeden Spots eines Klons identisch und daher die Intensitätsunterschiede direkt vergleichbar sind.

Zum Erstellen eines Chips, der zur Routineanwendung dienen soll, müssen alle Sonden vorher einzeln geprüft werden. Durch FISH auf Metaphasechromosomen muß getestet werden, daß der Klon eindeutig zu der richtigen Region hybridisiert. Außerdem dürfen nur solche Klone verwendet werden, die bei wiederholten Chiphybridisierungen auswertbare Signale erzeugten. Auch die Auswahl der Objektträger für die Chipproduktion ist wichtig. In meinen Experimenten konnte nur mit den Corning-Objektträgern eine gleichbleibend gute Hybridisierung erhalten werden.

Die vorgestellten Experimente befassen sich ausschließlich mit Dosisdifferenzen der X-Chromosomen. Aus diesem Grund konnte eine Normierung der Intensitätsverhältnisse anhand der Signale auf den autosomalen Sonden vorgenommen werden. Soll die Anwendung der CGH auf alle Chromosomen ausgeweitet werden, kann die Normierung entweder über alle auf dem Chip befindlichen Chromosomen durchgeführt werden, oder es müssen interne Standards eingeführt werden, die einer herkömmlichen Sonde entsprechen und immer im Genom vorhanden sind. Zur Normierung muß eine möglichst große Zahl von Kontrollsonden möglichst gleichmäßig über dem Chip verteilt sein, um den Hintergrund auf einzelnen Spots und eventuelle Intensitätsunterschiede in einem Experiment auszugleichen. Um Kontrollsonden zu erhalten, könnten beispielsweise die zu analysierenden Targets mit quantitativer PCR auf die Anwesenheit und Konzentration der Kontrollsonden untersucht werden. In genügend großer Anzahl gespottet, könnten diese Sonden die geeigneten internen Kontrollen zur Normierung bieten. Eine andere Möglichkeit wäre das Zusetzen einer bekannten Menge einer auf dem Chip gespotteten Sonde zu beiden Targets. Die Hybridisierungsintensität dieser zugesetzten Sonde könnte ebenfalls zur Normierung verwendet werden.

Im vorliegenden Ansatz ist die maximale Auflösung der Methode durch die Verwendung von YAC-Sonden etwa 1 Mb, d. h. das Auflösungsvermögen ist vergleichbar mit der FISH-Bandierung von YACs (siehe Kapitel 6.1.2). Die Auf-

lösung kann durch die Wahl kleinerer Sonden erhöht werden. Experimente mit einzelnen Inter-Alu-PCR-Klonen blieben bislang ohne Erfolg. Durch Verwendung von BAC-, PAC- und P1-Klonen als Sonde ließe sich eine Auflösung von etwa 100 kb erreichen. Hauptproblem bei der Verwendung kleinerer Sonden ist die verringerte Hybridisierungseffizienz zwischen Sonde und Target. Durch Inter-Alu-PCR kann wahrscheinlich keine ausreichend komplexe Probe von BACs, PACs und P1 mehr hergestellt werden, d. h. es müßte die genomische DNS der Klone gespottet werden und gesamtgenomische DNS als Target verwendet werden. Dieser Ansatz wird von SOLINAS-TOLDO *et al.* [142] mit P1 und PAC Klonen und von PINKEL *et al.* [121] und ALBERTSON *et al.* [1] verfolgt. POLLACK *et al.* [123] benutzten cDNS-Klone von 1-2 kb als Sonden und erhalten bei Hybridisierung gesamtgenomischer Targets auswertbare Signale. Andere Arbeitsgruppen konnten diese Resultate allerdings nicht reproduzieren. cDNS-Chips hätten den enormen Vorteil, daß sie gleichzeitig für Expressionsanalysen genutzt werden können.

Anwendungsmöglichkeiten der Matrix-CGH

Die Matrix-CGH ist ein geeignetes Werkzeug, um Genome auf Deletionen und Amplifikationen von definierten DNS-Sequenzen (Sonden) zu untersuchen. Von besonderem Interesse wäre ein topographischer Chip, der Sonden enthält, die gleichmäßig und in geringem Abstand im Genom verteilt sind und damit analog zu einer Metaphase bei der chromosomalen CGH das gesamte Genom repräsentiert. Zum anderen könnte ein „Telomerchip“ entworfen werden, der subtelomerische Sequenzen als Sonden enthält. Telomerische Regionen gelten als extrem genreich (SACCONE *et al.* [127]) und sind auffallend häufig an zytogenetisch kryptischen Chromosomenumbauten bei Patienten mit geistiger Behinderung beteiligt (FLINT *et al.* [32], KNIGHT *et al.* [71] und HOLINSKI-FEDER *et al.* [50]). Mit einem Chip, der die Chromosomenenden auf genomische Imbalancen testet, könnten Patienten mit idiopathischer Retardierung und/oder angeborenen Fehlbildungen untersucht werden. Dabei wäre es möglich, kryptische Deletionen in subtelomeren Regionen aller Chromosomen aufzudecken. Man schätzt, daß bei 10-20% dieser Patienten ein Umbau und damit die Krankheitsursache gefunden werden könnte. Da MR (Mentale Retardierung) das häufigste humangenetische Krankheitsbild ist und Patienten mit unklarer Diagnose zahlreiche Kliniken durchlaufen, wäre ein Chip zur Differentialdiagnose der MR von enormer medizinischer und wirtschaftlicher Bedeutung.

Der in meinen Experimenten verwandte Chip enthält zahlreiche subtelomerische Sonden von allen Autosomen und dem X-Chromosom und könnte zur Untersuchung subtelomerischer Deletionen genutzt werden. Um im Bereich der Chromosomenenden zu messen, ist aber eine bessere Sondenauswahl und die Validierung des Chips an Patienten mit definierten Deletionen erforderlich. Bevor die Matrix-CGH in der Routine angewendet werden kann, müssen sowohl Sondenauswahl als auch Hybridisierungsbedingungen optimiert werden.

Die Matrix-CGH bietet sich für Untersuchungen an, bei der wenig Patientenmaterial für DNS-Präparation verfügbar ist oder eine schnelle Diagnose erhalten werden muß, wie dies gelegentlich in der prä- und postnatalen Diagnostik vorkommt. Dabei könnten auf einem Chip alle interessierenden Sonden aufgebracht werden, die in einem einzigen Hybridisierungsschritt auf Deletionen oder Amplifikationen getestet werden sollen. Diese Methode würde sich ebenfalls zur Präimplantationsdiagnostik eignen, bei der beschränktes DNS-Material vorliegt, das mit Inter-Alu- oder DOP-PCR amplifiziert wird. Die Diagnose muß innerhalb 24 h erfolgen. Bei der Präimplantationsdiagnostik entnimmt man dem vierzelligen oder achtzelligen Embryo eine Zelle zur Analyse. Nach einer weiteren Teilung wird der Embryo dann in den Uterus implantiert. Mit einer Hybridisierung auf einem Chip könnten alle diese Forderungen erfüllt werden. Eine Vielzahl von genetischen verankerten Sonden kann mit nur einer Hybridisierung innerhalb kurzer Zeit untersucht werden.

Eine andere wichtige Anwendung ist die Tumordiagnostik. Die häufig stark rearrangierte Tumormetaphasen machen eine konventionelle Chromosomenanalyse oft sehr schwer oder unmöglich. Die CGH auf dem Chip bietet die Möglichkeit, Ungleichgewichte zwischen Tumor- und Kontrollgenomen schnell und exakt (mit einer hohen Auflösung) zu bestimmen. Zur Untersuchung von Tumoren wird derzeit die chromosomale CGH-Untersuchung routinemäßig eingesetzt, die aber in naher Zukunft von der Matrix-CGH abgelöst werden könnte. Ein weiterer Hauptvorteil der Chiptechnologie und damit der Matrix-CGH ist die Möglichkeit zu einer automatisierten und damit zeitsparenden Auswertung. Die CGH auf Metaphasechromosomen erfordert erfahrene Zytogenetiker und ist sehr zeitaufwendig. Die Matrix-CGH ermöglicht eine Suche nach genetischen Imbalancen in stark veränderten Tumoren und die Analyse großer Patientenkollektive, z. B. Patienten mit geistiger Behinderung auf zytogenetisch kryptische Chromosomenumbauten.

Abschließend bleibt zu erwähnen, daß die Fortschritte in anderen Bereichen der Array-Anwendungen, wie beispielsweise die Analysen der Genexpression mit der Matrix-CGH in Verbindung gebracht werden könnten. Bei geeignetem Chipdesign könnte sowohl eine Untersuchung auf DNS-Ebene stattfinden als auch auf mRNS-Niveau.

6.4 SKY und CGH zur Unterscheidung mütterlicher und väterlicher Chromosomen

Mit Chromosomenbandierung und FISH lassen sich Chromosomenstrukturen bis ins Detail untersuchen. Mit diesen weit entwickelten Methoden war es bisher nicht möglich, mütterliche und väterliche Chromosomen zu unterscheiden. Es gibt beim Menschen nur wenige relativ seltene extreme chromosomale Polymorphismen, die es erlauben, mütterliche und väterliche Chromosomen auseinanderzuhalten, dazu

gehören beispielsweise C-Band-positives Heterochromatin und NOR-Varianten. Desweiteren wurden synthetische Oligonukleotide entwickelt, die es ermöglichen, feine Unterschiede in chromosomenspezifischer hochrepetitiver α -Satelliten-DNS mit FISH zu detektieren (O'KEEFE *et al.* [114]). Die Auswahl solcher unterschiedlicher α -Satelliten-Sonden setzt eine hohe interindividuelle Variabilität in diesen Sequenzen voraus. Es ist daher anzunehmen, daß diese Sonden nicht für alle Chromosomen entwickelt werden können. Während sich die Oligonukleotidhybridisierung nur für hochrepetitive zentromerspezifische Sequenzen anwenden läßt, werden durch Kombination von CGH und SKY Sequenzunterschiede des ganzen Genoms untersucht.

In dem in dieser Arbeit beschriebenen Experiment wurden Chromosomen eines F1 Hybriden der Interspezies-Kreuzung von *M. musculus* (MMU) und *M. spretus* (MSP) nach ihrer elterlichen Herkunft geordnet. Als interne Kontrolle diente die stark unterschiedliche Satelliten-DNS beider Spezies, die eine spezifische FISH-Markierung von MMU und MSP Zentromeren ermöglicht (MATSUDA UND CHAPMAN [100]). Bei Hybridisierung von MMU und MSP gesamtgenomischer DNS konnten ca. 70% der Chromosomen ihrer richtigen väterlichen und mütterlichen Herkunft zugeordnet werden. Bei einer komparativen Hybridisierung von repetitiver C_{0t} -1-DNS wurde die elternspezifische Hybridisierung auf den homologen Chromosomen noch verstärkt und in ca. 76% eine richtige Zuordnung erreicht. Wurden Einzel-Kopie-Sequenzen hybridisiert, war eine Unterscheidung der Chromosomen nicht mehr möglich. Es resultierte eine relativ gleichmäßige Hybridisierung auf den mütterlichen MMU und väterlichen MSP Chromosomen. Da Einzelgensequenzen sehr viel weniger variieren und evolvieren als die nicht-kodierenden (mittel-) repetitiven DNS-Sequenzen, liegen die Hauptunterschiede zwischen verschiedenen Kopien desselben Chromosoms logischerweise in den repetitiven DNS-Funktionen.

Hybride der Mausspezies *M. musculus* und *M. spretus* werden häufig zu genetischen Kopplungsanalysen (zur Genkartierung) verwendet (AVNER *et al.* [4]). Eine Unterscheidung zwischen MMU- und MSP-Euchromatin würde es ermöglichen, Rekombinationereignisse in Rückkreuzungen direkt auf den Chromosomen sichtbar machen und zur Ergänzung von Kartierungsstudien zu verwenden. Die beiden Linien MMU und MSP haben sich vor 2-3 Millionen Jahren abgespalten (SILVER [140]) und zeigen in den 3'-untranslatierten Region der cDNSs einen Polymorphismus von ungefähr einem Austausch pro 100 Basenpaaren ($\cong 1\%$) (TAKAHASHI UND KO [145]). In der menschlichen Bevölkerung ist der Unterschied der Einzelnukleotidpolymorphismen ca. 10 mal geringer (LANDEGREN *et al.* [75] und WANG *et al.* [156]). D. h. die Sensitivität der Methode muß noch um einen Faktor von 10 gesteigert werden, um die Unterscheidung von väterlichen und mütterlichen Chromosomen beim Menschen zu erreichen. Eine solche Methode wäre extrem hilfreich zur Entdeckung von UPDn, die eine bisher unterdiagnostizierte Ursache für Fehlgeburten, Mißbildungssyndrome (Imprintingkrankheiten) und Tumorentstehung sind. Bei UPDs stammen beide homologen Chromosomen

von demselben Elternteil. Väterliche und mütterliche Chromosomen zeigen eine unterschiedliche Methylierung und verschiedene Expression einzelner (geprägter) Gene. Uniparentale Disomien führen daher häufig zu krankhaften Veränderungen, die konsitutionell auftreten und auch in Tumoren zu finden sind.

Eine Verbesserung der Hard- und Software ist notwendig, um das Auflösungsvermögen bei der Entdeckung von Sequenzunterschieden auf chromosomaler Ebene zu erhöhen. Zusätzlich könnte die Technik der „Representational Difference Analysis“ (RDA) (LISITSYN [87]) genutzt werden, um Sequenzen zu isolieren, in denen sich zwei komplexe Genome unterscheiden. Damit ließen sich komplexe Sonden mit spezifischen Sequenzen anreichern und verbesserte Proben für die elternspezifische Hybridisierung herstellen.

Kapitel 7

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Fluoreszenzmethoden zur Analyse von strukturellen und numerischen Chromosomenumbauten etabliert. Neue Entwicklungen zur strukturellen und funktionellen Genomanalyse und deren Anwendungsmöglichkeiten werden diskutiert.

Die spektrale Karyotypanalyse ermöglicht die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung aller 24 menschlichen Chromosomen und damit die Aufklärung komplexer Chromosomenaberrationen in einem einzigen Hybridisierungsexperiment. Diese Methode wurde verwendet, um bestrahlte Zellen lange Zeit nach Bestrahlung auf Translokationen zu untersuchen. Dabei konnte zwischen initial-verursachtem Schaden und durch Instabilität ausgelösten Veränderungen unterschieden werden. Bei der Untersuchung von P3 Zellen ca. 20 Tage nach Bestrahlung konnten nur in 17% der analysierten Zellen eine Instabilität aufgedeckt werden. Diese Rate ist nicht signifikant höher als die Häufigkeit von spontanen Aberrationen in unbestrahlten P3 Kontrollzellen (13%). Neben 24-Farben-FISH wurde SKY zur FISH-Bandierung benutzt. Am Beispiel der Chromosomen 2 und X wurde die Barkodierung mit YACs demonstriert. Während die 24-Farben-FISH ausschließlich Austauschaberrationen zwischen verschiedenen Chromosomen entdeckt, ermöglicht die Barkodierung auch die Auflösung von intrachromosomalen Aberrationen und Bruchpunktkartierung.

Zur Untersuchung genetischer Unterschiede (Imbalancen) zwischen zwei Genomen wurde in Analogie zur chromosomalen CGH eine Matrix-CGH etabliert. Dazu wurden Inter-Alu-PCR-Produkte zytogenetisch und genetisch verankerter YACs als Sonden auf Glasobjektträgern (Chips) gespottet und Inter-Alu-PCR-Produkte genomischer DNS als Targets auf den Chip hybridisiert. Anhand von Hybridisierungsunterschieden auf X-chromosomalen und autosomalen Sonden bei komparativer Hybridisierung von multiplen X-Zelllinien mit weiblicher (46,XX) und männlicher (46,XY) genomischer DNS wurde die Matrix-CGH soweit entwickelt, daß Dosisverhältnisse von 2:1 detektiert werden konnten. Damit sind die Voraussetzungen für die Verwendung von CGH-Chips für den Nachweis von Deletionen und Duplikationen in der Chromosomendiagnostik geschaffen. Man

nimmt an, daß die Matrix-CGH in Zukunft einen großen Teil der bisher üblichen Chromosomenbänderungsanalysen ersetzen wird. Sowohl das Auflösungsvermögen der Matrix-CGH als auch der FISH-Barkodierung könnte durch die Wahl kleinerer DNS-Sonden erhöht werden. Bei der Matrix-CGH handelt es sich um eine sehr „junge“ Methode, die durch Optimierung der Hybridisierungsbedingungen und Sondenauswahl noch erheblich verbessert werden kann. Im Gegensatz zur chromosomalen CGH ist eine Automatisierung und Miniaturisierung der Technik denkbar.

Die Kombination von SKY und CGH (auf Metaphasechromosomen) ermöglichte die Unterscheidung zwischen väterlichen und mütterlichen Chromosomen von MMU x MSP Maushybriden. Mit der dargestellten Methode konnten bis zu 70% der Chromosomen durch Hybridisierungsunterschiede in den euchromatischen Chromosomenbereichen ihrer elterlichen Herkunft nach zugeordnet werden. Die Sensitivität der entwickelten Methode muß um den Faktor 10 gesteigert werden, um eine Diagnostik von UPDs und Imprintingkrankheiten beim Menschen zu ermöglichen. Die Differenzierung zwischen väterlichen und mütterlichen Chromosomen ist eine der größten Herausforderungen und Ziele in der modernen Chromosomenforschung.

Glossar

Alu-PCR	PCR mit Primern, die an Alu-Sequenzen binden, um DNS zu amplifizieren, die zwischen zwei entgegengesetzt orientierten Alu-Sequenzen liegt. Bei Alu-Sequenzen handelt es sich um repetitive Sequenzen von ungefähr 300 bp, die etwa alle 5 kb im Genom auftreten.
Autosomen	Alle Chromosomen außer den Geschlechtschromosomen. Eine diploide Zelle besitzt jeweils eine väterliche und eine mütterliche Kopie jedes Autosoms.
B1-Sequenzen	Repetitive DNS-Sequenzen der Maus, entsprechend den Alu-Sequenzen beim Menschen
bp	Basenpaare, 1 kb = 1 kilobase = 1000 Basenpaare, 1Mb = 1 Megabase = 1000 kb, Einheit für die Länge eines DNS-Stranges.
CCD-Kamera	Charge-Coupled Device-Kamera, besteht aus einem Raster von winzigen Pixeln, die in ein Kristall (z. B. Si) geätzt sind. Ein Pixel ist ein Potentialtopf für Leitungselektronen, die durch auftreffende Strahlung ausgelöst werden. In jedem Pixel werden die Leitungselektronen gespeichert. Das aufgenommene Bild wird Zeile für Zeile ausgelesen. Die abgelieferten Elektronen bedeuten eine Folge von Stromimpulsen, die vom Rechner zur Rekonstruktion des Bildes verarbeitet werden.

CGH	Comparative Genomic Hybridization, vergleichende genomische Hybridisierung. Mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte genomische Tester- und Referenz-DNS werden gleichzeitig auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert. Deletionen oder Amplifikationen einzelner Regionen des Testergenoms werden als Unter- oder Überrepräsentation der Fluoreszenzintensität der Tester-DNS (im Vergleich zur Referenz-DNS) auf den betroffenen Chromosomenregionen sichtbar.
Chromosom	Transportvehikel für ein durch Proteine verpacktes DNS-Molekül. Es ist als morphologische Einheit nur während der Zellteilung sichtbar. Das gesamte Genom einer diploiden menschlichen Zelle ist auf 46 Chromosomen verteilt.
Chromosomenbänderung	Unterschiedliche, für ein Chromosom charakteristische Abfolge von hell und dunkel gefärbten Regionen, die durch verschiedenen chemische und thermische Behandlungen entstehen.
Chromosomenbibliothek	Ansammlung von klonierten oder PCR-amplifizierten kurzen DNS-Stücken, die alle von einem Chromosom stammen.
cM	centi Morgan, Einheit für den genetischen Abstand; 1 cM entspricht 1% Wahrscheinlichkeit, daß zwei Bereiche eines Chromosoms in der Meiose an einer Rekombination beteiligt sind. (cMpter, bezogen auf Telomerregion am p-Arm)
C₀t-1-DNS	Hochrepetitive DNS, die aus genomischer DNS isoliert wurde (Definition siehe Kapitel 4.1.5). C ₀ t ist das Produkt aus Konzentration und Zeit der Inkubation in der Reassoziationskinetik.
Deletion	Fehlen einer DNS-Sequenz oder eines Chromosomensegmentes.
Denaturation	Übergang der DNS vom doppelsträngigen zum einzelsträngigen Zustand, wird meist durch Erhitzen herbeigeführt.
dizentrisches Chromosom	Produkt einer Fusion von Chromosomenfragmenten, die beide ein Zentromer besitzen. Es ist instabil und bricht, wenn die Zentromere in der Mitose zu entgegengesetzten Polen gezogen werden.
DNAse	Enzym, das DNS schneidet.
DNA-Polymerase	Enzym, das nach der Vorlage der DNS einen Tochterstrang synthetisiert.

DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat. Das Nukleotid steht stellvertretend für die möglichen Basen A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin und U = Uracil.
DOP-PCR	Degenerated Oligonucleotid Primed-PCR. Ein degenerierter Primer bindet etwa alle 300-3000 bp an genomische DNS und wird benutzt, um in einer PCR genomische DNS möglichst repräsentativ zu amplifizieren. Es resultiert ein komplexes Gemisch von 200 bp bis 2 kb langen Fragmenten.
epigenetisch	Vererbare Eigenschaft, die nicht durch die Basenabfolge der DNS festgelegt wird, sondern durch Modifikationen (z. B. Methylierung) des DNS-Moleküls.
Euchromatin	Genomische DNS-Sequenzen, die im Interphasezellkern relativ gleichmäßig angefärbt sind (siehe auch Heterochromatin).
Exonuklease	Spaltet einzeln Nukleotide vom Ende einer Polynukleotidkette oder DNS ab (z. B. Bal31).
F1-Generation	Erste Generation der Nachkommen bei Kreuzung zweier homozygoter Individuen.
FISH	Fluorescence- <i>in situ</i> -Hybridization, Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
Genom	Gesamtheit aller DNS-Sequenzen eines Organismus.
Geschlechtschromosomen	Chromosomen, die in verschiedenem Geschlecht unterschiedlich auftreten, beim Menschen als X und Y bezeichnet, und das Geschlecht determinieren. Bei Säugern ist das weibliche Geschlecht homogametisch (zwei X-Chromosomen) und das männliche Geschlecht heterogametisch (ein X- und ein Y-Chromosom).
Heterochromatin	Regionen des Genoms, die immer in kondensierter Form vorliegen und deshalb nicht genetisch exprimiert werden. Konstitutives Heterochromatin besteht aus hochrepetitiven DNS-Sequenzen und zeigt im Gegensatz zum Euchromatin eine starke Färbung in der Interphase.
Hybridisierung	Paarung komplementärer DNS-Stränge zu einem doppelsträngigen Hybrid.
Ideogramm	Schematische Darstellung der G-Bandierung eines Chromosoms.

Imprinting	Genomische Prägung. Einfluß der väterlichen oder mütterlichen Herkunft eines Gens auf seine Expression, wahrscheinlich durch Methylierungsunterschiede gesteuert.
Karyotyp	Spezifische Anordnung der Chromosomen eines Organismus nach einer bestehenden Nomenklatur.
Klon	Große Anzahl an Zellen oder Molekülen, die aus einer einzigen ursprünglichen Zelle hervorgegangen sind.
komplexe Translokation	Translokation, an der mehr als zwei Chromosomen und/oder mehr als drei Brüche beteiligt sind.
LET	Linear Energy Transfer, lokal absorbierte Energie pro durchlaufener Wegstrecke, Maß zur Beschreibung der Strahlenqualität.
M-FISH	Multicolor-FISH, auf Filtern basierende Methode zur Analyse von Vielfarben-FISH (siehe Kapitel 3.1.2).
MMU	<i>Mus musculus</i> , Hausmaus
MSP	<i>Mus spretus</i> , Feldmaus
Nick Translation	Enzymatische Methode zur DNS-Markierung. DNA Pol I setzt einen Schnitt als Startpunkt. Von diesem ausgehend kann ein Strang der doppelsträngigen DNS abgebaut und neu synthetisiert werden. Durch Einsetzen fluoreszierender Nukleotide wird der neusynthetisierte Strang markiert.
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion. Enzymatische Reaktion um DNS-Sequenzen zu vervielfachen durch Zyklen von Denaturierung, Anlagerung von Primern und Verlängerung mit DNA-Polymerase I.
Primer	Kurze Sequenz, die mit DNS paart und ein freies 3'-OH-Ende zur Verfügung stellt, an dem die Polymerase starten und eine DNS-Kette synthetisieren kann.
reziproke Translokation	Austausch von Stücken, DNS-Segmenten, zwischen nicht-homologen Chromosomen.
repetitive DNS	DNS, die als identische oder ähnliche Kopien mehrfach im Genom auftreten. Die Kopien können nacheinander wiederholt auftreten (Tandem) oder eingestreut vorkommen. Sie gehören in einer Reassoziaton zu den sich schnell wiedervereinigenden Sequenzen.
Satelliten-DNS	DNS-Fraktion, die bei der Aufspaltung im Dichtegradienten kleine Banden aufgrund der unüblichen Basenkomposition erzeugt. Die DNS setzt sich aus tandemartig aufeinanderfolgenden kurzen DNS-Sequenzen zusammen.

Single copy DNS	DNS, die nur einmal im Genom auftritt und die Gen-tragenden Sequenzen enthält.
SKY	Spectral Karyotyping, Spektrale Karyotypisierung, interfero-metrische Methode zur spektralen Analyse von Vielfarben-FISH (siehe Kapitel 3.1.2 und 4.5).
Telomer	Natürliches Ende eines Chromosom, bestehend aus einer einfachen, sich wiederholenden Sequenz, die sich am Ende zurückfaltet.
Translokation	Rearrangement eines Chromosomensegments, das durch einen Bruch an einer Stelle entfernt und zu einer anderen hinzuge-fügt wurde.
UPD	Uniparentale Disomie. Statt eines väterlichen und eines müt-terlichen Chromosoms stammen beide homologen Chromoso-men vom gleichen Elternteil ab.
YAC	Yeast Artificial Chromosome, künstliches Hefechromosom, das eine artfremde, z. B. menschliche, Sequenz trägt und zur Vervielfachung dieses Klons dient. (BAC: bacterial artifici-al chromosome, PAC, P1-derived artificial chromosome sind andere häufig verwendete Klonierungsvektoren.)

Literaturverzeichnis

- [1] D. G. Albertson, B. Ylstra, R. Seagraves, C. Collins, S. H. Dairkee, D. Kowbel, W. I. Kuo, J. W. Gray, and D. Pinkel. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nature Genetics*, 25:144–146, 2000.
- [2] T. Alper. Inactivation of bacteriophage after irradiation. *Br. J. Radiat.*, pages 50–54, 1954.
- [3] R. M. Anderson, S. J. Marsden, E. G. Wright, and M. A. Kadhim. Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-let alpha particles. *Int. J. Radiat. Biol.*
- [4] P. Avner, L. Amar, L. Dandolo, and J. L. Guenet. Genetic analysis of the mouse using interspecific crosses. *Trends in Genetics*, 4.
- [5] J. Azofeifa, C. Fauth, J. Kraus, C. Maierhofer, S. Langer, A. Bolzer, J. Reichman, S. Schuffenhauer, and M. R. Speicher. An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color-FISH. *Am. J. Hum. Genet.*, 66:1684–1688, 2000.
- [6] K. Baverstock, B. Egloff, A. Pinchera, C. Ruchti, and D. Williams. Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature*, 359:21–22, 1992.
- [7] M. Beier and J. D. Hoheisel. Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acid Research*, 27:1970–1977, 1999.
- [8] R. G. Best, D. Diamond, E. Crawford, F. S. Grass, C. Janish, T. L. Lear, D. Soensken, A. A. Szalay, and C. M. Moore. Baboon/human homologies examined by spectral karyotyping (SKY): a visual comparison. *Cytogenet. Cell Genet.*, 82:83–87, 1998.
- [9] A. Bolzer, J. M. Craig, T. Cremer, and M. R. Speicher. A complete set of repeat depleted, pcr-amplifiable human chromosome-specific painting probes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 84:233–240, 1999.

- [10] G. Borck, J. Wirth, T. Hardt, H. Tönnies, K. Brødum-Nielsen, M. Bugge, N. Tommerup, H.-G. Nothwang, H. H. Ropers, and T. Haaf. Molecular cytogenetic characterisation of a complex 46,XY,t(7;8;11;13) chromosome rearrangement in a patient with Moebius syndrom. *Journal of Medical Genetics*, 38:117–121, 2001.
- [11] S. D. Bouffler, E. I. Meijne, R. Huiskamp, and R. Cox. Chromosomal abnormalities in neutron-induced acute myeloid leukemias in CBA/H mice. *Radiat. Res.*, 146:349–352, 1996.
- [12] P. Bray-Ward, J. Menninger, J. Lieman, T. Desai, N. Mokady, A. Banks, and D. C. Ward. Integration of the cytogenetic, genetic and physical maps of the human genome by FISH mapping of CEPH-YAC clones. *Genomics*, 32:1–14, 1996.
- [13] R. J. Brennan and R. H. Schiestl. Persistent genomic instability in the yeast *saccharomyces cerevisiae* induced by ionizing radiation and DNA-damaging agents. *Rad. Res.*, 155:768–777, 2001.
- [14] T. Caspersson, S. Farber, G. E. Foley, J. Kudinowski, E. J. Modest, E. Simonsson, V. Wagh, and L. Zech. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research*, 49:219–222, 1968.
- [15] T. Caspersson, L. Zech, C. Johannson, and E. J. Modest. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma*, 30:215–227, 1970.
- [16] H. Cedar. DNA methylation and gene activity. *Cell*, 53:3–4, 1988.
- [17] W. P. Chang and J. B. Little. Delayed reproductive death in X-irradiated chinese hamster ovary cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 60:483–496, 1991.
- [18] W. P. Chang and J. B. Little. Delayed reproductive death as a dominant phenotype in cell clones surviving X-irradiation. *Carcinogenesis*, 13:923–928, 1992.
- [19] W. P. Chang and J. B. Little. Evidence that DNA double-strand breaks initiate the phenotype, that of delayed reproductive death in chinese hamster ovary cells. *Radiat. Res.*, 131:53–59, 1992.
- [20] Y. Chen, E. R. Dougherty, and M. L. Bittner. Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray images. *Journal of Biomedical Optics*, 2:364–374, 1997.
- [21] I. Chudoba, A. Plesch, T. Lörch, J. Lemke, U. Claussen, and G. Senger. High-resolution multicolor-banding a new technique for refined FISH analysis for human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 84:156–160, 1999.

- [22] J. M. Craig, J. Kraus, and T. Cremer. Removal of repetitive sequences from FISH probes using PCR-assisted affinity chromatography. *Hum. Genet.*, 100:472–476, 1997.
- [23] C. Desmaze, C. Alberti, L. Martins, G. Pottier, C. N. Sprung, J. P. Murnane, and L. Sabatier. The influence of interstitial telomeric sequences on chromosome instability in human cells. *Cytogenet. Cell Genet.*, 86:288–295, 1999.
- [24] A. Desphande, E. H. Goodwin, S. M. Bailey, B. L. Marrone, and B. E. Lehnert. Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target. *Radiat. Res.*, 145:260, 1996.
- [25] S. du Manoir, M. R. Speicher, S. Joos, E. Schröck, S. Popp, H. Döhner, G. Kovacs, M. Robert-Nicoud, P. Lichter, and T. Cremer. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Human Genetics*, 90:590–610, 1993.
- [26] Y. E. Dubrova, M. Plumb, J. Brown, J. Fenelly, P. Bois, D. T. Goodhead, and A. J. Jeffreys. Stage specificity, dose response and doubling dose for mouse minisatellite germ-line mutation induced by acute radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6251, 1988.
- [27] Y. E. Dubrova, M. Plumb, B. Gutierrez, E. Boulton, and A. J. Jeffreys. Transgenerational mutation by radiation. *Nature*, 405, May 2000.
- [28] R. Kanaar et al. Molecular mechanisms of DNA double stand break repair. *Trends Cell Biol.*, 8:483–489, 1998.
- [29] M. A. Ferguson-Smith. Genetic analysis by chromosome sorting and painting: Phylogenetic and diagnostic applications. *Eur. J. Hum. Genet.*, 5:253–265, 1997.
- [30] J. L. Fernandez, A. Campos, V. Goyanes, C. Losada, C. Veiras, and A. A. Edwards. X-ray biological dosimetry performed by selective painting of human chromosomes 1 and 2. *Int. J. Radiat. Biol.*, 67:295–302, 1995.
- [31] P. Finnon, D. C. Lloyd, and A. A. Edwards. Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68:429–435, 1995.
- [32] J. Flint, A. O. M. Wilkie, V. J. Buckle, R. M. Winter, A. J. Holland, and H. E. McDermid. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nature Genetics*, 9:132–140, 1995.

- [33] R. Fodde, J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J. H. van Es, C. Breukel, J. Wiegant, R. H. Giles, and H. Clevers. Mutations in the *apc* tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nature Cell Biology*, 3:433–438, 2001.
- [34] Y. Garini, N. Katzir, D. Cabib, R. A. Buckwald, D. Soensken, and Z. Malik. *Spectral-Bio-Imaging*, volume 137 of *Fluorescence imaging and microscopy*, chapter 4, pages 87–124. John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- [35] F. L. Gates. A study of the bactericidal action of ultraviolet light. III. the absorption of ultraviolet light by bacteria. *J. Gen. Physiol.*, 14:31–42, 1930.
- [36] D. H. Geschwind, J. Gregg, K. Boone, J. Karrim, A. Pawlikowska-Haddad, E. Rao, J. Ellison, A. Ciccodicola, M. D’Urso, R. Woods, G. A. Rappold, R. Swerdloff, and S. F. Nelson. Klinefelter’s syndrome as a model of anomalous cerebral laterality: testing gene dosage in the X chromosome pseudoautosomal region using a DNA microarray. *Developmental Genetics*, 23:215–229, 1998.
- [37] D. Gisselsson, L. Pettersson, M. Höglund, M. Heidenblad, L. Gorunova, J. Wiegant, F. Mertens, P. D. Chin, F. Mitelman, and N. Mandahl. Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:5357–5362, 2000.
- [38] L. Gorgojo and J. B. Little. Expression of lethal mutations in progeny of irradiated mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 55:619–630, 1989.
- [39] R. Greinert, J. Smida, E. W. Breitbart, and B. Volkmer. Möglichkeiten des Nachweises genetischer Instabilität in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des malignen Melanoms der Haut. GBS 2000 - Proceedings der 4. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung, 2000.
- [40] C. S. Griffin, S. J. Marsden, D. L. Stevens, P. Simpson, and J. R. K. Savage. Frequencies of complex chromosome exchange aberrations induced by 238-pu alpha-particles and detected by fluorescence *in situ* hybridization using single chromosome specific probes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 67:431–439, 1995.
- [41] X.-Y. Guan, P. S. Meltzer, and J. M. Trent. Rapid generation of whole chromosome painting probes by chromosome microdissection. *Genomics*, 22:101–107, 1994.
- [42] T. Haaf and P. Bray-Ward. Region-specific YAC banding and painting probes for comparative genome mapping: implications for the evolution of human chromosome 2. *Chromosoma*, 104:537–544, 1996.

- [43] K. Haefner and U. Striebeck. Radiation induced lethal sectoring in *Escherichia coli* B/r and Bs-1. *Mutat. Res.*, 4:399–407, 1967.
- [44] T. Hardt. Dosis-Effekt-Beziehungen für Translokationen nach Röntgenbestrahlung unter Anwendung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung. Diplomarbeit am Institut für Biophysik der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1996.
- [45] M. Harms-Ringdahl. Some aspects on radiation induced transmissible genomic instability. *Mutation Research*, 404:27–33, 1998.
- [46] K. Harper, S. A. Lorimore, and E. G. Wright. Delayed appearance of radiation induced mutations at the HPRT locus in murine hemopoietic cells. *Exp. Hematol.*, 25:263–269, 1997.
- [47] C. K. Hill, J. Holland, C. M. Chang-Liu, E. M. Buess, J. G. Peak, and M. J. Peak. Human epithelial teratocarcinoma cells (P3): Radiobiological characterization, DNA damage, and comparison with other rodent and human cell lines. *Radiation Research*, 113:278–288, 1988.
- [48] H. Himmelbauer, N. Wedemeyer, T. Haaf, E. E. Wanker, L. C. Schalwyk, and H. Lehrach. IRS-PCR-based genetic mapping of the huntingtin interacting protein gene (*HIP1*) on mouse chromosome 5. *Mammalian Genome*, 9:26–31, 1998.
- [49] N. J. Holbrook and A. J. Fornace. Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biologist*, 3:825–833, 1991.
- [50] E. Holinski-Feder, E. Reyniers, S. Uhrig, A. Golla, J. Wauters, P. Kroisel, P. Bossuyt, I. Rost, K. Jedele, H. Zierler, S. Schwab, D. Wildenauer, M. R. Speicher, P. J. Willems, T. Meitinger, and R. R. Kooy. Familial mental retardation syndrome ATR-16 due to an inherited cryptic subtelomeric translocation, t(3;16)(q29;p13.3). *Am. J. Hum. Genet.*, 66:16–25, 2000.
- [51] K. Holmberg, S. Fält, A. Johansson, and B. Lambert. Clonal chromosome aberrations and genomic instability in X-irradiated human t-lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 286:321–330, 1993.
- [52] K. Holmberg, A. E. Meijer, G. Auer, and B. Lambert. Delayed chromosomal instability in human t-lymphocyte clones exposed to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68:245–255, 1995.
- [53] E. Huberman, C. K. McKeowan, C. A. Jones, D. R. Hoffman, and S. Murao. Induction of mutations by chemical agents at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in human epithelial teratoma cells. *Mutat. Res.*, 130:127–137, 1984.

- [54] Applied Spectral Imaging. Schematic optical diagram. www.applied-spectral-imaging.com.
- [55] J.-P. Issa, S. B. Baylin, and S. A. Belinsky. Methylation of the estrogen receptor CpG island distinguishes spontaneous and plutonium-induced tumors from NNK-induced lung tumours in rodents. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 36:537, 1995.
- [56] M. Jamali and K. R. Trott. Persistent increase in the rates of apoptosis and dicentric chromosomes in surviving V79 cells after X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 70:705–709, 1996.
- [57] C. Johannes, I. Chudoba, and G. Obe. Analysis of X-ray-induced aberrations in human chromosome 5 using high-resolution multicolor banding FISH (mBAND). *Chromosome Research*, 7:625–633, 1999.
- [58] S. Joos, H. Schertan, M. R. Speicher, J. Schlegel, T. Cremer, and P. Lichter. Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using tumor DNA as probe. *Hum Genet*, 90:584–589, 1993.
- [59] M. A. Kadhim, S. A. Lorimore, M. D. Hepburn, D. T. Goodhead, V. J. Buckle, and E. G. Wright. Particle induced chromosomal instability in human bone marrow cells. *Lancet*, 344:987, 1994.
- [60] M. A. Kadhim, S. A. Lorimore, K. M. Townsend, D. T. Goodhead, V. J. Buckle, and E. G. Wright. Radiation induced genomic instability: delayed cytogenetic aberrations and apoptosis in primary human bone marrow cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 67:287–293, 1995.
- [61] M. A. Kadhim, D. A. MacDonald, D. T. Goodhead, S. A. Lorimore, S. J. Marsden, and E. G. Wright. Transmission of chromosomal instability after plutonium α -particle irradiation. *Nature*, 355:738–740, 1992.
- [62] M. A. Kadhim, S. J. Marsden, and E. G. Wright. Radiation induced chromosomal instability in human fibroblasts: temporal effects and the influence of radiation quality. *Int. J. Radiat. Bio.*, 73:143, 1998.
- [63] A. Kallioniemi, O.-P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J. W. Gray, F. Waldman, and D. Pinkel. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258:818–821, 1992.
- [64] Y. Kano and J. B. Little. Mechanisms of human cell neoplastic transformation: X-ray induced abnormal clone formation in long-term cultures of human diploid fibroblasts. *Cancer Res.*, 45:2550–2555, 1985.
- [65] M. I. Kaplan and W. F. Morgan. The nucleus is the target for radiation-induced chromosomal instability. *Radiation Research*, 150:382–390, 1998.

- [66] M. Karin. Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:415–424, 1994.
- [67] U. S. Kazakov, E. P. Demichik, and L. N. Astakhova. Thyroid cancer after chernobyl. *Nature*, 359:21, 1992.
- [68] A. R. Kennedy, M. Fox, G. Murphy, and J. B. Little. Relation between X-ray exposure and malignant transformation in C3H 10T1/2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:7262, 1980.
- [69] I. Keshet, J. Yisraeli, and H. Cedar. Effect of regional DNA methylation on gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:2560–2564, 1985.
- [70] Jürgen Kiefer. *Biologische Strahlenwirkung*. Birkhäuser Verlag, second edition, 1989.
- [71] S. L. Knight, C. M. Lese, K. S. Precht, J. Kuc, Y. Ning, S. Lucas, R. Regan, M. Brenan, A. Nicod, N. M. Lawrie, D. L. N. Cardy, H. Nguyen, T. J. Hudson, H. C. Riethman, D. H. Ledbetter, and J. Flint. An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am. J. Hum. Genet.*, 67:320–332, 2000.
- [72] M. Kophlpoth. Untersuchung zur Mutationsinduktion durch ^{60}Co -Gamma-Strahlung. Dissertation am Institut für Biophysik am Strahlenzentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- [73] J. Kraus, R. G. Weber, M. Cremer, T. Seebacher, C. Fischer, C. Schurra, A. Jauch, P. Lichter, and A. Bensimon. High-resolution comparative hybridization to combed DNA fibers. *Hum. Genet.*, 99:374–380, 1997.
- [74] A. Kronenberg. Radiation-induced genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.*, 66:603–609, 1994.
- [75] U. Landegren, M. Nilsson, and P. Y. Kwok. Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.*, 8:769–776, 1998.
- [76] P. R. Langer, A. A. Waldrop, and D. C. Ward. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:6633–6637, 1981.
- [77] C. Lengauer, H. C. Riethman, M. R. Speicher, M. Taniwaki, D. Konecki, E. D. Green, R. Becher, M. V. Olson, and T. Cremer. Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf, c-fms and c-erbB-2. *Cancer Res.*, 52:2590–2596, 1992.

- [78] C. Lengauer, M. R. Speicher, S. Popp, A. Jauch, M. Taniwaki, R. Nagaraja, H. C. Riethman, H. Donis-Keller, M. D'Urso, D. Schlessinger, and T. Cremer. Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence *in situ* hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Human Molecular Genetics*, 2:505–512, 1993.
- [79] P. Lichter, T. Cremer, J. Borden, L. Manuelidis, and D. C. Ward. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.*, 80:224–234, 1988.
- [80] P. Lichter, C.-J. C. Tang, K. Call, G. Hermanson, G. A. Evans, D. Housman, and D. C. Ward. High-resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones. *Science*, 24:64–69, 1990.
- [81] A. B. Limoli, B. Ponnaiya, J. J. Corcoran, and E. Giedzinski. Genomic instability induced by high and low let ionizing radiation. *Adv. Space Res.*, 25:2107–2117, 2000.
- [82] A. B. Limoli, B. Ponnaiya, J. J. Corcoran, E. Giedzinski, and W. F. Morgan. Genomic instability induced by heavy ion irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 76:1599–1606, 2000.
- [83] C. L. Limoli, J. J. Corcoran, J. R. Milligan, J. F. Ward, and W. F. Morgan. Critical target and dose and dose-rate response for the induction of chromosomal instability by ionizing radiation. *Radiation Research*, 151:677–685, 1999.
- [84] C. L. Limoli, J. P. Day, J. F. Ward, and W. F. Morgan. Induction of chromosome aberrations and delayed genomic instability by photochemical processes. *Photochemistry and Photobiology*, 67:233–238, 1998.
- [85] C. L. Limoli, M. I. Kaplan, J. Corcoran, M. Meyers, D. A. Boothman, and W. F. Morgan. Chromosomal instability and its relationship to other endpoints of genomic instability. *Cancer Res.*, 57:5557–5563, 1997.
- [86] C. L. Limoli, M. I. Kaplan, J. W. Phillips, G. M. Adair, and W. F. Morgan. Differential induction of chromosomal instability by DNA-strand breaking agents. *Cancer Res.*, 57:4048–4056, 1997.
- [87] N. A. Lisitsyn. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *Trends in Genetics*, 11:303–307, 1995.
- [88] J. B. Little. Radiation induced genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74(6):663–671, 1998.

- [89] J. B. Little, H. Nagasawa, T. Pfenning, and H. Vetrovs. Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenetic effects of X-rays and α -particles. *Radiation Research*, 148:299–307, 1997.
- [90] S. A. Lorimore, M. A. Kadhim, D. A. Pocock, D. Papworth, D. L. Stevens, D. T. Goodhead, and E. G. Wright. Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:5730, 1998.
- [91] J. N. Lucas, A. Awa, T. Straume, M. Poggensee, Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, H.-U. Weier, D. Pinkel, J. Gray, and G. Littlefield. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62:53–63, 1992.
- [92] J. N. Lucas, F. S. Hill, A. M. Chen, and C. E. Burk. A rapid method for measuring pericentric inversions using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Int. J. Radiat. Biol.*, 71:29–33, 1997.
- [93] J. N. Lucas, M. Poggensee, and T. Straume. The persistence of chromosome translocations in a radiation worker accidentally exposed to tritium. *Cytogenet. Cell Genet.*, 60:255–256, 1992.
- [94] C. Lundsteen, J. Maahr, B. Christensen, T. Bryndorf, M. Bentz, P. Lichter, and T. Geerdes. Image analysis in comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 19:42–50, 1995.
- [95] E. Maier, S. Meier-Ewert, A. R. Ahmadi, J. Curtis, and H. Lehrach. Application of robotic technology to automated sequence fingerprint analysis by oligonucleotide hybridization. *J. Biotechnol.*, 35:191–203, 1994.
- [96] Z. Malik, D. Cabib, R. A. Buckwald, A. Talmi, and Y. Garini S. G. Lipson. Fourier transform multipixel spectroscopy for quantitative cytology. *Journal of Microscopy*, 182:133–140, 1996.
- [97] L. Manti, M. Jamali, K. M. Prise, B. D. Michael, and K. R. Trott. Genomic instability in chinese hamster cells after exposure to X-rays or alpha-particles of different mean linear energy transfer. *Radiation Research*, 147:22–28, 1997.
- [98] B. A. Marder and W. F. Morgan. Delayed chromosomal instability induced by DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 13:6667–6677, 1993.
- [99] M. B. Martins, L. Sabatier, M. Ricoul, A. Pinton, and B. Dutrillaux. Specific chromosome instability induced by heavy ions: a step towards transformation of human fibroblasts? *Mutat. Res.*, 285:229–237, 1993.

- [100] Y. Matsuda and V. M. Chapman. In situ analysis of centromeric satellite DNA segregating in *mus* species crosses. *Mammalian Genome*, 1:71–77, 1991.
- [101] B. McClintock. *Genetics*, 26:243–282, 1940.
- [102] M. S. Mendoca, R. J. Antoniono, and J. L. Redpath. Delayed heritable damage and epigenetics in radiation induced neoplastic transformation of human hybrid cells. *Rad. Res.*, 134:209–216, 1993.
- [103] M. S. Mendoca, W. Kurohara, R. Antoniono, and J. L. Redpath. Plating efficiency as a function of time postirradiation: evidence for the delayed expression of lethal mutations. *Rad. Res.*, 119:387–393, 1989.
- [104] S. Müller, M. Rocchi, M. A. Ferguson-Smith, and J. Wienberg. Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 100:271–278, 1997.
- [105] C. Mothersill, M. A. Kadhim, S. O’Reilly, D. Papworth, S. J. Marsden, C. B. Seymour, and E. G. Wright. Dose and time-response relationships for lethal mutations and chromosomal instability induced by ionizing radiation in an immortalized human keratinocyte cell line. *Int. J. Radiat. Biol.*, 76:799–806, 2000.
- [106] C. Mothersill and C. Seymour. Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Rad. Res.*, 155:759–767, 2001.
- [107] J. P. Murnane. The role of combinational hotspots in genome instability in mammalian cells. *BioEssay*, 12:577–581, 1990.
- [108] J. P. Murnane. Role of induced genetic instability in the mutagenic effects of chemicals and radiation. *Mutation Research*, 367:11–23, 1996.
- [109] A. T. Natarajan, J. J. W. A. Boei, S. Vermeulen, and A. S. Balajee. Frequencies of X-ray induced pericentric inversions and centric rings in human lymphocytes detected by FISH using chromosome arm specific DNA libraries. *Mutation Research*, 372:1–7, 1996.
- [110] A. T. Natarajan, G. Obe, A. A. V. Zeeland, F. Palitti, and M. Meijers. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations: II. utilizations of *neurospora* endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle. *Mutat. Res.*, 69:293–305, 1980.
- [111] A. H. W. Nias, C. W. Gilbert, L. G. Lajtha, and C. S. Lange. Clone-size analysis in the study of cell growth following single or during continuous irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 9:275–290, 1965.

- [112] M. N. Nikiforova, J. R. Stringer, R. Blough, M. Medvedovic, J. A. Fagin, and Y. E. Nikiforov. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science*, 290:138–141, 2000.
- [113] P. E. Nisson, P. C. Watkins, and A. Boyle. Efficient mapping of mouse clones using mouse cot-1 DNA. *Focus*, 14:119–122, 1992.
- [114] C. L. O’Keefe, P. E. Warburton, and A. G. Matera. Oligonucleotide probes for alpha satellite DNA variants can distinguish homologous chromosomes by FISH. *Hum. mol. Genet.*, 5:1793–1799, 1996.
- [115] S. Pampfer and C. Streffer. Increased chromosome aberration levels in cells from mouse fetuses after zygote x-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 55:85, 1989.
- [116] B. Paquette and J. B. Little. *In vivo* enhancement of genomic instability in minisatellite sequences of mouse C3H/10T1/2 cells transformed *in vitro* by X-rays. *Cancer. Res.*, 54:3173, 1994.
- [117] M. L. Pardue and J. G. Gall. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 64:600–604, 1969.
- [118] F. Parente, P. Gaudray, G. F. Carle, and C. Turc-Carel. Experimental assessment of the detection limit of genomic amplification by comparative genomic hybridization cgh. *Cytogenet Cell Genet*, 78:65–68, 1997.
- [119] A. C. Pease, D. Solas, E.-J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holmes, and S. P. A. Fodor. Light-generated oligonucleotide-arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:5022–5026, 1994.
- [120] D. Pinkel, C. Landegent, C. Collins, J. Fuscoe, R. Segraves, J. Lucas, and J. Gray. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome specific libraries: detection of trisomie 21 and translocations of human chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:9138–9142, 1988.
- [121] D. Pinkel, R. Segraves, D. Sudar, S. Clark, I. Poole, D. Knowbel, C. Collins, W.-L. Kuo, C. Chen, Y. Zhai, S. H. Dairkee, B.-M. Ljung, J. W. Gray, and D. G. Albertson. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics*, 20:207–211, 1998.
- [122] J. Piper, D. Rutovitz, D. Sudar, A. Kallioniemi, O.-P. Kallioniemi, F. M. Waldmann, J. W. Gray, and D. Pinkel. Computer image analyses of comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 19:10–26, 1995.

- [123] J. R. Pollack, C. M. Perou, A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. S. Jeffrey, D. Botstein, and P. O. Brown. Genome-wide analysis of DNA copy number changes using cDNA microarrays. *Nature Genetics*, 23:41–46, 1999.
- [124] B. Ponnaiya, M. N. Cornforth, and R. L. Ullrich. Induction of chromosomal instability in human mammary cells by neutrons and gamma rays. *Radiat. Res.*, 147:288, 1997.
- [125] B. Ponnaiya, M. N. Cornforth, and R. L. Ullrich. Radiation induced chromosomal instability in BALB/C and C57BL/6 mice: the difference is as clear as black and white. *Radiat. Res.*, 147:121, 1997.
- [126] L. Sabatier, B. Dutrillaux, and M. B. Martins. Chromosomal instability. *Nature*, 357:548, 1992.
- [127] S. Saccone, A. De Sario, G. Della Valle, and G. Bernardi. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4913–4917, 1992.
- [128] R. K. Sachs, L. R. Hlatky, and B. J. Trask. Radiation-produced chromosome aberrations - colorful clues. *Trends in Genetics*, 16(4):143–146, 2000.
- [129] S. Sadamoto, S. Suzuki, K. Kamiya, R. Kominami, K. Dohi, and O. Niwa. Radiation induction of germline mutation at a hypervariable mouse minisatellite locus. *Int. J. Radiat. Biol.*, 65:459, 1994.
- [130] K. Salassidis, V. Georgiadou-Schumacher, H. Braselman, P. Müller, R. U. Peter, and M. Bauchinger. Chromosome painting in highly irradiated chernobyl victims: a follow-up study to evaluate the stability of symmetrical translocations and the influence of clonal aberrations for retrospective dose estimation. *Int. J. Radiat. Res.*, 68:257–262, 1995.
- [131] K. Salassidis, E. Schmid, H. Braselman, and M. Bauchinger. Dicentric and translocation analysis for retrospective dose estimation in humans exposed to ionizing radiation during the chernobyl nuclear power plant accident. *Mutation Research*, 311:39–48, 1994.
- [132] J. R. Savage. A brief survey of aberration origin theories. *Mutat. Res.*, 404:139–147, 1998.
- [133] E. Schmid, H. Zitzelsberger, H. Braselman, J. W. Gray, and M. Bauchinger. Radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62:673–678, 1992.

- [134] E. Schröck, S. du Manoir, T. Veldman, B. Schoell, J. Wienberg, M. A. Ferguson-Smith, Y. Ning, D. H. Ledbetter, I. Bar-Am, D. Soenken, Y. Garrini, and T. Ried. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273:494–497, 1996.
- [135] E. Schröck, T. Veldman, H. Padilla-Nash, Y. Ning, J. Spurbeck, S. Jalal, L. G. Shaffer, P. Papenhausen, C. Kozma, M. C. Phela, E. Kjeldsen, S. A. Schonberg, P. O'Brien, L. Biesecker, S. du Manoir, and T. Ried. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum. Genet.*, 101:255–262, 1997.
- [136] T. Schwarzacher, A. R. Leitch, M. D. Bennet, and J. S. Heslop-Harrison. In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann. Bot.*, 64:315–324, 1989.
- [137] C. S. Selvanayagam, C. M. Davis, M. N. Cornforth, and R. L. Ullrich. Latent expression of *p53* mutations and radiation-induced mammary cancer. *Cancer Research*, 55:3310–3317, 1995.
- [138] C. B. Seymour, C. Mothershill, and T. Alper. High yields of lethal mutations in somatic mammalian cells that survive ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 50:161–179, 1986.
- [139] D. Shalon, S. J. Smith, and P. O. Brown. A DNA micorarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research*, 6:639–645, 1996.
- [140] L. M. Silver. *Mouse Genetics*. Oxford University Press, New York, 1995.
- [141] W. K. Sinclair. X-ray induced heritable damage (small-colony formation) in cultured mammalian cells. *Radiat. Res.*, 21:584–611, 1964.
- [142] S. Solinas-Toldo, S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Brenner, H. Döhner, T. Cremer, and P. Lichter. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 20:399–407, 1997.
- [143] M. R. Speicher, S. G. Ballard, and D. C. Ward. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics*, 12:368–375, 1996.
- [144] T. Straume, R. G. Lanlois, J. Lucas, R. H. Jensen, and W. L. Bigbee. Novel biodosimetry methods applied to victims of the Goiana accident. *Health Physics*, 60:71–76, 1991.

- [145] N. Takahashi and M. S. H. Ko. The short 3'-end of complementary DNAs as PCR-based polymorphic markers for an expression map of the mouse genome. *Genomics*, 16:161–168, 1993.
- [146] H. J. Tanke, J. Wiegant, R. P. M. van Gijlswijk, V. Bezrokoove, H. Pat-tenier, R. J. Heetebrij, E. G. Talman, and A. K. Raap. New strategy for multi-color fluorescence *in situ* hybridization: COBRA: COmbined Binary RAtio labelling. *European Journal of Human Genetics*, 7:2–11, 1999.
- [147] B. Taylor. *Arch. Biochem. Biophys.*, pages 19–31, 1948.
- [148] H. Telenius, N. P. Carter, C. E. Bebb, M. Nordenskjöld, B. A. Ponder, and A. Tunnacliffe. Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR. General amplifi-cation of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13:718–725, 1992.
- [149] J. D. Tucker, D. A. Lee, and D. H. Moore. Validation of chromosome painting II. A detailed analysis of aberrations following high dosis of ionizing radiation *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.*, 67:19–28, 1995.
- [150] J. D. Tucker, M. J. Ramsey, D. A. Lee, and J. L. Minkler. Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.*, 64:27–37, 1993.
- [151] J. D. Tucker, E. J. Tawn, D. Holdsworth, S. Morris, R. Langlois, M. J. Ramsey, P. Kato, J. D. Bois Jr. R. E. Tarone, and R. H. Jensen. Biological dosimetry of radiation workers at the Sellafield nuclear facility. *Radiation Research*, 148:216–226, 1997.
- [152] S. Uhrig, S. Schuffenhauer, C. Fauth, A. Wirtz, C. Daumer-Haas, C. Apa-cik, M. Cohen, J. Müller-Navia, T. Cremer, J. Murken, and M. R. Spei-cher. Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am. J. Hum. Genet.*, 65:448–462, 1999.
- [153] R. L. Ullrich and B. Ponnaiya. Radiation-induced instability and its relation to radiation carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74:747–754, 1998.
- [154] T. Veldman, C. Vignon, E. Schröck, J. D. Rowley, and T. Ried. Hiden chro-mosome abnormalities in haematological malignancies detected by multico-lor spectral karyotyping. *Nature Genetics*, 15:406–410, 1997.
- [155] M. Vooijs, L.-C. Yu, D. Dhachuk, D. Pinkel, D. Johnson, and J. W. Gray. Libraries for each human chromosome, constructed from sorter-enriched chromosomes by using linker-adaptor PCR. *Am. J. Human. Genet.*, 52:586–597, 1993.

- [156] D. G. Wang, J. B. Fan, C. J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Gruglyack, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, and E. S. Lander. Large scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280:1077–1082, 1998.
- [157] G. E. Watson, S. A. Lorimore, S. M. Clutton, M. A. Kadhim, and E. G. Wright. Genetic factors influencing α -particle-induced chromosomal instability. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71:497, 1997.
- [158] G. E. Watson, S. A. Lorimore, and E. G. Wright. Long term in vivo transmission of alpha-particle induced chromosomal instability in murine haemopoietic cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 69:175, 1996.
- [159] U. Weissenborn and C. Streffer. The one-cell mouse embryo: cell cycle dependent radiosensitivity and the development of chromosomal anomalies in postradiation cell cycles. *Int. J. Radiat. Biol.*, 54:659–674, 1988.
- [160] A. Westra and G. W. Barendsen. Proliferation characteristics of cultured mammalian cells after irradiation with sparsely and densely ionizing radiations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 11:477–485, 1966.
- [161] J. Wiegant, V. Bezrookove, C. Rosenberg, H. J. Tanke, A. K. Raap, H. Zhang, M. Bittner, J. M. Trent, and P. Meltzer. Differentially painting human chromosome arms with combined binary ratio-labelling fluorescence in situ hybridization. *Genome Research*, 10:861–865, 2000.
- [162] L. M. Wiley, J. E. Baulch, O. G. Raabe, and T. Straume. Impaired cell proliferation in mice persists across at least two generations after paternal irradiation. *Radiat. Res.*, 148:145–151, 1997.
- [163] J. Wirth, H.-G. Nothwang, S. van der Maarel, C. Menzel, G. Borck, I. Lopez-Pajares, K. Brødum-Nielsen, M. Mugge, H.-H. Ropers, and T. Haaf. Systematic characterisation of disease associated balanced chromosome rearrangements by FISH: cytogenetically anchored YACs identify microdeletions and candidate regions for mental retardation genes. *Med. Genet.*, 36:271–278, 1999.
- [164] J. J. Yunis. High resolution mapping of human chromosomes. *Science*, 191:1268–1270, 1976.
- [165] R. Zaire, M. Notter, W. Riedel, and E. Thiel. Unexpected rates of chromosomal instability and alterations of hormone levels in namibian uranium miners. *Radiation Research*, 147:569–584, 1997.

- [166] H. Zitzelsberger, L. Lehmann, L. Hieber, H.-U. Weier, C. Janish, J. Fung, T. Negele, F. Spelsberg, E. Lengfelder, E. P. Demidchik, K. Salassidis, A. M. Kellerer, M. Werner, and M. Bauchinger. Cytogenetic changes in radiation-induced tumors of the thyroid. *Cancer Research*, 58:135–140, 1999.

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Jürgen Kiefer danken, daß er die Betreuung der Arbeit an der Uni in Giessen begeistert übernommen hat, die Arbeit am MPI stets unterstützte und für Diskussionen immer offen war.

Besonders danken möchte ich Priv. Doz. Dr. Thomas Haaf für die intensive Betreuung der Arbeit am MPI in Berlin und für das Einbringen seiner zahlreichen Ideen, die diese Arbeit voran gebracht haben, sowie für seine Vorschläge bei der Korrektur der Arbeit.

Vielen Dank an Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers, der es mir ermöglichte, in seiner Abteilung die Arbeit durchzuführen und mich in unterschiedliche moderne Methoden einzuarbeiten.

Vielen Dank an Dr. Michael Köhler, das gesamte ASI-Team, sowie an Dr. Evelin Schröck die über die anfänglichen Schwierigkeiten hinweg halfen, indem sie immer ansprechbar waren, wenn es Probleme mit dem SpectraCube gab und stets einen freundschaftlichen Rat parat hatten.

Danken möchte ich Dr. Wolfgang Mann, der mich in die Arbeit mit Microarrays einführte und mit viel Humor zu einer angenehmen Atmosphäre und Freude am Arbeiten beitrug.

Danke an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe der Biophysik in Giessen, insbesondere Dr. Frank Gutermuth, Petra Beppler-Kranert und Helga Schneider, die mich mit den bestrahlten Klonen versorgten und das Bestrahlungsexperiment durchführten.

Für eine gute Zusammenarbeit danke ich Dr. Ulrike Nuber und der gesamten Arraygruppe, bei denen ich wegen jeder Kleinigkeit vorbeikommen konnte.

Danke an die gesamte FISH-Gruppe und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung, die für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben; besonderer Dank gilt Susanne Freier, Corinna Menzel, Lisa Rießelmann für ihre stete Hilfsbereitschaft, sowie Karen Stout, die mein Englisch trainierte und eine große Unterstützung beim Auswerten der bestrahlten Klone war.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die während der ganzen Zeit immer für mich da waren.

Hiermit versichere ich, daß ich die Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.