

Multiphotonen Multicolor Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung

**Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich- Schiller- Universität Jena**

**von Axel Göhlert
geboren am 12.11.1974 in Dessau**

1. Gutachter: PD Dr. K. König
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Claussen
3. Gutachter: Prof. Dr. M. Speicher

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.04.2002

**Der Moralität geht der Zwang voraus,
ja sie selber ist noch eine Zeitlang Zwang,
dem man, sich zur Vermeidung der Unlust, fügt.
Später wird sie Sitte, noch später freier Gehorsam,
endlich beinahe Instinkt: Dann ist sie wie alles
lang Gewöhnte und Natürliche mit Lust
verknüpft – und heißt nun Tugend.**

Friedrich Nietzsche

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	In <i>situ</i> Hybridisierung	2
1.2	Fluoreszenz in <i>situ</i> Hybridisierung (FISH)	3
1.3	Multicolor- FISH	6
1.4	Fluoreszenzanregung	7
1.4.1	Einphotonen Fluoreszenzanregung	7
1.4.2	Multiphotonen Fluoreszenzanregung	9
1.5	Zielsetzung und Aufgabenstellung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	DNA Sonden	14
2.1.1	Kommerzielle Sonden	14
2.1.2	Eigens markierte Sonden	14
2.1.2.1	PCR	14
2.1.2.2	Fällen, trocknen und resuspendieren der DNA Sonden	16
2.1.3	Verwendete Mengen der Sonden	17
2.1.4	Denaturierung und Prähybridisierung	17
2.2	Fluoreszenz in <i>situ</i> Hybridisierung an Metaphasen	18
2.2.1	Herstellung der Lymphozytensuspension	18
2.2.2	Herstellung der in <i>situ</i> Präparate	18
2.2.2.1	Vorbehandlung der Objektträger	19
2.2.2.2	Auftropfen der Lymphozytensuspension	19
2.2.3	Proteinase- Vorbehandlung und Nachfixierung	19
2.2.4	Denaturierung	20
2.2.5	Hybridisierung	21
2.2.6	Posthybridisierungswaschen	21
2.2.7	Proben Detektion	22
2.3	FISH an unkultivierten Amniozyten	23
2.3.1	Präparation von unkultivierten Fruchtwasserzellen	23
2.3.2	Herstellung der Fruchtwasser in <i>situ</i> Präparate	24
2.3.3	Denaturierung, Hybridisierung, Posthybridisierungswaschen und Detektion der Fruchtwasserkerne	24
2.4	FISH am Kryostatschnitt	24
2.4.1	Silanisierung der Objektträger	25
2.4.2	Schneiden des Gewebes	25
2.4.3	Gewebsfixierung	25
2.4.4	Proteinasevorbehandlung	26
2.4.5	Denaturierung, Hybridisierung und Posthybridisierungswaschen	26
2.5	Multiphotonen- Mikroskop	26
2.6	Auswertung am Laser Scannig Mikroskop	27
2.7	Zeitaufgelöstes Messen von Fluoreszenzen	29
2.8	Überprüfung der Zwei- Photonen- Anregung	29
2.9	Bestimmung des Ausbleichverhaltens von SpektrumOrange	30
2.10	Lösungen und Chemikalien	30
2.11	Biologisches Material	32
2.12	Technische Ausrüstung	33

3	Ergebnisse	35
3.1	Multiphotonen- Anregung von FISH- Fluorophoren	35
3.1.1	Anregbarkeit der verwendeten Fluorophore	35
3.1.2	Anregung von DAPI	39
3.1.3	Anregung von Cyanin5	40
3.1.4	Ausbleichverhalten der Fluorophore	41
3.1.5	Auftrennbarkeit der Emissionen	44
3.2	Exogen verursachte Eigenfluoreszenz	46
3.3	Multiphotonen- Multicolor- FISH an Metaphasen	49
3.4	3D Multiphotonen- Multicolor- FISH am Fruchtwasserkern	53
3.5	3D Multiphotonen- Multicolor- FISH am Gewebsschnitt	59
3.6	Einzelmolekül- Detektion	64
3.6.1	Detektion von Subtelomersonden	64
3.6.2	Detektion einer <i>bcr- abl</i> Sonde auf einem DNA- Faden	66
3.7	FISH- Fluorophor- Abklingkurven	68
4	Diskussion	70
4.1	Bedeutung der MM- FISH	70
4.2	Einsatzgebiete der MM- FISH in der Zytogenetik	76
4.3	Diagnostik am Gewebsschnitt	77
4.4	Zukunftsansichten	78
5	Zusammenfassung	79
6	Literatur	81
7	Abkürzungen	92
7.1	Abkürzungen von Fachausdrücken	92
7.2	Abkürzungen von Einheiten	93
7.3	Vorsätze bei Größeneinheiten	94
8	Danksagung	95
9	Lebenslauf	97
10	Ehrenwörtliche Erklärung	98

1 Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist das neuartige Verfahren Multiphotonen Multicolor Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung (MM- FISH). Das Verfahren basiert auf einer Kombination der Multiphotonen- Lasermikroskopie mit der etablierten Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung.

Die Multiphotonen- Lasermikroskopie wurde durch Denk et al. 1990 in der Grundlagenforschung etabliert. Sie stellt eine neuartige 3 dimensionale Mikroskopie auf der Basis von nahinfraroten Laserpulsen dar. Durch die Arbeitsgruppe Lasermikroskopie der Anatomie/ Anatomie II der FSU erfolgte erstmalig eine Ausdehnung der Multiphotonen Lasermikroskopie auf die Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung (FISH).

Die Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung ist ein weitverbreitete Methode zum Nachweis von DNA- oder RNA- Sequenzen. In weiten Teilen der Grundlagenforschung hat sich die FISH als eine einfache und zuverlässige Methode durchgesetzt. Als Ergänzung zur konventionellen Zytogenetik ist sie eine tragende Säule der medizinischen Diagnostik. Die FISH gehört zu den Methoden, welche im Rahmen der zunehmenden Bedeutung der Genetik einen immer größeren Stellenwert erlangen werden.

Diese Arbeit stellt die Grundzüge beider Methoden vor. Die ersten Applikationen des Verfahrens MM- FISH werden vorgestellt. Es erfolgt eine Beschreibung von Multicolor- Hybridisierungen an Metaphasen, Interphasekernen und einem Gewebsschnitt nach Multiphotonen- Anregung. Die 3 dimensional Darstellung von Zellstrukturen konnte mit einer Submikrometer- Auflösung demonstriert werden.

Durch Verbindung beider Methoden erweitert sich das Einsatzgebiet der FISH. Es werden Grenzen, aber auch zukunftsweisende Möglichkeiten aufgezeigt, welche durch die Kombination von Multiphotonenmikroskopie und FISH entstehen können.

1.1 In *situ* Hybridisierung

Seit Ende der 60iger Jahre ist es möglich DNA oder RNA nachzuweisen, ohne sie aus ihrem histologischen, zytologischen oder chromosomalen Kontext heraus zu lösen [in *situ*] (Luke und Shepelsky, 1998).

Zwei komplementäre DNA- Sequenzen werden durch Wasserstoffbrückenbindungen in einem stabilen Doppelstrang fixiert (Buddeke, 1989). Eine Denaturierung, d.h. das Auflösen dieser Wasserstoffbrückenbindungen, erfolgt durch hohe Temperaturen, einem hohen Formamidgehalt, Veränderungen des pH- Wertes und niedrige Salzkonzentrationen (Ramesh et al., 1997; Casey und Davidson., 1977; Schildkraut, 1965). Werden die Faktoren, welche für die Denaturierung Voraussetzung waren, dahingehend verändert, dass die Ausgangsbedingungen wieder vorherrschen, kann eine Renaturierung erfolgen (Wetmur, 1976). Die Renaturierung bedeutet die Bildung von Doppelsträngen aus zwei komplementären DNA- oder (und) RNA- Sequenzen. Markierte RNA- Sequenzen können auch mit fixierten DNA- Sequenzen stabile Doppelstränge bilden. Diese nicht natürlichen Doppelstränge werden als Hybride [Hybrid – gemischt, von zweierlei Herkunft (Pschyrembel, 1994)] bezeichnet. Ist eine der an der Hybridisierung beteiligten Sequenzen markiert, kann durch Detektion dieser Markierung nach erfolgter Hybridisierung die komplementäre spezifische Sequenz nachgewiesen werden. Diese Methode zum Nachweis von DNA oder RNA wird als in *situ* Hybridisierung bezeichnet.

Die Entwicklung dieser Technik begann im Jahre 1969 durch John et al. sowie Gall und Pardure. Beide Arbeitsgruppen arbeiteten unabhängig voneinander mit repetitiven tRNA Sequenzen. Sie markierten in *vivo* RNA mit Tritium [Wasserstoffisotop ^3H , β -Strahler, Halbwertszeit $\tau = 12,3$ Jahre (dtv Lexikon 1990)]. Die Pioniere der in *situ* Hybridisierung beobachteten, dass einzelsträngige RNA mit der komplementären einzelsträngigen DNA stabile Doppelstränge bilden können (John et al., 1969, Gall und Pardure, 1969). Durch gezieltes Reinigen (Posthybridisierungswaschen) verblieb nur die markierte RNA, welche mit der fixierten DNA stabile Doppelstränge gebildet hatte. Mit der Detektion des radioaktiven Zerfalls der Wasserstoffisotope konnte somit erstmalig die komplementäre DNA nachgewiesen werden.

Noch heute ist die radioaktive in *situ* Hybridisierung die wohl sensitivste Methode spezifische DNA- Sequenzen aufzuspüren. Mit ihr sind DNA- Detektionen weit unter 1 kb (Kilobase) möglich (Leitch et al., 1994).

Die Arbeit mit radioaktiven Isotopen ist mit einem hohen wirtschaftlichen Aufwand verbunden. Lange autoradiographische Expositionszeiten, kurze Halbwertszeiten bestimmter Radioisotope, Entsorgungsprobleme, hohe Anforderungen an Umweltschutz und Arbeitsschutz bedeuten nicht nur einen hohen personellen und zeitlichen Bedarf, sondern auch einen hohen finanziellen Aufwand (Leitch et al., 1994). Dem gegenüber stand eine stetig wachsende Anzahl von Fragestellungen, welche mit Hilfe der in *situ* Hybridisierung bearbeitet werden konnten. Aus diesen Spannungen heraus entwickelte sich Anfang der 80iger Jahre die nichtradioaktive in *situ* Hybridisierung (Langer et al., 1981; Manuelidis et al., 1982; Pinkel et al., 1986). Bei der nicht radioaktiven in *situ* Hybridisierung kann der Nachweis der DNA über die Detektion von Fluoreszenzen erfolgen. Dieses Verfahren wird Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) genannt.

1.2 Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung (FISH)

Durch die Möglichkeit, mittels Fluoreszenz DNA zu detektieren (FISH), war Anfang der 80iger Jahre ein Werkzeug geschaffen (Pinkel et al., 1986), welches auch heute noch an Bedeutung zunimmt.

FISH hat sich nicht nur in der Grundlagenforschung sondern auch in der Routinediagnostik etablieren können. Eine Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation von spezifischen DNA und RNA Sequenzen in Metaphasenplatten, intrazellulären Strukturen und Geweben (Tkachuk et al., 1991). Aufgrund dieses weitreichenden Einsatzgebietes lassen sich

- 1) physikalische Karten von Chromosomen erstellen
- 2) Chromosomenstrukturen oder deren Abweichung analysieren
- 3) Struktur, Funktion und Evolution von Chromosomen und Genomen untersuchen
- 4) die räumliche und zeitliche Expression von Genen bestimmen
- 5) Viren, virale Sequenzen und Bakterien in Geweben identifizieren und charakterisieren
- 6) Geschlechtsbestimmungen vornehmen
- 7) transformierende Sequenzen und Onkogene lokalisieren
- 8) die Expression von Neurotransmittern analysieren (Leitch et al., 1994).

Vorraussetzung für den Siegeszug der Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung (FISH) waren viele innovative Entwicklungen, von denen die wichtigsten nachfolgend erwähnt werden. So gelang es 1982 Manuelidis et al. mit in DNA-Sonden eingebauten biotinmarkierten

Nukleotiden (Langer et al., 1981) und unter Verwendung von enzymkonjugierten Antikörpern und Avidinderivaten (Green, 1964) erstmalig eine hochauflösende nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung (Manuelidis et al., 1982).

Durch Modifizierung bestehender Protokolle gelang nicht nur die Darstellung von Einzelsequenzen um fünf kb (Cherif et al., 1989; Viegas-Pequignot et al., 1989; Lichter et al., 1990), sondern auch eine Unterscheidung zweier hybridisierter Signale mit einem Abstand von 100 kb in einem Interphasekern (Lawrence et al., 1988; Trask et al., 1989; Lawrence et al., 1990; Brandriff et al., 1991).

Die Zeitersparnis gegenüber der radioaktiven ISH ist beachtlich. So dauert die Präparation der radioaktiven ISH 2 bis 3 Wochen. Die FISH- Prozedur ist mit 1-3 Tagen wesentlich kürzer. Es werden FISH- Protokolle beschrieben bei denen in weniger als 12 Stunden die Detektion der hybridisierten Signale abgeschlossen ist (Sushanta et al., 1998).

Auch die Stabilität einmal markierter Sonden variiert beträchtlich. Eine mit Biotin markierte Sonde ist bei -20°C über ein Jahr lagerbar und kann bedenkenlos zur Hybridisierung verwendet werden (Manuelidis et al., 1985). Bei der radioaktiven ISH ist die Verwendung der markierten Sonden unter anderem von der Halbwertszeit (die Zeit, in der sich der radioaktive Zerfall des Isotops auf die Hälfte verringert hat) der verwendeten Isotope abhängig. So besitzt das Phosphorisotop P-32 eine Halbwertszeit von 14,3 Tagen (Pschyrembel, 1994).

1985 haben Old und Pimrose durch die Amplifikation der Nukleinsäuren in Plasmid- und Phagenvektoren die Markierung der Sonden erheblich erleichtert (Old und Pimrose, 1985). Diese Entwicklung wurde durch die Amplifikation in Cosmidvektoren erweitert (Maniatis et al., 1989). Seit 1989 konnten Polymerasen- Ketten- Reaktion (PCR)- Techniken erfolgreich für die Amplifizierung und Markierung von DNA- Sonden eingesetzt werden (Belyasky et al., 1989).

Ein weiterer Vorteil der FISH gegenüber einer radioaktiven ISH ist der geringere unspezifische Hintergrund (Langer-Safer et al., 1982)

In dieser Arbeit wurden Fluorophore verwendet, die entweder direkt oder indirekt die Detektion der DNA ermöglichten. Bei der direkten Detektionsmethode erfolgte mit der Amplifikation der Sonde ein Einbau von Nukleotiden (Uridin), welche bereits mit den Fluorophoren gekoppelt waren. Wurden die Sonden mit modifizierten Nukleotiden markiert, die erst durch die Bindung von Fluorophor tragenden Antikörpern detektiert wurden, so wurde dies als indirekte Detektion bezeichnet.

Die Antikörper- Detektion von Digoxigenin (Kessler, 1990) und der Biotin – Avidin Komplex (Langer et.al., 1981) sind Beispiele für eine indirekte DNA- Detektion. Die indirekten Nachweismethoden besitzen auf Grund von möglichen Verstärkerschritten eine größere Sensitivität in der FISH.

Folgende Abbildung gibt eine graphische Übersicht über diese beiden unterschiedlichen Detektionsmethoden.

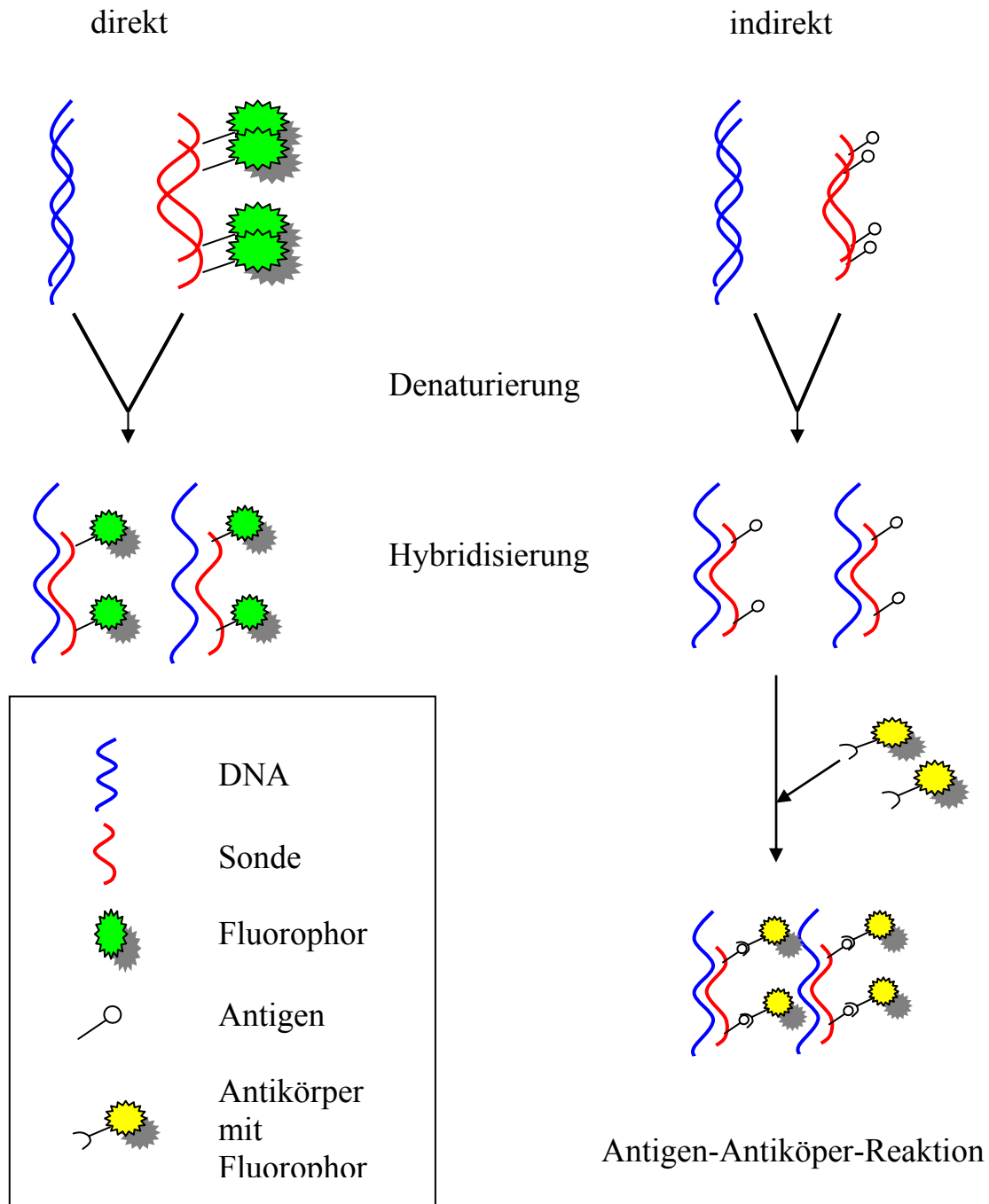


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen direkter und indirekter DNA- Detektion.

1.3 Multicolor- FISH

Das Bestreben, mehrere DNA- Sequenzen durch nur eine Hybridisierung zu visualisieren, wurde durch Hopman et al. 1986 eingeleitet. Durch biotinylierte und merkumarierte Polynukleotide wurden zwei unterschiedliche DNA- Sonden markiert. Diese Sonden konnten durch eine Hybridisierung und mit Hilfe von FITC- Fluoreszenz bzw. durch Alkaline Phosphatase- und Peroxidase- Kopplung detektiert werden (Hopman et al., 1986). Die Bemühung in der Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung auf diese Art und Weise möglichst viele spezifische DNA Sequenzen simultan darzustellen, war durch die Anzahl in der Emission sicher voneinander zu trennenden Fluorophoren begrenzt.

Werden der DNA- Polymerase bei der Amplifikation der Sonden an Stelle von einem Fluorophor mehrere verschiedene Fluorophore angeboten, so kommt es zur Konkurrenz der Fluorophor- gekoppelten dUTP's um Bindungsstellen innerhalb der DNA- Sequenz. Dies erlaubt eine Kombination der einsetzbaren Fluorophore. So gelang es mit Hilfe von drei Fluorophoren fünf unterschiedliche DNA- Sequenzen zu detektieren (Nederlof et al., 1989; Nederlof et al., 1990). Werden fünf in der Emissionen sicher voneinander zu trennende Fluorophore in einer solchen Kombinatorik in einer Hybridisierung eingesetzt, so ist der Nachweis von 31 spezifischen DNA- Sequenzen möglich [$(2^n)-1 = \text{max. Anzahl der mit einer Detektion nachweisbaren DNA- Sequenzen (n = Anzahl der verwendeten Fluorophore)}$].

Nur fünf Fluorophore sind somit notwendig, um alle 24 (22+X+Y) menschlichen Chromosomen mit einer Hybridisierung zu visualisieren (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996). Damit konnte gegenüber der konventionellen Zytogenetik in den meisten Fällen eine höhere Sensitivität und Spezifität im Erkennen von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen erreicht werden. Mit dieser Technik wurde es möglich, Markerchromosomen und Chromosomenfragmente ohne zytologische Zuordnung mit einer Hybridisierung zu erfassen und zu kategorisieren (Ried et al., 1992; Speicher et al., 1996; Macville et al., 1997).

In Erweiterung dieser Methode gelang es, das Chromosom 5 nach spezifischen DNA-Banken farblich zu segmentieren [MCB = Multicolor Banding; (Chudoba et al., 1999)]. Mit der Differenzierung von spezifischen Chromosomenregionen erhält die Zytogenetik ein weiteres diagnostisches Werkzeug. Durch diese Chromosomenbänderung lassen sich auch intrachromosomale Veränderungen beschreiben, welche mit einer Giemsa-Bänderung

nicht erfasst werden können. Mit einer hohen Sensitivität und Spezifität können intrachromosomale Inversionen, Duplikationen und Insertionen diagnostiziert werden.

1.4 Fluoreszenzanregung

1.4.1 Einphotonen Fluoreszenzanregung

Eine Fluoreszenz (Emission) entsteht, wenn Elektronen der Fluoreszenz- Moleküle von einem höheren Energieniveau (angeregter Zustand) auf ihr Ausgangsniveau zurückfallen. Um Fluoreszenz-Moleküle in den angeregten Zustand zu versetzen, bedarf es einer optischen Anregung. Getreu dem Gesetz zur Erhaltung der Energie ist der Betrag der absorbierten Energie immer größer als der Betrag der emittierenden Energie.

Klassische FISH- Energiequellen, welche für die optische Anregung der Fluoreszenzen verwendet werden, sind Quecksilber- oder Xenon- Hochdrucklampen. Diese Energiequellen zeichnen sich durch ein breites zu verwendendes Wellenlängenspektrum aus. Aufgrund der geringen Leistungsdichte (Intensität) bei Verwendung dieser Energiequellen erfolgt die Absorption nach der Einphotonentheorie.

Die Einphotonentheorie besagt, dass die Absorption eines energiereichen Photons eine Emission eines energieärmeren Photons bewirken kann. Um eine molekülspezifische Emission zu erhalten, muss daher mit einer Wellenlänge kleiner als die zu erwartende Emission angeregt werden [Stoksche Regel (Stroppe, 1989)]. Das Absorptionsvermögen und das Emissionsvermögen sind molekülspezifische Eigenschaften.

Das Einphotonenabsorptionsverhalten und das Emissionsverhalten typischer FISH Fluorophore sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

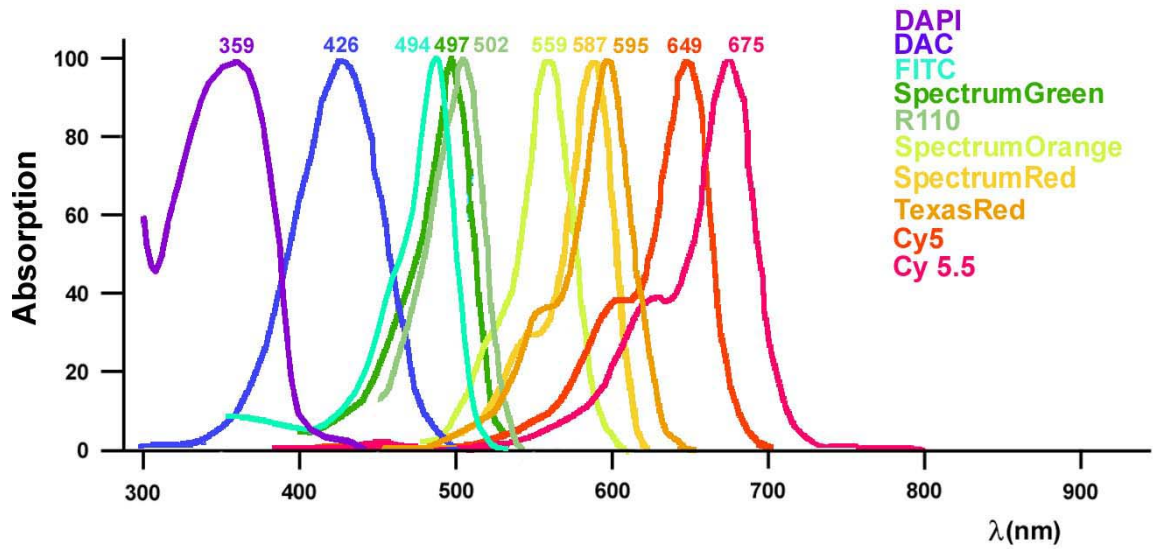


Abbildung 2 Normierte Einphotonen- Absorptionsspektren typischer FISH- Fluorophore. Die Auflistung der Fluorophorabkürzungen von oben nach unten entspricht der Spektrenreihenfolge von links nach rechts. Angegeben sind die Absorptionsmaxima.

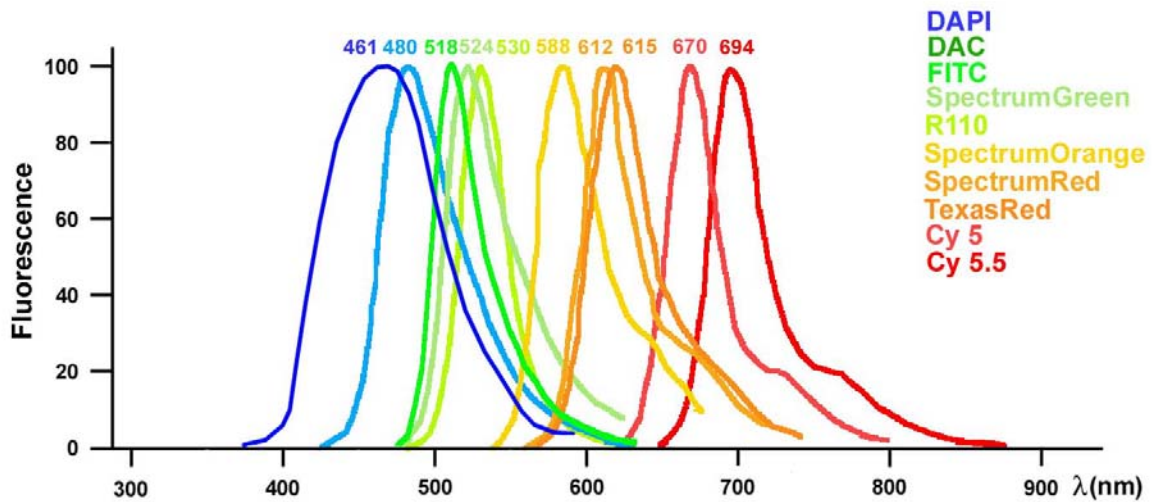


Abbildung 3 Normierte Einphotonen- Emissionsspektren typischer FISH- Fluorophore. Die Auflistung der Fluorophorabkürzungen von oben nach unten entspricht der Spektrenreihenfolge von links nach rechts. Angegeben sind die Emissionsmaxima.

Die Fluoreszenzanregung basierend auf der Einphotonenanregung ist im Zusammenhang mit der FISH weiterentwickelt worden und stellt heute einen ausgereiften technischen Standard dar. So können in der FISH verwendete Fluorophore selektiv angeregt und somit dem detektierten Signal rechnergestützt eine Falschfarbe zugeordnet werden.

Die selektive Anregung wird erreicht, indem ein Bandpassfilter nur das Spektrum der Energiequelle zur Probe passieren lässt, welche für die Anregung des ausgesuchten Fluorophors notwendig ist. Ein weiterer Bandpass lässt nur das von dem angeregten Fluorophor erwartete Emissionsspektrum auf den Detektor passieren. Die Sicherheit, mit der in der Einphotonenmethode hybridisierte Signale detektiert werden, erlauben den Einsatz in der Routinediagnostik.

Die Einphotonen-Absorption galt lange Zeit als einzige Möglichkeit Elektronen auf ein höheres Energieniveau zu heben. Maria Göppert-Meyer diskutierte in ihrer Dissertation erstmalig die Möglichkeit einer simultanen Absorption zweier energieärmerer Photonen zur Erzeugung von Fluoreszenzen mit kürzerer Wellenlänge als die Wellenlänge, welche für die Anregung verwendet wurde (Göppert-Meyer, 1931).

1.4.2 Multiphotonen Fluoreszenzanregung

1961 realisierten Kaiser und Garret eine Zwei-Photonen Emission (Kaiser und Garret, 1961). Die simultane Absorption zweier energieärmerer Photonen kann nur bei einer ausreichenden Photonenflussdichte erreicht werden. Für eine Zwei-Photonenanregung bedarf es einer Photonenflussdichte von $\Phi=10^{24} - 10^{25}$ Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (König, 1999). Diese enorm hohe Anzahl Photonen pro Fläche und Zeit kann mit Objektiven hoher Numerischer Apertur und Laserstrahlen hoher Leistungsdichte erreicht werden.

In Abbildung 4 wird der Unterschied zwischen Ein- und Zwei-Photonenanregung graphisch dargestellt.

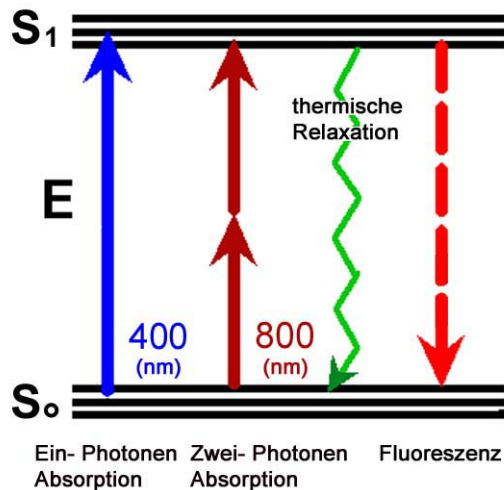


Abbildung 4 Simultane Absorption zweier energieärmer Photonen (zwei Pfeile 800 nm) oder die Absorption eines energiereichen Photons (ein Pfeil 400 nm) können Elektronen in den angeregten Zustand versetzen (S_1). Durch den Wechsel vom angeregten Zustand in den Ausgangszustand (S_0) resultiert in thermischer Relaxation oder der gewünschten Fluoreszenz.

Denk, Strickler und Webb gelang es 1990 erstmalig, Fluoreszenzen in lebenden Zellen basierend auf der Zweiphotonen- Anregung zu realisieren. Sie nutzten einen Femtosekunden- Laser in Kombination mit einem Laser- Scannig- Mikroskop (Denk et al., 1990).

PD Dr. Karsten König schlug vor, die Multiphotonen- Anregung basierend auf einem Nah Infraroten (NIR)- Laserstrahl für die Anregung von FISH- Fluorophoren zu nutzen und nannte dies Multiphotonen Multicolor- FISH [MM- FISH] (König et al., 2000a).

Die mit Hilfe von NIR- Laserstrahlen induzierte simultane Absorption mehrerer Photonen besitzt gegenüber der Einphotonenabsorption folgende Vorteile:

1. Werden Objektive hoher numerischer Apertur verwendet, ist es möglich, die für die Absorption notwendigen hohen Photonenflussdichten auf ein sehr kleines Anregungsvolumen zu begrenzen. Diese Anregungsvolumina liegen im sub- femtoliter Bereich ($< 10^{-15}$ l). Gegenüber herkömmlicher Anregungsmethoden ist damit das Anregungsvolumen sehr klein. Aufgrund der räumlichen Begrenzung der Anregung ergeben sich folgende Vorteile:

- Eine hohe Hintergrundfluoreszenz/ Eigenfluoreszenz bedingt durch ein großes Anregungsvolumen ist bei der Multiphotonen- Mikroskopie soweit reduziert, dass gegenüber der herkömmlichen 3- dimensionalen Darstellung die dafür notwendige Lochblende entfernt werden konnte (König et al., 1996a).
- Da die Anregung der Fluorophore fast nur im Fokus erfolgt, ist das Ausbleichen der Fluorophore außerhalb des Fokus zu vernachlässigen [no- out- of- fokus- bleaching (Xu et al., 1996)].

2. Die Verwendung von Laserstrahlen erlaubt ein konsekutives Abscannen beliebig ansteuerbarer Objektebenen. Damit ist eine 3- dimensionale Darstellung von zu detektierenden Objekten möglich.

3. Mit der Möglichkeit, durch Einsatz eines langwelligen Laserstrahls, kurzwellige emittierende Fluorophore anzuregen, kann auf die kostspielige Ultraviolett (UV)- Optik verzichtet werden.

4. Die Verwendung eines NIR- Lasers erlaubt das Arbeiten im optischen Fenster (s.u.). Daraus resultiert eine hohe Eindringtiefe (Chong et al., 1990) in biologisches Material.

5. Das Arbeiten im NIR- Bereich zeichnet sich auch durch ein verringertes Schädigungspotential biologischer Objekte aus (Xu et al., 1996; Squirrell et al., 1999).

6. Die simultane Absorption mehrerer Photonen ermöglicht es, mit einer Wellenlänge und mit einem Anregungsvorgang eine Vielzahl von Fluorophoren gleichzeitig anzuregen.

Der für den Durchbruch der Multiphotonenmikroskopie verantwortliche größte Vorteil ist die nahezu Transparenz von biologischen Material bei der Verwendung von NIR- Wellenlängen. Es existieren kaum endogene Absorber in Zellen und Geweben.

Nachstehende graphische Übersicht stellt die Absorption der endogenen Absorber Melanin, Hämoglobin und Wasser in Abhängigkeit der Wellenlänge dar.

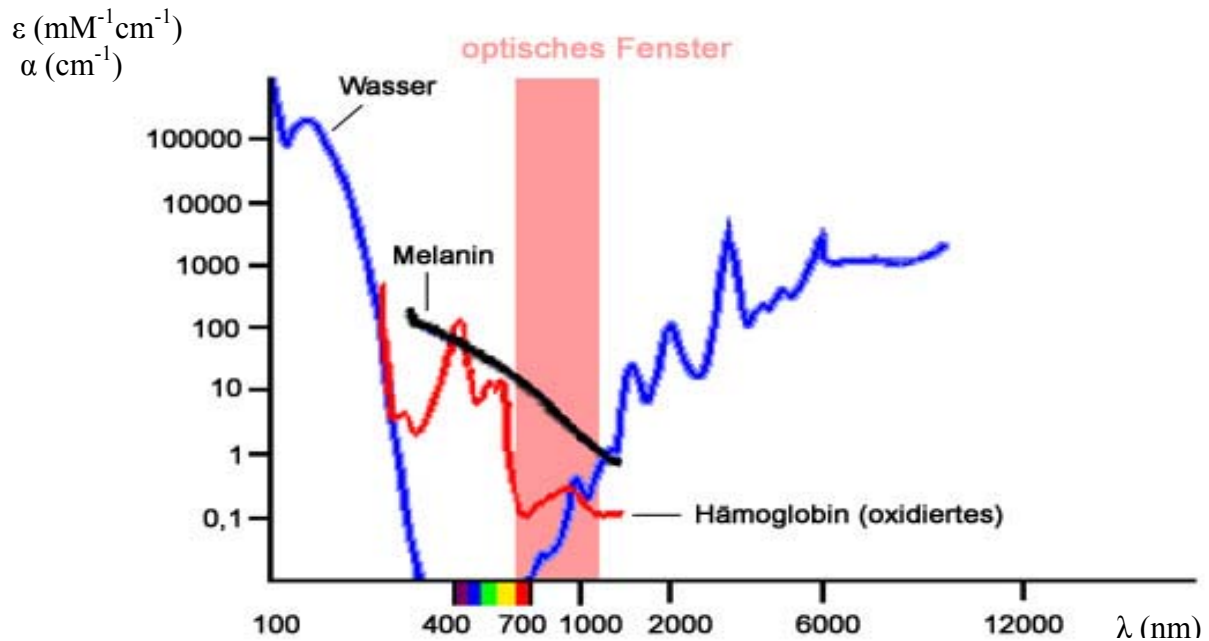


Abbildung 5 Dargestellt ist das Absorptionsvermögen der drei wichtigsten zellulären Absorber Wasser, Melanin und Hämoglobin. Eine Anregungswellenlänge von 800 nm ermöglicht das Arbeiten im Bereich des optischen Fensters, d.h. biologische Objekte sind nahezu transparent. Die Wellenlängenabhängigkeit des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ (Hämoglobin und Melanin) bzw. des Absorptionskoeffizienten α (Wasser) erfolgte mit doppellogarithmischer Achsenskalierung (Hale und Query 1973; Wray et al. 1988; König, 1999).

Der Bereich, in dem die endogenen Absorber ein Minimum an Absorption besitzen, wird auch als optisches Fenster bezeichnet. Das optische Fenster erstreckt sich definitionsgemäß von 700 nm bis 1200 nm.

Das Arbeiten im Bereich des optischen Fensters ermöglicht somit nicht nur sehr hohe Eindringtiefen, sondern zeichnet sich auch durch ein reduziertes Schädigungspotential aus. Werden Wellenlängen im Bereich von 700 nm bis 1200 nm eingesetzt, ist das Schädigungspotential so gering, dass dies eine Anwendung in der *in vivo* Diagnostik erlaubt (König et al., 2000c/d; Squirrell et al., 1999).

1.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Im Rahmen eines Bio- Regio- Projektes erfolgten, in Zusammenarbeit mit Carl Zeiss Jena GmbH, die ersten FISH Untersuchungen basierend auf einer Multiphotonen- Anregung. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen ergaben sich folgende Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollten.

1. Sind Femtosekunden- Pulse einer Wellenlänge von 800 nm geeignet, MM- FISH zu realisieren?

-Ferner soll unter Ausnutzung der Eigenschaften des Lasers, Fragen zur Möglichkeit für die Bestimmung von Abklingzeiten und Ausbleichverhalten von FISH- Fluorophoren nachgegangen werden.

2. Kann eine 5 Farben MM- FISH in einem Interphasekern mit Submikrometerauflösung detektiert werden?

-Erarbeitung von Applikationen für die 3- dimensionale Darstellung von MM- FISH spezifischer und unspezifischer DNA- Sequenzen innerhalb biologischer Objekte.

3. Kann die hohe Eindringtiefe von NIR- Laserstrahlung genutzt werden, um MM- FISH für die molekular- pathologische Untersuchung von Gewebsbiopsien anzuwenden?

2 Material und Methoden

2.1 DNA Sonden

Die bei dieser Arbeit verwendeten DNA- Sonden waren entweder kommerziell erworbene oder von mir selbst amplifizierte und markierte (gelabelte) Proben, welche im Institut für Humangenetik der FSU Jena als DNA-Banken vorhanden waren.

2.1.1 Kommerzielle Sonden

Als käuflich erworbene Proben wurden die Zentromersonden der Chromosomen X, Y und 4 (Vysis) eingesetzt. Diese Sonden wurden beim Multicolor Gewebs-FISH (2.4.) verwandt. Der Ansatz beinhaltet einen Puffer und die Zentromersonden, welche mit den Fluorophoren SpectrumAqua (Zentromer Y), SpectrumOrange (Zentromer X) und SpectrumGreen (Zentromer 4) direkt markiert waren. In einem Ansatz für einen halben Objektträger befanden sich 7µl Puffer, 2 µl H₂O und jeweils 1 µl DNA- Sonde. Zur Denaturierung wurde das Gefäß mit dem Ansatz 5 min auf 75°C erhitzt und dann schnell auf 4°C abgekühlt. Danach erfolgte die Hybridisierung (2.2.3.).

2.1.2 Eigens markierte Sonden

Die DNA-Banken die durch das Institut für Humangenetik bereitgestellt wurden, waren einerseits durch das Institut selber mikrosequenziert (Ganzchromosomen-Sonden) bzw. wurden freundlicherweise von Mariano Rocchi [Bari, Italien (Zentromer spezifische alpha-Satelliten Proben)] zur Verfügung gestellt. Diese DNA-Sonden wurden mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction =PCR) amplifiziert und gleichzeitig mit dem gewünschten Fluorophor markiert.

2.1.2.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1985) ermöglicht die exponentielle *in vitro* Amplifizierung von DNA-Segmenten. Die Anwendungsgebiete umfassen unter anderem DNA-Klonierung, Nachweis und Identifizierung genomischer DNA-Sequenzen sowie die Analyse spezifischer Transkripte. In dieser Arbeit erfolgte die Verwendung der PCR zur Amplifizierung und gleichzeitiger Markierung von DNA- Sonden. Die Reaktion setzt sich

aus mehreren nacheinandergeschalteten Zyklen zusammen; ein Zyklus besteht aus drei Schritten, in denen unterschiedliche Temperaturniveaus durchlaufen werden:

- Erster Schritt – Denaturierung:** Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA-Matrize, 30 bis 60 s bei 94 °C
- Zweiter Schritt – Annealing:** Anlagerung der Primer an die DNA, 1-2 min bei einer Temperatur, die von der kalkulierten Primerschmelztemperatur abhängt
- Dritter Schritt – Extension:** Enzymatische Verlängerung eines Primer- initiierten DNA-Stranges durch Polymerisierung in 5' → 3' Richtung, 2 min bei 72°C (entspricht dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase und ist außerdem abhängig von der Größe der zu amplifizierenden Sequenzen)

Es werden 20 – 35 Zyklen durchlaufen, wobei dem ersten Zyklus eine Denaturierungsphase von 2 – 5 min vorausgeht und dem letzten Zyklus eine Extensionsphase von 5 – 30 min folgt.

Das für diese Arbeit verwandte Label- Protokoll ist nachfolgend tabellarisch zusammengefasst.

LABEL- PCR

Zyklen	Temperatur	Zeit	Beschreibung
1	92°C	3min	Initiale Denaturierung
2	91°C	1min	Denaturierung
3	56°C	1min	Annealing
4	70°C	2min	Extension
5	Go to 2, 31x (Zyklen 2-4 werden 31x wiederholt)		
6	72°C	5min	Extension
7	4°C	for ever	

Tabelle 1 Auflistung der Zyklen zur Amplifizierung und Markierung von DNA- Sonden

Durch den Einsatz von Fluorophor oder Biotin/Digoxigenin gekoppelten dUTP's konnte bei der Amplifizierung die DNA nach Wunsch markiert werden. Ich konnte im Institut für Humangenetik ein standardisiertes und erprobtes Protokoll übernehmen. Zur Amplifizierung und Markierung einer DNA-Probe wurde folgender PCR- Ansatz verwendet:

Zahl der Ansätze			1	2	3	4
	Stock	Endkonz.	20 µl	40µl	60µl	80µl
H ₂ O			11,88	23,76	35,64	47,52
Replitherm Puffer	20x	1x	1	2	3	4
dNTP's	* ¹	1x	2	4	6	8
dUTP* ²	1 mM	40µM	2	4	6	8
DOP-Primer	40µM	2µM	1	2	3	4
MgCl ₂	25 mM	2,5µM	2	4	6	8
Ampli Taq	5 U/µl	0,03U/µl	0,12	0,24	0,36	0,48

*¹ **10x dNTP-Mix:** dTTP (1mM) 25µl 50µl
dATP, C, G (2mM) 50µl (x3) 100µl
H₂O 75µl 150µl

*² SpectrumGreen, Diethylaminocumarin, Rhodamin 110 2 µl
SpektrumOrange, TexasRed, Biotin, Digoxigenin 0,8 µl

Tabelle 2 Protokoll für die Amplifikation und Markierung von DNA- Sonden. (Übersicht von Mengen und Konzentrationen der für die Amplifikation und Markierung von einer bis zu vier unterschiedlichen DNA- Sonden notwendigen Bestandteile.)

Die für die Amplifikation und Markierung notwendigen Bestandteile (Tabelle 2) wurden pro Ansatz mit 2 µl der gewünschten DNA- Sonde aufgefüllt und gut vermischt. Anschließend wurde das PCR- Programm wie oben beschrieben gestartet.

2.1.2.2 Fällen, trocknen und resuspendieren der DNA Sonden

Um die amplifizierte und markierte DNA-Sonde für die Hybridisierung verwenden zu können, waren noch folgende Arbeitsschritte notwendig:

Das Gefäß mit dem Reaktionsprodukt aus der PCR ($\approx 20 \mu\text{l}$) wurde mit $10 \mu\text{l}$ tRNA und $20 \mu\text{l}$ H_2O aufgefüllt. Die tRNA erhöhte dabei den relativen Anteil der zu fällenden Nukleinsäuren. Es wurden noch $\frac{1}{10}$ Natrium-Acetat und das 2,5fache an Ethanol des Volumens, in dem die DNA gelöst war (DNA, tRNA und H_2O), hinzupipettiert. Dadurch erfolgte eine Erhöhung der Ausbeute der Fällung. Dieser Inhalt wurde vermischt und anschließend 15 min bei -80°C gefällt (auch über Nacht bei -20°C möglich). Bei 4°C , 15 min und 15000 rpm wurde die DNA abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abpipettiert und verworfen wurde, erfolgte eine 5 minütige Trocknung der Proben mit geöffnetem Gefäßdeckel in der Speed Vac. Die so erhaltenen, getrockneten DNA-Sonden wurden in, zum besseren Pipettieren auf 40°C vorgewärmtes, 20- 25 μl Hybridisierungsmix (Dextransulfat, 20xSSC, 0,5M Natriumphosphat, Formamid und Wasser) resuspendiert. Während das Formamid die Schmelztemperatur der DNA herabsetzt, soll das Dextransulfat die Probenkonzentration durch Volumeneinengung erhöhen und so durch Vernetzung der Proben- DNA zu einer Signal- Amplifikation führen (Wahl et al., 1979; Harper et al., 1981).

Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung bei -20°C .

2.1.3 Verwendete Mengen der Sonden

Um den Objektträger (OT) optimal auszunutzen, können für die FISH pro OT zwei verschiedene Proben (Einfarb-FISH) oder Probenkombinationen (Zwei- bis Mehrfarb-FISH) eingesetzt werden. Daher wird im folgenden mit „halben OTs“ gerechnet. Je nach Probentyp werden pro halben OT verschiedene DNA-Mengen eingesetzt. Für eine Hybridisierung wurden 3 – 6 μl DNA-Sonde, welche nach dem Fällen und Trocknen in 20 μl Dextransulfat resuspendiert wurde, verwendet. Für einen Ansatz wurde das zu denaturierende Volumen gegebenenfalls auf 12- 15 μl mit Dextransulfat aufgefüllt.

2.1.4 Denaturierung und Prähybridisierung

Um unerwünschte Kreuzhybridisierungen zu unterdrücken, wurde die Proben- DNA vor der eigentlichen Hybridisierung mit COT-1 DNA prähybridisiert. COT-1 DNA besteht aus repetitiven Sequenzen und wird als Kompetitor- DNA zum Abblocken repetitiver Sequenzen verwendet (Landegent et al., 1987). Im Zusammenhang mit Zentromer- Sonden wird COT-1 DNA normalerweise nicht eingesetzt, eine geringe Mengen (zwischen 0,5 und $2 \mu\text{g}$) erwies sich aber als günstig, um unerwünschte Kreuzhybridisierungen zu

unterdrücken. Für die Prähybridisierung wurden die Proben aus 2.1.3 bei 75°C für 5min denaturiert, nachfolgend für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Die Probe sollte im Anschluss sofort auf den denaturierten OT aufgetragen werden.

2.2 Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung an Metaphasen

2.2.1 Herstellung der Lymphozytensuspension

0,8 ml bis 1 ml heparinisertes, peripher venöses Blut eines freiwilligen Spenders wurde mit 10 ml Nährmedium und 0,1ml Phytohämagglutinin in eine 25 cm² Kulturflasche pipettiert (Ronne, 1989). Die 24-72 h Inkubation erfolgte mit 5% CO₂ Partialdruck in einem 37°C warmen Brutschrank. Um eine Kultur mit möglichst vielen Metaphase-Stadien zu erreichen, wurde vor der weiteren Präparation das Spindelgift Colzemid (5µg/ml) 200 µl auf 10ml Kultur) hinzugegeben (Ronne, 1989). Es folgte eine weitere 30 min Inkubation unter gleichen Bedingungen. Die jetzt durch Colzemid in der Metaphase gestoppte Lymphozytenkultur wurde nun in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1500 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Sediment wurde mit 10 ml vorgewärmter KCl- Lösung vermischt und anschließend 20 min bei 37°C inkubiert. Die durch die hypotone KCl- Lösung erfolgte Quellung bewirkt die Zerstörung der Zellmembran. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in auf -20 °C gekühltem Fixativ resuspendiert. Diese Prozedur wurde 3 mal wiederholt, um eine möglichst von überschüssigem Plasma aufgereinigte Lymphozytensuspension zu erhalten (Schwarzacher, 1976).

Eine Lagerung der Lymphozytensuspension im Fixativ erfolgte bei -20 °C.

2.2.2 Herstellung der in *situ* Präparate

Da sich auf Objektträgern vorhandener Schmutz bei der Fluoreszenzanregung sehr störend auswirkt, und um eine optimale Spreitung und Fixierung der Mitosen zu erreichen, wurden die Objektträger vor der Verwendung gereinigt.

2.2.2.1 Vorbehandlung der Objektträger

Die Objektträger wurden über Nacht (ÜN) in einer detergenzien-haltigen Aqua-Dest-Lösung (Prilwasser) inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit Aqua-Dest gespült, um sie bis zur Verwendung in einer Lösung bestehend aus 35% Methanol, 1% HCL (32%), 64% Aqua-Dest zu lagern. Nach einem weiteren Spülgang der Objektträger mit Aqua-Dest konnte die Suspension aufgetropft werden.

2.2.2.2 Auftropfen der Lymphozytensuspension

Die vorher gut durchmischte Suspension wurde in eine Pipettenspitze aufgenommen und aus einer Höhe von ca. 15-30 cm auf den immer noch feuchten Objektträger tropfenweise aufgetragen. Nach kurzer Antrockenzeit wurde der Objektträger mit Fixativ überschichtet, um noch vorhandene Plasmareste abzuspülen. Die Spreitung der Chromosomen erfolgte durch das Verdunsten des Methanols, was eine Konzentrierung der Essigsäure nach sich zog. Dadurch wurde die hygroskopische Wirkung der Säure erhöht. Das angereicherte Wasser ist Bedingung für die Quellung und somit der Spreitung der Chromosomen. Des weiteren trägt der denaturierende Effekt der Säure zur Fixierung des organischen Materials auf dem Objektträger bei. Der Erfolg des Auftropfens wurde unter dem Mikroskop (10X, Phasenkontrast) überprüft. Waren die Objektträger zu dicht mit Metaphasen und Interphasekernen (bilden den größten Teil) behaftet, wurde die Suspension mit Fixativ verdünnt. War hingegen die Metaphasenausbeute zu gering, erfolgte durch eine nochmalige Zentrifugation und das Verwerfen eines Teiles des Überstandes eine Konzentrierung der Suspension. Die so hergestellten Präparate wurden staubfrei und trocken gelagert. Bei einer Temperatur von -20°C sind die Präparate über mehrere Monate lagerbar.

2.2.3 Proteinase-Vorbehandlung und Nachfixierung

Das die Metaphasen umgebende Plasma wirkt sich bei der Hybridisierung durch eine Diffusionseinschränkung und bei der Detektion durch die vorhandene Eigenfluoreszenz störend aus. Um das Plasma zu reduzieren, wurden die Präparate mit einer Proteinase vorbehandelt. In dieser Arbeit wurde die Proteinase Pepsin verwendet.

100 ml einer 1% HCL- Lösung wurde auf 37°C in einem Wasserbad erwärmt und (nach Erreichen der Temperatur) mit dem Enzym vermischt. Unter Beobachtung der Temperatur wurden nun die um mindestens 1 Tag gealterten Präparate für 5 min in die Proteinase-Lösung gestellt. Die Inkubationszeit kann variabel geändert werden und ist unter anderem abhängig vom Zellmaterial, dem Alter der Präparate und dem Plasmagehalt. Eine zu lange Proteinasebehandlung wirkt sich negativ auf den Erhalt der Chromosomenstruktur und das Hybridisierungsergebnis aus. Um die Enzymwirkung zu stoppen, wurden die Objektträger nach der Einwirkzeit in 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min gewaschen.

Die bisher erfolgte denaturierende Fixierung (2.2.2) der Chromosomen auf dem Objektträger reicht für die Gesamtheit der weiteren präparativen Schritte nicht aus. Um einem Verlust der Chromosomen vorzubeugen, wurden die Präparate nachfixiert. Nach dem Standardprotokoll erfolgte die Nachfixierung durch eine 10 min Inkubation mit 1xPBS/ 50 ml MgCl₂/ 3% Paraformaldehyd (Liehr et al., 1995b). Die quervernetzende Wirkung des Formalins hat jedoch nicht nur die gewünschte fixierende Wirkung, sondern ruft auch eine Eigenfluoreszenz hervor. Diese exogen verursachte Fluoreszenz konnte bei der Multiphotonenanregung so dominierend sein, dass eine Auswertung der gezielt hybridisierten Fluoreszenzsignale unmöglich wurde.

Das Protokoll zur Nachfixierung für die Multiphotonenanregung wurde wie folgt verändert:

Die Inkubationszeit wurde auf 5 min verkürzt und das nachfolgende Waschen in 1xPBS auf 10 min verlängert.

Vor der Dehydratation mit Hilfe einer Ethanolreihe (70%, 95% und 100%, je 3min) wurden die Objektträger, um noch vorhandene PBS-Reste zu entfernen, mit H₂O abgespült. Der Erfolg der Vorbehandlung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und gegebenenfalls wurden einzelne Behandlungsphasen wiederholt.

Lagerung und Haltbarkeit der OT sind die gleichen wie unter 2.2.2 beschrieben.

2.2.4 Denaturierung

Die unter 2.2.3 erhaltenen Objektträger wurden zur Denaturierung auf eine 72°C warme Heizplatte gelegt. Nach einer 20 s Vorwärmzeit wurden 100µl Denaturierungslösung (70% deionisiertes Formamid, 10% Aqua Bidest, 10% 0,5M NaH₂PO₄/NaHPO₄ (pH6,8), 10% 20xSSC) aufgetragen und mit einem 24x60 mm Deckglas abgedeckt. Die Denaturierungszeit betrug ca. 3 min. Um die DNA in ihrem denaturierten Zustand zu

stabilisieren, erfolgte der erste Schritt der folgenden Dehydratation mit auf -20°C gekühlten 70% Ethanol (3 min). Anschließend wurde mit 95% und 100% Ethanol jeweils 3 min weiter dehydriert. Die Objektträger wurden getrocknet und standen für die Hybridisierung bereit.

2.2.5 Hybridisierung

Die eigentliche Hybridisierung erfolgte durch das Pipettieren der denaturierten und markierten DNA-Sonden auf die Objektträger mit den denaturierten Metaphasen. Nach gleichmäßiger Verteilung der Sonden-Lösung unter einem 24x24 mm Deckglas wurde mit Fixogum (Rubber Cement) abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer für eine Zeitspanne von 12 h bis zu 3 Tagen in einem 37°C warmen Brutschrank. 12 h Hybridisierungszeit sind für sehr große Sonden und für repetitiven Sequenzen ausreichend. Sehr kleine Einzelkopiesonden bedürfen bis zu 3 Tagen Hybridisierungszeit. Durch die feuchte Kammer und die Abdichtung mit Fixogum wurde eine möglichst gleichbleibende Konzentration der Sonden- DNA und somit bei der vorherrschenden Inkubationstemperatur eine optimale Diffusion der Sonden ermöglicht (Larwence und Singer, 1985).

2.2.6 Posthybridisierungswaschen

Um das Intensitätsverhältnis Signal/Hintergrund zu Gunsten des Signals zu erhöhen, erfolgte die Posthybridisierungswaschung. Dadurch wurde vorrangig die unspezifisch gebundene DNA vom Objektträger entfernt. Faktoren, welche die Stringenz erhöhen, d. h. nur Bindungen mit einem hohen Grad an Homologie zulassen, sind: hohe Temperaturen, hoher Formamidegehalt und niedriger Salzgehalt (Harris und Wilkinson, 1990). Der Objektträger wurde nach Entfernung von Fixogum und Deckglas in 2xSSC/50% Formamid (pH 7,0) 3x 5 min und anschließend 3x 5 min in 2xSSC (pH 7,5) gewaschen. Der gesamte Waschvorgang wurde bei 42°C durchgeführt.

Eine andere Möglichkeit des Posthybridisierungswaschens war das Waschen mit 0,4 x SSC 2 min bei 68°C und anschließend 1 min in 4xSSC/Tween bei Raumtemperatur. Dieses stringente Waschen erfolgte nur bei Ganzchromosomensonden und Zentromersonden.

2.2.7 Proben-Detektion

Bei der Verwendung von AK- gekoppelten Fluorophoren schloss sich nach dem Posthybridisierungswaschen die Detektion von Biotin oder Digoxigenin an. Durch eine 15 min Inkubation der Präparate mit 4x SSC/0,2% Tween/5% Magermilchpulver wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen abgeblockt.

Für die Biotin-Detektion mittels FITC war sowohl bei Ganzchromosomen- als auch bei Zentromer-Sonden eine Einschichtreaktion ausreichend, d.h. eine Signalverstärkung im Sinne des „Sandwich-Systems“ war nicht notwendig (s.u.). Bei der Biotin- und Digoxigenin- Detektion mittels der Fluorophore Cy5 und Cy5.5 war eine Signalverstärkung notwendig. Die Signalverstärkung beinhaltete drei Detektionsschritte: Biotin-Proben wurden im ersten Schritt mit einem Fluorophor gekoppelten Avidin (bzw. Streptavidin), im zweiten Schritt mit einem gegen Avidin gerichteten biotinyliertem Antikörper und im dritten Schritt wieder mit einem Fluorophor gekoppelten Avidin inkubiert. Digoxigenin- Proben wurden im ersten Schritt mit einem Fluorophor gekoppelten Antikörper, welcher gegen Digoxigenin gerichtet ist, im zweiten Schritt mit einem Digoxigenin gekoppelten Antikörper, welcher gegen das Fc-Teil des im ersten Schritt verwendeten Antikörpers gerichtet ist und im dritten Schritt wieder mit einem Fluorophor gekoppelten Antikörper, welcher gegen Digoxigenin gerichtet ist, inkubiert (siehe Schema Einleitung S.5).

Detektion ohne Signalverstärkung: Der Objektträger wurde mit 50µl 4x SSC/0,2% Tween/5% Magermilchpulver + 0,2 µl FITC-Avidin überschichtet und mit einem Deckglas (24x60mm) abgedeckelt. Anschließend erfolgte eine 30 min Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C. Nach Entfernung des Deckglases beendete eine 8 min Waschung (bei Raumtemperatur) in 4x SSC/0,2% Tween/5% Magermilchpulver die Detektion.

Detektion mit Signalverstärkung:

Erster Schritt: Der Objektträger wurde mit 50µl 4x SSC/0,2% Tween/5% Magermilchpulver + 0,5µl Avidin Cy5 (oder 5µl Antidig Cy5.5) überschichtet und mit einem Deckglas (24x60mm) abgedeckelt und für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

Zweiter Schritt: Der Objektträger wurde mit 50µl 4x SSC/0,2% Tween/5% Magermilchpulver + 0,5µl biotinyliertes Avidin Cy5 (oder 5µl Anti-mouse-dig Cy5.5)

überschichtet und mit einem Deckglas (24x60mm) abgedeckt und für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

Dritter Schritt: wie erster Schritt

Nach jedem Schritt erfolgte das Entfernen des Deckglases mit anschließender 8 min Waschung in 4x SSC/0,2% Tween.

Um die Fluoreszenz zu stabilisieren, wurden nach dem letzten Waschvorgang die Objektträger getrocknet, pro Objektträger 15 µl Antifade-Reagenz (Vectashield, Camon Vector Laboratories, H1000) aufgetragen und das Präparat mit einem Deckglas (24x60mm) luftblasenfrei eingedeckelt. Das Antifade-Reagenz reduziert nicht nur das Ausbleichen der Proben, sondern auch die Fluoreszenzintensität (Longin et al.,1993). Der fertige Objektträger kann sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Eine Lagerung der OT ist bei -20°C über mehrere Monate ohne nennenswerte Fluoreszenzintensitätsverluste möglich.

2.3 FISH an unkultivierten Amniocyten

Um hybridisierte Signale in Interphasekernen bei gleichzeitiger räumlicher Darstellung des Kernes zu erreichen, war ein Wechsel des zu hybridisierenden Materiales notwendig. Bei der Präparation von unkultivierten Fruchtwasserzellen blieb die Kernmorphologie nicht vollständig erhalten, jedoch blieb die 3D Struktur besser erhalten als bei Interphasenkernen einer Lymphozytensuspension (Präparation siehe unter 2.2.1).

Das in dieser Arbeit verwendete Fruchtwasser wurde freundlicherweise durch das Institut für Humangenetik der FSU Jena zur Verfügung gestellt.

2.3.1 Präparation von unkultivierten Fruchtwasserzellen

2-3 ml Fruchtwasser wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest verworfen. Die Resuspendierung der Zellen erfolgte sehr vorsichtig durch Bewegen/ Ansnippen des Röhrchens. Es erfolgte eine 15 min Inkubation mit 3 ml Trypsin/EDTA (auf 37°C vorgewärmt). Die Trypsinwirkung wurde mit 5 ml 1xPBS/Kälberserum (auf 37°C vorgewärmt) gestoppt. Nach Zentrifugation (1000 rpm 5 min), dem Verwerfen des Überstandes und der Resuspendierung wurden die Zellen mit 5 ml 0,075 M KCl (auf 37°C vorgewärmt) für 20 min inkubiert. Vor nochmaliger Zentrifugation, Verwerfen des

Überstandes und Resuspendierung wurden unter vorsichtigem Schütteln des Röhrchens 2 ml kaltes Fixativ hinzugegossen. Es schloss sich eine 30 min Inkubation bei 4°C der in weiteren 3 ml kaltem Fixativ resuspendierten Lösung an. Die Resuspendierung erfolgte abschließend nach der Zentrifugation in 200-300 µl des Überstandes. Die Fruchtwasserkerne, die nach Trypsinverdau, hypotoner Behandlung und Waschen in Fixativ separiert wurden, standen zur Auftragung auf die Objektträger zur Verfügung.

2.3.2 Herstellung der Fruchtwasser in *situ* Präparate

Die gereinigten Objektträger (2.2.2.1) wurden mit einigen Tropfen Fixativ beschichtet. Mit Hilfe einer Pipette wurden immer wieder auf die gleiche Stelle des Objektträgers mehrere kleine Tröpfchen der Suspension abgesetzt. Kurz vor dem vollständigen Antrocknen wurde der Objektträger noch einmal mit frischem Fixativ übertropft. Eine Dehydratation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 95% und 100% je 3 min) und die Trocknung des Objektträgers erfolgten abschließend.

2.3.3 Denaturierung, Hybridisierung, Posthybridisierungswaschen und Detektion der Fruchtwasserkerne

Nach einer Alterung der Präparate von mindestens 1 Tag konnte die Hybridisierung erfolgen. Eine zusätzliche Proteinasebehandlung fiel auf Grund der unter 2.3.1 aufgeführten präparativen Schritte weg. Denaturierung, Hybridisierung, Posthybridisierungswaschen und Detektion der Fruchtwasserkerne wurden wie unter 2.2.4-7 durchgeführt (die Denaturierungszeit verlängerte sich auf 5 min).

2.4 FISH am Kryostatschnitt

Die Methodik für FISH am Gewebsschnitt, welche in der vorhandenen Literatur beschrieben wurde, war nicht auf die Multiphotonen-Mikroskopie übertragbar. Um dennoch das Einsatzgebiet der Multiphotonen- Mikroskopie auf den DNA- Nachweis im Gewebsschnitt auszudehnen, erfolgte eine Veränderung bestehender Protokolle. Nachfolgend wird ein modifiziertes Protokoll im Einzelnen beschrieben.

2.4.1 Silanisierung der Objektträger

Für die folgenden Arbeitsschritte wurden 100 ml Glasküvetten verwendet.

Die zu silanisierenden Objektträger wurden 1 min in Aceton/3% Silan (3-(Triethoxisilyl)propylamin) getaucht. Es folgten zwei Waschgänge für 30 s in reinem Aceton, um dann mit zwei 30 s langen Spülvorgängen in H₂O die Beschichtung zu beenden. Eine Trocknung der Beschichtung erfolgte ÜN bei 70°C in einem Brutschrank. Die so behandelten Objektträger standen zur Aufnahme der Kryostatschnitte zur Verfügung. Eine Lagerung über mehr als 24 h erwies sich als nicht sinnvoll, da dadurch die Gewebsfixierung mit 0,5% Formalin nicht mehr effektiv genug war.

2.4.2 Schneiden des Gewebes

Das bei –80°C tiefgefrorene Nierengewebe, welches im Institut für Anatomie vorrätig war, wurde auf einen Stempel aufgefroren und in das Kryotom (LM 3000, Leica) eingespannt. Die gewünschte Schnittbreite wurde über eine Mikrometerschraube eingestellt. Um gute Schnitte zu erhalten, erfolgte zuerst das Einschneiden in das Gewebe. Das dabei entstehende Material wurde verworfen. Die sich sauber abtrennenden Kryostatschnitte wurden mit dem vorbereiteten Objektträger (siehe 2.4.1) aufgenommen. Ein Objektträger wurde mit 4-6 Schnitten versehen. Nachdem das Präparat angetrocknet war, wurde es umgehend fixiert.

2.4.3 Gewebsfixierung

Die aus 2.4.2 erhaltenen Präparate wurden 10 min bei Raumtemperatur mit 0,5% Formalin inkubiert und mit Wasser abgespült. Die Dehydratation (jeweils 3 min) mittels aufsteigender Ethanolreihe (70%, 95% und 100%) und anschließende Lufttrocknung beendete die Fixierung. Die Objektträger wurden staubfrei bis zur Hybridisierung gelagert.

2.4.4 Proteinasevorbehandlung

Eine Proteinasevorbehandlung mit Pepsin (wie unter 2.2.3 beschrieben) wurde durchgeführt. Protokollveränderungen erfolgten bei der Einwirkzeit der Proteinase und der Nachfixierung. Die Pepsininkubationszeit verlängerte sich auf 8 min und die Nachfixierung entfiel.

2.4.5 Denaturierung, Hybridisierung und Posthybridisierungswaschen

Einzig die Denaturierungszeit verlängerte sich auf 8 min. Die weiteren Präparationsschritte waren wie unter 2.2.4, 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben.

2.5 Multiphotonen- Mikroskop

Eine Weiterentwicklung des Laser- Scanning- Mikroskopes stellt das Multiphotonen- Mikroskop dar. Ein Multiphotonen- Mikroskop ist ein modifiziertes Laser- Scanning- Mikroskop mit der Möglichkeit der Multiphotonen- Anregung. Die Multiphotonen- Anregung wird mit Hilfe eines NIR- Lasers realisiert.

Die theoretischen Grundlagen für ein solches Mikroskop legte Minsky 1957 in einer Patentschrift (Minsky, 1957). Realisiert wurde eine von Minsky vorgeschlagene Anordnung durch Egger und Petran 1967. Eine 3- dimensionale Darstellung wurde durch das Einführen einer Lochblende in den Detektionsstrahlengang möglich. Diese Lochblende ist so angeordnet, dass eine fast ausschließliche Detektion der Photonen aus der Fokusebene gewährleistet wird.

Ein Multiphotonen- Mikroskop zeichnet sich durch ein sehr geringes Anregungsvolumen aus. Dadurch ist für die 3- dimensionale Darstellung die Verwendung einer Lochblende nicht notwendig (weitere Vorteile der Multiphotonen- Anregung S.10-11).

Heute sind Einphotonen- und Multiphotonen- Mikroskope zur Beantwortung von Fragestellungen betreffend die 3- dimensionale Struktur nicht mehr aus Forschungslaboren wegzudenken. Das in dieser Arbeit verwendete nicht kommerzielle Multiphotonen- Mikroskop wurde durch die Arbeitsgruppe Lasermikroskopie der Anatomie/ Anatomie II aufgebaut.

Ein Titan:Saphir-Laser (Vitesse, Coherent) mit einer 800 nm Wellenlänge, einer mittleren Ausgangsleistung von 1 Watt, einer Pulsdauer von 80 fs (Erzeugung von Leistungsdichten

im Terawattbereich) und einer Pulsfolgefrequenz von 80 MHz wurde über einen Strahlenaufweiter in ein modifiziertes Laser- Scanning- Mikroskop (LSM 410, Zeiss) eingekoppelt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mittels Basport- Detektor (König 2000; König et al., 2000e)

Der Grundaufbau dieses Multiphotonen- Mikroskopes ist anhand nachfolgender Skizze dargestellt.

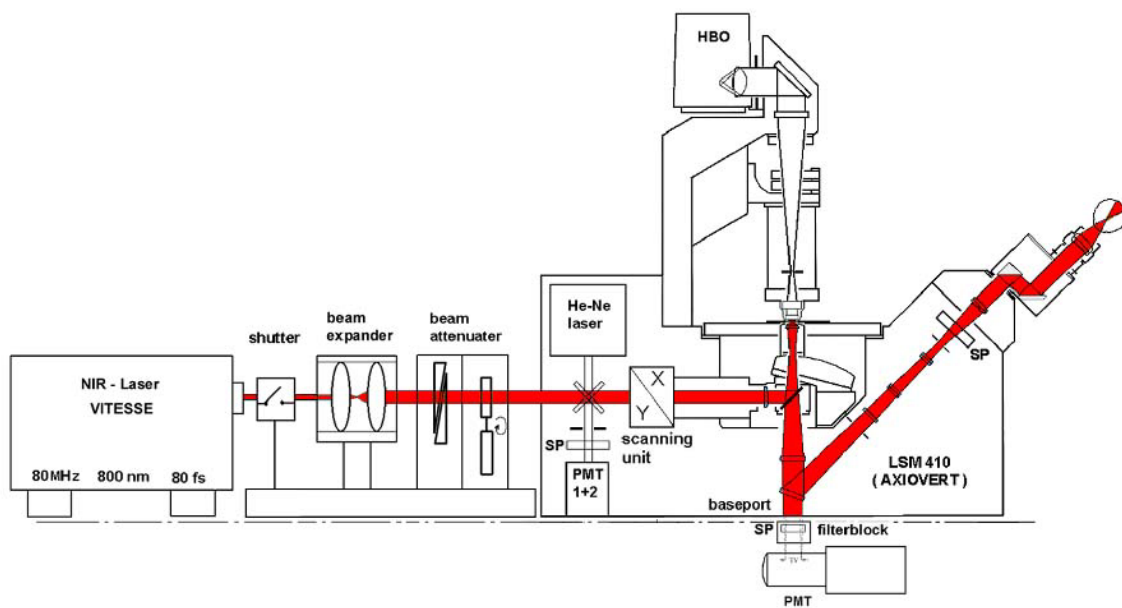


Abbildung 6 Schematische Darstellung eines Multiphotonen- Laser- Scanning- Mikroskops.

2.6 Auswertung am Laser Scanning Mikroskop

Für die Bearbeitung der Metaphasen und der Fruchtwasserkerne wurde das Objektiv Plan-Neofluor 63x Öl Phasenkontrast [Numerische Apatur (NA) 1,25 Zeiss] und für die Kryostatschnitte das Objektiv Plan-Neofluor 40x Öl [(NA 1,3)Zeiss] verwendet. Das biologische Objekt wurde unter visueller Kontrolle in die Fokusebene gebracht. Es folgte ein elektronischer Abgleich des Kontrastes. Die Detektion des Transmissionsbildes bei einer Laserleistung von einem Milliwatt (mW) ermöglichte die Zentrierung und die maximale elektronische Vergrößerung. Eine absolute Verdunklung des Laborraumes war Voraussetzung für die Detektion der Fluoreszenzsignale. Diese Maßnahmen waren notwendig, da der Photomultiplier (PMT) eine außerordentlich hohe Empfindlichkeit

besitzt und dadurch jede Photonenquelle, die nicht von der angeregten Fluoreszenz herrührte, einen erheblichen Störeffekt verursachte.

Um die Fluoreszenzsignale zu visualisieren, wurde die mittlere Leistung des Lasers auf maximal 7 mW erhöht. Es konnten 3 verschiedene Bilder unabhängig voneinander aufgenommen und in 3 verschiedenen Kanälen überlagert werden. So wurde z.B. das Transmissionsbild einer Metaphase oder eines Fruchtwasserkernes mit dem dazugehörigen Fluoreszenzbild überlagert.

Eine Differenzierung von mehreren Farben aus einem Bild war nicht möglich. Die Auswertung von Multicolor- Bildern war durch das konsequente Einschleusen von Langpassfiltern in den Strahlengang vor dem PMT durchführbar. Es kamen folgende Langpässe zum Einsatz: LP 495, LP 530, LP 550, LP 570, LP 590. Somit konnten theoretisch ohne Filter alle Fluorophore und mit dem LP 450 alle Fluorophore außer SpectrumAqua und Diethylaminocumarin (DAC) detektiert werden. Beim LP 530 wurden alle Wellenlängen kleiner als 530 nm abgeschnitten. Damit waren zusätzlich die Fluorophore SpectrumGreen und R110 der Detektion stark eingeschränkt zugänglich. Mit dem LP 550 konnten die blauen und grünen Fluorophore ausgeschlossen werden. Der LP 590 erlaubte nur noch die Detektion der Fluorophore TexasRed, Cy5 und Cy5.5. Im Vergleich der so erhaltenen Bilder wurde beim Multicolor- FISH jedem detektierten Signal eine Falschfarbe zugeordnet.

Für die 3D Auswertung bietet die Software des Laser- Scanning- Mikroskops die Möglichkeit, die Ansteuerung des automatischen Z-Triebes auf minimal 0,1µm pro Scan einzustellen. Um eine Bildserie für eine 3D Darstellung aufnehmen zu können, wurde das zu scannende biologische Objekt unter Fluoreszenzlicht ein wenig unterhalb der ersten detektierbaren Signale gestellt. Für die Detektion der Fluoreszenz pro Ebene wurde ein Z-Intervall von 0,5-0,7µm gewählt. Die Bildserie wurde beendet, wenn der zu detektierende Bereich außerhalb der Fokusebene war. Nach jedem Beenden einer Bildserie wurde das Objektiv automatisch in die Ausgangslage zurückversetzt. Die digitalisierten Bilder wurden nach jedem Scan in ein zuvor angegebenes Verzeichnis abgespeichert.

Die Multicolor- Detektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch musste je nach verwendetem Langpass eine Bildserie aufgenommen werden. Eine Bildserie umfasste bei einem Fruchtwasserkern 15-20 Bilder und bei einem 10 µm Gewebsschnitt 20-30 Bilder.

Zur Unterscheidung der hybridisierten Signale von dem umgebenden nicht hybridisierten DNA-Material erfolgte eine Gegenfärbung. Bei Metaphasen und Fruchtwasserkernen

wurde DAPI verwendet. Durch die aggressive Vorbehandlung (Pepsinverdau), erwies sich Ethidium- Bromid (keine so hohe DNA- Sensitivität wie DAPI) zur Gegenfärbung der Gewebsschnitte als geeigneter. Um eine Gegenfärbung durchführen zu können, erfolgte nach Aufnahme der hybridisierten Fluoreszenzsignale eine Markierung des abgescannten Areal. Mit Hilfe eines dünnen Folienstiftes wurde auf der Rückseite des Objektträgers das Areal mit Sicherheitsabstand umrundet. Vor dem Auftragen des unspezifischen DNA- Farbstoffs wurde der Objektträger vom Mikroskopisch genommen und das Deckglas entfernt. 5 μ l (100 μ g/ml) in Vectashield verdünntes DAPI oder 5 μ l 10 μ M in PBS gelöstes Ethidium-Bromid wurden aufgetragen und anschließend mit einem Deckglas (25x60mm) luftblasenfrei wieder abgedeckt. Der Objektträger wurde erneut in das Mikroskop eingespannt und das zuvor markierte Areal über das Objektiv gerückt. Im Vergleich mit dem vor der Gegenfärbung aufgenommenen Transmissionsbild wurde in der Transmission die Position genau abgeglichen. Um sicher zu gehen, dass die Diffusionszeit ausreichend war, wurde noch 5 min gewartet, bevor die Detektion der Gegenfärbung erfolgte. Der Z-Trieb blieb die ganze Zeit unberührt.

2.7 Zeitaufgelöstes Messen von Fluoreszenzen

Durch die extrem kurzen Laserpulse (80 fs) und der relativ großen Pulsfolgefrequenz (80 MHz) war ein zeitaufgelöstes Messen der Fluoreszenzen möglich. Das Zeitfenster, welches zwischen zwei Anregungsvorgängen entsteht, war ausreichend, um die Lebensdauer einer durch einen Anregungsvorgang erzeugten Fluoreszenz messen zu können.

Die Region in der die hybridisierte Fluoreszenz erwartet wurde, wurde im Transmissionsbild dargestellt. Die emittierenden Photonen wurden auf einen für zeitaufgelöstes Messen speziellen Detektor (Becker & Hickl GmbH PMH-100-1) umgelenkt. Unter kontinuierlicher Anregung (1 mW) eines ausgesuchten Bereiches erfolgte, unter Berücksichtigung der Pulsfolgefrequenz, rechnergestützt eine Photonenzählung. Wurde der Laser im „Spot Scan Modus“ auf einen hybridisierten Bereich fixiert, konnte eine Messung der Fluoreszenzlebensdauer durchgeführt werden.

2.8 Überprüfung der Zwei-Photonen-Anregung

Von einem hybridisierten Objektträger wurde ein Bereich von jeweils sechs verschiedenen Metaphasen aufgenommen. Dies wurde mit zwei weiteren Laserleistungen wiederholt. Mit

der zum Laser- Scanning- Mikroskop 410 (Zeiss) gehörenden Software wurde die anschließende Graustufenmessung der Signale durchgeführt. Die Graustufenergebnisse wurden in Abhängigkeit der verwandten Laserleistungen graphisch dargestellt.

2.9 Bestimmung des Ausbleichverhaltens von SpectrumOrange

Eine Ganzchromosomensonde wurde mit SpectrumOrange markiert. Bei der ersten Detektion der Fluoreszenz wurde die Bildverstärkung so modifiziert, dass die Fluoreszenz mit maximaler Graustufe ohne Übersteuerung aufgenommen werden konnte. Mit konstanter Pixelverweildauer erfolgte ein wiederholtes Abscannen des biologischen Zielobjektes, bis keine Fluoreszenz mehr detektiert werden konnte. Die kontinuierliche Verringerung des Graustufenwertes wurde graphisch in Abhängigkeit der Pixelverweildauer dargestellt.

2.10 Lösungen und Chemikalien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Reinstwasser angesetzt. Verwendet wurde mit Seralpur Delta (Seral) gewonnenes entionisiertes, organisch reines und partikelfreies Reinstwasser. Dieses wurde vor Gebrauch zusätzlich autoklaviert.

Aceton	100 % Roth
Blocking Reagenz (SSC/T/M)	0,5 g fettfreie Trockenmilch (Marvel) in 5 ml 4x SSC/T lösen, 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren, obere Schicht verwerfen
Colzemid	(Seromed)
4'6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI- Lösung)	4 µl DAPI Stocklösung (50 mg/ml) 1 ml Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories) Lagerung bei 4°C
Eisessig	100% (Roth)
Fixativ	75 % Methanol 25 % Essigsäure (immer frisch ansetzen oder bei -20°C lagern!)

Formamid (deionisiert)	(Merck) Denaturierungstemperatur von DNA wird heruntergesetzt. Es werden Konzentrationen von 50 % und 70 % benötigt und mit 4x SSC hergestellt. Wichtig ist die Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 mit 1 M HCl.
50 % Formamid (FA) / 2x SSC	250 ml Formamid 50 ml 20x SSC 200 ml H ₂ O pH 7,0
70% Formamid/SSC	350 ml Formamid 50 ml 20x SSC 100 ml H ₂ O
Formalin	37% Formaldehyd (Roth)
HCl	3,7% 1 mol/l Salzsäure (Merk)
Hybridisierungsmix (Dextransulfat)	2 g Dextransulfat 2 ml 20x SSC 2 ml 0,5 M Natriumphosphat 5 ml deionisiertes Formamid ad 10 ml mit H ₂ O (DNA wird darin gelöst) (bei 70°C (3 h) lösen)
Marvel	zu 99% fettfreies Milchpulver
Methanol	32,04 g/mg (Merk)
Nährmedium (Lymphozytenkultur)	PRMI 1640 with Glutamax (Gibco BRL)
Natriumacetat-Lösung 3M (bezogen auf Acetat)	24,6 g wasserfreies Natriumacetat (Sigma) in 100 ml H ₂ O lösen und pH 4,8 - 5,2 mit Essigsäure (Merck) einstellen
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline = PBS)	9,55 g (Biochrom KG) werden in 1 l Wasser gelöst
Phosphatpuffer	0,89 g Na ₂ HPO ₄ in 10 ml H ₂ O lösen (=0,5 M) 0,69 g NaH ₂ PO ₄ in 10 ml H ₂ O lösen (=0,5 M)
Postfixierungslösung (für Pepsinverdau)	2,5 ml 1 M MgCl ₂ (50 mM) 22,5 ml 1x PBS 25 ml Paraformaldehyd

Silan	3-Aminopropyl-Triethoxysilan (Sigma)
20x SSC	3 M NaCl (Roth) 0,3 M Natriumcitrat-Dihydrat (Merck) pH 7,0 mit 1 M HCl einstellen
2x SSC	50 ml 20x SSC 450 ml H ₂ O pH 7,0
4x SSC/T	100 ml 20x SSC 400 ml H ₂ O 250 µl 0,05 % Tween20 (Sigma) pH 7,0
0,4x SSC	480 ml H ₂ O 20 ml 20x SSC pH 7,0
Vectashield	Camon Vector Laboratories, H1000

2.11 Biologisches Material

Anti-Digoxigenin-Rhodamin	Fluorochrom-markierter Antikörper (Roche)
AMCA Anti-Sheep	Antikörper gegen Digoxigenin (Vector Lab)
Anti-Rabbit-Rhodamin	Fluorochrom-markierter Antikörper (Roche)
Avidin-FITC	Fluorochrom-markiertes Glykoprotein (Vectorlab) geht mit Avidin eine irreversible Bindung ein.
Cyanin 5	Roche
Cyanin 5.5	Roche
Biotinyliertes Anti-Avidin D (Goat)	Antikörper gegen Avidin (Vector Lab)
Cep (X, Y, 4)- Sonden	Zentromersonden (Vysis)
COT1-DNA	1 mg/ml für Prähybridisierung (GibcoBRL, Life Technologies)
Fiber Objektträger	Ritva Karhu und Minna Tanner (Center of Laboratory Medicine, Tampere University Hospital, Finland)
Kälberserum	Jetales (Seromed)
Phytohämagglutinin	PHA-L (Seromed)

Pepsin	Kristallin 2500 units/mg (Sigma) 1 g auf 50 ml H ₂ O kurz vortexen und zu je 500 µl aliquotieren
Diethylaminocumarin-5-dUTP	Fluoreszenzfarbstoff gebunden an dUTP (NEN-Dupont)
SpectrumAqua-5-dUTP	Fluoreszenzfarbstoff gebunden an dUTP (Vysis)
SpectrumGreen-dUTP	Fluoreszenzfarbstoff gebunden an dUTP (Vysis)
SpectrumOrange-dUTP	Fluoreszenzfarbstoff gebunden an dUTP (Vysis)
TexasRed-dUTP	Fluoreszenzfarbstoff gebunden an dUTP (Molecular Probes)
SpectrumRed-dUTP	Fluoreszenzfarbstoff gebunden an dUTP (Vysis)
Trypsin	BioChrom
Zentromerproben	Mariano Rocchi (Bari, Italien)

2.12 Technische Ausrüstung

Fluoreszenzmikroskop	Axioplan2 von Zeiss
Heizplatte	Gerhardt (Bonn)
Kulturflaschen	Geimer
Kryotom	LM 3000 (Leica)
Photomultiplier	R1527P (Hamamatsu Photonics, Japan)
Pufferkammer	(Serva Feinbiochemie GmbH & Co)
Software zur Bildaufnahme	Metasystems
ISIS3	
in-situ imaging system	
Schüttler	Certomat [®] H (Braun)
Speed Vac (DNA 110)	Savant
Sterilwerkbank (Laminar Flow Box)	Hera Safe (Heraeus Instruments)
Stopuhr	Digital-Timer (Roth)
Stromversorgungsgerät	Consort E321 (Fröbel Labor Geräte)
Thermo-Cycler	Peltier Thermal Cycler PTC200 (MJResearch)
Tiefkühltruhe	Liebherr

Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Wärmeschrank	(Heraeus Instruments)
Zentrifugen	Laborzentrifuge 3K10 (Sigma)
	Zentrifuge 5415C (Eppendorf)
	Mikrozentrifuge MC13 (Amicon Bioseparations)
	Biofuge 28RS (Heraeus sepatech)
Titan:Saphir-Laser	Vitesse,Coherent
Laser- Scanning- Miroskop	Carl Zeiss Jena GmbH
410	
Heizschrank	Heraeus
Photonendetektor	Becker & Hickl GmbH PMH–100-1
(zeitaufgelöste Messungen)	

3 Ergebnisse

3.1 Multi-Photonen-Anregung von FISH-Fluorophoren

3.1.1 Anregbarkeit der verwendeten Fluorophore

Die in der FISH verwendeten Fluorophore wurden hinsichtlich einer 800 nm Anregung überprüft. Die Tabelle 3 bietet eine Übersicht der in der Arbeit verwendeten Fluorophore.

Name	Abkürzung	Einphotonen Absorption (max) in nm	Einphotonen Emission (max) in nm	indirekt/direkt
Ethidium Bromid	EB	518	604	
4'6'-Diamidino-2-Phenylindol	DAPI	353	461	
SpectrumAqua	SA	426	480	direkt
Diethylamino-cumarin	DAC	426	480	direkt
Fluorescein-5-iso-thiocyanat	FITC	494	518	indirekt
SpectrumGreen	SG	497	524	direkt
Rhodamin 110	R110	502	530	direkt
SpectrumOrange	SO	559	588	direkt
TexasRed	TR	587	612	direkt
SpectrumRed	SR	595	615	direkt
Cyanin 5	Cy5	649	670	indirekt
Cyanin 5.5	Cy5.5	675	694	indirekt

Tabelle 3 Verwendete Fluorophore mit den dazugehörigen Einphotonen- Absorptionsmaxima/ Emissionsmaxima (Spektren Einleitung S. 8) und die angewendete Art der Hybridisierung.

Es zeigte sich, dass alle hier aufgelisteten Fluorophore mit Hilfe der simultanen Absorption mehrerer energieärmerer 800 nm- Photonen zur Fluoreszenz angeregt werden konnten.

Die Qualität der Signale war sehr unterschiedlich. Bemessungsgrundlage für die qualitative Aussage des Signals war das Signal/Hintergrund- Verhältnis [signal- noise- ratio = NSR

(König et al., 2000b)]. So wurde, um die Quantenausbeute der hybridisierten Bereiche bei weniger gut anregbaren Fluorophoren zu erhöhen, die mittlere Laserleistung heraufgesetzt. Dies hatte nicht nur ein deutlicheres Signal, sondern auch eine Verstärkung der Hintergrundfluoreszenz zur Folge.

Ein hoher SNR- Wert bedeutet im allgemeinen ein deutliches Signal bei kaum vorhandenem Hintergrund.

In nachfolgender Abbildung sind die Fluoreszenzgrauwerte von markierten Ganzchromosomen aller verwendeter Fluorophore dividiert durch die Grauwerte der extrachromosomalen Bereiche dargestellt (SNR- Werte).

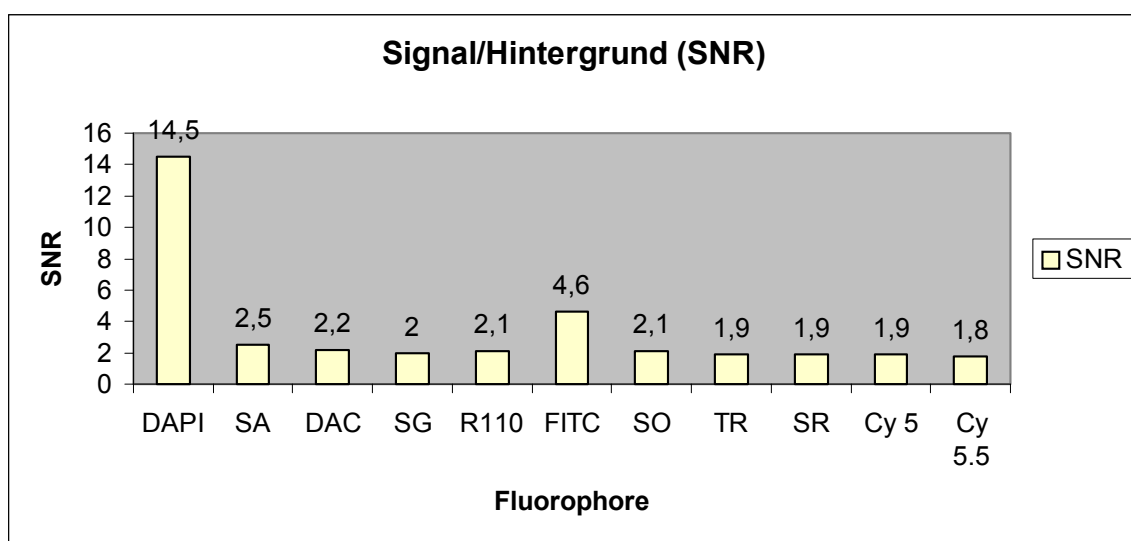


Abbildung 7 Graphische Übersicht der SNR- Werte aller verwendeten Fluorophore. Alle Fluorophormarkierten Ganzchromosomen wurden mit einer Leistung von 6,4 mW angeregt.

Die zur direkten Markierung der DNA verwendeten Fluorophore SpectrumAqua, Diethylaminocumarin (DAC), SpectrumGreen, Rhodamin 110 und SpectrumOrange wiesen keine großen Unterschiede in der Qualität der Signale auf.

Die immer, jedoch in unterschiedlichem Maße, vorhandene Hintergrundfluoreszenz stellte sich als Mischfluoreszenz mit deutlichen blau/grünen aber auch orange/rötlichen Anteilen dar. Mit Hilfe von nacheinander eingesetzten Langpassfiltern war eine Differenzierung der eingesetzten Fluorophore möglich. Durch das Herausfiltern der blauen Fluoreszenzen wurde der blaue Anteil des Hintergrundes abgeblockt. Bei der Verwendung des Langpasses 550 wurde zusätzlich der grüne Anteil ausgeschlossen. Somit musste man die blauen Signale von einem starken und die grünen Signale von einem etwas abgeschwächten Hintergrund unterscheiden.

Obwohl die Signalstärken von DAC und SpectrumAqua mit einem hohen Grauwert des Hintergrundes dividiert wurden, heben sich die SNR- Werte von den anderen direkten Fluorophoren etwas ab. Daraus lässt sich auf eine hohe Quantenausbeute schließen. Das Absorptionsspektrum von DAC bietet ein Beispiel für eine optimale Anregung. Den für die Zwei- Photonen- Anregung erwünschten Absorptionsbereich um 400 nm deckt DAC von allen in der FISH verwendeten Fluorophore am besten ab. DAC und SpectrumAqua haben die gleichen Absorptions- und Emissionsmaxima. Aus diesem Grunde ist anzunehmen, dass das Absorptions- und Emissionsspektrum von SpectrumAqua (Einleitung S. 8) dem von DAC ähnelt und somit SpectrumAqua ähnliche Eigenschaften wie DAC besitzen könnte.

Bei den direkt markierten DNA- Sonden kristallisierte sich SpectrumOrange als zu bevorzugendes Fluorophor heraus. Der Signal/ Hintergrund Quotient für SpectrumOrange hebt sich nicht von dem anderer direkt markierter Fluorophore ab, jedoch ist durch einen Einsatz von Langpassfiltern ein Ausblenden des unspezifischen blau/grünen Hintergrundes möglich. Mit einer solchen Reduktion des unspezifischen Hintergrundes hebt sich die SpectrumOrange Fluoreszenz deutlich von nicht hybridisierten DNA- Abschnitten ab. Ein weiterer Vorteil des Fluorophors SpectrumOrange ist, dass sich im Gegensatz zu anderen direkt markierten DNA-Sonden, der Einsatz von Fluorophor- gekoppeltem dUTP bei der Markierung und Amplifizierung der DNA- Sonden verringern lässt. Eine SpectrumOrange Markierung erfolgte mit weniger als der Hälfte des üblicherweise eingesetzten Fluorophor- gekoppelten dUTP.

Somit zeichnet sich die Verwendung der mit SpectrumOrange markierten DNA- Sonden nicht nur durch ein qualitativ gutes Fluoreszenz- Signal, sondern auch durch eine nicht ganz unerhebliche Kostenersparnis aus.

Damit ist bei direkt markierten DNA-Sonden das Fluorophor SpectrumOrange für die Multiphotonen- Mikroskopie zu favorisieren.

Lag die Auswahl der zu hybridisierenden Fluorophore im roten Spektralbereich, traten sowohl bei den direkt als auch bei den indirekt markierten DNA-Sonden einige, allerdings lösbare Probleme auf. Um TexasRed, SpectrumRed, Cyanin 5 und Cyanin 5.5 zu visualisieren, musste im Vergleich zu den anderen Fluorophoren die mittlere Laserleistung erhöht werden. Dadurch stieg auch die Intensität des Hintergrundes. Die Signalqualität war bei allen vier roten Fluorophoren gering.

Werden zur Erklärung dieser geringen Quantenausbeute die Absorptionsspektren herangezogen, fällt auf, dass ein Absorptionsspektrum um 400 nm von keinem der

Fluorophore erfüllt wird. Einzig Cyanin 5.5 weist bei 450 nm ein sehr geringes Absorptionsvermögen auf. Es war weder aus der Literatur noch von den Herstellerfirmen das Absorptionsverhalten dieser Fluorophore im ultravioletten Bereich in Erfahrung zu bringen. Bei einer Absorption im Bereich von 265 nm wäre ein drei Photonen- Effekt für die erhaltene Fluoreszenz verantwortlich. Man kann jedoch davon ausgehen, dass das Absorptionsverhalten der roten Fluorophore auch im Bereich von 400 nm nicht gleich Null ist. Das Fluorophor Cyanin 5 besitzt von den verwendeten Fluorophoren das langwelligste Absorptionsmaximum ohne ein zusätzliches kleines Absorptionsmaximum bei 450 nm (Cyanin 5.5) aufzuweisen (s. S.8). Deswegen wurde dieses Fluorophor herangezogen, um eine Abschätzung für die Anzahl der absorbierten Photonen vorzunehmen. Diese Ergebnisse werden in 3.1.3 dargestellt.

Bei Betrachtung der Abbildung 7 tritt der SNR- Wert von FITC (Fluorescein-5-iso-thiocyanate) deutlich hervor. Durch die indirekte Detektion von Biotin- markierter DNA mit Hilfe von an Avidin gekoppeltem FITC ist der Multiphotonen- Mikroskopie ein spezifisches und sensitives Fluorophor zur Verfügung gestellt. Eine Erklärung für diese hohe Quantenausbeute bietet das Absorptionsspektrum. Dies weist bei 400 nm zwar ein Minimum auf, jedoch zeigt sich < 400 nm wieder ein Anstieg des Absorptionsvermögens. Somit kommt für das Fluorophor FITC gleichzeitig die simultane Absorption von zwei und drei Photonen in Frage. Da sich je ein Biotin- Molekül mit einem FITC gekoppeltem Avidin verbindet (Harris et al., 1990), ist bei einer Detektion ohne Verstärkerschritte die Anzahl der FITC- Moleküle in etwa gleich zu setzen mit der Anzahl der Fluorophore bei direkt markierter DNA. Ein deutliches Signal, hervorgerufen durch eine hohe Fluorophorendichte, kommt somit nicht in Betracht.

Die Fluorophorendichte pro eingebautem, Biotin gekoppeltem Uridin kann durch eine Signalverstärkung noch weiter erhöht werden (Green, 1990; Pinkel et al., 1986). Der erste Detektionsschritt erfolgte, in dem das in die DNA- Sequenz inkorporierte, Uridin gekoppelte Biotin mit FITC gekoppeltem Avidin inkubiert wurde. Zur Verstärkung kann ein Biotin gekoppelter Antikörper verwendet werden, welcher gegen Avidin gerichtet ist. Die noch nicht abgebundenen Biotinmoleküle könnten so mit FITC gekoppeltem Avidin erneut inkubiert werden.

Bei einer so erfolgten Biotin- Detektion mit Verstärkung würde die Fluorophorendichte pro Biotinmolekül theoretisch auf das Doppelte erhöht (Harris et al., 1990). Dadurch ist es denkbar, dass die Sensitivität in der Multiphotonen- Mikroskopie noch weiter gesteigert werden kann.

3.1.2 Anregung von DAPI

Der hohe SNR- Wert des unspezifischen DNA- Farbstoffs DAPI ergibt eine sich von allen anderen Fluorophoren deutlich abhebende Signalintensität bei gleicher Leistung. Für die Erzeugung einer sichtbaren Fluoreszenz von mit DAPI gefärbter DNA reichen 25 μ W aus (Koenig et al., 2000e). Die durchschnittliche Anregungsleistung von mit Fluorophoren markierter DNA betrug 5-7 mW. Wurde bei der Multi-Photonen-Anregung von FISH Signalen DAPI verwendet, erlangte die DAPI- Fluoreszenz eine so hohe Intensität, dass eine Unterscheidung von anderen hybridisierten Signalen nicht durchzuführen war. Die nach einer 10 min Inkubation in 100% Ethanol verbliebende Restmenge an DAPI konnte durch die Verwendung des Langpassfilters 530 abgeblockt werden. Die Unterscheidung von grünen und langwelligeren Signalen war somit möglich. Die verbliebende Fluoreszenz war jedoch immer noch so stark, dass eine Unterscheidung von blauen Signalen (DAC und SA) nicht durchführbar war. Um eine Verwendung der beiden blauen Fluorophore weiterhin zu gewährleisten, wurde aus diesem Grunde auf die Verwendung von DAPI vor der Detektion der hybridisierten Signale verzichtet.

Eine Begründung für diese hohe Fluoreszenzintensität ist das Absorptionsspektrum von DAPI (Einleitung S.8), welches den Bereich von $<<300$ nm - <400 nm abdeckt. Daraus lässt sich ableiten, dass eine simultane 2 Photonen- und 3 Photonen- Anregung vorliegt. Eine Zwei- Photonen Anregung von DAPI mit Hilfe eines 647 nm Ar^+/Kr^+ Laser wurde durch Booth und Hell nachgewiesen (Booth und Hell; 1998). Bei dieser Zwei-Photonen Anregung muss ein Absorptionsvermögen für DAPI bei ca. 324 nm vorgelegen haben. Wird bei einer 800 nm Anregung von einem Drei- Photoneneffekt ausgegangen, sollte eine Absorption von ca. 265 nm vorliegen. Die simultane Absorption von zwei und drei Photonen wurde mit 970 nm bereits demonstriert (Lakowicz et al.; 1997). Für Fragestellungen, die nur den Nachweis von DNA beinhalten, bietet die DAPI Anfärbung wegen der hohen Sensitivität einen großen Vorteil.

In der FISH Routine Diagnostik wird die DAPI- Färbung unter anderen auch für ein schnelleres Auffinden der Zielobjekte (Metaphasen) benützt. Um die Zielobjekte ohne Inanspruchnahme des Fluoreszenzbildes in der Multiphotonen- Mikroskopie aufzufinden, muss ein Phasen- Kontrast Objektiv mit hoher Numerischer Apertur verwendet werden. Die Verwendung von Phasen- Kontrast- Objektiven hat eine Abschwächung der emittierten Photonen zur Folge. Des weiteren ist das Auffinden der Zielobjekte mit einem höheren zeitlichen Aufwand verbunden.

3.1.3 Anregung von Cyanin 5

Denk et al. stellte 1990 eine Näherung (1) für die Anzahl der absorbierten Photonen auf.

$$n \approx P^2 \alpha / (\tau f^2) \pi^2 NA^4 / (h^2 c^2 \lambda^2) \quad (1)$$

h = Planksche Konstante

τ = Pulsdauer

c = Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes

f = Pulsfrequenz

n = Anzahl der absorbierten Photonen

NA = Numerische Apertur

P = Mittlere Leistung

λ = Wellenlänge

α = Absorptionskoeffizient

Wird die Formel (1) durch eine Zusammenfassung aller Konstanten vereinfacht, erhält man die Näherung (2) (R = Konstante):

$$n \approx P^2 R \quad (2)$$

Diese Näherung zeigt die quadratische Abhängigkeit der Anregungsleistung zur Zwei-Photonen Absorption. Liegt der Anregung eine simultane Absorption von drei Photonen zu Grunde, hätte die Näherung $n \approx P^3 R$ Gültigkeit. Die Anzahl der absorbierten Photonen steht im direkten Zusammenhang zum Grauwert des fluoreszierenden Signals. Wird demnach bei der Zwei-Photonen-Anregung die Anregungsleistung verdoppelt, vervierfacht sich die Signalintensität. Für die simultane Drei-Photonenabsorption würde sich bei einer Leistungsverdopplung die Signalintensität verachtfachen. In dieser Arbeit wurden die Signale von einem Cyanin 5 markierten Ganzchromosom verwendet. Die Fluoreszenz wurde mit drei unterschiedlichen Leistungen erzeugt. Ein Intensitätswert bildete sich aus dem Mittelwert von drei Gaustufenmessungen eines Signals.

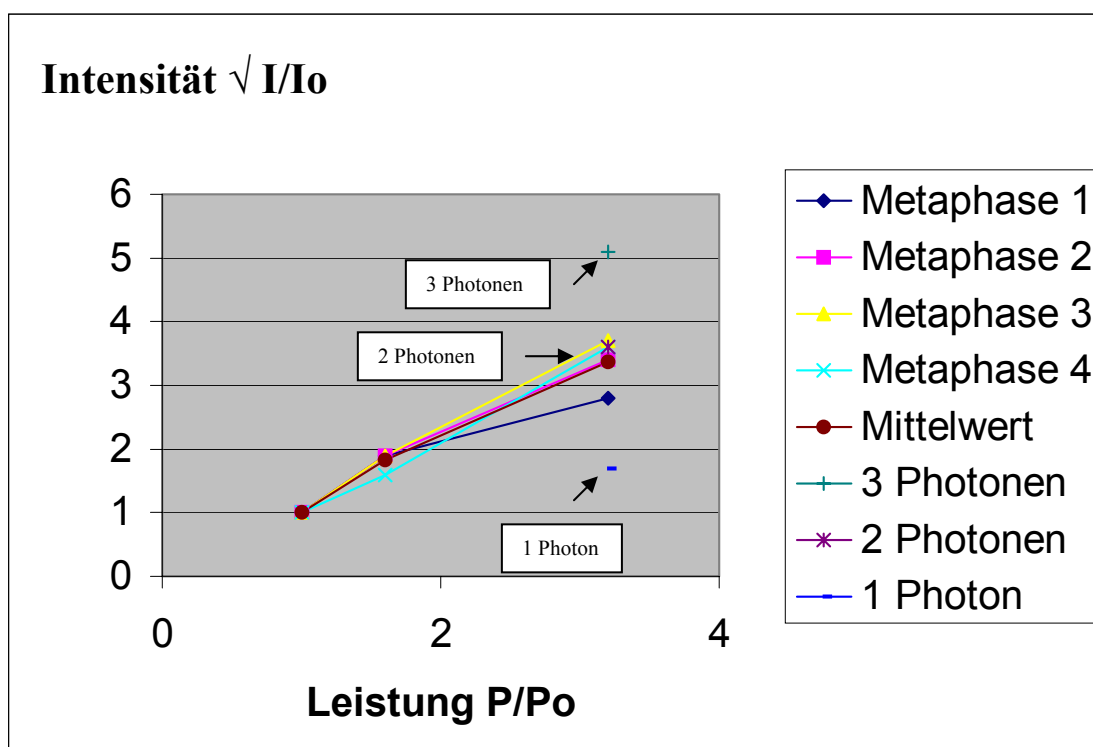


Abbildung 8 Zusammenhang zwischen Anregungsleistung und Signalintensität. Die Punkte 1/2/3 – Photonen verdeutlichen den errechneten Kurvenverlauf bei der Absorption von 1, 2 oder 3 Photonen. In der Graphik ist die Quadratwurzel aus I/I_0 in Abhängigkeit zur Leistung (P/P_0) dargestellt (normierte Achseneinteilung). Anregungsleistungen mit 2,2; 3,6 und 7 mW.

Bei dieser Achseneinteilung erhält man bei einem Zwei- Photonen- Effekt eine lineare Abhängigkeit. Bei Betrachtung der Graphik fällt die Streuung der Ergebnisse auf. Die Kurven besitzen keinerlei Bezug zu dem Punkt (3 Photonen), zu welchem sich die Kurven bei einer simultanen Absorption von 3 Photonen rechnerisch annähern müssten. Ebenso ist der Punkt (1 Photon) , um den rechnerisch für die Einphotonen- Absorption gestreut werden müsste, isoliert im Diagramm zu erkennen.

Somit kann bei der 800 nm Anregung des Fluorophors Cyanin 5 von einer simultanen Absorption zweier Photonen ausgegangen werden.

3.1.4 Ausbleichverhalten der Fluorophore

Die Eigenschaft von Fluorophoren nach Anregung Photonen im sichtbaren Spektralbereich zu emittieren, ist nicht dauerhaft. Nach wiederholtem Abscannen des Zielobjektes lässt sich ein zunehmendes Verblässen des Signals beschreiben. Der Signalverlust ist abhängig von der Anregungsleistung und der Pixelverweildauer des Lasers. Um das

Ausbleichverhalten des Fluorophors SpectrumOrange zu ermitteln, wurde die mittlere Laserleistung bei 6,1 mW und die Dauer für einen Scan bei 16 s konstant gehalten.

Um das Ausbleichverhalten graphisch zu visualisieren, wurde der Grauwert des Signals in Abhängigkeit der Verweildauer des Lasers auf einem Pixel dargestellt. Die Pixelverweildauer errechnete sich aus der erforderlichen Gesamtzeit für einen Scan dividiert durch die Gesamtheit der bei diesem Scan angesteuerten Pixel. Werden 512x512 Pixel in 16 s angesteuert, ergibt dies eine Verweildauer des Lasers pro Pixel von 61 μ s. Bei der ersten Signaldetektion wurde die Signalverstärkung so eingestellt, dass der maximale Graustufenwert ohne Übersteuerung eingestellt werden konnte.

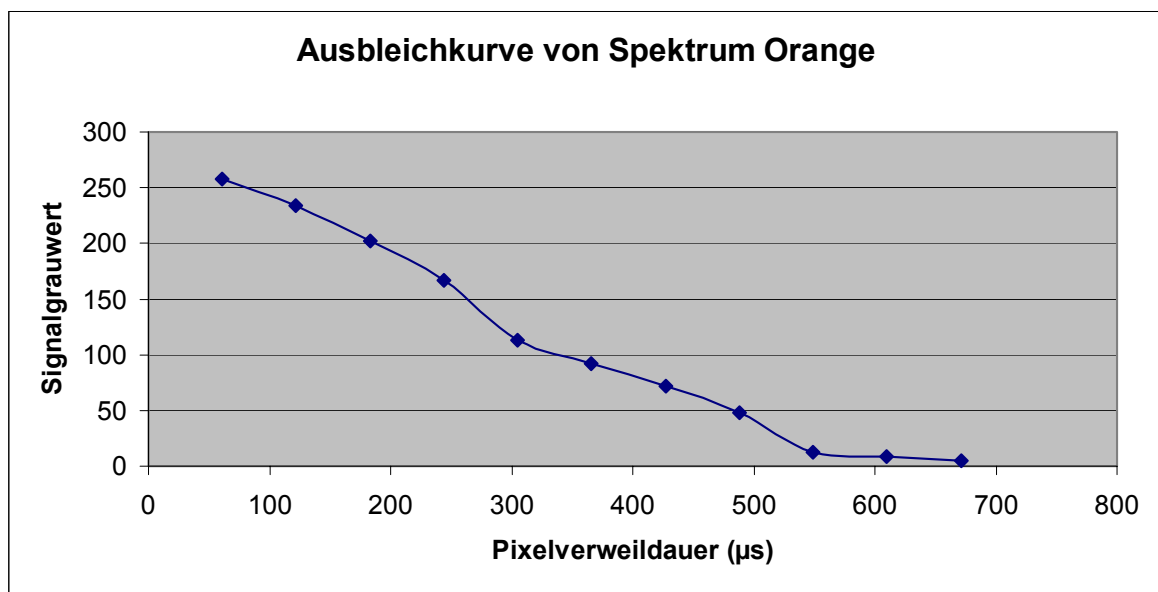


Abbildung 9 zeigt graphisch das Ausbleichen des mit SpectrumOrange markierten Ganzchromosoms 9. Jeder Punkt auf dem Graphen entspricht einem Scan mit 16 s Dauer. Die Anregungsleistung betrug 6,1 mW.

Bis zum 9. Scan lässt sich ein kontinuierlicher Signalverlust beschreiben. In der Extrapolation ist ein linearer Verlauf der Kurve zu vermuten. Dieser lineare Verlauf kann mit der Gleichung $f(x) = -0,5x + 288,5$ [$f(x)$ = Signalgrauwert, x = Pixelverweildauer] beschrieben werden. Nach 319 μ s Pixelverweildauer hat sich der Signalgrauwert auf die Hälfte reduziert (T_{50}). Dies würde ca. 5 Scans mit 16 s Dauer entsprechen. Der T_{37} Wert, d.h. wenn die Signalintensität auf 37 % abgefallen ist, würde nach einer Pixelverweildauer von 386 μ s erreicht sein. 386 μ s Pixelverweildauer entsprechen ca. 6 Scans mit 16 s Dauer oder 12 Scans mit 8 s Dauer. Um ein deutliches Signal mit ausreichendem Kontrast zum Hintergrund zu detektieren, empfiehlt es sich, die Probe nicht länger als mit 100 μ s

Verweildauer pro Pixel anzuregen. Bei einer Anregung mit 6,1 mW würde die Pixelverweildauer von 164 μ s ein Signalverlust um ca. 20% bedeuten. Dies würde ca. 5 Scans mit je 8s Dauer entsprechen. Nach ca. 561 μ s Verweildauer des Lasers auf einem Pixel war das Signal soweit ausgebleicht, dass eine Unterscheidung vom Hintergrund nur noch schwer möglich war.

Der Hintergrund blieb für den Bereich der für die hybridisierten Signale relevanten Pixelverweildauer konstant. Bei der Multicolor- Detektion des verwendeten Systems, welches bis zu 5 mal das Abscannen einer Fokusebene voraussetzt, muss auf die 8 s Scandauer zurückgegriffen werden. Werden hingegen Ein- Farbdetektionen vorgenommen ist die 16 s Scandauer zu bevorzugen.

Das leistungsbezogene Anregungsfenster von 5- 7 mW ist so klein, das sich keine relevanten Aussagen ableiten lassen. Auf die leistungsabhängige Darstellung des Ausbleichverhalten wurde aus diesem Grunde verzichtet.

Die für die simultane Absorption von zwei bzw. drei Photonen unabdingbare Photonenflussdichte wird nur im Fokus erreicht. Außerhalb des Fokus können mehrere Photonen nicht simultan absorbiert werden. Somit ist nahezu nur der im Fokus abgescannte Bereich dem Ausbleichen unterworfen.

Das Problem, dass nach mehrmaliger Anregung die erhaltene Fluoreszenz kontinuierlich abnimmt, ist natürlich auch ein Problem der Multiphotonen- Mikroskopie. Anhand dieser Ausbleichkurve konnte ein Richtwert für die Anzahl von Anregungsvorgängen in Bezug auf eine sichere Detektion der Fluoreszenz von SpectrumOrange ermittelt werden. Für weitere Experimente wäre es sinnvoll, für alle verwendeten Fluorophore Ausbleichkurven zu ermitteln. Aus der Erfahrung heraus ist anzunehmen, dass vermutlich für die verwendeten roten Fluorophore Cyanin 5 und Cyanin 5.5 die am stärksten abfallenden Ausbleichkurven ermittelt werden würden, d.h. dass wenige Scans ein starkes Ausbleichen der Fluoreszenz zur Folge haben.

Die technische Lösung, Langpassfilter für die Differenzierung der Emissionen von Multicolor Hybridisierungen einzusetzen, ist ausreichend, damit das Ausbleichen der Fluorophore, vor ihrer Detektion, als Fehlerquelle ausgeschlossen werden kann.

Ergäben sich für die verwendeten Fluorophore spezifische Ausbleichkurven, so könnten diese Eigenschaften zur Differenzierung der erhaltenen Emissionen herangezogen werden.

3.1.5 Auftrennbarkeit der Emissionen

Die Ergebnisse, betreffend der Methodik zur Auftrennung der Emissionen bei Multicolor-Bildern, sollen hier noch einmal eigenständig aufgeführt werden.

Die Möglichkeit mit einer Wellenlänge von 800 nm, durch die simultane Absorption zweier bzw. dreier energieärmerer Photonen, Fluoreszenzen zu erzeugen, war mit Schwierigkeiten verbunden. Das gesamte Spektrum der erzeugten Emissionen wurde in Graustufen dargestellt. Um Multicolor-Bilder auswerten zu können, mussten die detektierten Wellenlängen differenziert werden.

Der derzeitige technische Stand machte es möglich, eine solche Auftrennung der Emissionen vorzunehmen. Mit Hilfe von Langpassfiltern, welche vor dem Photonendetektor platziert wurden, konnten diese Anforderungen erfüllt werden. Ein Langpass besitzt die Eigenschaft, ab einer bestimmten Wellenlänge nur noch Photonen mit einer größeren Wellenlänge passieren zu lassen. Photonen, die kleiner als die angegebene Trennwellenlänge sind, werden abgeblockt.

Es kamen folgende Langpassfilter zum Einsatz: LP 495, LP 530, LP 550, LP 570, LP 590, LP 645. Somit konnten theoretisch ohne Filter alle Fluorophore und mit dem LP 495 alle Fluorophore außer Sepctrum Aqua und Diethylaminocumarin detektiert werden. Beim LP 530 wurden alle Wellenlängen kleiner als 530 nm abgeschnitten. Damit waren zusätzlich die Fluorophore FITC, SpectrumGreen und R110 der Detektion stark eingeschränkt zugänglich. Mit dem LP 550 konnten die blauen und grünen Fluorophore ausgeschlossen werden. Der LP 590 erlaubte nur noch die Detektion der Fluorophore TexasRed, SpectrumRed, Cy5 und Cy5.5. Eine Differenzierung zwischen TexasRed/ SpectrumRed und Cyanin 5/Cyanin 5.5 wurde mit der Verwendung des Langpassfilters 645 nm erreicht. Im Vergleich der so erhaltenen Bilder konnte beim Multi-Color-FISH jedem detektierten Signal eine Falschfarbe zugeordnet werden.

Nachfolgende Abbildung verdeutlicht die Eigenschaften der Langpassfilter in Bezug auf die Emissionsspektren der eingesetzten Fluorophore.

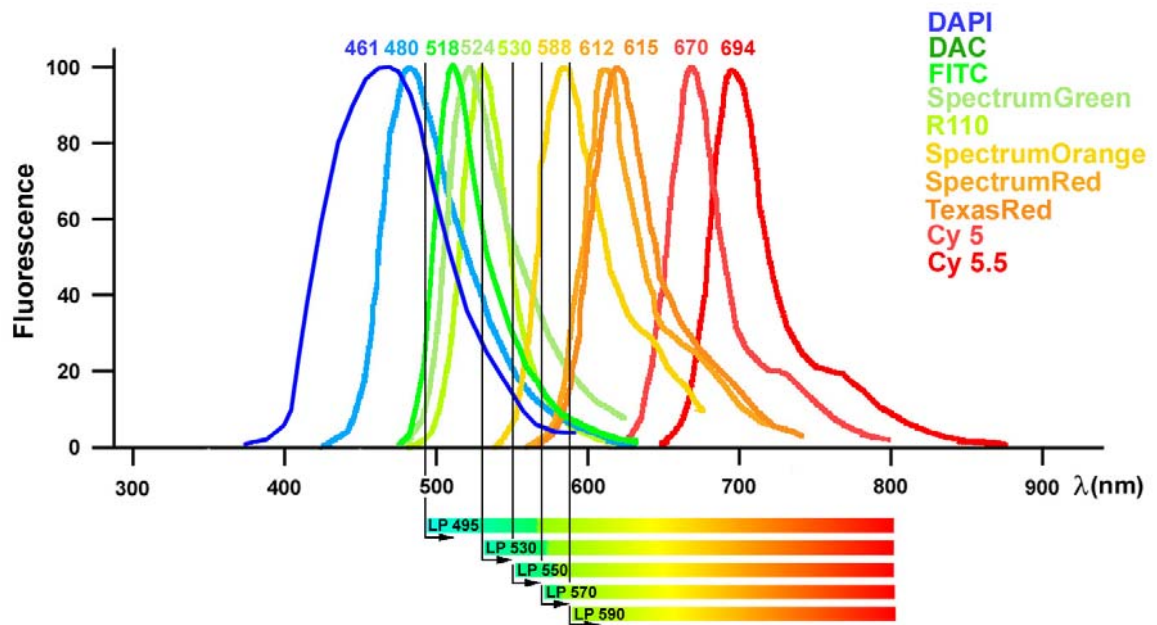


Abbildung 10 Emissionsspektren in Zusammenhang mit den verwendeten Langpassfiltern. Die Wellenlängen kleiner als der eingesetzte Langpass werden der Detektion nicht zugeführt. Es wird verdeutlicht, welche Fluorophore mit welchem Langpass von der Detektion ausgeschlossen werden.

Die Fluorophore DAC und SpectrumAqua haben die gleichen Emissionsspitzen von 480 nm. Eine Differenzierung dieser beiden Fluorophore mit Hilfe von Langpassfiltern ist deshalb ausgeschlossen. Die Emissionsmaxima der grünen Fluorophore FITC (518 nm), SpectrumGreen (524 nm) und Rhodamin 110 (530 nm) liegen jeweils 6 nm voneinander getrennt. Eine Unterscheidung dieser drei Fluorophore war mit Verwendung der oben aufgeführten Langpassfilter nicht möglich. Die Emissionen von SpectrumRed (612 nm) und TexasRed (615 nm) liegen ebenfalls so nah beieinander, dass eine Auftrennung der Fluorophore mit der oben beschriebenen Anordnung nicht ausführbar war. Mit den Emissionsmaxima von Cyanin 5 (670 nm) und Cyanin 5.5 (694 nm) ist eine Wellenlängendifferenz von 24 nm gegeben. Dieser Emissionsabstand ist zwar für eine Unterscheidung mit Langpassfiltern ausreichend, jedoch mit der Verwendung von Langpass 645 nm war keine sichere Differenzierung möglich.

Eine sichere Unterscheidung der Emissionen erfolgte zwischen: blau emittierenden Fluorophoren (DAC und SA), grün emittierenden Fluorophoren (FITC, SG und R110), orange emittierenden Fluorophoren (SO), rot emittierenden Fluorophoren (SR und TR) und infrarot emittierenden Fluorophoren (Cy5 und Cy5.5).

Ein Langpass ist nicht in der Lage die für den Verwendungszweck vorgesehene Wellenlängen zu 100% abzublocken. Es existiert ein Restdurchlassvermögen von ca. 5 %.

Diese Eigenschaft war bei der Verwendung von Fluorophoren mit einer hohen Quantenausbeute von Bedeutung. So war bei einem starken FITC- Signal (Biotin markierte Ganzchromosomen-sonde) ein Abblocken des Signals mit einem Langpassfilter 570 nm nicht im ausreichenden Maße möglich. Durch die Abschwächung der Signalintensität, die durch einen Einsatz des Langpassfilters 570 zustande kam, war jedoch eine sichere Aussage über die Wellenlänge des Signals immer noch gewährleistet.

Der unspezifische DNA- Farbstoff DAPI besitzt eine sehr hohe Quantenausbeute. Bei einer ergebnisorientierten Verwendung von DAPI bedarf es einer minimalen Konzentration von 100 µg/ ml. Die Signalintensität ist so groß, dass ein Filtern mit den oben aufgeführten Langpassfiltern nicht möglich ist. Wurde DAPI durch eine 10 min Inkubation in 100% Ethanol wieder herausgewaschen, war das Abblocken der verbleibenden DAPI-Fluoreszenz mit dem Langpass 530 möglich.

3.2 Exogen verursachte Eigenfluoreszenz

In einem Eigenfluoreszenzbild einer nativen unbehandelten Zelle (bei einer Anregung mit 20 mW) zeichnet sich der Zellkern durch eine Fluoreszenzaussparung aus. Unter diesen Bedingungen besitzt die unbehandelte DNA in der Multiphotonen- Mikroskopie keine fluoreszierenden Eigenschaften.

Wird eine Metaphase nach der Fixierung, jedoch ohne Hybridisierungsprozedur, unter der Multiphotonen- Fluoreszenz betrachtet, besitzen die Chromosomen eine deutliche Fluoreszenz. Die DNA oder (und) die der DNA assoziierten Proteine erhalten somit durch die Präparation Veränderungen in ihren physikalischen/ biochemischen Eigenschaften, welche mit der Möglichkeit zu fluoreszieren verbunden sind.

In erster Linie sind die Fixierungsmittel für diese Veränderungen der Eigenschaften verantwortlich (Steinkamp et al., 1999; Clancy und Cauller, 1998; Kimura et al., 1986; Hunter et al., 1984; Prasada, 1982; Ezaki, 2000). Es gibt eine Einteilung in denaturierende- und quervernetzende Fixierungsmittel (Leitch et al., 1994). Das denaturierende Fixierungsmittel Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1) ist zur Zeit für die Präparation von Metaphasen unumgänglich.

Beim Einsatz von Fixativ erfolgt die fixierende, denaturierende Wirkung durch die Essigsäure. Mit dem Verdunsten des Methanols steigt die hygroskopische Wirkung der Säure. Das angesogene Wasser ist Voraussetzung für die Quellung/ Spreitung der Chromosomen. Die denaturierende Fixierung ist für die Gesamtheit der präparativen

Schritte für die FISH nicht ausreichend. Um einem Verlust der zu hybridisierenden Objekte vorzubeugen, muss ein quervernetzendes Fixierungsmittel verwendet werden. Der Verlust von Metaphasen wird durch 50 % Paraformaldehyd vermindert.

In Standardprotokollen wird zur quervernetzenden Nachfixierung eine 10 min Inkubation mit 50 % Paraformaldehyd beschrieben (Macville et al., 1997; Liehr et al., 1995b). Der Kontrast zwischen Eigenfluoreszenz und den fluoreszierenden Signalen war zu gering, um mit der Multiphotonen- Mikroskopie eine Differenzierung durchzuführen. Eine Reduktion der Inkubationszeit auf 5 min war für die sichere Unterscheidung zwischen Signal und Eigenfluoreszenz ausreichend. Die gestiegene Wahrscheinlichkeit des Verlustes von auf dem Objektträger befindlichen Metaphasen konnte in Kauf genommen werden.

Da sich bei einer Metaphase die exogen verursachte Fluoreszenz nur auf die Chromosomen bezieht, war die Detektion der nicht hybridisierten DNA auch ohne eine Verwendung eines unspezifischen DNA- Farbstoff (DAPI) möglich.

Das Protokoll für die Hybridisierung von unkultivierten Fruchtwasserzellen ähnelt dem der Metaphasenpräparation (Aufreinigung in Fixativ, Nachfixierung mit Paraformaldehyd). Auch hier war die Reduktion der Inkubationszeit mit Paraformaldehyd ausreichend, um eine Detektion der hybridisierten Signale zu erreichen. Wurden Fruchtwasserkerne untersucht, an denen noch Zellfragmente hafteten, war die Fluoreszenz der nicht hybridisierten DNA nicht im ausreichenden Maße von der Fluoreszenz der Zellfragmente zu unterscheiden. Dies machte eine unspezifische DNA- Färbung notwendig.

Grundlegende Schwierigkeiten bereitete das Fixieren der Gewebsschnitte. In der Literatur wurden Fixierungen mit bis zu 30%tigem Formalin (Aubele et al., 1997; Bull und Harnden, 1999; Liehr et al., 1995a; Hopman et al.,1991; D'Alessandro et al., 1997) beschrieben. Die durch die quervernetzende Fixierung entstandenen Fluoreszenzeigenschaften waren selbst bei minimaler Konzentration des Formalins noch so stark, dass keine hybridisierten Fluoreszenzsignale detektiert werden konnten. Bei weiterer Verringerung der Formalinkonzentration war eine Ablösung der Kryostatschnitte vom Objektträger in einem Wasserbad (Pepsinverdau, Posthybridisierungswaschen) die Folge. Eine Verwendung von anderen quervernetzenden Fixierungsmitteln (Glutardialdehyd) oder denaturierenden Fixierungsmittel (Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1)) war aus folgenden Gründen nicht möglich.

Glutardialdehyd stellt auch bei sehr geringen Konzentrationen (0,1 %) ein sehr gutes quervernetzendes Fixierungsmittel dar. An jedem Ende des vierkettigen Kohlenwasserstoffs besitzt Glutardialdehyd eine Aldehydgruppe. Diese Aldehydgruppen

sind sehr gut in der Lage, nicht nur mit den zu fixierenden Proteinen, sondern auch mit sich selbst quervernetzende Moleküle zu bilden. Diese Strukturveränderungen haben ausgezeichnete fluoreszierende Eigenschaften zur Folge. Gesucht wurde jedoch nach einem Fixierungsmittel, welches keine oder nur geringe Fluoreszenz aufweist. Eine Verwendung von Glutaraldehyd zur Fixierung von biologischen Objekten kommt für die Multiphotonen- Mikroskopie nicht in Betracht.

Die Verwendung des sich schon bewährten denaturierenden Fixierungsmittels Fixativ war in Hinsicht der Fixierung eines Kryostatschnittes unzureichend.

Mit Hilfe einer Objektträgeroberflächenbehandlung (Silanisierung) konnten diese präparativen Hindernisse überwunden werden.

Die Beschichtung der Objektträger mit 3-Aminopropyl- Triethoxysilan (Sigma) stellt eine Oberflächenbehandlung dar, wobei die auf der Oberfläche des Siliziumkristalles befindlichen polaren Gruppen abgeschirmt werden. Dadurch entstehen vorrangig hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Gewebsschnitt und Glasoberfläche. Somit wird die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen verhindert, welche in Lösung elektrostatisch abgeschirmt werden. Die vom Silan ausgehenden Aminoalkylgruppen sind in der Lage, mit den vom Kryostatschnitt ausgehenden Ketonen bzw. Aldehyden kovalente Bindungen einzugehen [Nukleophile Substitutionsreaktion (Flörke und Wolff, 1991)]. Die Möglichkeit das biologische Objekt mit kovalenten Bindungen an den Objektträger zu fixieren, verringert die Notwendigkeit einer effektiven quervernetzenden Fixierung. Isoliert ist die Oberflächenbehandlung allerdings unzureichend. So wurde auf das quervernetzende Formalin als zusätzliches Fixierungsmittel zurückgegriffen.

Eine 10 min Inkubation mit 0,5 % Formalinlösung stellte eine optimale Fixierung mit einer kaum vorhandenen exogen verursachter Eigenfluoreszenz dar. Jedoch war das Konzentrationsfenster sehr klein. Bei einer Fixierung mit Formalin $>1\%$ war die entstandene Eigenfluoreszenz wieder so stark, dass eine Unterscheidung von den hybridisierten Fluoreszenzsignalen nicht möglich war. Des weiteren durften die oberflächenbeschichteten Objektträger nicht mehr als drei Tage gelagert werden und die quervernetzende Fixierung mit Formalin sollte umgehend nach Auftrag des Gewebsschnittes erfolgt sein. Bei Nichtbeachten dieser Zeitgrenzen stieg die Wahrscheinlichkeit des Verlustes des biologischen Objektes während der Präparation.

Eine Eigenfluoreszenz, welche von unspezifisch gebundenen DNA- Sonden herrührte, war durch wiederholtes stringentes Waschen beherrschbar. Des weiteren konnte durch das

Variieren der Hybridisierungszeit auf die Intensität der unspezifisch gebundenen DNA-Fluoreszenz und somit auf die Hybridisierungsergebnisse Einfluss genommen werden.

Neuere Experimente zeigten, dass bei der Präparation von Metaphasen und Interphasekernen auf oberflächenbehandelten Objektträger (Silanisierung) und dem Verzicht des Paraformaldehyd zur Nachfixierung, ein Detektionsergebnis mit kaum vorhandener, exogen verursachter Eigenfluoreszenz erreicht werden kann.

3.3 Multiphotonen- Multicolor- FISH an Metaphasen

Abbildung 11 (S. 51) zeigt eine Aufnahme einer Metaphasenplatte mit Multiphotonen-Multicolor- Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (MM-FISH). Es kamen Ganzchromosomensonden mit folgenden Markierungen zum Einsatz: Chromosomen 1- Digoxigenin, 6- TexasRed, 9- Biotin, 13- SpectrumOrange, 17- Diethylaminocumarin und 21- Rhodamin 110. Biotin wurde mit Cyanin 5 und Digoxigenin mit Cyanin 5.5 detektiert. Um eine Unterscheidung von Fluoreszenzen ähnlicher Wellenlänge zu erleichtern, erfolgte eine größenabhängige Auswahl der Sonden. So wurden die Chromosomen 1, 6 und 9 mit den roten Fluorophoren Cyanin 5, Cyanin 5.5 und TexasRed markiert. Diese Größenauswahl der Sonden erleichterte die Fluorophorzuordnung zu den Signalen erheblich. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit einer Wellenlänge und mit nur einem Scan. Eine Differenzierung der Fluoreszenzen gelang durch den Einsatz von Langpassfiltern und unabhängig davon durch die Morphologie der Chromosomen im Transmissionsbild. Es erfolgte nach Aufnahme der Fluoreszenzen eine unspezifische DNA- Färbung durch DAPI.

Die Abbildung 11 zeigt die Überlagerung der DAPI- Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzbild der hybridisierten Sonden. Um die Multicolor- Bilder zu visualisieren, erfolgte eine Falschfarbenzuordnung. Es erfolgte eine Zuordnung von Chromosom 1 (Cy5.5) mit dunkelrot, Chromosom 6 (TR) mit hellrot, Chromosom 9 (Cy5) mit gelb, Chromosom 13 (SO) mit weiß und Chromosom 21 (R110) mit grün. Eine qualitative Aussage über die Signale ist nach der Falschfarbenzuordnung nicht mehr möglich.

Die Lage der Chromosomen entspricht einer üblichen Verteilung einer Metaphasenplatte. Die Größe der Chromosomen lässt auch auf eine standardmäßige Präparation schließen. Es ist eine mit 46 Chromosomen vollständige Metaphase eines menschlichen Lymphozyten. Eine Überlappung der fluoreszenzmarkierten und detektierten Chromosomen liegt nicht

vor, d.h. eine Verwechslung der Chromosomen, aufgrund sich überlagernder unterschiedlicher Wellenlängen, kann ausgeschlossen werden. Die chromosomale Struktur ist bei den Chromosomen 1 und 6 am deutlichsten zu erkennen, d.h. eine Aufspaltung in 2 Chromatiden ist zu visualisieren. Die Zentromerlage ist ebenfalls bei den Chromosomen 1 (metazentrisch) und 6 (submetazentrisch) am sichersten aufzuzeigen. Nicht mehr ganz so deutlich, aber immer noch sicher, lassen sich die submetazentrischen Zentromerverjüngungen des Chromosoms 9 ausmachen. Die akrozentrische Lage der Zentromere der Chromosomen 13 und 21 lassen sich nur noch auf Grund der Signalverjüngungen an jeweils einem Ende der Chromosomen erahnen. Eine Auswertung der chromosomalen Bänderung ist in diesem Fluoreszenzbild nicht möglich.

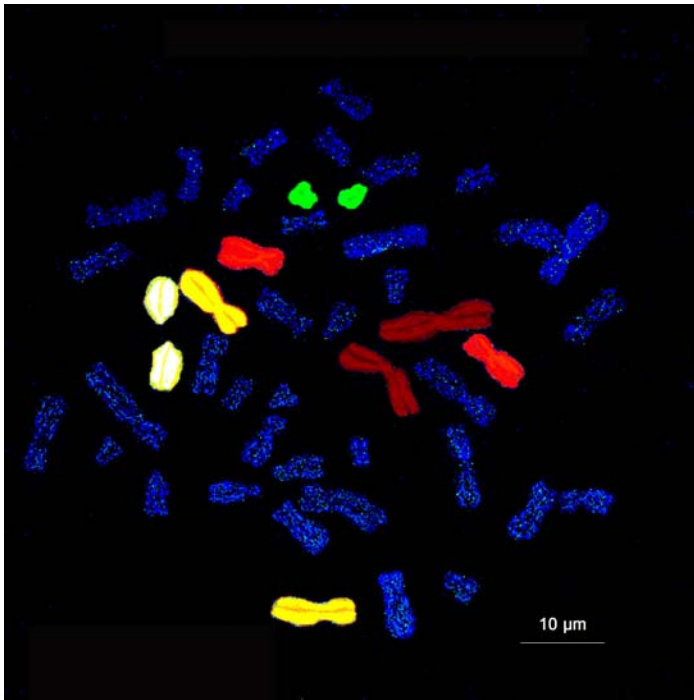


Abbildung 11 Aufnahme einer Metaphase mit Ganzchromosomen (WCP) Multicolor Multiphotonen FISH (MM-FISH). Folgende Markierungen wurden vorgenommen: Chromosom 1 (Digoxigenin) Cyanin 5.5- dunkelrot, Chrom. 6 TexasRed- hell rot, Chrom. 9 (Biotin) Cyanin5- gelb, Chrom. 13 SpectrumOrange- weiß, Chrom. 21 Rohdamin 110- grün. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI.

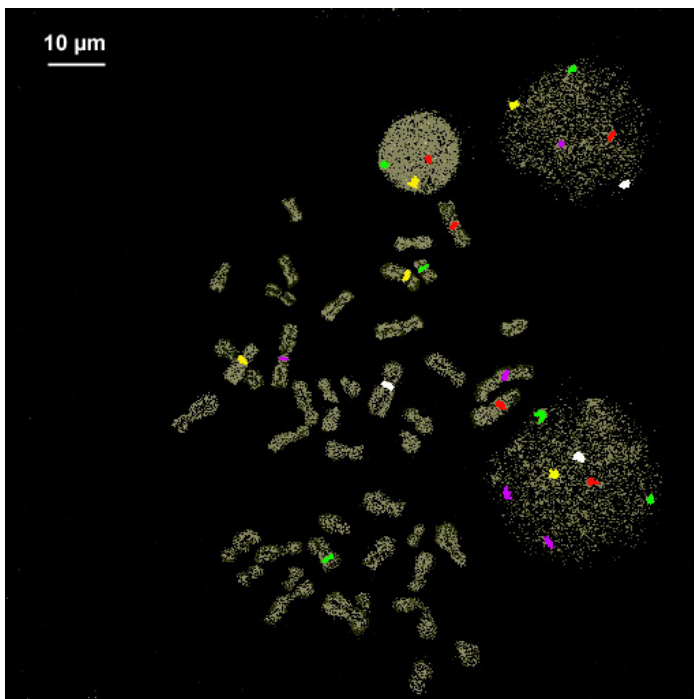


Abbildung 12 Zentromer- MM-FISH Detektion. Eine Metaphase und 3 Interphasekerne sind abgebildet. Folgende Markierungen wurden vorgenommen: Zentromer (Cep) 1 Diethylaminocumarin- violett, Cep 3 SpectrumOrange- rot, Cep 6 SpectrumGreen- gelb, Cep 17 Rohdamin 110- grün und Cep X SpectrumAqua- weiß. Die Fluoreszenz der nicht hybridisierten DNA resultiert aus der unspezifischen Eigenfluoreszenz.

Abbildung 12 (MMFISH Zentromer) zeigt ebenfalls ein mit einem Scan und einer Wellenlänge aufgenommenes Multicolor- Bild. Bei dieser Hybridisierung wurden Zentromersonden verwendet.

Folgende Markierungen wurden vorgenommen: Zentromer 1 – Diethylaminocumarin, Zentromer 3 - SpectrumOrange, Zentromer 6 – SpectrumGreen, Zentromer 17 – Rhodamin 110, Zentromer X – SpectrumAqua. Auf eine unspezifische DNA- Färbung durch DAPI wurde aufgrund der exogen verursachten Fluoreszenz der Chromosomen verzichtet. Die Falschfarbenzuordnung schlüsselt sich wie folgt auf: Zentromer 1 (DAC) violett, Zentromer 3 (SO) rot, Zentromer 6 (SG) gelb, Zentromer 17 (R110) grün und Zentromer X (SA) weiß.

Das Bild zeigt eine Metaphase mit 44 Chromosomen und drei Interphasekernen. Die hybridisierten Signale lassen sich deutlich von der fluoreszierenden Eigenfluoreszenz der Chromosomen abgrenzen. Auch bei dieser Detektion wurden die Signale durch eine konsekutive Verwendung von Langpassfiltern und anhand der Chromosomenmorphologie differenziert. Die exogen verursachte Eigenfluoreszenz war für eine Detektion der nicht hybridisierten DNA ausreichend. Jedoch ist im Vergleich mit der unspezifischen DAPI-Färbung eine genügende Differenzierung der Chromosomenmorphologie nicht gewährleistet. So können die Lagen der metazentrischen Zentromere der Chromosomen 1 und 3 und die submetazentrischen Zentromere der Chromosomen 6, 17 und X erkannt werden, jedoch nicht so deutlich wie bei einer DAPI- Gegenfärbung.

Die Zellkerne, welche bei der Präparation nicht in die Metaphase eingetreten waren, stellen sich in diesem Bild als kreisförmige flache Scheiben dar. Eine Kernscheibe kann eine Dicke von 2-4 μm aufweisen. Eine Detektion von spezifischen Fluoreszenzsignalen weist eine erfolgreiche Hybridisierung der Zentromersonden in den Interphasekernen nach. Die exogen verursachte Eigenfluoreszenz detektiert auch in den Interphasekernen die nicht hybridisierte DNA. So lässt sich der kleinere Kern durch seine scharfe Begrenzung und seine deutliche Eigenfluoreszenz von zwei weiteren in der Eigenfluoreszenz aufgelockerten und nicht so scharf begrenzten Kernen unterscheiden. Die Kerne haben einen Durchmesser von 14 μm , 23 μm und 27 μm . In der Fokusebene, welche für die Detektion der Zentromersignale der Metaphasenplatte optimal war, ließen sich auch Fluoreszenzsignale in den Interphasekernen detektieren. Eine Unterscheidung der beiden blauen Signale (Cep 1-DAC und Cep X-SA) und der beiden grünen Signale (Cep 6 –SG und Cep 17 –R110) ist hier nicht mehr möglich. Eine Unterscheidung von blauen, grünen und orangen Signalen konnte mit Hilfe der Langpassfilter sicher vorgenommen werden. Es

konnte kein Unterschied der Signalgrößen zwischen Zentromeren im Interphasekern und Zentromeren in der Metaphase bestimmt werden. Bei Betrachtung der Signalverteilung dieser drei Interphasekerne fällt auf, dass von 15 detektierten Signalen 9 Zentromerfluoreszenzen randständig sind und 6 Signale sich zentral im Kern detektieren lassen. Die blauen Fluoreszenzen (Cep-1 DAC (violett) und Cep-X SpectrumAqua (weiß)) sind sowohl randständig als auch zentral vertreten. Eine vorwiegende Randständigkeit ist bei den grünen Signalen (Cep-6 SpectrumGreen (gelb) und Cep-17 R110 (grün)) anzutreffen. Werden die orangen Signale (Cep-3 SpectrumOrange(rot)) betrachtet, so finden sich diese ausschließlich zentral.

3.4 3D Multiphotonen Multicolor- FISH am Fruchtwasserkern

Ein großer Vorteil von Laser- Scanning- Mikroskopen ist die Möglichkeit der 3-dimensionalen Darstellung (3D) von biologischen Objekten. Um bei einem herkömmlichen confokalen Laser- Scanning- Mikroskop die Signale nur aus einer Ebene zu detektieren, muss eine Lochblende verwendet werden. Diese ist notwendig, da es nicht nur im Fokusbereich zu Photonenabsorptionen und somit zu Fluoreszenzen kommt. Bei dem hier verwendeten modifizierten Nah- Infrarot- Laser- Scanning- Mikroskop erfolgte die Photonenabsorption nahezu nur im Fokus. Um eine weitere Photonenabschwächung zu vermeiden, wurde die Lochblende entfernt. Dass dennoch eine hochauflösende 3D Darstellung erfolgen kann, zeigt folgende Bildserie.

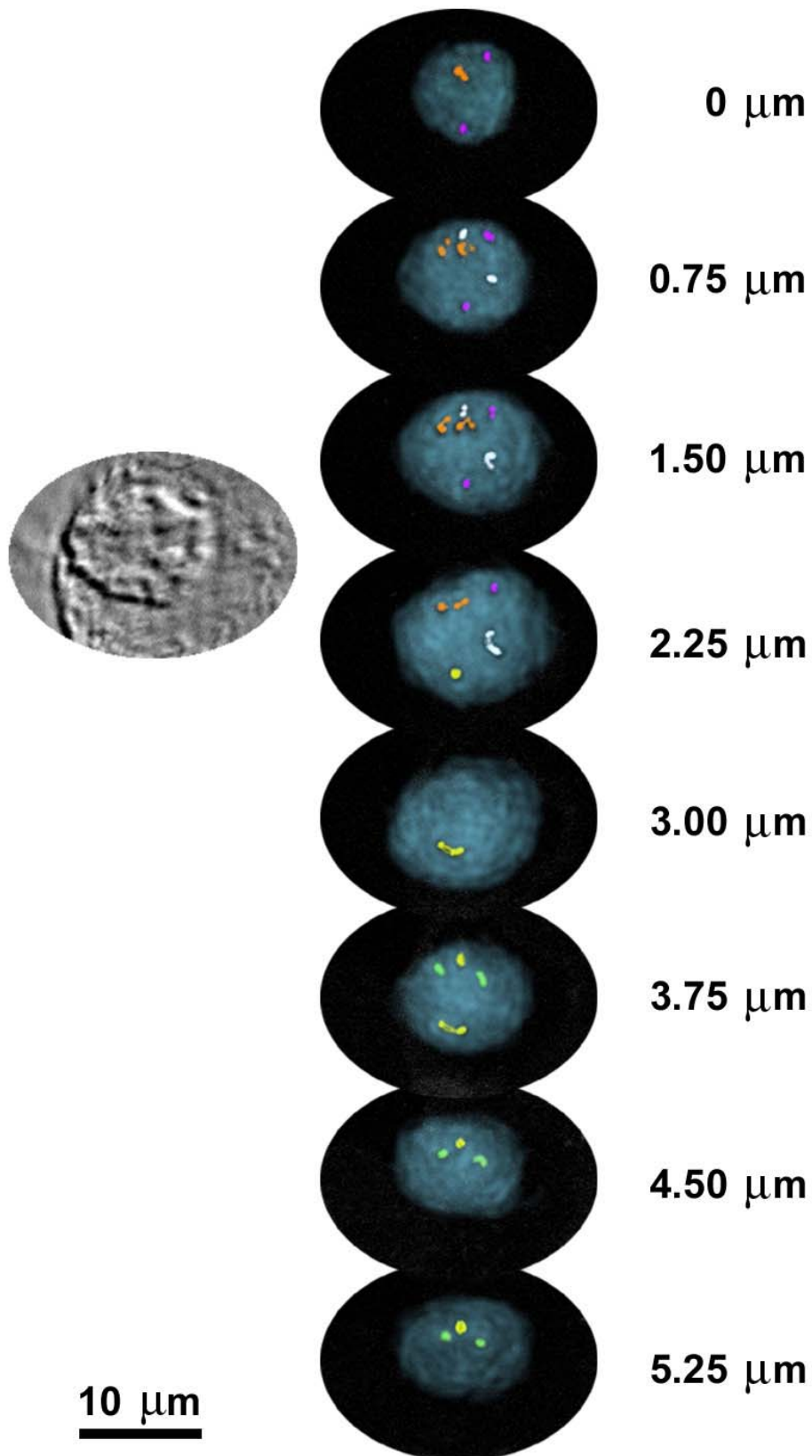


Abbildung 13 Bildserie eines hybridisierten Fruchtwasserkerns mit dazugehörigem Transmissionsbild. Detektion der Signale im Abstand von 0,75 μm. Folgende Markierungen: Zentromer (Cep) 1 Diethylaminocumarin- violett, Cep 3 SpectrumOrange- orange, Cep 6 SpectrumGreen- gelb, Cep 12 Rohdamin 110- grün, Cep X SpectrumAqua- weiß. Unspezifische DNA Färbung mit DAPI.

Es handelt sich hierbei um einen Fruchtwasserkern, welcher so präpariert wurde, dass eine 3- dimensionale Struktur weitgehend erhalten blieb. Das Transmissionsbild ist in der Lage neben der 2- dimensionalen Größe noch die erhaltenen Zytoplasma- und Membranreste darzustellen.

Es erfolgten im Abstand von 0,75 μm optische Schnitte zur Detektion der hybridisierten Signale. In der Bildserie wurden nur die Aufnahmen abgebildet, in welchen hybridisierte Signale detektierbar waren. Die Aufnahme bei 0 μm stellt den Anfang, d.h. die Auflage des Fruchtwasserkernes auf den Objektträger dar. Um die nicht hybridisierte DNA zu detektieren, erfolgte nach Aufnahme der hybridisierten Signale eine DAPI Anfärbung. Die somit von der Eigenfluoreszenz des Zytoplasmas abgegrenzte DNA- Fluoreszenz ermöglichte die Abgrenzung des Zellkernes im Fluoreszenzbild.

Die Fluoreszenz der DNA zeigt, dass der Zellkern eine Flächenhaftung zum Objektträger besitzt. Bei Beobachtung der Kerngrenzen macht sich eine kontinuierliche Zunahme des Durchmessers bis zu einer Höhe von 2,25 μm bemerkbar. Danach verkleinert sich der Durchmesser bis zu der Höhe von 5,25 μm . Die Kerngrenzen stellen sich nicht als scharfe Begrenzung dar. Die Kerndurchmesser betragen in den Fokusebenen 1 (0 μm) – 7,8 μm , 4 (2,25 μm) – 13,3 μm und in Ebene 8 (5,25 μm) – 10 μm . Der Kerndurchmesser im Transmissionsbild beträgt 13,3 μm . In der dargestellten Bildserie ist der Abschluss des Kernes nicht mehr zu sehen.

Eine Hybridisierung erfolgte mit den Zentromersonden der Chromosomen 1 (DAC), 3 (SpectrumOrange), 6 (SpectrumGreen), 12 (Rhodamin 110) und X (SpectrumAqua). Es konnten jeweils zwei Zentromersignale der Chromosomen 1, 3, 6, 12 und X detektiert werden.

Auch hier war zur Visualisierung eine Falschfarbenzuordnung notwendig. Da die vier Signale im blauen Spektralbereich (DAC und SpectrumAqua) und die vier Signale im grünen Spektralbereich (SpectrumGreen und Rhodamin 110) nicht den Chromosomen zugeordnet werden konnten, erfolgte eine willkürliche Zuordnung der Falschfarben. Daraus resultiert, dass die Farben Weiß und Violett sowohl die Zentromere des Chromosomen 1 (DAC) als auch die Signale des Chromosoms X (SpectrumAqua) darstellen können. Gleiches gilt für die Farben Gelb und Grün. Bei diesen Farben war keine eindeutige Zuordnung zu den Zentromersignalen der Chromosomen 6 (SpectrumGreen) und 12 (Rhodamin 110) durchführbar. Die Signale der Zentromersonden des Chromosoms 3 (SpectrumOrange) erhielten die Farbe Orange.

Um bei der nachfolgenden Beschreibung nicht die Übersicht zu verlieren, wurde eine tabellarische Zusammenfassung vorangestellt.

DNA-Sonde	Markierung	Falschfarbe	Detektion in Ebene	Länge des Signals (μm)	Signalauftrennung in den Ebenen
Zentromer 1	DAC	violett (weiß)	1-4	ca.3	3
			1-3	ca.2,25	nein
Zentromer 3	SpectrumOrange	orange	1-4	ca.3	1-4
			2-4	ca.2,25	2-3
Zentromer 6	SpectrumGreen	gelb (grün)	4-6	ca.2,25	5-6
			6-8	ca.2,25	7-8
Zentromer 12	Rhodamin 110	grün (gelb)	6-8	ca.2,25	nein
			6-8	ca.2,25	6-7
Zentromer X	SpectrumAqua	weiß (violett)	2-3	ca.1,5	3
			2-4	ca.2,25	3-4

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten DNA- Sonden, der dazugehörigen Markierung, der Falschfarbenzuordnung, der Ausdehnung und eine eventuelle Signalauftrennung der detektierten Fluoreszenzen in einem Fruchtwasserkern (Abbildung 13). (Die Reihenfolge der aufgelisteten Signale einer Sonde ist bestimmt durch ihr erstes Auftreten. Werden beide Fluoreszenzen eines Signals in einer Ebene zuerst detektiert, so erfolgte die Erstbeschreibung nach dem Signal, welches am weitesten links und oberhalb des Kernes aufgenommen wurde.)

Bei der Betrachtung der Signale fällt auf, dass die Lage der Fluoreszenzen weder randständig noch eindeutig zentral ist. Die blauen Signale lassen sich von 0 μm bis 2,25 μm verfolgen. Das kürzeste blaue Signal (Falschfarbe Weiß) kann über zwei Ebenen (zweite und dritte Ebene) verfolgt werden und hat somit eine ungefähre Länge von 1,5 μm . Ein blaues Signal (Falschfarbe violett) lässt sich in vier aufeinanderfolgenden Ebenen verfolgen. Die detektierte Länge beträgt ca. 3 μm . In der dritten und vierten Ebene wird bei den blauen (weiß und violett) Signalen eine Signalauftrennung in zwei Anteile beobachtet. Bei zwei Signalen ist diese Signalauftrennung nur in der dritten Ebene zu beobachten. Das eine violette Zentromersignal weist in der dritten Ebene eine Trennung auf, welches dann in der vierten Ebene wieder zu einem Signal konfluiert. Bei einem weißen Signal vergrößerte sich die Signalauftrennung von der dritten zur vierten Ebene. Das aufgetrennte

Signal stellte sich nicht mit zwei voneinander unabhängigen Signalanteilen dar, sondern war durch an Intensität schwächeren Signale verbunden.

Die Zentromersignale des Chromosoms 3, welche aus der Fluoreszenz von SpectrumOrange hervorgegangen waren, ließen sich in vier Ebenen detektieren. Ein Signal weist eine Länge von 3 μm , das andere Signal eine Länge von 2,25 μm auf. Das 3 μm lange Signal zeigt in allen vier Ebenen eine Auftrennung. Ein in der vierten Ebene konfluierendes Signal zeigt das kürzere Signal einer der beiden SpectrumOrange Fluoreszenzen. In Ebene zwei lassen sich zwischen den Signalauftrennungen keine Signalverbindungen nachweisen.

Alle mit einer grünen Fluoreszenz markierten Zentromersignale (abgebildet mit Hilfe von gelb und grün) ließen sich über drei Ebenen detektieren. Die Länge der Zentromersignale entspricht somit bei allen ca. 2,25 μm . In der Ebene vier ließ sich das erste grüne Signal detektieren. Dieses eine Signal splittet sich in den Ebenen 5 und 6 sehr deutlich auf. Die Aufspaltung dieses Signales besaß von allen detektierten Signalen den größten Abstand innerhalb eines Zentromersignals. 1,7 μm wurden für diesen Abstand ermittelt. Alle weiteren grün markierten Zentromersignale der Chromosomen 6 und 12 wurden in den Ebenen 6 bis 8 detektiert.

Eine Computeranimation bietet die Möglichkeit aus den aufgenommenen Bildebenen die dazugehörige 3- dimensionale Struktur darzustellen.

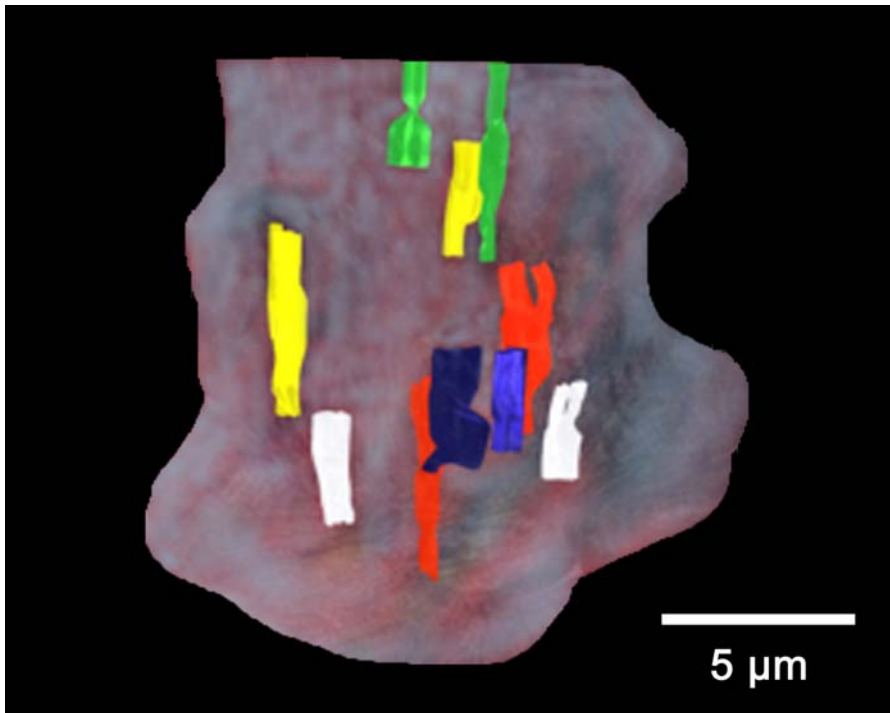


Abbildung 14 Darstellung des durchgescannten Fruchtwasserkerns als räumliches Gebilde. Folgende Markierungen: Zentromer (Cep) 1 Diethylaminocumarin- violett, Cep 3 SpectrumOrange- orange, Cep 6 SpectrumGreen- gelb, Cep 12 Rohdamin 110- grün, Cep X SpectrumAqua- weiß. Unspezifische DNA Färbung mit DAPI.

Es erfolgte eine seitenverkehrte Darstellung zur oben beschriebenen Bildserie, d.h. die in der Bildserie beschriebene erste Ebene ist in diesem Bild die unterste Ebene. Die Falschfarbenzuordnung ist die gleiche wie oben beschrieben. Eine Signalauftrennung stellt sich in diesem Bild als zwei parallel verlaufende Schläuche dar. Nicht alle aus der Bildserie erhaltenen Informationen können in dieser Darstellung bestätigt werden. So sind nicht alle Signalauftrennungen aus diesem Blickwinkel der 3- dimensionalen Abbildung eindeutig ersichtlich. Dies kann durch eine computersimulierte Rotation des Kernes behoben werden. Bei der 3- dimensionalen Darstellung wird der Kern als ein, in der Mitte den größten Durchmesser aufweisendes, ungleichmäßig schlauchförmiges Gebilde dargestellt.

3.5 3D Multiphotonen- Multicolor- FISH am Gewebsschnitt

Um die 3- dimensionale Darstellungsmöglichkeit verbunden mit der gewebsschonenden hohen Eindringtiefe des Nah- Infrarot- Lasers auszunutzen, wurde ein Protokoll entwickelt, welches die Gewebs- Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung für die Multiphotonen- Mikroskopie zugänglich machte.

In Abbildung 15 ist eine Bildserie dargestellt, in der FISH Signale in einem zusammenhängenden Nierenkryostatschnitt detektiert wurden.

Die Signale konnten über die gesamte Dicke des Gewebsschnittes von 10 μm aufgenommen werden. Alle 0,5 μm erfolgte ein Scan. Es sind nur die Aufnahmen abgebildet in denen hybridisierte Signale detektiert wurden. Jede Ebene ist nach der abgescannten Höhe bezeichnet. Die exogen verursachte Eigenfluoreszenz wurde soweit reduziert, dass eine Unterscheidung zu den hybridisierten Signalen problemlos möglich wurde. Die noch vorhandene Eigenfluoreszenz lässt sich in den Ebenen 2,5 μm bis 9,5 μm verfolgen. Die Intensität und die Fläche der detektierten Eigenfluoreszenz steigt bis zur Ebene 5,5 μm an, bleibt bis zur Ebene 7,5 μm relativ konstant, um sich dann bis zur Ebene 9,5 μm soweit abzuschwächen, dass eine Abbildung kaum noch erkennbar war.

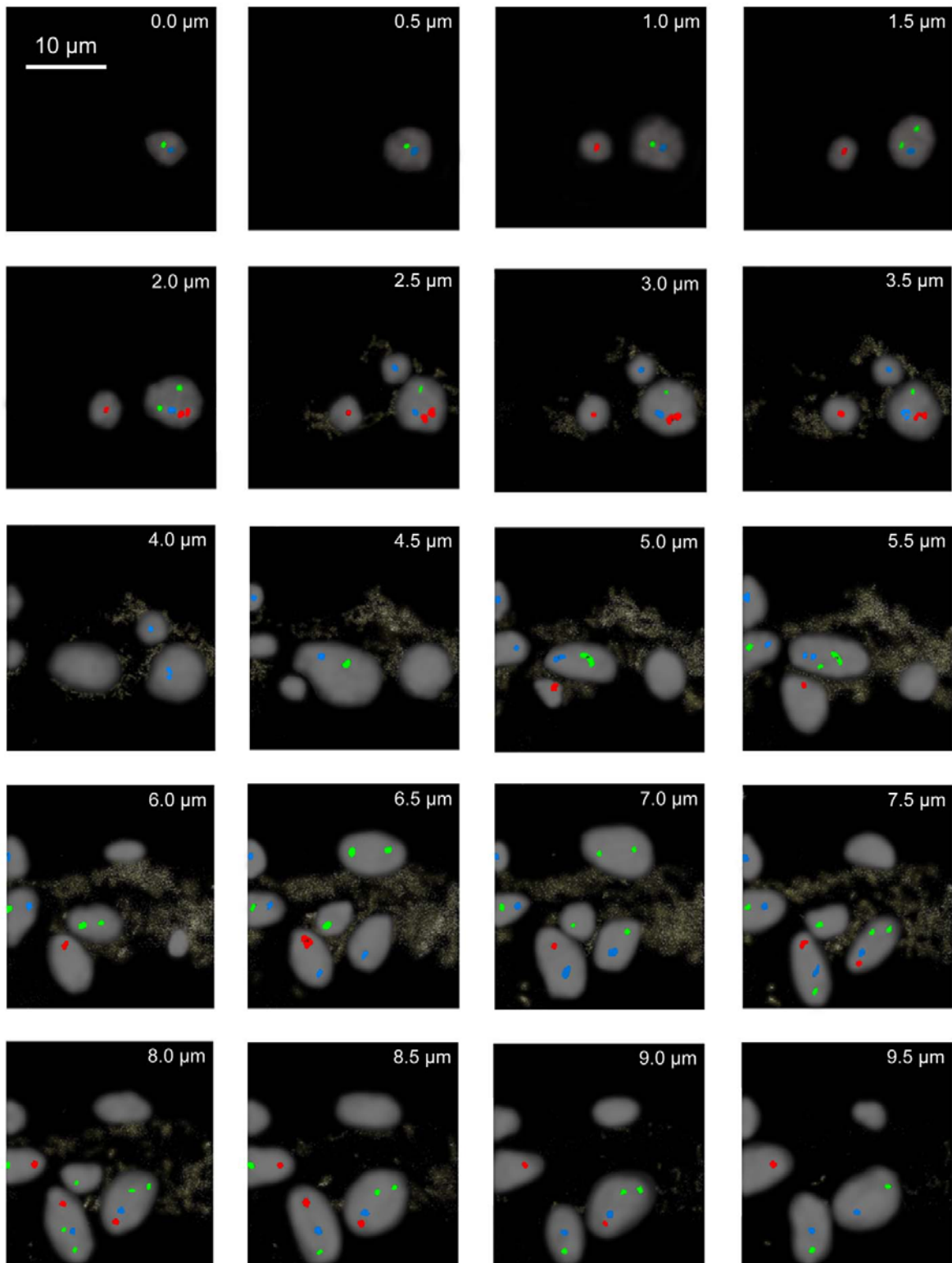


Abbildung 15 Bildserie durch einen 10 µm dicken Nierenkryostatschnitt. Detektion der hybridisierten Signale alle 0,5 µm. Folgende Markierungen: Zentromer (Cep) X SpectrumOrange- rot, Cep 4 SpectrumGreen- grün und Cep Y SpectrumAqua- blau. Unspezifische DNA Färbung mit Ethidium Bromid.

Die Zellkerne konnten nach Aufnahme der hybridisierten Signale durch eine unspezifische DNA- Färbung mit Ethidium Bromid visualisiert werden. Alle detektierten Kerne sind scharf begrenzt und eindeutig voneinander abgrenzbar. Es wurden 8 Kerne in einem Raum von $30 \times 30 \times 10 \mu\text{m}^3$ detektiert. Dies entspricht einer Zelldichte von einer Zelle pro Picoliter (10^{-12} Liter). Zwei Kerne befinden sich innerhalb des Kryostatschnittes und sind dadurch vollständig abgebildet. 1 Kern ist am Boden angeschnitten. Die 5 übrigen Kerne bilden den Abschluss zum Deckglas. Der kleinste Abstand zwischen zwei Kernen beträgt $0,4 \mu\text{m}$ (Ebene $7,0 \mu\text{m}$). Zwei Kerne konnten nur am linken Rand des abgescannten Bereiches detektiert werden (Ebenen $4,0 \mu\text{m}$ bis $9,5 \mu\text{m}$). Die Morphologie keines der Kerne entspricht einer Kugel. Beträchtliche Unterschiede bieten die Kerne, welche bei der Präparation nicht angeschnitten wurden. Der eine Kern lässt sich über 4 Ebenen detektieren (Ebene $2,5 \mu\text{m}$ bis $4,0 \mu\text{m}$). Er ist mit seiner Ausdehnung von $4 \mu\text{m}$ der kleinste Kern. Der zweite nicht angeschnittene Kern ist der größte detektierte Kern. Er lässt sich über 15 Ebenen ($1,0 \mu\text{m}$ bis $8,0 \mu\text{m}$) verfolgen. Dies entspricht einer Kernhöhe von $7,5 \mu\text{m}$. Die größte Flächenausdehnung in einer Ebene (Ebene $5,5 \mu\text{m}$) beträgt $10,6 \mu\text{m}$. In dem größten Kern lassen sich alle hybridisierten Signale, in dem kleinsten Kern nur 1 Signal detektieren. Alle Kerne nehmen in ihrer Ausdehnung erst über mehrere Ebenen zu, um sich dann wieder kontinuierlich zu verkleinern.

Es wurden drei unterschiedliche Zentromersonden für die Gewebs- FISH verwendet. Die Zentromersonden der Chromosomen X, Y und 4 ermöglichten eine gute Überschaubarkeit der vielen Signale und gleichzeitig eine eindeutige Unterscheidung mit Hilfe von Langpassfiltern. Es handelte sich um kommerzielle Sonden der Firma Vysis. Die Sonden waren mit SpectrumAqua (Zentromer Y), SpectrumOrange (Zentromer X) und SpectrumGreen (Zentromer 4) markiert. Diese Hybridisierung lässt für die Zentromere X und Y jeweils ein Signal und für das Zentromer 4 zwei Signale pro Kern erwarten. Auch hier wurde eine Falschfarbzuordnung vorgenommen. In der Bildserie wurden die Signale der Zentromere X mit rot, Y mit blau und 4 mit grün gekennzeichnet.

Es wurden insgesamt 23 einzelne Signale in 20 Ebenen detektiert. Eine randständige oder zentrale Lage lässt sich bei Betrachtung aller Signale bei keiner Zentromersonde beschreiben. In vier Kernen erfolgte die erwartete Detektion von vier Signalen (1 blaues, 1 rotes und zwei grüne Signale). Ein Signal von jeder Zentromersonde wurde in einem Kern detektiert. In einem weiteren Kern konnten zwei grüne Signale aufgenommen werden. Nur ein blaues Signal befand sich in zwei Kernen.

Um bei der nachfolgenden Beschreibung den Überblick zu wahren, erfolgt zum Vergleich eine tabellarische Zusammenfassung.

Kern	Detektiert in Ebenen	Zentromersignal (Falschfarbe) in den Ebenen [Länge (µm)]			
		Y (blau)	X (rot)	4 (grün)	
1	0,0-5,5	0,0-4,0 (4,5) ^{x2}	2,0-3,5 (2) ^{x2}	0,0-2,0 (2,5)	1,5-3,5 (2,5)
2	1,0-8,0 ^{x1}	4,5-5,5 (1,5) ^{x2}	1,0-3,5 (3)	4,5-6,0 (2) ^{x2}	5,5-8,0 (3)
3	2,5-4,0 ^{x1}	2,5-4,0 (2)	/	/	/
4	4,0-9,5	4,5-7,5 (3,5)	/	/	/
5	4,0-9,5	5,0-7,5 (3)	8,0-9,5 (2)	5,5-8,5 (3,5)	/
6	4,5-9,5	6,5-9,5 (3,5)	5,0-8,5 (4)	7,5-9,5 (2,5)	8,0 (0,5)
7	6,0-9,5	/	/	6,5-7,0 (1)	6,5-7,0 (1)
8	6,5-9,5	6,5-9,5 (3,5)	7,5-9,0 (2)	7,0-9,5 (3)	7,5-9,0 (2)

Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Zentromer- Sonden, der Falschfarbenuordnung, der Ausdehnung und einer eventuellen Signalauftrennung der detektierten Fluoreszenzen in Bezug auf ihre Kernzugehörigkeit eines Gewebsschnittes (Abbildung 15). (Die Reihenfolge der aufgelisteten Kerne und Signale ist bestimmt durch ihr erstes Auftreten. Werden zwei Kerne oder zwei gleiche Signale in einem Kern in einer Ebene detektiert, so erfolgte die Erstbeschreibung nach dem Kern oder Signal welcher(s) am weitesten links und oberhalb des Bildausschnittes/ Kernes aufgenommen wurde.)

^{x1} Kerne, die nicht angeschnitten wurden

^{x2} Signalauftrennung

Die Anzahl der Ebenen über die ein Signal verfolgt werden kann, ist sehr unterschiedlich. Das längste Signal (Zentromer Y (Ebenen 0,0 µm bis 4,0 µm)) lässt sich über 9 Ebenen verfolgen. Ein grünes Signal fluoresziert nur in einer Ebene (Ebene 8,0 µm). Es ist somit das kürzeste detektierte Signal. Wird der Mittelwert der detektierten Ebenen einer Zentromersonde gebildet, so gibt es deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Sonden. Die durchschnittliche Länge der Zentromersonde Y beträgt 3,1 µm (blaue Signale). Rote Signale sind in dem detektierten Bereich im Schnitt 2,6 µm lang (Zentromersonde X) und die durchschnittliche Länge der grünen Signale beträgt 2,1 µm (Zentromersonde 4). Diese Ergebnisse korrelieren auch mit der Flächenausdehnung der Signale. So nehmen die blauen Signale vorrangig die größte Signalausdehnung ein. Die grünen Signale erscheinen häufig nur als punktueller Bereich. So fern keine Signalauftrennung bei der Zentromersonde X detektiert wurde, befindet sich die

Flächenausdehnung dieser roten Signale zwischen den blauen und grünen Signalen. Ein Beispiel für diese Aussage bietet die Ebene 7,0 μm .

Eine Signalauftrennung trat nicht so häufig auf wie erwartet. So konnten nur im ersten detektierten Kern (Ebenen 0,0 μm bis 6,0 μm) und im großen, nicht angeschnittenen Kern (Ebenen 1,0 μm bis 8,0 μm) Signalauftrennungen detektiert werden. Dies entspricht den beiden größten aufgenommenen Kernen (Kerne waren über 13 und 15 Ebenen verfolgbar). Der erste detektierte Kern besitzt Signalauftrennungen der Zentromersonden X und Y. Das rote aufgetrennte Signal lässt sich über vier Ebenen (Ebenen 2,0 μm bis 3,5 μm) verfolgen. Es besteht in der Ebene 2,0 μm aus zwei deutlichen Anteilen, welche sich in der Ebene 2,5 μm vergrößern. In Ebene 3,0 μm deutet sich ein Konfluieren beider Signale an, jedoch weist die Ebene 3,5 μm immer noch eine Signalauftrennung auf. Die Signalauftrennung des blauen Signals wurde in den Ebenen 3,5 μm und 4,0 μm detektiert. Diese Signalauftrennung entwickelt sich aus einem in der Fläche über zwei Ebenen (2,5 μm und 3,0 μm) anwachsenden Signal. Während das rote Signal dieses Kernes Signalverbindungen aufweist, stellen sich die blauen, gesplitteten Signalanteile als zwei voneinander unterscheidbare Fluoreszenzen in beiden Ebenen dar. Das soeben beschriebene blaue Signal ist mit 4,5 μm das längste aller detektierten Signale. Die Signalauftrennungen des nicht angeschnittenen Kernes beschränken sich auf die Ebenen 5,0 μm und 5,5 μm . Die Auftrennungen betreffen ein blaues und ein grünes Signal. Das blaue Signal nimmt über die Ebene 4,5 μm in der Flächenausdehnung zu und entwickelt sich in der Ebene 5,5 μm zu zwei voneinander unabhängigen kleinen Signalen. Die Fluoreszenz einer Zentromersonde des Chromosoms 4 nimmt ebenfalls in der Flächenausdehnung zu, um dann in der Ebene 6,0 μm auf ein kleines Signal wieder abzunehmen.

Der Abstand eines blauen Signals zu einem grünen Signal ist in fast jedem Kern kleiner, als der Abstand des grünen Signals zu einem roten Signal. Daraus ließe sich eine größere Nähe des Zentromers von Chromosom Y zu den Zentromeren des Chromosoms 4 schließen. Im Gegensatz dazu ist die räumliche Beziehung des Zentromers von Chromosomen X zu den Zentromeren des Chromosoms 4 größer. Gleiches lässt sich für die beiden Geschlechtschromosomen beschreiben. So ist der Abstand zwischen rotem und blauem Signal immer kleiner als zwischen rotem/blauem und dem grünen Signalen.

Zusammenfassend ließe sich beschreiben, dass zum größten Teil die Zentromere der Chromosomen X mit einer Polarität den Zentromeren der Chromosomen 4 gegenüberliegen und die Zentromere der Chromosomen Y zwischen beiden liegen. Jedoch

befinden sind die Y- Zentromere näher an den X- Zentromeren als an den Zentromeren von Chromosom 4.

3.6 Einzelmolekül- Detektion

Ein zunehmendes Interesse gilt der Fähigkeit, einzelne Moleküle zu detektieren. Folgende Ergebnisse sollen zeigen, dass die Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung auch im Zusammenhang mit der Nah- Infrarot- Laser- Mikroskopie zu dieser Auflösung in der Lage ist.

Mit Hilfe von Subtelomersonden hybridisiert auf eine Metaphase und der Hybridisierung einer *bcr-abl* Sonde auf einen DNA- Faden, erfolgt eine Näherung, welche Rückschlüsse auf die Detektion einzelner Moleküle zulässt.

3.6.1 Detektion von Subtelomersonden

Zum Nachweis von Subtelomeren des Chromosoms 14 kamen Biotin markierte Sonden zum Einsatz. Diese Sonden wurden nach der Hybridisierung mit Avidin- FITC inkubiert. Der sequenzabdeckende Bereich der Sonde beträgt ca. 40 kb. Zur Visualisierung sehr kleiner Signale wurde das Fluoreszenzbild mit dem dazugehörigen Transmissionsbild überlagert. Abbildung 16 zeigt eine solche Überlagerung.

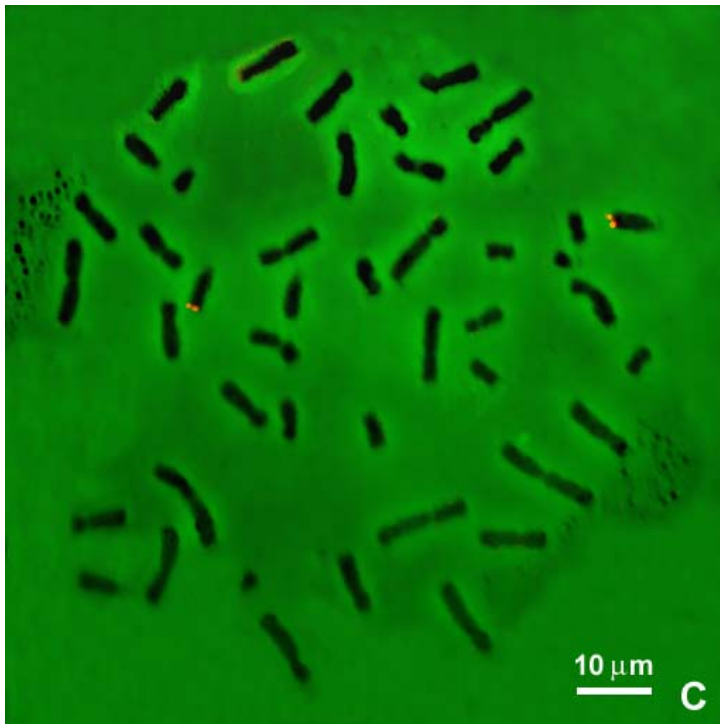


Abbildung 16 Überlagerung von Fluoreszenzbild und Transmissionsbild einer Metaphase. Die Fluoreszenzen stellen die mit FITC (Biotin) detektierten Subtelomersonden der Chromosomen 14 dar.

Bei Betrachtung der Metaphase zeigen sich 44 Chromosomen. Der Hintergrund konnte mit Hilfe geringer Leistung (5 mW) und geringer elektronischer Signalverstärkung soweit reduziert werden, dass bei der Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild nur die hybridisierten Signale sichtbar wurden. Dies war möglich, da das FITC-Signal sehr viel stärker fluoreszierte, als die exogen verursachte Eigenfluoreszenz. Bei der Visualisierung der Chromosomen durch das Transmissionsbild ist die Auflösung von Chromatiden nicht möglich. Eine Beschreibung der Chromosomenbänderung kann bei dieser Aufnahme nicht erfolgen. Die Zentromere, welche durch eine lokale Verjüngung in der Chromosomenstruktur gekennzeichnet sind, können bei fast allen Chromosomen erkannt werden. Weiterhin lässt sich bei der Betrachtung des Bildes eine Verringerung der Helligkeit vom unteren Bildteil zum oberen Bildteil verfolgen. Dies kann auch durch die größere Transparenz der Chromosomen im unteren Bildteil belegt werden.

Die Chromosomen 14 sind jeweils durch zwei deutlich voneinander abgrenzbare Signale zu erkennen. Ein Signal detektiert jeweils den Subtelomerbereich eines Chromatids. Die grüne FITC-Fluoreszenz wurde durch eine orange Falschfarbe kenntlich gemacht.

Die ca. 40000 Basen umfassenden Sonden des Subtelomerbereichs von Chromosom 14 wurden mit der Polymerasen- Ketten- Reaktion amplifiziert und dabei mit Biotin markiert. Bei einer Inkorporationsrate von 1-3% Biotin markierter Uridinmoleküle (Angaben von Vysis) enthalten die Sonden ca. 400 bis 1200 Biotinmoleküle pro Subtelomersequenz. Die visualisierte Fluoreszenz einer 40 kb Subtelomersonde (spezifisch für das Chromosom 14) ist durch die Detektion von ca. 400 bis 1200 Biotinmolekülen möglich geworden. Die Detektion der Biotinmoleküle erfolgte durch die Fluoreszenz von Avidin gekoppelten FITC- Fluorophoren.

Die Anzahl der detektierten Biotinmoleküle ist ein Näherungswert, da weder die genaue Sondenlänge noch die genaue Einbaurate von Biotin markierten Uridinmolekülen bekannt ist.

3.6.2 Detektion einer *bcr- abl* Sonde auf einem DNA-Faden

Um die Detektion von einzelnen Molekülen zu verdeutlichen, erfolgte die Hybridisierung einer *bcr- abl* Sonde auf einen DNA- Faden (Fiber). Bei einem DNA- Fiber wird davon ausgegangen, dass die nicht kondensierte oder gequollene DNA aus dem Kern ausläuft und somit als einzelner Faden vorliegt. Objektträger mit präparierten DNA- Fäden wurden mir freundlicherweise von Ritva Karhu und Minna Tanner (Tampere Universität Finnland) zur Verfügung gestellt.

Das kleinste Chromosom des Menschen ist das Chromosom 21. Es besteht aus annähernd 46 Mb (Strachan et al., 1996). Nach dem Watson-Crick Modell beträgt die Steigung der Doppelhelix (die Strecke, die die Helix für eine einzige Umdrehung benötigt) 3,4 nm (Watson und Crick, 1974). Diese wird durch 10 Basenpaare gebildet. 46 Mb bilden demnach theoretisch ein einziges zusammenhängendes Molekül von 15,6 mm Länge. Bei einer Länge eines Metaphasen- Chromosoms 21 von 2 µm, kann ein Kondensationsfaktor von 7800 ermittelt werden. Dies bedeutet, dass dieses Chromosom 7800 mal dichter gepackt ist, als ein nicht kondensiertes oder gequollenes Chromosom 21.

Um die Leistungsfähigkeit der Nah- Infrarot- Lasermikroskopie zu zeigen, wurde ein DNA- Faden mit der *bcr- abl* Genregion- Sonde (LSI *bcr/ abl*- ES- Sonde von Vysis) hybridisiert.

Eine Translokation 9/22 [t(9;22) (q34;q11.2)], die zur Fusion der Genregionen von *bcr* und *abl* führen, wird bei 95% aller Patienten mit Chronisch- Myeloischen- Leukämien

gefunden (Heisterkamp et al., 1983). Diese Translokation (9/22) ist auch bei der Akuten-Lymphatischen- Leukämie beschrieben wurden (Kurzrock et al., 1988). Die Sonde der *bcr* (breakpoint cluster region) Genregion bindet spezifisch auf einer Sequenz des Chromosoms 22 (22q11.2). Es werden mit der Sonde etwa 300 kb der breakpoint cluster region abgedeckt. Diese Sonde war mit SpectrumGreen markiert. Die verwendete *abl* Sonde, markiert mit SpectrumOrange, hybridisiert spezifisch auf Chromosom 9 (9q34). Diese Sonde deckt ca. 650 kb der Genregion ab.

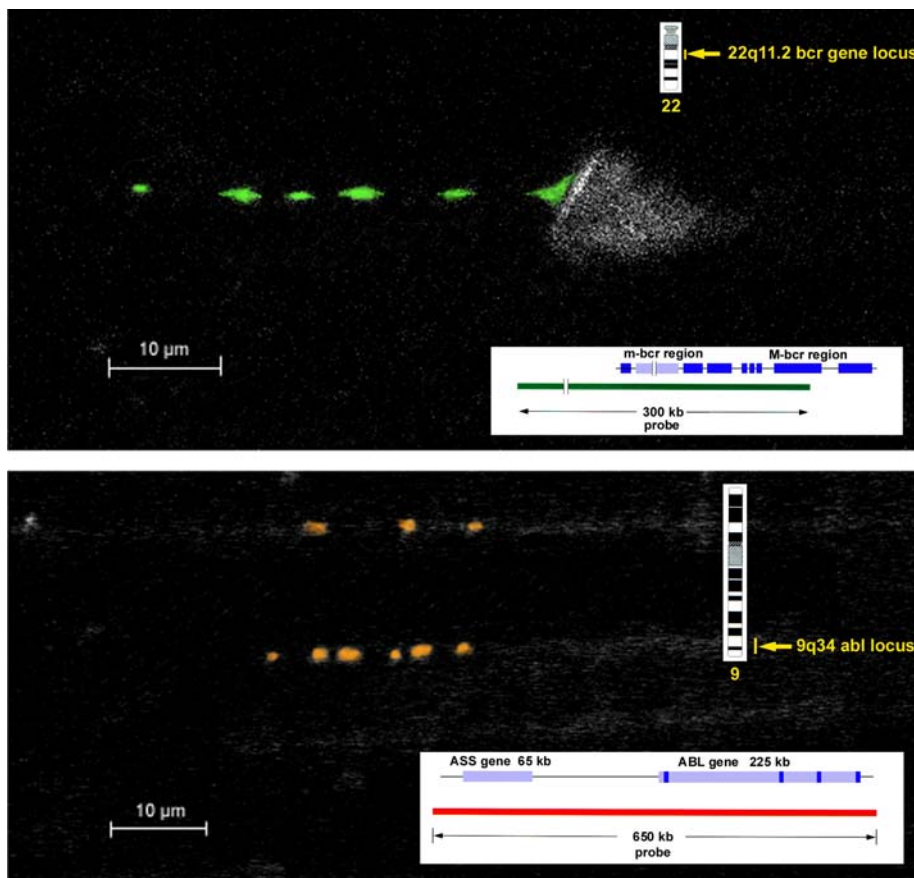


Abbildung 17 Detektion eines hybridisierten DNA Fadens. Typische Signalanordnung in „Perlenschnurform“. Die in der oberen Abbildung detektierte *bcr*- Sonde war mit SpectrumGreen markiert. Die *abl*- Sonde (unteren Bild) war mit SpectrumOrange markiert.

Die Fluoreszenzen konnten in einer für Fiber- FISH üblichen „Perlenkettenschnur“ detektiert werden (van de Rijke et al., 2000; Florijn et al., 1995). Das selektive Auftreten von einer Fluoreszenz in je einer „Perlenkettenschnur“ lässt auf eine nicht vorhandene Translokation schließen. Im oberen Bildteil (Abbildung 17) wurde der Fluoreszenz der *bcr*- Sonde die Falschfarbe Grün zugeordnet. Die detektierte *abl*- Sonde erhielt die Farbe Orange (unterer Bildteil von Abbildung 17).

Bei Annahme einer vollständigen Detektion und Darstellung der *bcr*- Sonde (oberer Bildausschnitt Abb. 16) beträgt die Länge der 300 kb Sonde 39,5 μm . Dies würde einem Kondensationsfaktor von 2,6 entsprechen. Somit ist eine DNA- Sequenzauflösung von 7,6 kb pro μm möglich (Auflösung im Watsen-Crick Modell: 2,9 kb pro μm). Bei einer angenommenen Fluorophor- Einbaurrate von 1-3% werden somit ca. 150 bis 460 Fluoreszenzmoleküle pro μm detektiert.

Die im unteren Teil der Abb. 16 dargestellte Signalkette der *abl*- Sonde ist, unter der Voraussetzung einer vollständigen Detektion und Abbildung, 21 μm lang. Dies entspricht einem Kondensationsfaktor von 10,5 und einer Auflösung von 30,9 kb pro μm . Eine Dichte von ca. 620 bis 1800 Fluoreszenzmolekülen pro μm ist in dieser Detektion dargestellt.

3.7 FISH- Fluorophor- Abklingkurven

Die sehr kurze Pulsdauer des verwendeten Titan- Saphir- Lasers von 80 Femtosekunden ($\text{fs} = 10^{-15} \text{ s}$) erlauben ein zeitaufgelöstes Messen der angeregten Fluoreszenzen. Erfolgt eine zeitaufgelöste Messung von Fluoreszenzen im Nanosekundenbereich ($\text{ns} = 10^{-9} \text{ s}$), so kann die Anzahl der detektierten Fluoreszenzphotonen, welche durch die Multiphotonen-Absorption eines Laserpulses emittiert werden, in Abhängigkeit der Zeit dargestellt werden. Diese Darstellung wird als Abklingkurve der Fluorophore bezeichnet. Aus dieser Kurve lässt sich errechnen, wie lange die Fluoreszenzphotonen nach einer Anregung nachweisbar sind. Die Pulsfolgefrequenz von 80 MHz ist so groß, dass ein sicheres Ausklingen der Fluoreszenzen ohne erneute Anregung zu messen ist.

Zur Demonstration dieser Messung an FISH- Signalen wurde ein Biotin markiertes Ganzchromosom mit FITC gekoppeltem Avidin inkubiert. Um nur die FITC- Fluoreszenz zeitaufgelöst zu messen, wurde der Laser auf einen Punkt des Biotin markierten Chromosoms 2 fixiert (spot scan).

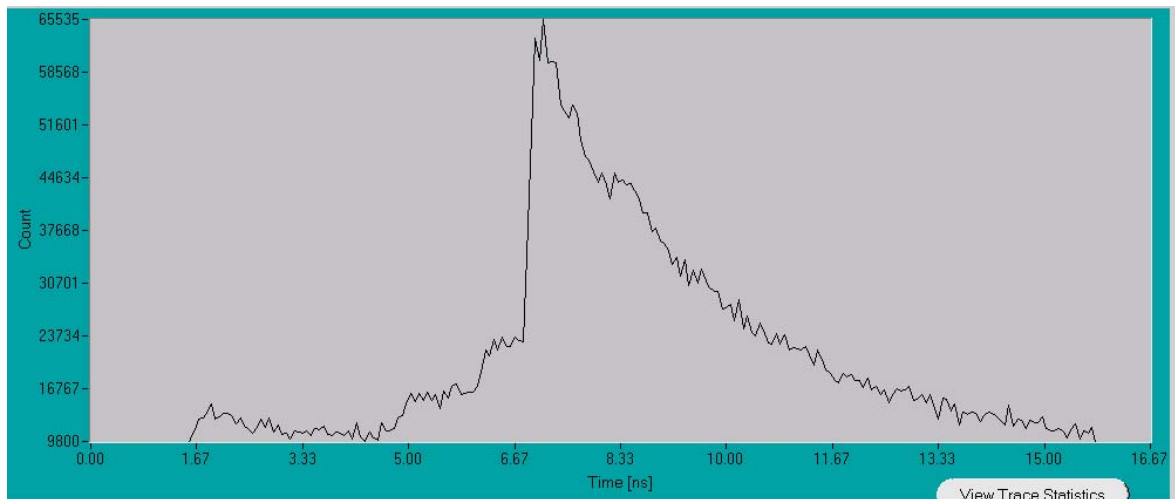


Abbildung 18 Abklingkurve des FISH- Fluorophors FITC. Die graphische Darstellung erfolgt mit der Anzahl der emittierenden Photonen in Abhängigkeit der Zeit (Nanosekunden [10^{-9} s]).

Die Kurve zeigt einen sehr steilen Anstieg auf das Maximum von 65535 Photonen. Über die Zeitdauer zwischen dem Laserpuls und den ersten detektierten Fluoreszenzphotonen können keine Aussagen getroffen werden. Aufgrund von drei hintereinanderliegenden Kurzpassfiltern 720 nm, werden keine Anregungsphotonen von 800 nm in die zeitaufgelöste Messung einbezogen.

Nach dem Erreichen des Maximums klingt die Detektion der Fluoreszenzphotonen über einen Zeitraum von 10 ns ab. 66,7 % aller gemessenen Photonen wurden nach 4 ns detektiert.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der MM- FISH

MM- FISH stellt eine neuartige Methode der 3 dimensional Mikroskopie dar (Patentschrift; König et al., 2000b). Um die Bedeutung der Multiphotonen- Mikroskopie in Zusammenhang mit der FISH zu verdeutlichen, werden die Besonderheiten dieser Technik in Abgrenzung zur Einphotonen- Mikroskopie nachfolgend kurz beschrieben.

Für die Erzeugung der Fluoreszenzen aller in dieser Arbeit aufgelisteter Fluorophore und der Gegenfärbungen mit DAPI und Ethidium Bromid (siehe S. 35) wurde nur eine Wellenlänge von 800 nm verwendet. Durch die simultane Absorption mehrerer energieärmerer Photonen war es möglich, Emissionen im visuellen- und im infraroten Bereich zu erzeugen (König et al., 2000b). In der Einphotonen- Mikroskopie ist es notwendig, für jede erwünschte Fluoreszenz ein spezielles Anregungsspektrum zur Verfügung zu stellen. Diese Anregungswellenlänge muss so ausgesucht werden, dass sie nach Möglichkeit mit der Absorptionsspitze des Fluorophors (Absorptionsspektren siehe S. 8) übereinstimmt. Quecksilber- oder Xenon- Hochdrucklampen bieten Emissionskennlinien über das gesamte benötigte Anregungsspektrum.

Der Vorteil in der Multiphotonen- Mikroskopie, mit einer konstanten Wellenlänge alle gewünschten Fluoreszenzen zu erzeugen, wird dadurch bereichert, dass für die Anregung der multiplen Fluorophore nur ein Anregungsvorgang nötig ist.

Der ausgereifte technische Stand der Einphotonen- Mikroskopie ermöglicht eine selektive Anregung der FISH- Fluorophore. Ein Bandpass lässt nur das Spektrum der Energiequelle zur Probe passieren, welche für die Anregung des ausgesuchten Fluorophors notwendig ist. Ein weiterer Bandpass lässt nur das von dem angeregten Fluorophor erwartete Emissionsspektrum auf den Detektor passieren. Dies bietet eine Sicherheit bei der Detektion von hybridisierten Signalen. Diese Sicherheit kann nur erreicht werden, indem für jedes Fluorophor eine selektive Anregung erfolgt.

Aus dem großen Vorteil, mit einer Wellenlänge und einem Anregungsvorgang alle hybridisierten Fluorophore anzuregen, erwuchs in der Multiphotonen- Mikroskopie die technische Herausforderung, die erhaltenen Emissionen nach ihrer Wellenlänge zu differenzieren.

In dem Abschnitt 3.1.5 wurde eine Möglichkeit beschrieben, mit der Multicolor-Detektionen nach erfolgter Multiphotonen- Anregung anhand ihrer Emissionen aufgetrennt werden können. Bei Betrachtung der Emissionsspektren (Einleitung S. 8) der verwendeten Fluorophore und der verwendeten Langpassfilter lassen sich Gruppierungen der Fluorophore vornehmen, welche nach einer sicheren Differenzierung ihrer Emissionen zwischen den Fluorophorgruppen ausgerichtet sind.

Die blau emittierenden Fluorophore (SpectrumAqua und DAC), die grün emittierenden Fluorophore (SpectrumGreen, Rhodamin 110 und FITC), die rot emittierenden Fluorophore (SpectrumRed und TexasRed), die infrarot emittierenden Fluorophore (Cyanin5 und Cyanin 5.5) und das Fluorophor SpectrumOrange lassen sich untereinander mit den verwendeten Langpassfiltern sicher unterscheiden.

Eine Unterscheidung von Fluorophoren ähnlicher Emissionen war mit dieser Anordnung nicht möglich. In der Einphotonen- Mikroskopie ist ebenfalls eine Unterscheidung von Fluorophoren ähnlicher Emissionswellenlängen nicht möglich. Jedoch ist die selektive Anregung und die selektive Detektion der erwarteten Emission mit einer größeren Sicherheit der Detektion von Fluorophoren verbunden.

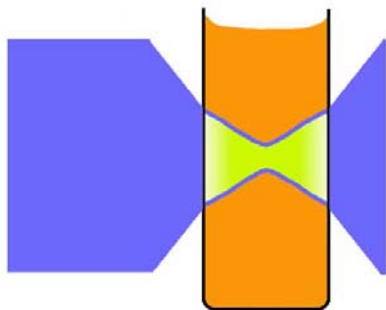
Der Vorteil, in der Multiphotonen- Mikroskopie mit einer Wellenlänge und einem Scan alle hybridisierten Fluorophore anzuregen, kommt bei Multicolor- Hybridisierungen nicht voll zum Tragen. Wird nur ein Detektor verwendet, muss zur Differenzierung von mehreren Emissionen pro erwarteter Wellenlänge ein Anregungsvorgang durchgeführt werden. Dies entspricht genauso vielen Anregungsvorgängen, wie in der Einphotonen- Mikroskopie.

Technische Innovationen erlauben einen Ausblick auf Detektionsmöglichkeiten, welche die soeben beschriebene Limitierung in der Multiphotonen- Mikroskopie ausgleichen können.

Es existieren Aufnahmemöglichkeiten, mit der pro Pixel ein Spektrum der detektierten Photonen bestimmt werden kann (Schröck et al., 1996; Liyanag et al., 1996; Schröck et al., 1997; Hesel et al., 1999). Dies würde bedeuten, dass mit einer Anregungswellenlänge und einem Anregungsvorgang in der Multiphotonen- Mikroskopie Multicolor- Bilder errechnet werden könnten. Somit wäre ein einziger Scan ausreichend für eine genaue spektrale Auftrennung verschiedener emittierender Signale. Dies kommt einer ausreichenden Sicherheit in der Differenzierung verschiedener Fluorophore und der Schnelligkeit in der Bildanalyse zu gute.

Der Einsatz von Laser- Scanning- Mikroskopen (LSM) ist Voraussetzung für die Analyse von 3- dimensionalen Strukturen biologischer Objekte. Das in dieser Arbeit verwendete Multiphotonen- Mikroskop basiert auf einem herkömmlichen LSM 410 (Carl Zeiss Jena GmbH). Um mit der verwendeten Wellenlänge Fluoreszenzen zu erzeugen, bedarf es extrem hoher Photonenflussdichten. Außerhalb des Fokus werden diese Energiedichten, welche für eine Absorption Bedingung sind, nicht erreicht. Dies bedeutet eine Begrenzung des Anregungsvolumens fast ausschließlich nur auf den Fokus (König et al., 1996a).

Einphotonen- Anregungsvolumen



Multiphotonen- Anregungsvolumen

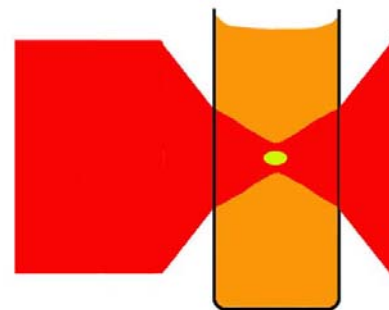


Abbildung 19 Einphotonen- Anregung: Grüner Bereich → großes Anregungsvolumen (auch des Fokusbereiches ist eine Anregung möglich. Blauer Bereich: Strahlenverlauf der Anregungsquelle. Multiphotonen- Anregung: Grüner Bereich → Subfemtoliter- Anregungsvolumen bei Benutzung von Objektiven mit $NA > 1$. Dunkelroter Bereich: Strahlenverlauf des NIR- Lasers.

In der Einphotonen- Anregung ist eine für die Erzeugung von Fluoreszenzen ausreichende Energieabsorptionen auch vor und nach der maximalen Fokussierung möglich. Dies bedeutet in Abgrenzung zur Multiphotonen- Mikroskopie ein unerwünscht großes Anregungsvolumen.

Die Multiphotonen- Mikroskopie ermöglicht auf den Fokus begrenzte, kleine Anregungsvolumina. Mit der Verwendung eines sehr kleinen Anregungsvolumens, welches nur auf den Fokus begrenzt ist, resultiert die Eigenschaft, dass es außerhalb des Fokus zu keinen Destruktionen kommt (Xu et al., 1996). Die Bedeutung von Subfemtoliter- Anregungsvolumen und das fast völlige Fehlen von endogenen Absorbern (optisches Fenster S. 12) spiegelt sich bei der Verwendung von NIR- Laserstrahlen durch die stark reduzierten durch den Laser induzierten Destruktionen von biologischen Material wieder. So konnte sehr deutlich die NIR- Laseranwendung für die *in vivo* Fluoreszenzdiagnostik demonstriert werden (Squirell et al., 1999).

Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass bei zu hohen Leistungsdichten eine Zellschädigung durch NIR- Strahlen möglich ist (König et al., 1995; Liang et al., 1996; König et al., 1996b). Bei weiterer Erhöhung der Intensitäten kann durch simultane Absorption von vier und mehr energiearmen Photonen ein optischer Durchbruch erzielt werden. Beim optischen Durchbruch ist der absorbierte Energiebetrag so hoch, dass intramolekulare Bindungen aufgebrochen werden. Es wurde gezeigt, dass mit dem selben Versuchsaufbau, wie er in dieser Arbeit zur FISH- Detektion verwendet wurde, durch Erhöhung der Leistungsdichten ein durch den Laser kontaktfreies Schneiden von Chromosomen möglich ist (König et al., 1999; König et al., 2000d; Rubtsov et al., 2000).

Die in der Einphotonen- Mikroskopie mitinduzierte hohe Hintergrundfluoreszenz/ Eigenfluoreszenz ist durch ein großes Anregungsvolumen bedingt. Dadurch ist für Aufnahmen von 3- dimensionalen Strukturen die Verwendung einer Lochblende unumgänglich. Eine Lochblende, welche nur die Photonen aus der Fokusebene zum Detektor passieren lässt, bringt eine Verringerung der Empfindlichkeit in der Detektion der emittierten Photonen mit sich. In einem Multiphotonen- Mikroskop kann aufgrund des kleinen Anregungsvolumens auf die Lochblende verzichtet werden (König et al., 2000b/e). Ein kleines Anregungsvolumen hat weiterhin zur Folge, dass ein Ausbleichen der Fluorophore außerhalb des Fokus gegenüber der Einphotonen- Mikroskopie deutlich reduziert ist (Xu et al., 1996).

In den neueren Laser- Scannig- Mikroskopen (z.B. LSM 510 Zeiss) stehen für die Einphotonen- Fluoreszenzanregung zwei verschiedene Lasertypen mit einer Vielzahl von Emissionskennlinien zur Verfügung. Für die Erzeugung der Emissionen blauer Fluorophore (SA, DAC und DAPI) werden in der Einphotonen- Lasermikroskopie Wellenlängen im UV- Bereich benötigt. UV- Laser sind sehr teuer und werden für die FISH kaum verwendet. Der in dieser Arbeit verwendete Laser ist in der Lage, blau emittierende Fluorophore anzuregen. Der erwünschte Absorptionsbereich von ca. 400 nm (Zwei- Photonen- Absorption) und ca. 265 nm (Drei- Photonen- Absorption) wird von den blauen Fluorophoren am Besten abgedeckt (siehe S. 8.). Werden zur Erzeugung von blauen Fluoreszenzen statt ultravioletter Wellenlängen ein langwelliger Laserstrahl benützt, kann auf einen kostspieligen UV- Laser und der dazugehörigen UV- Optik verzichtet werden.

Beim Einsatz unterschiedlicher Anregungswellenlängen entstehen wellenlängenabhängige Größenunterschiede der Fokusse. Mit Verwendung einer Anregungswellenlänge ist somit auch eine Dekonvolutionsberechnung erleichtert.

In den Abschnitten, in welchen eine 3- dimensionale Struktur eines FISH- Signals beschrieben wurde, fiel die Länge der Zentromersignale auf. Es wurden Zentromersignale bis zu einer Länge von 4,5 μm beschrieben. Diese Größe eines Zentromersignals ist beträchtlich und in Anbetracht der Kernrelation sehr unwahrscheinlich. Eine weitere Beobachtung ist die einseitige Ausrichtung aller Zentromersignale in 3- dimensionalen Abbildungen. Sowohl in der Fruchtwasserdetektion als auch im Gewebs- FISH wurden die Zentromersignale in länglicher Ausrichtung orthogonal zum Objektträger detektiert. Dass eine solche Ausrichtung die natürliche Realität widerspiegelt, kann ausgeschlossen werden.

Eine Begründung für beide Phänomene bietet die optische Auflösung. Eine maximale Auflösung bedeutet einen minimalen Abstand zwischen zwei Punkten, welche gerade noch voneinander unterscheidbar sind. Die horizontale Auflösung ist größer als die vertikale Auflösung. Aus diesem Grunde wird ein punktförmiges Signal mehr in die Länge als in die Breite vergrößert detektiert. Diese Eigenschaft wird als Signalkonvolution bezeichnet.

Nach der Abbeschen Invariante [$d = \lambda / n \sin \alpha$ ($d = \text{Abstand zweier unterscheidbarer Punkte}$, $\lambda = \text{verwendete Wellenlänge}$, $n \sin \alpha = \text{numerische Apertur}$)] ist die optische Auflösung unter anderem von der verwendeten Wellenlänge abhängig (Stroppe, 1989). Die Arbeit mit kleinen Wellenlängen ist Voraussetzung für eine maximale Auflösung. In dieser Arbeit wurde für die Multiphotonen- Mikroskopie eine Wellenlänge von 800 nm verwendet. Dies erklärt die unverhältnismäßig langen Fluoreszenzsignale.

Bei bekannten Parametern, welche zu einer Signalkonvolution führen, kann diese zurück gerechnet werden. Eine solche Software bietet die Firma Zeiss.

Durch die Verwendung eines Lasers mit ultrakurzer Pulsdauer eröffnet sich ein weiteres Anwendungsgebiet in der FISH. Eine Pulslänge von 80 fs (Femtosekunden = 10^{-15} s) und eine Pulsfolgefrequenz von 80 MHz gewährleisten das Messen der Fluoreszenzlebensdauer in der Multiphotonen- Mikroskopie. Die Möglichkeit, eine Fluoreszenzlebensdauer von FISH- Fluorophoren zu messen, wurde in Abschnitt 3.7 aufgezeigt.

Es ist zu vermuten, dass weitere Experimente fluorophorspezifische Abklingzeiten ergeben. Dies eröffnet die Chance einer Differenzierung aller in der FISH verwendeten Fluorophore anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer.

Eine Unterscheidung der Fluorophore ähnlicher Emissionswellenlängen (SpectrumGreen, Rhodamin 110 und FITC) wäre denkbar. Dies würde für die Multicolor- FISH einen enormen Zuwachs an verwendbaren Fluorophoren bedeuten. Durch die Kombination von fünf Fluorophoren ist die Detektion von maximal 31 unterschiedlichen DNA- Sequenzen möglich. Weisen alle in dieser Arbeit verwendeten FISH- Fluorophore eine deutliche Unterscheidung in ihrer Fluoreszenzlebensdauer auf, so könnten mit einer Anregungswellenlänge und mit einem Anregungsvorgang $[(2^n)-1 \text{ n= Anzahl der verwendeten Fluorophore (10)}]$ theoretisch 1023 unterschiedliche, spezifische DNA- Sequenzen detektiert werden.

In der Einphotonen- Mikroskopie wurde in den 80iger Jahren eine zeitaufgelöste Porphyrindetektion beschrieben (Koenig, 1989; Bugiel et al. 1989). In der Multiphotonen Detektion gelang es, die Fluoreszenzlebensdauer des intrazellulären Energieträgers NAD(P)H zu messen. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzlebensdauer zwischen Protein- gebundenem NAD(P)H und nicht gebundenem NAD(P)H herausgearbeitet (Schneckenburger und König, 1992).

Bezogen auf die Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung wäre ein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzlebensdauer zwischen unspezifisch gebundenen DNA- Sonden und spezifisch gebundenen DNA- Sonden denkbar. Würde ein solcher Unterschied gefunden werden, käme der Multiphotonen- Mikroskopie eine Zeit- und Kostenersparnis zu Gute, indem sowohl das derzeit notwendige Posthybridisierungswaschen als auch die dafür verwendeten Chemikalien wegfallen würden.

Des weiteren würde die Problematik der Diffusionskinetik erheblich aufgehellt werden. So ist nicht nur bei der Gewebs- FISH die Diffusion der markierten Sonden zu der Zielsequenz mit Schwierigkeiten verbunden, sondern auch das Entfernen der unspezifisch gebundenen DNA- Sonden nach erfolgter Hybridisierung aus dem Gewebe.

Die größten Aussichten würden sich bei einem signifikanten Unterschied der Fluoreszenzlebensdauer zwischen einer durch Fixierungsmittel verursachte Eigenfluoreszenz und den hybridisierten Signalen ergeben. Somit wäre in der Multiphotonen- Mikroskopie eine sichere Auswertung von hybridisierten Signalen ohne Rücksicht auf die exogen verursachte Eigenfluoreszenz möglich.

Unter den gegebenen Vorraussetzungen wäre eine technische Anordnung denkbar, bei der gleichzeitig ein Spektrum pro Pixel und eine Fluoreszenzlebensdauer pro Pixel gemessen werden kann. Die digitalisierten Daten könnten simultan, rechnergestützt bearbeitet und unter den oben erwähnten Gesichtspunkten ausgewertet werden. Daraus würde sich eine

ebenso große Sicherheit in der Differenzierung der verschiedenen Emissionen wie in der Einphotonen- Anregung ergeben. Darüber hinaus ist mit einer Anregungswellenlänge und einem Anregungsvorgang der Zeitaufwand in der Detektion der Hybridisierungen weitaus geringer.

4.2 Einsatzgebiete der MM- FISH in der Zytogenetik

In den Abschnitten 3.3, 3.4 und 3.5 sind durch die Multiphotonen- Mikroskopie erzeugte Multicolor- FISH- Aufnahmen abgebildet. Durch Modifizierung von bestehenden Protokollen war eine Detektion von hybridisierten FISH- Signalen möglich geworden. Diese Arbeit liefert damit einen Beitrag für die Kombination der Multiphotonen- Mikroskopie mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.

Die bisherigen Resultate, welche durch die Multiphotonen- Mikroskopie in der Metaphasen- , Interphasen- , Fiber- und Gewebs- FISH erzielt wurden, lassen vermuten, dass die MM- FISH die gleiche Aussagekraft wie die Einphotonen- FISH besitzt. Ein aussagekräftiger Vergleich muss durch weitere Experimente erarbeitet werden.

Hervorzuheben ist, dass die MM- FISH die Möglichkeit bietet, Multicolor- Detektionen 3- dimensional darzustellen. Weiterhin bietet die Multiphotonen- Mikroskopie bei Ausnutzung der Lasereigenschaften die Möglichkeit, durch Messen der Fluoreszenzlebensdauer die FISH zu bereichern.

Die Aufnahmen zeigen, dass bei einer Multicolor- Detektion Aussagen über die Lokalisation und Anzahl der Signale getroffen werden können. Ferner sind Aussagen über Verteilung, Qualität und Größe in Fläche und Raum von einzelnen hybridisierten und detektierten Fluoreszenzen möglich. In 3- dimensionalen Aufnahmen wurden die Signalauftrennungen ausführlich beschrieben.

Die zusätzliche Möglichkeit, auch 3- dimensionale Strukturen zu detektieren, eröffnet der FISH in Kombination mit der Multiphotonen- Mikroskopie neue Anwendungsgebiete. So könnte die Multiphotonen- Mikroskopie einen großen Beitrag für die Diagnostik im Interphasekern leisten. Bei für die Diagnostik vorgesehenem, nicht ausreichendem, biologischen Material oder bei schlechter Qualität der Metaphasen könnte eine FISH von Interphasekernen vorgenommen werden. Mit Hilfe der 3- dimensional Darstellung wäre der Interphasendiagnostik eine größere Sicherheit im Erkennen von pathologischen Veränderungen gegeben. Weiterhin ist es interessant, mittels 3D den Kondensationsgrad von Chromosomen im Kern sowie die Verteilung und Lage der Chromosomen zueinander

zu bestimmen. Bei der Diskussion der Ergebnisse, welche mit der MM- FISH erzielt wurden, sollte die präparative Verfälschung der biologischen Objekte mit in Betracht gezogen werden. Allein die notwendigen Fixierungsschritte stellen einen großen Eingriff in die biologische Integrität dar.

Claussen et al. (2000) beschrieb eine Multicolor- Bänderung des Chromosoms 5 im Interphasekern. Um intrachromosomale Inversionen, Duplikationen und Insertionen im Interphasekern mit einer hohen Sensitivität und einer hohen Spezifität zu diagnostizieren, wäre eine 3- dimensionale Auswertung der Hybridisierung sehr zu wünschen. Die für die Multicolor- Bänderung notwendige Detektion von fünf unterschiedlichen Fluorophoren ist auch mit der Multiphotonen- Mikroskopie durchführbar. Zusätzlich bietet die neue Methode MM- FISH die Möglichkeit einer 3- dimensional Detektion. Somit ist die Multiphotonen- Mikroskopie ein geeignetes Werkzeug hinsichtlich dieses neuen Anwendungsgebietes.

4.3 Diagnostik am Gewebsschnitt

Die Möglichkeit, Multicolor- Detektionen in 3- dimensional Strukturen vorzunehmen, zeigen die Aufnahmen von hybridisierten Signalen in einem zusammenhängenden Gewebsschnitt besonders eindrucksvoll. Die Signale konnten über eine Tiefe von 10 μm verfolgt werden.

Bei einer Eindringtiefe von 10 μm ist das Potential eines 800 nm Lasers bei weitem nicht ausgeschöpft (Chong et al., 1990). Eine Anregung von FISH- Fluorophoren in einer Gewebstiefe von $> 100 \mu\text{m}$ ist theoretisch möglich, jedoch ist es fraglich, ob die Diffusionskinetik der DNA- Sonden für eine erfolgreiche Hybridisierung ausreichend ist.

Die Diffusionskinetik der DNA- Sonden ist unter anderem abhängig von der Art des Gewebes, der Fixierung (Fixierungsmittel, Konzentration und Einwirkzeit), der Proteinasebehandlung (Art der Proteinase, Konzentration und Inkubationszeit), der DNA- Sonden (Größe und Konzentration) und der Temperatur (Harris und Wilkinson, 1990; Quartin und Wetmur, 1989; Wetmur, 1991).

Bei einem Standardprotokoll zur Hybridisierung von Gewebe großer Schnittdicke und einer computergestützten Detektion der Signale könnte der derzeitige Einsatz der Multiphotonen- Mikroskopie noch weiter ausgedehnt werden. Es wäre denkbar eine Hybridisierungsprozedur an einem makroskopisch sichtbaren Gewebstück durchzuführen, ohne die Anfertigung von Gewebsschnitten und deren Fixierung auf OT.

So wäre der Einsatz in der Pathologie zur statistischen Erfassung von tumorrelevanten Mutationen bis hin zur Kontrolle molekulargenetischer Veränderungen von Tumorresektionsrändern denkbar. Es wäre sogar denkbar, dass durch weitreichende Standardisierung die Kosten im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden gesenkt werden könnten.

4.4 Zukunftsaussichten

Das fast völlige Fehlen endogener Absorber in zellulären Bestandteilen prädestiniert die Multiphotonen- Mikroskopie für die *in vivo* Anwendung. Es ist heute möglich, mikroskopische Bilder des Epithels einer vitalen Haut aufzunehmen (König et al., 2000c). Weiterhin ist mit Hilfe eines Multiphotonen- Mikroskops das Zerschneiden von Chromosomen in einer intakten vitalen Zelle beschrieben worden (König, 2000).

Im Zusammenhang mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und der Multiphotonen- Mikroskopie wird ein Tor aufgestoßen, welches den Nachweis von spezifischen DNA- Sequenzen in lebenden Zellen ermöglichen könnte.

Die Fluoreszenz von endogenen Fluorophoren [z.B. nach Zwei- Photonen- Anregung grün fluoreszierende Proteine (Potter et al., 1996)] und damit die Detektion von vitalen Zellen wird in der Multiphotonen- Mikroskopie seit Jahren angewendet (König et al., 1996a).

Dies könnte Fragestellungen betreffend der DNA Architektur beantworten, ohne die Auswirkungen von präparationsbedingter Verfälschung des biologischen Objektes (Kaplan et al., 1993; Zalensky et al., 1995). Weiterhin wäre die Multiphotonen- Mikroskopie mit der *in vivo* Hybridisierung ein Instrument, welches eine Beobachtung von spezifischen DNA- Sequenzen über mehrere Zellgenerationen hinweg erlauben könnte.

Ein weiteres Anwendungsgebiet wäre der Nachweis von DNA- Sequenzen spezifisch für maligne entartete Zellen im lebenden Organismus. So ist der Nachweis der DNA des Humanen Papillomvirus in Zellen und Gewebe von großem Interesse (Lizard et al.; 1998). Aber auch der Nachweis von mRNA in einem intakten, vitalen Zellverband hinsichtlich des aktuellen Expressionsgeschehen dürfte von weitreichenden Interesse sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Diagnostik sein.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag für die Kombination zweier etablierter wissenschaftlicher Methoden, der Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung (FISH) und der Multiphotonen- Mikroskopie.

Die FISH ist ein Standardverfahren zum Nachweis von spezifischen DNA- oder RNA-Sequenzen, sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der zytogenetischen Routinediagnostik. Die Multiphotonen- Mikroskopie ist ein neuartiges Laser- Mikroskopie- Verfahren mit vielen interessanten Vorteilen gegenüber herkömmlichen Mikroskopiemethoden. Dies spiegelt sich in einem großen Anwendungsbereich wieder. Dieses neue Verfahren wird als Multiphotonen Multicolor Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung (MM- FISH) bezeichnete (König et al., 2000a/b).

In dieser Arbeit wird aufgezeigt, dass mit einer Anregungswellenlänge von 800 nm eine MM- FISH realisiert werden kann. Alle gebräuchlichen FISH- Fluorophore konnten mit einer Multiphotonenabsorption angeregt werden. Es wurde eine qualitative Einteilung der verwendeten Fluorophore bezogen auf die Multiphotonen- Mikroskopie vorgenommen. Fünf- Farb- Hybridisierungen von Ganzchromosomen- und Zentromer- Sonden belegen die Multiphotonenanregbarkeit der FISH- Fluorophore an Metaphasen. Unter Ausnutzung der Eigenschaften des Laserstrahls war es möglich, für das Fluorophor SpectrumOrange das Ausbleichverhalten und für das Fluorophor FITC die Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen. Die extrem kurze Pulsdauer (80 Femtosekunden) und die Pulsfolgefrequenz von 80 MHz bieten für die FISH neuartige Möglichkeit, der zeitaufgelösten Messung von FISH- Signalen.

Ferner konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich Fixierungsmittel für das Entstehen von exogen induzierten Eigenfluoreszenzen verantwortlich sind.

Mit Hilfe einer Fünf- Farb- Hybridisierung eines Interphasekerns konnte das Potential der Multiphotonen- Mikroskopie hinsichtlich der 3- dimensional Detektion von FISH- Signalen demonstriert werden.

Durch Modifizierung bestehender Protokolle war es möglich, eine Detektion von Multicolor- Gewebs- Hybridisierungen der Multiphotonen- Mikroskopie zugänglich zu machen. Somit konnte demonstriert werden, dass die hohe Eindringtiefe von NIR-

Laserstrahlen für die molekular- pathologische Untersuchung von Gewebsbiopsien genutzt werden kann.

In dieser Arbeit wird aufgezeigt, dass eine Kombination beider Methoden sinnvoll ist.

Die Multiphotonen- Mikroskopie ist in der Lage, die Anwendungsgebiete der FISH zu bereichern.

6 Literatur

Aubele-M; Zitzelsberger-H; Szucs-S; Werner-M; Braselmann-H; Hutzler-P; Rodenacker-K; Lehmann-L; Minkus-G; Hofler-H (1997)

Comparative FISH analysis of numerical chromosome 7 abnormalities in 5-micron and 15-micron paraffin-embedded tissue sections from prostatic carcinoma.

Histochem-Cell-Biol. Feb; 107(2): 121-6

Belyasky A., T. Vinogradova, K. Rajlewsky (1989)

PCR- based cDNA library construction: general cDNA Bibliothken at the level of a few cells.

Nucleic Acids Res 17: 2919-2934

Booth-MJ; Hell-SW (1998)

Continuous wave excitation two-photon fluorescence microscopy exemplified with the 647-nm ArKr laser line.

J-Microsc. Jun; 190 (Pt 3): 298-304

Brandriff-B; Gordon-L; Trask-B (1991)

A new system for high-resolution DNA sequence mapping interphase pronuclei.

Genomics. May; 10(1): 75-82

Buddeke E. (1989)

Grundriss der Biochemie

8. Auflage Berlin, New York: de Gruyter & Co.

ISBN 3-11-012076-3

Bugiel I., König K., Wabnitz H. (1989)

Investigation of cells by fluorescence laser scanning microscopy with subnanosecond time resolution

Laser in the life Siecnce 3(1):47-53

Bull-JH; Harnden-P (1999)

Efficient nuclear FISH on paraffin-embedded tissue sections using microwave pretreatment.

Biotechniques. Mar; 26(3): 416-8, 422

Casey-J; Davidson-N (1977)

Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide

Nucleic-Acids-Res; 4(5): 1539-52

Cherif-D; Bernard-O; Berger-R (1989)

Detection of single-copy genes by nonisotopic in situ hybridization on human chromosomes.

Hum-Genet. Mar; 81(4): 358-62

Chong WF., Prahl SA., Welch AJ. (1990)
Review of the optical properties of biological tissue.
J Quantum Electron 26:2166-2185

Chudoba-I; Plesch-A; Lorch-T; Lemke-J; Claussen-U; Senger-G (1999)
High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes.
Cytogenet-Cell-Genet.; 84(3-4): 156-60

Clancy-B; Cauller-LJ (1998)
Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride.
J-Neurosci-Methods. Sep 1; 83(2): 97-102

Claussen U., J. Lemke, S. Michel, I. Chudoba, P. Mühlig, M. Westermann, J. Claussen, N. Rubtsov, U-W. Grummt (2000)
The concept of chromosome condensation and de- condensation during mitosis has to be reassessed
3rd World- Congress: Cellular and Molecular Biology
Cell. Mol. Biol. No.46, 37

D'Alessandro-I; Zitzelsberger-H; Hutzler-P; Lehmann-L; Braselmann-H; Chimenti-S; Hofler-H (1997)
Numerical aberrations of chromosome 7 detected in 15 microns paraffin-embedded tissue sections of primary cutaneous melanomas by fluorescence in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy.
J-Cutan-Pathol. Feb; 24(2): 70-5

Denk-W; Strickler-JH; Webb-WW (1990)
Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.
Science. Apr 6; 248(4951): 73-6

dtv Lexikon (1990)
Band 19 Tus- Wek
F. A. Brockhaus GmbH, Mannheim, und Deutscher Taschenbuchverlag GmbH & Co. KG, München
ISBN 3-423-05998-2

Egger- MD, Petran- M. (1967)
New reflect- light microscope for viewing unstained brain and Ganglion cells
Sience 157: 305-307

Ezaki-T (2000)
Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: its potential drawbacks and optimization for double immunostaining.
Micron. Dec; 31(6): 639-49

Florijn-RJ; Bonden-LA; Vrolijk-H; Wiegant-J; Vaandrager-JW; Baas-F; den-Dunnen-JT; Tanke-HJ; van-Ommen-GJ; Raap-AK (1995)
High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes.
Hum-Mol-Genet. May; 4(5): 831-6

Flörke U.,R. Wolff (1991)
Chemie
2.Auflage Dümmler, Bonn, S. 159
ISBN 3-427-43152-5

Gall-JG; Pardue-ML (1969)
Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations
Proc-Natl-Acad-Sci-USA Jun; 63(2): 378-83

Göppert- Meyer, Maria (1931)
Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen
Göttinger Dissertation Ann. Phys. 9:273-294

Green-NM (1964)
The molecular weight of avidin
Biochem-J Aug; 92(2): 16C-17C

Green-NM (1990)
Avidin and streptavidin
Methods-Enzymol; 184: 51-67

Hale GM., Querry MR. (1973)
Optical Constants of Water in the 200 nm to 200 mm wavelength region
Appl. Opt. 12: 555-563

Harper-ME; Ullrich-A; Saunders-GF (1981)
Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11.
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. Jul; 78(7): 4458-60

Harris N., D.G. Wilkinson (1990)
In situ Hybridisation: application to developmental biology and medicine
Cambridge University Press 1990 1. Auflage
ISBN 0 521 38062 6

Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de-Klein A, Bartram CR, Grosveld G (1983)
Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia.
Nature 306:239-242

Hesed M. Padilla-Nash, William G.Nash, George M.Padilla, Kathryn M.Roberson, Cary N.Robertson, Merryn Macville, E.Schröck, Thomas Ried (1999)

Molecular Cytogenetic Analysis of the Bladder Carcinoma Cell Line BK-10 by Spectral Karyotyping

Genes, Chromosomes and Cancer 25:53-59

Hopman-AH; Wiegant-J; van-Duijn-P (1986)

A new hybridocytochemical method based on mercurated nucleic acid probes and sulfhydryl-hapten ligands. II. Effects of variations in ligand structure on the in situ detection of mercurated probes.

Histochemistry.; 84(2): 179-85

Hopman-AH; van-Hooren-E; van-de-Kaa-CA; Vooijs-PG; Ramaekers-FC (1991)

Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers.

Mod-Pathol. Jul; 4(4): 503-13

Hunter-EF; Greer-PW; Swisher-BL; Simons-AR; Farshy-CE; Crawford-JA; Sulzer-KR (1984)

Immunofluorescent staining of Treponema in tissues fixed with formalin.

Arch-Pathol-Lab-Med. Nov; 108(11): 878-80

John-HA; Birnstiel-ML; Jones-KW (1969)

RNA-DNA hybrids at the cytological level.

Nature. Aug 9; 223(206): 582-7

Kaiser W., Garrett (1961)

Two- Photon Excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$

Phys. Rev. Lett. 7(6):229-231

KaplanFS., J. Murray, JE. Sylvester, IL. Gonzales, JP. O`Conner, JL. Doering, M. Muenke, BS. Emanuel, MA. Zasloff (1993)

The topographic organization of repetitive DNA in the human nucleus.

Genomics 15:123-132

Kessler-C (1991)

The digoxigenin:anti-digoxigenin (DIG) technology--a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system.

Mol-Cell-Probes. Jun; 5(3): 161-205

Kimura-N; Sasano-N; Ishioka-K (1986)

Use of formaldehyde-induced fluorescence for cytological diagnosis of pheochromocytoma.

Acta-Pathol-Jpn. Jul; 36(7): 1049-54

König K. (1989)

Beiträge zur selektiven Photochemotherapie und optischen Diagnostik von Tumoren

Promotion FSU Jena

König (1999)

Biomedizinische Applikationen der optischen Mikromanipulation und Zweiphotonen-Anregung vitaler Zellen mittels Naher- Infrarot Laser- Mikroskopie
Lasertechnik 1. Auflage Shaker Verlag Aachen
ISBN 3-8265-6788-9

König K. (2000)

Multiphoton Microscopy in life science.
J. of Microscopy 200 83-104

König K., Wabnitz H. (1990)

Fluoreszenzuntersuchung mit hoher zeitlicher, spektraler und räumlicher Auflösung
Labortechnik 23: 26-31

König-K; Liang-H; Berns-MW; Tromberg-BJ (1995)

Cell damage by near-IR microbeams [letter]
Nature. Sep 7; 377(6544): 20-1

König K., U. Simon, K.-J. Halbhuber (1996a)

3D Resolved Two-Photon Fluorescence Microscopy of Living Cells Using a Modified Confocal Laser Scanning Microscope
Cellular and Molecular Biology 42 (8) 1181-1194

König K., Y. Tadir, P. Patrizio, M. W. Berns, B. J. Tromberg (1996b)

Effects of ultraviolet exposure and near infrared laser tweezers on human spermatozoa
Human Reproduction Vol.11, No.10 2162-2164

König K., I. Riemann, P. Fischer, K.J. Halbhuber (1999)

Intracellular Nanosurgery with Infrared Femtosecond Laser Pulses
Cellular and Molecular Biology 45 (2):195-201

König K., I. Riemann, A. Göhlert, P. Fischer, T. Liehr, I. F. Loncarevic, U. Claussen, K.-J. Halbhuber (2000a)

Multiphotonen Multicolor FISH
Laser Microscopy
Proceeding of SPIE Volume 4164: 18-28

König K., I. Riemann, P. Fischer, K.J. Halbhuber (2000b)

Multiplex FISH and three- dimensional DNA imaging with near infrared femtosecond laser pulsed
Histochemistry and Cell Biology 114 337-345

König K., Peuckert C., Riemann I., Wollina U (2000c)

Non- Invasive 3D optical biopsy of Human skin with NIR- Femtosecond Laser pulses for diagnosis of dermatological disorders
3rd World- Congress: Cellular and Molecular Biology
Cell. Mol. Biol. No.46, 117

König K., U. Tirlapur, I. Riemann, W. Fritsche (2000d)

Nanosurgery of chromosomes, living cells and tissue with Femtosecond Laserpulses in the Near infrared
3rd World- Congress: Cellular and Molecular Biology
Cell. Mol. Biol. No.46, 118

König K., A. Göhlert, P. Fischer, T. Liehr, I. F.Loncarevic, U. Claussen, K.-J. Halbhuber , I. Riemann (2000e)

Two-Photon Multicolor FISH: A Versatile Technique to Detect Specific Sequences within Single DNA Molecules in Cells and Tissue
Single Molecule 1:41-51

Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. (1988)

The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias.
N Engl J Med. Oct 13;319(15):990-8

Lakowicz-JR; Gryczynski-I; Malak-H; Schrader-M; Engelhardt-P; Kano-H; Hell-SW (1997)

Time-resolved fluorescence spectroscopy and imaging of DNA labeled with DAPI and Hoechst 33342 using three-photon excitation.
Biophys-J. Feb; 72(2 Pt 1): 567-78

Landegent-JE; Jansen-in-de-Wal-N; Dirks-RW; Baao-F; van-der-Ploeg-M (1987)

Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization.
Hum-Genet. Dec; 77(4): 366-70

Langer-PR; Waldrop-AA; Ward-DC (1981)

Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes.
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. Nov; 78(11): 6633-7

Langer-Safer-PR, Levine-M. Ward-DC (1982)

Immunological method for mapping genes in Drosophila polytene chromosomes
Proc-Natl-Acad-Sci-USA 79(14):4381-5

Lawrence J.B. and Singer R.H. (1985)

Quantitative analysis of in situ hybridisation for the detection of actin gene expression.
Nucleic Acids Research, 13 (5), 1777-1799

Lawrence-JB; Singer-RH; McNeil-JA (1990)

Interphase and metaphase resolution of different distances within the human dystrophin gene.
Science. Aug 24; 249(4971): 928-32

Lawrence-JB; Villnave-CA; Singer-RH (1988)

Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line.
Cell. Jan 15; 52(1): 51-61

Leitch AR., T. Szwarczacher, D. Jackson, I.J. Leitch (1994)

In situ Hybridisierung

Auflage Heidelberg, Berlin, Oxford.; Spektrum Akad. Verl.

ISBN 3-86025-225-9

Liang-H; Vu-KT; Krishnan-P; Trang-TC; Shin-D; Kimel-S; Berns-MW (1996)

Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping.

Biophys-J. Mar; 70(3): 1529-33

Lichter-P; Tang-CJ; Call-K; Hermanson-G; Evans-GA; Housman-D; Ward-DC (1990)

High-resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones.

Science. Jan 5; 247(4938): 64-9

Liehr-T; Grehl-H; Rautenstrauss-B (1995a)

FISH analysis of interphase nuclei extracted from paraffin-embedded tissue.

Trends-Genet. Oct; 11(10): 377-8

Liehr T.; K. Thoma; K. Kammler; C. Gehring; A. Ekici; KD. Bathke; H. Grehl; B. Ratenstrauss (1995b)

Direct preparation of uncultured EDTA- treated of heparinized blood for interphase FISH analysis

Appl Cytogenet Vol. 21, pp 185-188

Liyanage M., A. Coleman, S. du Manoir, T. Veldman, S. McCormack, R. B. Dickson, C. Barlow, A. W.-B., S. Janz, J. Wienberg, M. A. Ferguson-Smith, E. Schröck, T. Ried (1996)

Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes

Nature Genetics Vol 14 november

Lizard G., M.-C. Chignol, C. Souchier, P. Roignot, Y. Chardonnet, D. Schmitt (1998)

Detection of low copy numbers of HPV DNA by fluorescent *in situ* hybridization

combined with confocal microscopy as an alternative to *in situ* polymerase chain reaction

Journal of Virological Methods 72:15-25

Longin-A; Souchier-C; Ffrench-M; Bryon-PA (1993)

Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study.

J-Histochem-Cytochem. Dec; 41(12): 1833-40

Luke S., M. Shepelsky (1998)

FISH: Recent advances and diagnostic aspects

Cell Vision Vol. 5, No. 1: 49-53

Macville-M; Veldman-T; Padilla-Nash-H; Wangsa-D; O'Brien-P; Schrock-E; Ried-T (1997)

Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements.

Histochem-Cell-Biol. Oct-Nov; 108(4-5): 299-305

Maniatis T., EF. Fritsch, J. Sambrook (1989)

Molecular cloning: a laboratory manual.
Cold Spring Harbor, New York

Manuelidis-L; Langer-Safer-PR; Ward-DC (1982)

High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes.
J-Cell-Biol. Nov; 95(2 Pt 1): 619-25

Manuelitis L. (1985)

In situ detection of DNA sequences using biotinylated probes.
Focus 7:4-8

Minsky (1957)

Mikroskopy apparatus.
US- Patent 3013467 (Anmeldung: 07.11.1957)

Nederlof-PM; Robinson-D; Abuknesha-R; Wiegant-J; Hopman-AH; Tanke-HJ; Raap-AK (1989)

Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences.
Cytometry. Jan; 10(1): 20-7

Nederlof-PM; van-der-Flier-S; Wiegant-J; Raap-AK; Tanke-HJ; Ploem-JS; van-der-Ploeg-M (1990)

Multiple fluorescence in situ hybridization.
Cytometry.; 11(1): 126-31

Nietzsche, Friedrich

Menschliches, Allzumenschliches
Kritische Studienausgabe - Herausgegeben von Giorgio Colli und Mazzino Montinari
(Men.I, 99)
Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, New York
ISBN 3-423-30152-X

Old RW. and Pimrose SB. (1985)

Principles of gene manipulation.
Blackwell Scientific, Oxford

Patentschrift

Deutsches Patent und Markenamt
Patentanmeldung DE 199 35 766 A1 vom 29.07.1999

Pinkel-D; Straume-T; Gray-JW (1986)

Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization
Proc-Natl-Acad-Sci-USA May; 83(9): 2934-8

Potter-SM; Wang-CM; Garrity-PA; Fraser-SE (1996)

Intravital imaging of green fluorescent protein using two-photon laser-scanning microscopy.
Gene.; 173(1 Spec No): 25-31

Prasada-Rao-PD (1982)

Changes in formaldehyde-induced fluorescence of the hypothalamus and pars intermedia in the frog, *Rana temporaria*, following background adaptation.
Brain-Res-Bull. Jul-Dec; 9(1-6): 765-76

Pschyrembel (1994)

Klinisches Wörterbuch
257. Auflage Walter de Gruyter, Berlin, New York
ISBN 3-11-012692-3

Quartin R., G. Wetmur (1989)

Effect of ionic strength on the hybridization of oligodeoxynucleotides with reduced charge due to methylphosphonate linkages to unmodified oligodeoxynucleotides containing complementary sequence
Biochemistry, 28, 1040-1047

Ramesh-KH; Macera-MJ; Verma-RS (1997)

Rapid denaturation improves chromosome morphology and permits multiple hybridizations during fluorescence in situ hybridization
Biotech-Histochem May; 72(3): 141-3

Ried-T; Baldini-A; Rand-TC; Ward-DC (1992)

Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy.
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. Feb 15; 89(4): 1388-92

Ronne-M (1989)

Chromosome preparation and high resolution banding techniques. A review
J-Dairy-Sci May; 72(5): 1363-77

Rubtsov N., I. Riemann, V. Trifonov, T. Karamysheva, T. Liehr, U. Claussen, K. König (2000)

Chromosome microdissection using NIR- Femtosecond Laserpulse and generation of band specific DNA- Libraries with DOP- PCR
3rd World- Congress: Cellular and Molecular Biology
Cell. Mol. Biol. No.46, 200

Saiki RK.; Scharf S.; Fallona- F.; Mullis KB.; Horn GT.; Erlich HA.; Arnheim N.; (1985)

Enzymatic amplification of β - globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia
Science. 230: 1350-1354

Schildkraut-C (1965)

Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration.
Biopolymers; 3(2): 195-208

Schneckenburger, H., K. König (1992)

Fluorescence decay kinetics and imaging of NAD(P)H and flavins as metabolic indicators.
Opt Eng. 31(7): 1447-1451

Schröck E., S.du Manoir, T.Veldman, B.Schoell, J.Weinberg, M.A.Ferguson-Smith, Y.Ning, D.H.Ledbetter, I.Bar-Am, Dsoenksen, Y.Garini.T.Ried (1996)
Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes
Science Vol.273

Schröck E., T. Veldman, Hesed Padilla-Nsah, Y. Ning, J. Spurbeck, S. Jalal, L. G.Shaffer, P. Papenhausen, C. Kozma, M. C.Phelan, E. Kjeldsen, S. A.Schonberg, P. O'Brien, L. Biesecker, . du Manoir, T. Ried (1997)
Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities
Human genetics 101:255-262

Schwarzacher H.G. (1976)
Chromosomes in Mitosis and Interphase.
Springer, Berlin, S182

Speicher-MR; Gwyn-Ballard-S; Ward-DC (1996)
Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH.
Department of Genetics, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510, USA.
Nat-Genet. Apr; 12(4): 368-75

Squirrell J M., David L.Wokosin, John G.White, Barry D.Bavister (1999)
Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability
Nature Biotechnology Vol 17 August

Steinkamp-JA; Lehnert-NM; Keij-JF; Lehnert-BE (1999)
Enhanced immunofluorescence measurement resolution of surface antigens on highly autofluorescent, glutaraldehyde-fixed cells analyzed by phase-sensitive flow cytometry.
Cytometry. Dec 1; 37(4): 275-83

Strachan T., Read, A.P. (1996)
Human Molecular Genetics.
Spectrum, Heidelberg, Berlin, Oxford
ISBN 3-8274-0039-2

Stroppe H. (1989)
Physik
8. Auflage VEB Fachbuchverlag Leipzig
ISBN 3-343-00182-1

Sushanta K. Banerjee, Allan P. Weston, Diane L. Persons, Donald R. Campbell (1998)
Quick-FISH: A Rapid Fluorescence In Situ Hybridisation Technique for Molecular cytogenetic Analysis
BioTechniques 24:826-830

Tkachuk DC., D. Pinkel, WL. Kuo, HU. Weier, JW. Gray (1991)
Clinical application of fluorescence in situ hybridisation
Genet-Anal-Tech-Appl. Apr; 8(2): 67-74

Trask-B; Pinkel-D; van-den-Engh-G (1989)

The proximity of DNA sequences in interphase cell nuclei is correlated to genomic distance and permits ordering of cosmids spanning 250 kilobase pairs.
Genomics. Nov; 5(4): 710-7

van-de-Rijke-FM; Florijn-RJ; Tanke-HJ; Raap-AK (2000)

DNA fiber-FISH staining mechanism
J-Histochem-Cytochem. Jun; 48(6): 743-5

Viegas-Pequignot-E; Jeanpierre-M; Dutrillaux-AM; Gerbault-Seureau-M; Muleris-M; Dutrillaux-B (1989)

Detection of 1q polysomy in interphase nuclei of human solid tumors with a biotinylated probe.
Hum-Genet. Mar; 81(4): 311-4

Vysis: Herstellerangaben

Wahl-GM; Stern-M; Stark-GR (1979)

Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate.
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. Aug; 76(8): 3683-7

Watson-JD; Crick-FH (1974)

Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. G.D. Watson and F.H.C. Crick. Published in Nature, number 4356 April 25, 1953
Nature. Apr 26; 248(451): 765

Wetmur-JG (1976)

Hybridization and renaturation kinetics of nucleic acids
Annu-Rev-Biophys-Bioeng; 5: 337-61

Wetmur- JG (1991)

DNA Probes: Applications of the principles of nucleic acid hybridization
Biocemistry, 26, 227-259

Wray S., Cope M., Delpy DT., Wyatt JS., Rynolds EOR. (1988)

Characterization of the near- infrared absorption spectra of cytochrome aa3 and hemoglobin for the non- invasive monitoring of cerebral oxygenation.
Biophysica Acta. 933: 184-192

Xu C., Zipfel W., Shear JB., Williams RM., Webb WW. (1996)

Multiphoton fluorescence excitation: new spektral windows for biological nonlinear microscopy
Proc Natl Acad Sci USA 93: 10763-10768

Zalensky AO., MJ. Allen, A. Kobayashi, IA. Zalenskaya, R.Balhorn, EM. Bradbury (1995)

Well- defined genome structure in the human sperm nucleus.
Chromosoma 103:577-590

7 Abkürzungen

7.1 Abkürzungen von Fachausdrücken

Aqua Dest	Einmal destilliertes Wasser
Aqua Bidest	Doppelt destilliertes Wasser
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCD-Kamera	charge-coupled device -Kamera (= gekühlter, ladungsgekoppelter Bildsensor)
Cep	Zentromer
Chr.	Chromosom
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
Cy5	Cyanin 5
Cy5.5	Cyanin 5.5
DAC	Diethylaminocumarin
DAPI	Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dUTP`s	Desoxiribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraazetat (Dinatriumsalz)
Fc-Teil	Fragment crystalin (Abschnitt eines Immunoglobolins)
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälber Serum
GTG	<u>G</u> -bands by <u>T</u> rypsin using <u>G</u> iemsa
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
ISH	In <i>situ</i> Hybridisierung
KCl	Kaliumchlorid
LSM	Laser- Scannig- Mikroskop
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

MM-	Multiphotonen- Multicolor-
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NIR	Nahes Infrarot
NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	Natriumphosphatpuffer
NaOH	Natronlauge
OT	Objektträger (Einzahl)
OTs	Objektträger (Mehrzahl)
³² P	radioaktives Phosphorisotop der relativen Masse 32
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung)
PMT	Photomultiplier (Photonenvervielfältiger)
RNA	Ribonukleinsäure
R110	Rodamin 110
SA	Spektrum Aqua
SG	Spektrum Green
SO	Spektrum Orange
SR	Spektrum Red
³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop der relativen Masse 35
SSC	standard saline citrate (Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat)
Taq	Thermus aquaticus
TR	TexasRed
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tween	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat
UV	ultra violett
ÜN	Über Nacht
3D	3- dimensional

7.2 Abkürzungen von Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
fs (FS)	Femtosekunden(10^{-15} s)
g	Gramm

kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	Mol / molar
Mbp	Megabasenpaare
MHz	Mega Hertz (Schwingungen pro Sekunde)
min	Minute
mm	Millimeter
m	Meter
nm	Nanometer
%	Prozent
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen Konzentration
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunde
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
λ	physikalische Symbol für die Wellenlänge
Φ	Photonenflussdichte

7.3 Vorsätze bei Größeneinheiten

k	Kilo	(10 ³)
c	Zenti	(10 ⁻²)
m	Milli	(10 ⁻³)
μ	Mikro	(10 ⁻⁶)
n	Nano	(10 ⁻⁹)
p	Piko	(10 ⁻¹²)
f	Femto	(10 ⁻¹⁵)

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Hilfsbereitschaft zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit beigetragen haben.

Besonderst danken möchte ich:

- Dem Institutsdirektor der Anatomie II Prof. Dr. K.- J. Halbhuber und dem Institutsdirektor der Humangenetik Prof. Dr. U. Claussen für die herzliche Aufnahme in den Instituten, für ihre Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreudigkeit beim Lösen fachlicher Probleme.
- PD Dr. Karsten König möchte ich danken für das Bereitstellen des Themas, die sehr gute Betreuung, die geduldigen Erklärungen und für sein Interesse und seine Hilfsbereitschaft auch außerhalb des fachlichen Bereiches.
- Dr. Iris Riemann danke ich für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit, ihre Motivationskünste, die vielen Korrekturlesungen, die Akzeptanz meiner Orthographie und Grammatik, für die Teilung von Erfolg und Misserfolg in allen Bereichen und überhaupt - wäre ich ohne sie nie soweit gekommen.
- Dr. Peter Fischer möchte ich danken für die unerschöpfliche Geduld und Hilfsbereitschaft beim Ausbügeln der von mir verursachten Fehler bei der Bedienung des LSM.
- Isa Lemke danke ich für ihre Unterstützung bei der Anfertigung der Abbildungen.
- Kathrin Riemann danke ich für ihre neun Monate Geduld.
- Guido Anton danke ich für die überaus gelungene Motivation, um den Schluss meiner Arbeit voranzubringen.

- Anita Heller, Ivan F. Loncarevic, Thomas Liehr und Heike Starke danke ich für die Einarbeitung in die Fluoreszenz in situ Hybridisierung, für das Heranführen an die wissenschaftliche Arbeit, für die geduldige Beantwortung all meiner Fragen, für das Heraufsetzen meiner Frustrationstoleranz, für die Durchsicht und Betreuung meiner Arbeit.
- Allen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik danke ich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitsgruppen, das Interesse und die Unterstützung an meiner Arbeit und die angenehme Zeit miteinander. Namentlich seien hier genannt: Alma Küchler, Monika Ziegler, Isabell Hartmann, Angela Bleichert, Harald Hohmann, Susanne Michel, Vladimir Trifonov, Dr. Beensen und Frau Wolter.
- Des weiteren möchte ich allen Mitarbeitern der Anatomie I und II. danken. Namentlich seien hier genannt: Reimar Krieg, Herr Lemke, Helmut Hörich, Uday Tirlapur, Frau Möller, Frau Hitschke, Frau Schönfeld, Frau Arends und Frau Hoffmann.
- Meinen Eltern, Annette und Bernd Göhlert, möchte ich für ihre langjährige und geduldige Unterstützung danken.
- Mein größter Dank gilt Angela Nietzel.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Arbeit und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: PD Dr. Karsten König, Dr. Iris Riemann und Angela Nietzel,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 20.02.2001

Axel Göhlert