

Aus dem Bereich Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Optische Rasternahfeldmikroskopie: eine Methode für die Darstellung und Manipulation chromosomaler DNA

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät***

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2006

vorgelegt von: Markus Niedereichholz
geb. am: 16.02.1973 in Illingen

1. ZUSAMMENFASSUNG	4
SUMMARY.....	6
2. EINLEITUNG.....	8
2.1 Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH)	8
2.2 Optische Rasternahfeldmikroskopie (engl.: scanning near-field optical microscopy, SNOM)	13
2.3 Ziele	15
3. MATERIAL UND METHODEN.....	16
3.1 Chromosomenpräparation	16
3.1.1 Chromosomenpräparation aus menschlichen Lymphozyten.....	16
3.1.1.1 Colcemidbehandlung	17
3.1.1.2 Hypotonie.....	17
3.1.1.3 Fixierung	18
3.1.1.4 Auftropfen der Mitosen.....	18
3.1.2 Chromosomenpräparation aus der Zelllinie Colo 320 DM.....	19
3.1.2.1 Arbeitsbedingungen für die Zellkultur	19
3.1.2.2 Zellkultivierung.....	20
3.1.2.3 Unterkultivierung.....	20
3.1.2.4 Metaphasen-Präparation	21
3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR)....	22
3.2.1 Prinzip der PCR	22
3.2.1.1 Reaktionsansatz	24
3.2.1.2 PCR-Programm	25
3.2.2 Verifizierung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese.....	26
3.2.2.1 Herstellung des Agarosegels.....	26
3.2.2.2 Auftragen der Proben.....	26
3.2.2.3 Darstellung der PCR-Produkte	26
3.2.3 Herstellung der Sonden	31
3.2.3.1 Aufreinigen der PCR-Produkte	31
3.2.3.2 Markierung der PCR-Produkte.....	32

3.3 Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH)	34
3.3.1 Prinzip	34
3.3.2 Protokolle	36
3.3.2.1 Grundprotokoll	36
3.3.2.2 Variationen	39
3.4 Fluoreszenzmikroskopie	41
3.5 SNOM	41
3.5.1 Funktionsprinzip	41
3.5.2 Darstellung der Chromosomen	44
3.5.3 Manipulation/Extraktion chromosomaler DNA	45
3.6 Verwendete Materialien	46
3.6.1 Zellmaterial	46
3.6.2 Chemikalien	46
3.6.3 Puffer und Lösungen	47
4. ERGEBNISSE	49
4.1 Auswertung der FISH-Experimente mittels Fluoreszenzmikroskopie	49
4.1.1 Zentromersonde gegen Chromosom 1	49
4.1.2 Sondenmix gegen alle Zentromere.....	51
4.1.3 c-myc-Sonde.....	52
4.1.4 Mittels PCR hergestellte Sonden der Länge 1031, 718, 485, 243bp.....	53
4.2 Auswertung der FISH-Experimente mittels SNOM	57
4.2.1 Zentromersonde gegen Chromosom 1	57
4.2.2 Sondenmix gegen alle Zentromere.....	62
4.2.3 c-myc-Sonde.....	64
4.2.4 Mittels PCR hergestellte Sonden der Länge 1031, 718, 485, 243bp.....	65
4.2.5 Manipulation/Extraktion chromosomaler DNA	67
4.3 Vergleich der Auswertungen der FISH-Experimente mittels Fluoreszenzmikroskopie und mittels SNOM	69

5. DISKUSSION	70
5.1 Methodische Aspekte.....	70
5.1.1 Probenherstellung.....	70
5.1.2 PCR	71
5.1.3 FISH.....	72
5.1.3.1 Zentromersonde gegen Chromosom 1	72
5.1.3.2 Sondenmix gegen alle Zentromere.....	72
5.1.3.3 c-myc-Sonde.....	73
5.1.3.4 Mittels PCR hergestellte Sonden der Länge 1031, 718, 485, 243bp.....	74
5.1.4 SNOM.....	74
5.2 Ergebnisse	78
5.2.1 Abbilden.....	78
5.2.2 Manipulation/Extraktion chromosomaler DNA	82
5.3 Wertung und Ausblick	83
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	90
7. LITERATURVERZEICHNIS	92
8. DANK	102
9. LEBENS LAUF	103

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob mittels eines kommerziell erworbenen optischen Rasternahfeldmikroskops das Abbilden chromosomaler DNA im optischen und topographischen Modus möglich ist oder ob Veränderungen des Setups vorgenommen werden müssen. Weiterhin wurde überprüft, ob in Fluoreszenz in situ-Hybridisierungen eingesetzte DNA-Sonden optisch und topographisch dargestellt werden können, bis zu welcher kleinsten Größe Zielsequenzen nachgewiesen werden können und ob die Abbildungen mit denen aus der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie korrelieren. Abschließend wurde untersucht, ob das optische Rasternahfeldmikroskop auch zur Manipulation/Extraktion chromosomaler DNA geeignet ist.

Initial wurden Fluoreszenz in situ-Hybridisierungen mit einer Zentromersonde gegen Chromosom 1, welche mit einer großen Zielsequenz von 440kb-1,51Mb hybridisiert, durchgeführt. Es zeigte sich, dass das vorliegende Setup des optischen Rasternahfeldmikroskops im Allgemeinen nicht für die zu untersuchenden Proben geeignet war. Durch Veränderungen bei der Positionierung der Mikroskopspitze, der Detektionseinrichtung und der Abstandsregelung konnte das Setup so umgerüstet werden, dass die optische und topographische Abbildung von Metaphasechromosomen sowie der Zentromersonde gegen Chromosom 1 gelang. Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie zeigten sich im Zentromerbereich zwei Signale, was für Telomersonden bereits beschrieben ist.

Durch den Einsatz eines Sondenmix gegen alle Zentromere wurde das Auffinden von Sonden, die ebenfalls eine große Zielsequenz im Bereich mehrerer hundert kb bis ca. 5Mb haben, erleichtert. Im Vergleich zu fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen waren bei der Rasternahfeld-Analyse einige Zentromersignale in zwei oder mehrere kleine Teile aufgetrennt. Außerdem kamen mit dieser Technik auch wenig intensive Sonden signale zur Darstellung.

Mit der c-myc-Sonde konnte eine Sonde abgebildet werden, die mit einer mittelgroßen Zielsequenz von 80kb hybridisiert.

Kleinere, mittels Polymerase-Ketten-Reaktion selbst hergestellte Sonden, die eine Länge von 1031, 718, 485, 243bp besaßen, konnten dagegen nicht nachgewiesen werden, was möglicherweise durch eine verminderte Hybridisierungseffizienz der Fluoreszenz in situ-Hybridisierungen bedingt war. Mit diesem Ansatz konnte folglich

die untere Nachweisgrenze hinsichtlich der Auflösung des optischen Rasternahfeldmikroskops nicht bestimmt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem optischen Rasternahfeldmikroskop neben dem abbildenden Modus auch die Manipulation chromosomaler DNA möglich ist. Der Beweis der Extraktion konnte bisher jedoch nicht erbracht werden.

Das optische Rasternahfeldmikroskop stellt für die medizinische und biologische Forschung ein vielversprechendes Werkzeug dar, da es die optische und topographische Darstellung von sowohl chromosomaler DNA als auch darauf lokalisierter Sonden erlaubt. Ebenso ist deren Manipulation im Nanometerbereich möglich. Dadurch kann es zum Bindeglied zwischen der molekularen Zytogenetik und der Molekularbiologie werden. Technische Weiterentwicklungen versprechen zukünftig eine einfachere Bedienbarkeit sowie eine weitere Verbesserung der Auflösung und eröffnen somit viele neue Perspektiven.

Summary

This study was aimed at investigating whether a commercial scanning near-field optical microscope (SNOM) was suitable for displaying chromosomal DNA in the optical and topographic mode, or if technological changes in the setup must be conducted. Furthermore, this study determined if DNA probes used in fluorescence in situ hybridization (FISH) could be displayed optically and topographically. This study was also aimed at identifying the smallest size target sequences that can be detected, and aimed at determining if SNOM images correlate with those of a conventional fluorescence microscope. Finally, it was investigated whether the SNOM was suited for manipulation and extraction of chromosomal DNA.

Initially, FISH was performed with a centromere probe against chromosome 1, which contains a large target sequence ranging from 440kb to 1.51Mb. It was shown that the actual SNOM setup was not suitable for displaying the probes. After modifications were conducted in the positioning of the microscope tip, the detection device and the distance regulation, the setup could be used to display metaphase chromosomes and the centromere probe against chromosome 1 in optical and topographic mode. In contrast to conventional fluorescence microscopy, two distinct signals were detected in the centromere region, which has already been described for telomere probes. By application of a probe mix against all human centromeres, locating of these probes, sized several hundred kb to about 5Mb, was facilitated. In comparison to fluorescence micrographs, some centromere signals were split into two or more small signals when applying the SNOM setup. Furthermore, using this technique, less intense signals could be detected. By using the c-myc probe, mid-sized target sequences of 80kb were also displayed. However, small probes with lengths of 1031, 718, 485 and 243bp respectively, produced by polymerase chain reaction (PCR), could not be detected which maybe was caused by a low hybridization efficiency of the FISH-experiments. Thus, using this approach it was not possible to determine the detection limit in regard to the resolution of the SNOM.

It was shown that using the SNOM, in addition to its optical use, manipulation of chromosomal DNA was achievable, although the evidence of extraction could not be supplied yet.

The SNOM constitutes a promising tool for medical and biological research by enabling the display of optical and topological information of chromosomal DNA and

target sequences. Also, manipulation of chromosomal DNA in the nanometer range is feasible. Thereby, SNOM can become a link between molecular cytogenetic and molecular biology. Further technical advancements may lead to simpler operability, improved resolution, and possibilities of novel applications.

2. Einleitung

2.1 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Identifikation und das Kartieren von Genen sind in der Molekularbiologie, der zytogenetischen Forschung und der medizinischen Diagnostik von besonderer Wichtigkeit.

Die hier eingesetzte Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) stellt eine Technik dar, mit der Gene erkannt und kartiert werden können. Das Prinzip der *in situ*-Hybridisierung (ISH) beruht darauf, dass markierte einzelsträngige DNA- oder RNA-Sonden mit komplementärer einzelsträngiger zellulärer DNA oder RNA unter geeigneten Bedingungen Hybride bilden. Die ISH ermöglicht es, Nukleinsäuresequenzen in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen zu lokalisieren. Damit lässt sich die Nukleinsäure direkt im biologischen Präparat *in situ*, also vor Ort, nachweisen. Die ISH wurde 1969 von GALL und PARDUE und unabhängig davon von JOHN et al. entwickelt. Sie verwendeten radioaktiv markierte Sonden, deren Nachteile in dem zeitlichen Aufwand der Signaldetektion und einem starken Hintergrund bestanden. Dadurch war die genaue örtliche Lokalisierung der Zielsequenz eingeschränkt, was durch die mit der Zeit abnehmende Signalstabilität zusätzlich erschwert wurde. Einen entscheidenden Fortschritt brachte die Erfindung der nichtradioaktiven ISH (MANNING et al., 1975). In der Folge entstand eine Vielzahl verschiedener Protokolle und markierter Sonden (LANGER et al., 1981; TRASK, 1991), welche die schnelle, einfache und präzise Lokalisierung der Zielsequenz ermöglichten. PINKEL et al. führten 1986 die FISH ein, bei der die mit einem Reportermolekül markierte Sonde mit einem fluoreszenzmarkierten spezifischen Bindungspartner detektiert wird, welcher mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Die Anwendungsmöglichkeiten der FISH sind vielfältig: Fragestellungen der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung ebenso wie spezielle klinische Probleme in den verschiedensten Bereichen der Medizin können mit der FISH angegangen werden - angefangen von der prä- und postnatalen Chromosomenanalyse über die molekulare Pathologie und Hämatologie bis hin zur Erforschung genetisch bedingter Erkrankungen.

Hierfür stehen mittlerweile verschiedene Sondentypen zur Verfügung. Mit chromosomen- oder chromosomenarm-spezifischen Sonden („Painting Sonden“) können in der prä- und postnatalen Zytogenetik Markerchromosomen identifiziert werden. Außerdem können multiple Chromosomenrearrangements (PAI et al., 1980; STANKIEWICZ et al., 1997), strahlenbedingte Chromosomenschäden sowie Translokationen, die mit der klassischen Bänderungsmethode nicht zu erkennen sind, sogenannte kryptische Translokationen, nachgewiesen werden (LEDBETTER, 1992). Für die Darstellung von Telomertranslokationen hingegen sind die chromosomen- oder chromosomenarm-spezifischen Sonden nicht geeignet. Dies gelingt mit Subtelomer- bzw. Telomersonden, mit denen auch kleinere Deletionen der Schlusssequenz sichtbar gemacht werden können. Chromosomenveränderungen in den Subtelomerregionen werden bei Patienten mit mentaler Retardierung, Dysmorphiezeichen sowie Entwicklungsverzögerungen beobachtet. Zentromersonden ermöglichen die Identifizierung von Markerchromosomen in Metaphasechromosomen. Ferner werden sie beim pränatalen Schnelltest an Interphasezellen zur Markierung der Chromosomen 18, X und Y eingesetzt, wodurch numerische Aberrationen, wie das Klinefelter-Syndrom (47,XXY), das Turner-Syndrom (45,X0) und das Edwards-Syndrom (Trisomie 18) erkannt werden können. „Dual color/dual fusion“-Sonden stellen eine Mischung zweier Einzelsonden (grün und rot) dar, die jeweils einen bestimmten Bruchpunkt überspannen, so dass bei einer stattgefundenen Translokation das Fusionssignal auf beiden translozierten Chromosomen zu finden ist. Sind diese Translokationen spezifisch für eine Erkrankung, kann dadurch die Diagnose gesichert werden. Dies ist bei der chronisch myeloischen Leukämie der Fall, bei der mehr als 90% der Patienten eine Translokation t(9;22) des c-abl-Protoonkogens von Chromosom 9 zu Chromosom 22 in die Region des bcr-Gens aufweisen. Mit einer „Dual color/dual fusion“-Sonde kann auch die reziproke Translokation beim Burkitt-Lymphom t(8;14) nachgewiesen werden. „Dual color/break apart“-Sonden sind Zweifarbensonden, deren Genregionen im Bruchpunktbereich zweifarbig markiert sind. Im Falle einer Translokation werden die beiden Farben getrennt, womit z.B. 11q23 Anomalien der akuten lymphatischen Leukämie sichtbar gemacht werden können. Mit Locus-spezifischen Sonden können Amplifikationen von Onkogenen (z.B. Her2/neu) sowie Deletionen von Tumorsuppressorgenen (z.B. p53) erkannt werden. Auch können Mikrodeletions-Syndrome, wie das DiGeorge Syndrom (SCHMICKEL,

1986; SCAMBLER et al., 1992) nachgewiesen werden. Bei einigen Mikrodeletions-Syndromen konnten mittels FISH zusätzliche aberrante Chromosomenabschnitte neben den bereits durch Routine- oder High-Resolution-Untersuchungen bekannten aufgedeckt werden (BETTIO et al., 1995).

Die Beispiele belegen, dass die FISH eine ergänzende Methode zur klassischen zytogenetischen Diagnostik darstellt und darüber hinaus eine Präzisierung chromosomaler Aberrationen erlaubt. Dennoch scheinen die Grenzen der FISH noch nicht erreicht, da es mittlerweile mit gentechnischen Methoden prinzipiell möglich ist, jede DNA-Sequenz zu klonieren und somit auch kleinste Sonden herzustellen. Jedoch wird die Darstellung kleinster Sonden und damit die Auswertung der FISH-Experimente durch die Auflösung limitiert.

Dies gilt auch für das Erstellen physikalischer Genkarten mittels FISH (GINGRICH et al., 1993). Auf physikalischen Genkarten werden die Lage definierter Sequenzen auf den Chromosomen und deren physikalische Abstände (in bp) vermessen. Somit kann die Position einzelner Gene auf den Chromosomen bestimmt werden (SCHNITTGER et al., 1992; ODA et al., 1997). Diese kann wichtige Aufschlüsse über die Funktion des entsprechenden Gens liefern. Ist der Genort lokalisiert, so können durch den Vergleich eines auffälligen Phänotyps mit einer diese Region betreffenden chromosomalen Aberration Rückschlüsse auf die Funktion des Gens gezogen werden.

Für das physikalische Kartieren werden verschiedene Sonden benutzt, die mit Hilfe von in Vektoren einklonierten genomischen DNA-Fragmenten hergestellt werden. Die größten genomischen DNA-Fragmente von mehreren hundert kb bis zu 2Mb können in künstlichen Hefechromosomen (engl.: yeast artificial chromosomes, YACs) enthalten sein (BURKE et al., 1987; BRAY-WARD et al., 1996). Mittlerweile werden jedoch vielfach künstliche bakterielle Chromosomen (bacterial artificial chromosomes, BACs) verwendet, da sie stabiler als YACs sind (KIM et al., 1996) und zudem mit einer Insertgröße von 100-300kb über eine ausreichende Kapazität für eine Grobkartierung verfügen (SHIZUYA et al., 1992). Auf dem Phagen P1 beruhende Chromosomen (P1 derived artificial chromosomes, PACs), die eine Insertgröße von 130-150kb besitzen (IOANNOU et al., 1994), und auf E. coli basierende Cosmide, die DNA in einer Größenordnung von 30-44kb enthalten (COLLINS, HOHN, 1978), erlauben eine feinere Kartierung. Einzelkopiesequenzen, wie z.B. das von SCHERTHAN et al. (1992) nach einmaliger Amplifikation noch

nachweisbare single-copy Plasmid von 3,65kb ermöglichen eine noch exaktere physikalische Kartierung. Jedoch gestaltet sich die Darstellung dieser Einzelkopiesequenzen schwierig, da sie nur schwache Sondensignale erzeugen und daher hochempfindliche optische Systeme der Fluoreszenzmikroskopie wie auch entsprechend sensitive und hochauflösende Bildaufnahme- und Bildverarbeitungsverfahren erforderlich sind.

Die Auflösung, d.h. der detektierbare Abstand zwischen zwei Zielsequenzen, wird dabei auch vom Kondensationsgrad der Ziel-DNA mitbestimmt. Metaphasechromosomen sind stark kondensiert und erlauben nur eine relativ grobe Kartierung mit einer Auflösung von 1-1,5Mb, d.h. dass zwischen den einzelnen Sonden ein Abstand von 1-1,5Mb bestehen muss, damit sie getrennt voneinander aufgelöst werden können (LAWRENCE et al., 1990; TRASK et al., 1991; HEISKANEN et al., 1996). Somit kann nur eine Vorinformation über die mutmaßlichen Positionen gewonnen werden, die durch eine hochauflösende FISH ergänzt werden muss. Durch Zentrifugation der isolierten Metaphasechromosomen werden diese bis zu 20fach gestreckt und die störende Kondensation der Metaphasechromosomen damit überwunden. Die Technik wurde von HAAF und WARD (1994) entwickelt, ihre Anwendbarkeit für das physikalische Kartieren von LAAN et al. (1995) demonstriert. Die so präparierten Chromosomen eignen sich hervorragend, schnell und zuverlässig Sequenzen aufzufinden, die nur noch 200-300kb voneinander getrennt sein müssen (HEISKANEN et al., 1996). Jedoch unterliegt das Strecken der einzelnen Chromosomen sehr starken Schwankungen und folglich können die Abstände zwischen den Signalen nicht genau reproduziert werden. Im Gegensatz zu Metaphasechromosomen liefern Interphasekerne weniger stark kondensiertes Chromatin und ermöglichen eine Auflösung von ungefähr 50kb bis 1Mb (TRASK, 1991; van den ENGH et al., 1992). Dieser breite Auflösungsbereich stellt neben dem geringen Präparationsaufwand einen der Hauptvorteile des Kartierens während der Interphase dar; außerdem kann im Vergleich zu den mechanisch gestreckten Metaphasechromosomen eine Abstandsbestimmung erfolgen (TRASK et al., 1989). Allerdings geht die Telomer-Zentromer Orientierung bei den Interphasekernen verloren, so dass nur die relative Lage einer Reihe von Sonden auf kürzerer Distanz ermittelt werden kann. Die größte Auflösung kann mit der „High-Resolution-FISH“, auch „Fibre-FISH“ genannt, erzielt werden. Bei dieser Methode werden ausgestreckte DNA-Stränge präpariert, was auf unterschiedliche

Arten möglich ist. Eine Art, die so genannte „Molecular-Combing-Methode“, erfordert einen silanisierten Objektträger (BENSIMON et al., 1994), eine andere benützt in Agarose eingebettete DNA-Stränge, die geschmolzen und mechanisch gestreckt werden (HEISKANEN et al., 1994). Die so entstandenen DNA-Fibers erlauben eine Auflösung von ca. 1-500kb (HEISKANEN et al., 1996) und eine exakte Abstandsbestimmung. Jedoch geht auch hier die Telomer-Zentromer Orientierung verloren.

Somit kann die Auflösung im Vergleich zur klassischen Chromosomenpräparation an Metaphasechromosomen durch die Anwendung anderer Präparationstechniken verbessert werden. Als nachteilig erweist sich dabei aber, dass dies teilweise mit einem deutlich erhöhten Präparationsaufwand, einer unpräzisen Abstandsbestimmung sowie dem Verlust der Telomer-Zentromer Orientierung verbunden ist, was die physikalische Feinkartierung erschwert.

Folglich wäre eine Auflösungsverbesserung wünschenswert, die nicht mit diesen Nachteilen behaftet ist und zusätzlich eine Auflösung unter 1kb ermöglicht. Dadurch könnten auch kleinste Deletionen und DNA-Amplifikationen, die bislang fluoreszenzmikroskopisch nicht darstellbar sind, nachgewiesen werden.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderer Ansatz gewählt, um eine Verbesserung der Auflösungsgrenze zu erreichen. Es wurde eine andere Mikroskopiertechnik, die optische Rasternahfeldmikroskopie (engl.: scanning near-field optical microscopy, SNOM) benutzt, die bislang vorwiegend in der Physik eingesetzt wurde.

2.2 Optische Rasternahfeldmikroskopie (SNOM)

Die SNOM gehört zur Gruppe der *Rastersondenmikroskopie* (engl.: *scanning probe microscopy, SPM*), zu der auch die *Rastertunnelmikroskopie* (engl.: *scanning tunneling microscopy, STM*) und die *Rasterkraftmikroskopie* (engl.: *atomic force microscopy, AFM*) gezählt werden. Gemeinsam ist diesen Mikroskopiertechniken, dass eine scharfe Spitze verwendet wird, die gegenüber der Probenoberfläche verschoben wird, was mit Piezoelementen gesteuert wird.

Die SNOM entwickelte sich direkt nach dem Beginn der Rastertunnelmikroskopie noch vor der Rasterkraftmikroskopie (POHL et al., 1984). Während die Rasterkraftmikroskopie sich relativ schnell als ein sehr gutes Instrument zur Untersuchung biologischen Materials im Nanometerbereich erwiesen hat, wurde die SNOM lange Zeit als akademische Methode angesehen. Nach dem Nachweis ihrer Effizienz (BETZIG et al., 1991) und ihrer biologischen Anwendbarkeit (van HULST, MOERS, 1996) hat die SNOM jedoch zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen.

Benutzt man herkömmliche optische Mikroskope, so erreicht man eine Auflösung, die von der Wellenlänge (λ) des benutzten Lichts abhängig ist. Die Auflösungsgrenze liegt bei ca. der halben Wellenlänge ($\lambda/2$), auch als Abbé'sches-Diffraktionslimit bezeichnet. Grundlage hierfür ist die Heisenberg'sche Unschärferelation. Theoretisch wäre zwar eine örtliche Auflösung von 200-250nm möglich, doch wird in der Praxis die Grenze von 0,5 μ m nur mit konfokalen Mikroskopen mit Ölimmersionsobjektiven unterschritten.

Bei der SNOM hingegen ist die physikalische Gesetzmäßigkeit der Diffraktionsgrenze aufgehoben. Ursache hierfür ist das Arbeiten im Nahfeld. Ist der Abstand des Beobachters zur Lichtquelle geringer als die Wellenlänge des eingesetzten Lichts, so befindet sich der Beobachter im Nahfeld. Im Nahfeld ist die Auflösung nur noch von der Größe der Lichtquelle und ihrem Abstand zur Oberfläche des zu untersuchenden Materials abhängig (HEINZELMANN, POHL, 1994; POHL et al., 1996). Um eine möglichst kleine Lichtquelle zu erhalten, wird das benutzte Licht durch eine sehr kleine Öffnung geleitet. Diese ist für gewöhnlich kleiner als 100nm und liegt damit weit unterhalb der Wellenlänge des benutzten Lichts. In Bezug auf die Wellentheorie ist dies nur möglich, wenn sich jenseits der Öffnung neue Wellen bilden, deren Wellenlänge im Größenbereich des Öffnungsdurchmessers liegt. Man spricht von so genannten evaneszenten Wellen. Der Abstand der Lichtquelle zur Oberfläche des zu untersuchenden Materials kann bis auf wenige Nanometer verringert werden.

Dadurch wird eine Subwellenlängenauflösung erreicht, die die Möglichkeit bietet, Untersuchungen im Nanometerbereich anzustellen.

Im Gegensatz zur AFM liefert die SNOM nicht nur Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit (topographischer Modus) der Probe, sondern kann auch simultan optische Signale visualisieren (optischer Modus). Diese sind insbesondere für das Verständnis biologischer Prozesse sehr wichtig. Durch den Vergleich der optischen und topographischen Aufnahmen kann z.B. die Lokalisation einer Sonde exakt bestimmt werden. Bisher bestand keine Möglichkeit, verschieden gefärbte DNA-Sonden auf denselben Chromosomen mit einer Auflösung im Nanometerbereich zu unterscheiden, da sowohl bei der Elektronenmikroskopie als auch bei der Kraftmikroskopie die optische Unterscheidung nicht möglich ist.

Ein weiterer Vorteil der SNOM ist, dass ein präparativer Aufwand, wie z.B. die spezielle Vorbehandlung der Objektträger mit einer Goldbedampfung oder die Fixierung des zu untersuchenden Materials, nicht nötig ist. Dadurch kann im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie Material zerstörungsfrei erforscht werden.

In der Vergangenheit wurde die SNOM überwiegend zur Untersuchung spezieller physikalischer Fragestellungen eingesetzt. Ferner wurde aber auch die prinzipielle Eignung der SNOM für biologische Anwendungen gezeigt. Einige Beispiele dafür sind im Folgenden aufgelistet:

- Untersuchung intrazellulärer Strukturen (BETZIG et al., 1993; MURAMATSU et al., 1996)
- Darstellung der Struktur von Myofibrillen (SEIBEL, POLLACK, 1997)
- Darstellung ungefärbter Bakterien (BEN-AMI et al., 1998)
- Nachweis von Partikeln des Tabakmosaikvirus (KELLER et al., 1998)
- Untersuchung von mit Plasmodium falciparum infizierten Erythrozyten (ENDERLE et al., 1997)
- Untersuchung von Lipiden (HORIUCHI et al., 1999)
- Charakterisierung von Zelloberflächen (KIRSCH et al., 1998; SUBRAMANIAM et al., 1998; JENEI et al., 1999; NAGY et al., 1999)
- Untersuchung von Drosophila-Chromosomen (KIRSCH et al., 1998; JENEI et al., 1999)

2.3 Ziele

In der vorliegenden Arbeit sollte die Anwendung des SNOM im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie bei der Auswertung von FISH-Experimenten untersucht werden.

Im Detail sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Ist das kommerziell erworbene SNOM im vorliegenden Setup prinzipiell zum Abbilden chromosomaler DNA geeignet oder müssen Modifizierungen des Setups vorgenommen werden?
2. Können in der FISH eingesetzte DNA-Sonden, die mit großen Zielsequenzen hybridisieren, im topographischen und optischen Modus dargestellt werden?
Wie ist die Korrelation des topographischen und des optischen Modus?
3. Ist reproduzierbares Arbeiten möglich?
4. Können DNA-Sonden, die mit mittelgroßen Zielsequenzen hybridisieren, topographisch und optisch dargestellt werden?
Korrelieren der topographische und der optische Modus?
5. Können mit dem SNOM auch DNA-Sonden topographisch und optisch nachgewiesen werden, die mit Zielsequenzen hybridisieren, die kleiner als die bislang mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie nachweisbaren sind?
Korrelieren der topographische und der optische Modus? Bis zu welcher kleinsten Größe können diese Zielsequenzen in FISH-Experimenten dargestellt werden?
6. Korrelieren die SNOM-Abbildungen mit denen aus der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie?
7. Ist das SNOM auch zur Manipulation/Extraktion chromosomaler DNA geeignet?

Zur Klärung dieser Fragen wurden FISH-Experimente mit einer Zentromersonde gegen Chromosom 1, einem Sondenmix gegen alle Zentromere, einer c-myc-Sonde sowie mittels Polymerase-Ketten-Reaktion hergestellten Sonden der Länge 1031, 718, 485, 243bp durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1 Chromosomenpräparation

Vor der Durchführung der FISH musste zuerst das Ausgangsmaterial, die Chromosomen, gegen die hybridisiert werden sollte, gewonnen werden. Hierzu dienten im Rahmen der Versuche zwei unterschiedliche Zelltypen. Zum einen wurden Metaphasechromosomen aus menschlichen Blutlymphozyten präpariert, zum anderen aus der Zelllinie Colo 320 DM. Diese stammt von einem Colon-Karzinom ab und enthält Double minutes (DM), wobei es sich um extrachromosomale DNA handelt.

Wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche und gute Chromosomenpräparation war eine ausreichende Menge mitotischer Zellen. Daher wurde den Zellen ein Nährmedium (RPMI) zugefügt, welches Faktoren enthält, die die Zellen zur Proliferation anregen. Durch die zusätzliche Gabe von Colcemid, das ein abgeschwächtes Derivat des Spindelgiftes Colchizin darstellt, werden die Zellen in der Metaphase angehalten. Folglich sammeln sich während der Einwirkdauer des Colcemids nach und nach immer mehr Zellen in der Metaphase an.

Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten der Zellgewinnung: Entweder wird das gesamte Zellmaterial zur Mitosengewinnung herangezogen, was bei der Chromosomenpräparation aus menschlichen Blutlymphozyten so gehandhabt wurde, oder nur ein Teil der mitotischen Zellen zur Mitosengewinnung benutzt und der andere Teil zur Weiterkultivierung verwendet. Dies war bei der Chromosomenpräparation aus der Zelllinie Colo 320 DM der Fall.

3.1.1 Chromosomenpräparation aus menschlichen Lymphozyten

Bei der Präparation von Metaphasechromosomen aus menschlichen Lymphozyten wurde dem Probanden Blut aus der Arteria brachialis entnommen. 0,8ml des Blutes, 8ml RPMI Nährmedium (+ 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) und 0,4ml Phytohämagglutinin wurden in eine Kulturflasche gegeben und diese in den mit 5% CO₂ begasten 37°C warmen Brutschrank (Fa. Heraeus) gestellt. Durch die Zugabe des Mitogens Phytohämagglutinin wird die Teilung der T-Zell-Fraktion der Lymphozyten durch Permeabilitätsveränderungen der Zellmembran stimuliert, während die B-Zell-Fraktion und andere kernhaltige Zellen unbeeinflusst bleiben.

3.1.1.1 Colcemidbehandlung

72h später wurde Colcemid (Endkonzentration 0,1 µg/ml) unter der Sterilbank in das Röhrchen gegeben und hierdurch ein Mitosearrest erreicht. Die Dauer der Colcemidbehandlung musste optimiert werden, um eine gute Beurteilung der Metaphasen mit dem Fluoreszenzmikroskop zu gewährleisten. Ziel war es, eine große Anzahl von Metaphasen, die einen optisch gut auswertbaren Kondensationsgrad aufwiesen, zu erhalten. War die Anzahl an Metaphasechromosomen zu gering, musste die Colcemidbehandlung verlängert werden; waren die Chromosomen zu stark kondensiert, musste sie verkürzt werden. Es zeigte sich, dass eine Colcemidbehandlung von 30min eine hohe Dichte an Metaphasen mit Chromosomen eines mittleren Kondensationsgrades lieferte. Nach der Colcemidbehandlung erfolgte für 30min die Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Um die Mitosen zu gewinnen, wurde der Ansatz anschließend in Zentrifugenröhrchen umgefüllt und für 10min bei 1000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Als nächster Schritt fand die Hypotoniebehandlung statt.

3.1.1.2 Hypotonie

Die Hypotoniebehandlung führt zu einer Schwellung der Zellen, das Chromatin quillt, die Chromosomen trennen sich voneinander und werden besser entwirrt. Dadurch gelingt eine bessere Spreitung der Chromosomen bei der anschließenden Präparation. Außerdem kommt es zur Lyse der kernlosen Erythrozyten. Ein vorzeitiges Zerplatzen der Lymphozyten, was aus einer zu langen Hypotoniezeit resultiert, sollte vermieden werden. Als hypotone Lösung diente 0,0375M KCL. Davon wurden 5ml mit einer Pipette vorsichtig zu dem Zellpellet pipettiert und danach langsam suspendiert, wobei es möglichst nicht zur Bildung von Blasen kommen sollte. Das Röhrchen wurde anschließend in den 37°C warmen Brutschrank gestellt. Zur Optimierung der Methode wurden verschieden lange Hypotoniezeiten erprobt. Bei einer Hypotoniezeit von 6min lagen die Mitosen noch in ihren Hüllen; eine Hypotoniebehandlung über 9min führte zum vorzeitigen Zerplatzen der Zellen. Weitgehend hüllenlos waren die Mitosen bei einer Hypotoniezeit von 7min, so dass diese Zeit für die nachfolgenden Präparationen übernommen wurde. Es folgte ein zweiter Zentrifugierschritt über 10min bei 1000U/min und das Absaugen des Überstandes.

3.1.1.3 Fixierung

Die anschließende Fixierung soll die Gewebestruktur konservieren und den Verlust von Nukleinsäuren verhindern. Hierfür wurde ein -20°C kaltes Gemisch aus Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1 als Fixans verwendet. Methanol denaturiert und präzipitiert Proteine durch Dehydratation in saurer Umgebung, während Essigsäure Nukleoproteine koaguliert und in Verbindung mit Wasser aus der Luft eine Zellschwellung bzw. „Chromosomendehnung“ bewirkt. Es musste darauf geachtet werden, dass das Fixans nicht zu schnell zu den durch die Hypotoniebehandlung geschwollenen und damit sehr sensiblen Zellen hinzugegeben wurde, da diese vorzeitig zerplatzen könnten. Insgesamt wurden 6ml Fixans hinzupipettiert, zuerst tropfenweise, dann in größeren Volumina.

Nach jeder Zugabe wurde direkt suspendiert. Eine Blasenbildung war auch hier wieder zu vermeiden. Für mindestens 1h lagerten die Röhrchen bei -20°C . Im Anschluss wurde erneut 10min lang bei 1000U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die oben beschriebenen Schritte wurden insgesamt 3-mal durchgeführt. Beendet wurde die Fixierung durch Zugabe von 2 Volumen an Fixans zu dem Sedimentvolumen. So resultierte eine gute Dichte der Mitosen beim späteren Auftropfen.

3.1.1.4 Auftropfen der Mitosen

Das Pellet wurde in dem zugegebenen Fixans suspendiert und auf Glasobjektträger aufgetropft, wodurch es zum Platzen der Kernmembran und zur Spreitung der Chromosomen der mitotischen Zellen kommt. Wurden die Mitosen nicht direkt im Anschluss an die Präparation aufgetropft, so konnten sie im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden. Diese Zellen mussten dann vor dem Auftropfen zuerst 10min bei 1000U/min zentrifugiert und das Pellet anschließend erneut im Fixans suspendiert werden.

Für die Technik des Auftropfens wurden verschiedene Bedingungen ausgetestet; die Objektträgervorbehandlung, die Auftropfhöhe und das Pipettenmaterial wurden variiert.

Die Mitosen wurden nach dem Auftropfen an der Luft angetrocknet und zum vollständigen Trocknen auf eine 80°C heiße Heizplatte gelegt. Mit einem Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss) wurde die Qualität der Präparation überprüft.

Die Qualität der Präparate wurde mit Hilfe folgender Kriterien beurteilt:

- Anzahl der Mitosen
- Spreitung der Mitosen
- Vorhandensein von Hüllen
- Kondensationsgrad und Fixierungszustand der Chromosomen
- Verunreinigung des Präparates durch Zellbestandteile

Ziel war eine möglichst hohe Anzahl gut gespreiteter und fixierter Mitosen auf einem möglichst sauberen Objektträger.

3.1.2 Chromosomenpräparation aus der Zelllinie Colo 320 DM

Neben den Metaphasechromosomen, die aus menschlichen Blutlymphozyten präpariert wurden, wurden auch Metaphasechromosomen aus einer Zelllinie Colo 320 DM präpariert. Auf diesen sollten mit der nachfolgenden FISH Amplifikationen des c-myc Onkogens im Bereich von 8q24 nachgewiesen werden. Ferner sollten sich die Amplifikationen auch auf den außerhalb der Chromosomen gelegenen Double minutes befinden.

3.1.2.1 Arbeitsbedingungen für die Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten fanden an einer sterilen Werkbank (Fa. Heraeus) statt. Die Instrumente wurden ebenso wie die bereits steril angelieferten Zellkulturflaschen und Zentrifugenröhrchen vor Gebrauch nochmals kurz abgeflammt. Die selbst angesetzten Lösungen wurden autoklaviert.

3.1.2.2 Zellkultivierung

Als Ausgangsmaterial diente die Zelllinie Colo 320 DM (Passage 10), die in flüssigem Stickstoff gelagert worden war. Angesetzt wurde die Zellkultur durch Zugabe des Mediums RPMI 1640 (+ 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% NEA). Das Medium wurde langsam zu den eingefrorenen Zellen hinzupipettiert, bis diese aufgetaut waren. Danach wurden die Zellen bei 1200U/min 3min lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 7ml Medium wieder aufgenommen. Je 3,5ml wurden anschließend in zwei kleine Kulturflaschen (25cm² Greiner T25) gegeben und kultiviert. Die Zellkultivierung erfolgte unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C).

Anfangs wurden die Zellen täglich, später im Abstand von zwei Tagen mikroskopisch begutachtet. Der erste Mediumwechsel fand nach zwei Tagen statt, nachdem ein Anwachsen der Zellen beobachtet worden war. Danach wurde das Medium während der ersten Woche je nach Dichte der Zellcluster alle ein bis zwei Tage gewechselt. Nach zwei Wochen waren genügend Zellen vorhanden, um eine Chromosomenpräparation durchzuführen.

3.1.2.3 Unterkultivierung

Nach 28 Tagen war der Zellrasen nahezu konfluent, so dass die erste Unterkultivierung notwendig wurde. Hierzu wurde das Medium abpipettiert, die Kulturflasche zweimalig mit 5ml sterilem PBS gespült, welches verworfen wurde. Danach wurden 3ml 37°C warmes Trypsin (0,25%) in die Kulturflasche dazugegeben, um die adhärennten Zellen vom Boden abzulösen. Anschließend wurde für 5min bei 37°C inkubiert.

Unter dem Umkehrmikroskop (Axioskop 25, Zeiss) wurde der Zeitpunkt des Ablösens abgepasst. Das Ablösen wurde durch seitliches Beklopfen der in senkrechter Position gehaltenen Kulturflasche erreicht. Zur Neutralisierung des Trypsins wurden 5ml Medium hinzupipettiert und der gesamte Kulturflascheninhalt in ein Zentrifugenröhrchen umpipettiert. Anschließend wurde über 3min bei 1200U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 8ml Medium aufgenommen, gut durchmischt und auf neue Kulturflaschen verteilt.

3.1.2.4 Metaphasen-Präparation

Ein Tropfen Colcemid wurde in eine kleine Kulturflasche gegeben, die anschließend im Brutschrank inkubiert wurde. Auch hier musste die Dauer der Colcemidbehandlung optimiert werden. Das beste Ergebnis wurde mit einer Colcemidbehandlung von 3h15min erzielt. Nach der Colcemidbehandlung wurde das Medium abpipettiert. Um das Ablösen der Zellen zu erreichen, wurden danach 3ml Trypsin in die Kulturflasche pipettiert. Unter dem Umkehrmikroskop wurde der Zeitpunkt des Ablöses abgepasst. Das Trypsin und die Mitosen wurden daraufhin abpipettiert und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Kulturflasche wurde mit 2ml Medium gespült, welches in das Zentrifugenröhrchen mit den abtrypsinieren Zellen gegeben wurde. Die Kulturflasche wurde mit 4ml frischem Medium versehen und zurück in den Brutschrank gestellt.

Die folgenden Schritte entsprachen vom Ablauf her denen der bereits bei der Chromosomenpräparation aus den menschlichen Blutlymphozyten beschriebenen (s. 3.1.1.1-3.1.1.4, S.17, 18), wobei hier eine Hypotoniezeit von 12min das beste Ergebnis lieferte. Die Zentrifugation erfolgte mit 1200U/min über 7min, fixiert wurde zweimal. Die zweite Fixierung dauerte über Nacht. Auch hier wurden die Zellen direkt im Anschluss aufgetropft.

3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR)

3.2.1 Prinzip der PCR

Sie reicht auf Experimente zurück, die von KLEPPE erstmalig 1969 auf der „Gordon Conference on Nucleic Acids“ öffentlich vorgestellt wurden. Die moderne PCR-Technologie wurde 1983 von MULLIS entwickelt. Sie ermöglicht es, definierte DNA-Bereiche zu amplifizieren.

Zu Beginn der PCR wird bei 94°C eine 5-minütige Denaturierung durchgeführt, die gewährleisten soll, dass die gesamte DNA vollständig denaturiert wird.

Danach folgen drei Hauptschritte, die n-mal (n=Anzahl der Zyklen) durchlaufen werden:

- die Denaturierung
- das Annealing
- die Synthese

Im ersten Schritt wird die Matrizen-DNA bei 94°C denaturiert, das heißt die doppelsträngige DNA wird in Einzelstränge getrennt. Im zweiten Schritt lagert sich pro Einzelstrang jeweils ein Oligonukleotid, der Primer, an. Das Anlagern, Annealing, geschieht bei der für den Primer spezifischen Temperatur. Diese hängt von der Länge des Primers und seiner Basenzusammensetzung ab. Entsprechend liegt die Temperatur zwischen 45-65°C und muss optimiert werden. Die beiden Primer müssen komplementär zu ihrer Bindungsstelle sein. Ein Primer lagert sich an das 3'-OH-Ende des einen, der andere an das 5'-OH-Ende des anderen Einzelstranges an. Im dritten Schritt erfolgt die Synthese der Komplementärstränge. Dazu sind eine thermostabile Polymerase und ein Nukleotidmix aus den 4 Nukleotiden dATP, dTTP, dCTP und dGTP nötig. Damit es zur Veresterung der Nukleotide durch die Polymerase und damit zur Primerextension kommt, muss auch wiederum ein enzyspezifisches Temperaturoptimum bestehen. Für die im vorliegenden Protokoll verwendete Taq-Polymerase liegt es bei 72°C.

Nach Abschluss der gewünschten Synthese werden die neu entstandenen Stränge wieder denaturiert und die Temperatur anschließend auf die Annealingtemperatur gesenkt. Die Primer können wieder binden und es erfolgt eine erneute Synthese. Bei n -Zyklen entstehen so 2^n Kopien der Matrizen-DNA.

Am Ende der Kettenreaktion dient ein 5-minütiger Syntheseschritt dazu, alle begonnenen Polymerisationen fertigzustellen.

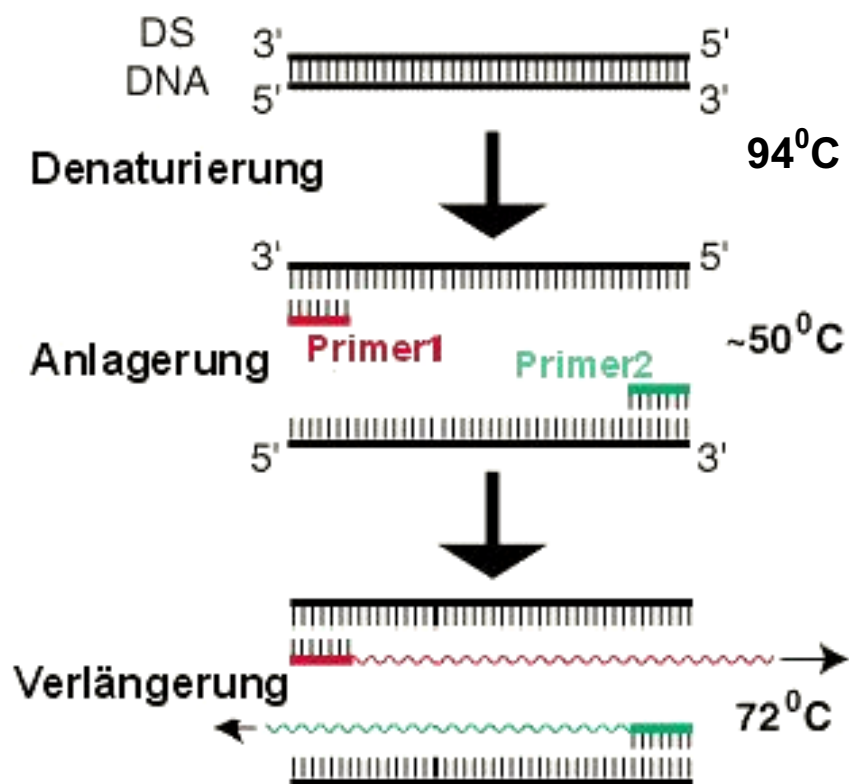


Abb. 1: Prinzip der PCR

3.2.1.1 Reaktionsansatz

Zuerst wurde für jedes Primerpaar die Annealingtemperatur gesucht, welche umso höher liegt, je höher der GC-Basengehalt der Primer ist. Es wurde ein Thermocycler (Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2400) verwendet, der einen Temperaturgradienten besaß. 9 verschiedene Temperaturen konnten gleichzeitig eingestellt werden:

- 51,7°C
- 53,2°C
- 54,5°C
- 56,0°C
- 57,5°C
- 59,1°C
- 60,4°C
- 61,5°C
- 62,4°C

Es wurden 4 verschiedene Primerpaare (alle MWG-Biotech GmbH) eingesetzt, die sich innerhalb des c-myc Onkogens anlagern und PCR-Produkte mit einer Länge von 1031, 718, 485 und 243bp liefern sollten.

Primerpaar 1031: MYC 1031-A: 5'-CTC TGG AAC AGG CAG ACA CA-3'

MYC 1031-B: 5'-TGC CTC TCG CTG GAA TTA CT-3'

Primerpaar 718: MYC 718-A: 5'-TGG AAA ACC AGG TAA GCA CC-3'

MYC 718-B: 5'-GAT TCC AGG AGA ATC GGA CA-3'

Primerpaar 475: MYC 475-A: 5'-GTC TTA GGT AAG AAT TGG CA-3'

MYC 475-B: 5'-CGT TAG AAA GGT CTC TGG AC-3'

Primerpaar 243: MYC 243-A: 5'-GGC ATT TAA ATT TCG GCT CA-3'

MYC 243-B: 5'-GAT TCC AGG AGA ATC GGA CA-3'

Für jedes Primerpaar wurde der folgende Reaktionsansatz 9-mal hergestellt. Um eine Verunreinigung des Reaktionsansatzes mit Fremd-DNA zu vermeiden, wurde unter der Sterilbank pipettiert. Die Reagenzien wurden auf Eis gelagert. Zuerst wurden die DNA, der Puffer (10xPCR-Puffer, Pharmacia Biotech), das H₂O und die Nukleotide (Pharmacia Biotech) in ein PCR-Gefäß (Biozym)

zusammenpipettiert und durchmischt. Danach wurden die Primerpaare und zum Schluss die Taq-Polymerase (Pharmacia Biotech) hinzugefügt.

Tabelle 1: Pipettierschema für Mastermix 1

DNA	1 μ l
Puffer	5 μ l
H ₂ O	36,5 μ l
Nukleotide	5 μ l
Primer A	1 μ l (20 μ M)
Primer B	1 μ l (20 μ M)
Taq-Polymerase	0,5 μ l
Σ	50 μ l

Der gesamte Ansatz wurde kurz mit dem Vortexgerät durchmischt. Anschließend wurden die PCR-Gefäße in den Thermocycler gestellt und die PCR gestartet.

3.2.1.2 PCR-Programm

Beginn: Denaturierung 94°C 5min

30 Zyklen {

1. Schritt:	Denaturierung	94°C	30-60s
2. Schritt:	Annealing	45-65°C	30-60s
3. Schritt:	Synthese	72°C	30-120s

Ende: Synthese 72°C 5min

So konnten für jedes der 4 Primerpaare 9 verschiedene Annealingtemperaturen simultan getestet werden. Welche Annealingtemperatur das beste Ergebnis lieferte, konnte mit der Gelelektrophorese überprüft werden.

3.2.2 Verifizierung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

3.2.2.1 Herstellung des Agarosegels

Hierzu wurden 1,5g Agarose in 100ml 1xTAE-Puffer mit Hilfe eines Mikrowellenofens gelöst, so dass ein 1,5%-iges Agarosegel entstand. Die Entstehung von Schlieren wurde durch Schütteln vermieden. Das Gel wurde in die zuvor gründlich gereinigte Elektrophoresekammer (Easy Cast Elektrophoresis System, Owl Scientific) möglichst ohne Luftblasenbildung gegossen, eine Spacerleiste für die Slots eingelegt und die Polymerisation des Gels abgewartet.

3.2.2.2 Auftragen der Proben

Je 25 μ l PCR-Produkt aus den 50 μ l Ansätzen für die 4 verschiedenen Primerpaare wurden mit je 3 μ l Ladepuffer versetzt und durchmischt. Anschließend wurden diese 28 μ l-Ansätze in die Slots pipettiert. Die anderen 25 μ l des 50 μ l Ansatzes wurden im Kühlschrank bei -4°C gelagert. Zur Bestimmung der Länge der PCR-Produkte diente ein Molekulargewichtsmarker (Molekulargewichtsmarker VII, Boehringer Mannheim). Hiervon wurden 2 μ l mit ebenfalls 3 μ l Ladepuffer zusammenpipettiert. Ein Volumen von 28 μ l wurde durch Hinzupipettieren von 23 μ l H₂O erreicht. Danach wurde die Elektrophorese bei 110V gestartet. Mittels des im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffs Bromphenolblau konnte die Wanderung der DNA durch das Gel beobachtet werden. Die Laufzeit betrug 30min.

3.2.2.3 Darstellung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Ethidiumbromid (EtBr, c=0,005%) in einer Wanne gefärbt. Später wurde zwecks einer einfacheren Handhabung EtBr in gleicher Konzentration direkt bei der Herstellung des Agarosegels dazugegeben. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert.

Die Länge der PCR-Produkte konnte durch Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker bestimmt werden. Die beste Annealingtemperatur war diejenige, die eine möglichst „reine“ Bande lieferte. Eine hohe Reinheit entspricht einer hohen Spezifität der PCR-Produkte. Es zeigte sich, dass bei Annealingtemperaturen von 54,5°C (Abb. 2: Bahnen 4, 14 oben und unten) und 56,0°C (Abb. 2: Bahnen 5, 15 oben und unten) für alle Primerpaare ähnlich gute PCR-Produkte entstanden. Daher wurde bei den folgenden PCR aus Praktikabilitätsgründen eine Annealingtemperatur von 55,0°C gewählt.

Auf Abb. 2 ist das Agarosegel, das zur Bestimmung der Annealingtemperatur herangezogen wurde, zu sehen. Insgesamt sind 40 Bahnen zu erkennen. Die Bahnen 1 links oben und links unten sowie die Bahnen 11 oben und unten zeigen den Molekulargewichtsmarker. Die Bahnen 2-10 oben entsprechen den PCR-Produkten des Primerpaares 243, die Bahnen 12-20 oben den PCR-Produkten des Primerpaares 485, die Bahnen 2-10 unten den PCR-Produkten des Primerpaares 718, die Bahnen 12-20 unten den PCR-Produkten des Primerpaares 1031 bei den 9 getesteten Annealingtemperaturen. Diese nehmen für alle Primerpaare von links nach rechts zu.

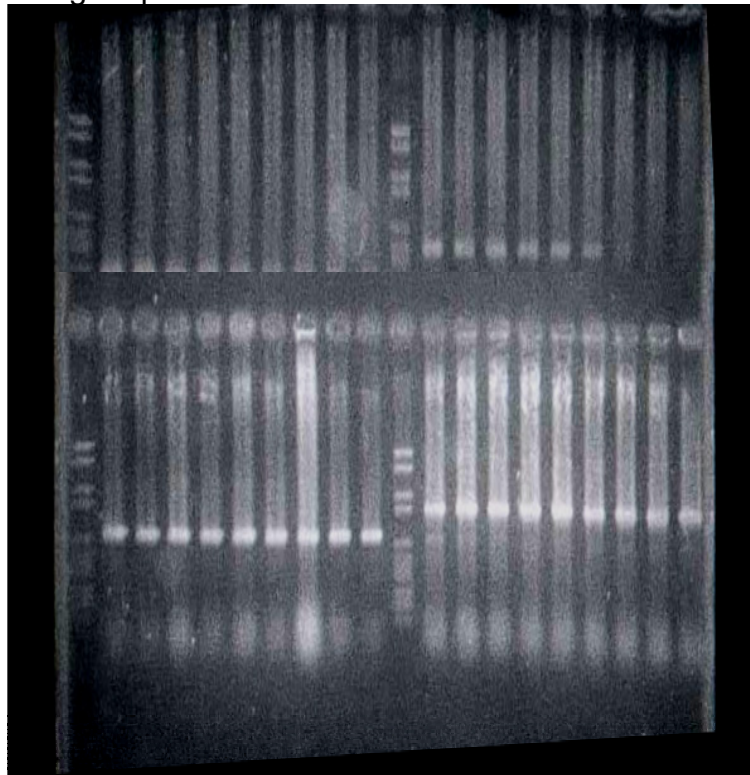


Abb. 2 zeigt das Agarosegel, mit dem die Annealingtemperatur bestimmt wurde. Die Bahnen 1 links oben und links unten sowie die Bahnen 11 oben und unten entsprechen dem Molekulargewichtsmarker. Oben sind auf den Bahnen 2-10 die PCR-Produkte des Primerpaares 243, auf den Bahnen 12-20 die PCR-Produkte des Primerpaares 485 zu sehen. Unten kommen auf den Bahnen 2-10 die PCR-Produkte des Primerpaares 718, auf den Bahnen 12-20 die des Primerpaares 1031 zur Darstellung. Die 9 getesteten Annealingtemperaturen nehmen für alle Primer von links nach rechts zu. Die Auswertung ergab, dass eine Annealingtemperatur von 54,5°C (Bahnen 4 und 14 oben und unten) bzw. von 56,0°C (Bahnen 5 und 15 oben und unten) ähnlich gute PCR-Produkte für die 4 verschiedenen Primerpaare lieferte.

Neben der Annealingtemperatur sind für die Herstellung spezifischer PCR-Produkte die eingesetzte Menge an DNA und Primer entscheidend, weshalb diese optimiert werden mussten. Dazu wurden die ursprünglichen Primer- und DNA-Mengen zunächst auf 1:10 verdünnt, wodurch ein leichteres Pipettieren ermöglicht wurde.

Somit entsprach in den folgenden Mastermixen die in 10µl enthaltene DNA- bzw. Primermenge der ursprünglichen in 1µl enthaltenen Menge.

Für jedes Primerpaar wurden 4 Mastermixe angesetzt:

Mastermix 1:

entsprach dem in Tab. 1 angegebenen Ansatz

Mastermix 2:

Es wurde nur 1/10 der ursprünglichen DNA-Menge eingesetzt, d.h. 1µl (siehe Tab. 2). Die Mengen an Primer, Nukleotiden, Taq-Polymerase und Puffer blieben konstant. Das Ausgangsvolumen von 50µl wurde durch Anpassen der Wassermenge auf 18,5µl eingestellt.

Tabelle 2: Pipettierschema für Mastermix 2

DNA	1µl
Puffer	5µl
H ₂ O	18,5µl
Nukleotide	5µl
Primer A	10µl
Primer B	10µl
Taq-Polymerase	0,5µl
Σ	50µl

Mastermix 3 :

7/10 der ursprünglichen Primermenge wurde eingesetzt, d.h. 7 μ l (siehe Tab. 3). Bis auf die Wassermenge blieben die Mengen der anderen Bestandteile des Ansatzes unverändert.

Tabelle 3: Pipettierschema für Mastermix 3

DNA	10 μ l
Puffer	5 μ l
H ₂ O	15,5 μ l
Nukleotide	5 μ l
Primer A	7 μ l
Primer B	7 μ l
Taq-Polymerase	0,5 μ l
Σ	50 μ l

Mastermix 4 :

Sowohl die eingesetzte DNA- als auch die Primermenge wurden verändert, nämlich auf 1/10 der ursprünglichen DNA- und auf 7/10 der ursprünglichen Primermenge (siehe Tab. 4). Dadurch musste die Wassermenge auf 24,5 μ l angepasst werden. Die anderen Bestandteile blieben gleich.

Tabelle 4: Pipettierschema für Mastermix 4

DNA	1 μ l
Puffer	5 μ l
H ₂ O	24,5 μ l
Nukleotide	5 μ l
Primer A	7 μ l
Primer B	7 μ l
Taq-Polymerase	0,5 μ l
Σ	50 μ l

Danach wurde mit jedem Mastermix eine PCR mit einer Annealingtemperatur von 55,0°C durchgeführt.

Die optimale Menge an DNA und Primer wurden auch hier wieder durch Überprüfung mit der Gelelektrophorese bestimmt. Mastermix 2 lieferte für alle Primerpaare das beste PCR-Ergebnis, was auf Abb. 3 zu sehen ist.

Das Agarosegel zeigt die PCR-Produkte der 4 Mastermixe für die 4 Primer. Links oben und unten kommt der Molekulargewichtsmarker zur Darstellung. Oben folgen auf den Bahnen 2-5 die PCR-Produkte der 4 Mastermixe für das Primerpaar 243, beginnend mit dem PCR-Produkt des Mastermix 1. Die Bahnen 7-10 oben entsprechen den PCR-Produkten der 4 Mastermixe des Primerpaares 718, ebenfalls beginnend mit Mastermix 1. Unten sind auf den Bahnen 2-5 die 4 Mastermixe für das Primerpaar 485, danach die PCR-Produkte der 4 Mastermixe für das Primerpaar 1031 abgebildet, immer beginnend mit Mastermix 1. Das beste Ergebnis für alle 4 Primerpaare liefert Mastermix 2. Da die Mastermixe des Primerpaares 485 schwierig zu beurteilen waren, wurde der Versuch für das Primerpaar 485 wiederholt. Das Ergebnis ist auf Abb. 4 zu sehen. Auch hier wurde mit Mastermix 2 das beste Ergebnis erzielt.

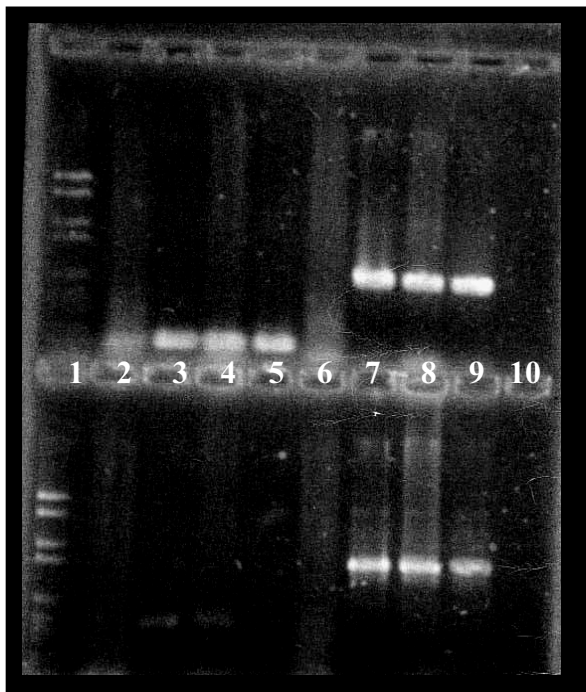


Abb. 3 zeigt das Agarosegel mit den PCR-Produkten der 4 Mastermixe für die 4 Primerpaare. Auf der ersten Bahn links oben und auf der ersten Bahn links unten kommt der Molekulargewichtsmarker zur Darstellung. Oben folgen die PCR-Produkte der 4 Mastermixe des Primerpaares 243, eine freie Bahn und anschließend die PCR-Produkte der 4 Mastermixe des Primerpaares 718. Unten sind neben dem Molekulargewichtsmarker die PCR-Produkte der 4 Mastermixe des Primerpaares 485, eine freie Bahn und danach die PCR-Produkte des Primerpaares 1031 abgebildet.

Mastermix 2 (Bahnen 3 und 8 oben und unten) liefert für alle 4 Primerpaare das beste PCR-Produkt, wobei die Mastermixe des Primerpaares 485 schwierig zu beurteilen sind.



Abb. 4 zeigt auf Bahn 1 den Molekulargewichtsmarker. Auf den Bahnen 2-5 sind die PCR-Produkte der 4 Mastermixe des Primerpaares 485 abgebildet, beginnend mit Mastermix 1. Mastermix 2 zeigt von allen Mastermixen die sauberste Bande.

Da die Überprüfung mit der Gelelektrophorese ergab, dass Mastermix 2 für alle Primerpaare das beste PCR-Ergebnis lieferte, wurde dieser Ansatz für die folgenden PCR übernommen.

3.2.3 Herstellung der Sonden

Hierzu wurden die im Kühlschrank gelagerten restlichen 25µl PCR-Produkt des ursprünglichen 50µl Ansatzes weiterverarbeitet.

3.2.3.1 Aufreinigen der PCR-Produkte

Aufgereinigt wurde mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Zu einem Volumen PCR-Produkt wurden 5 Volumen eines PB-Puffers gegeben, das Ganze durchmischt und in eine Spin-Säule pipettiert, die in ein Sammelröhrchen gestellt wurde. Der PB-Puffer gewährleistet mit einem speziellen Salzgehalt und einem $\text{pH} \leq 7,5$, dass die PCR-Produkte während des folgenden Zentrifugiervorgangs an eine Silicium-Gel-Membran binden konnten, die sich in der Spin-Säule befand. Zentrifugiert wurde für 30-60s bei 13 000U/min. Der Durchfluss wurde verworfen.

Zum Waschen wurden 0,75ml PE-Puffer in die Spin-Säule gegeben, wieder für 30-60s zentrifugiert und der Durchfluss mit den Verunreinigungen verworfen. Verbliebener PE-Puffer wurde in einem anschließenden einminütigen Zentrifugiervorgang entfernt.

Danach wurde die Spin-Säule in ein neues, sauberes 1,5ml Sammelröhrchen gestellt. Um die gebundenen PCR-Produkte aus der Silicium-Gel-Membran herauszuwaschen, wurden 50µl EB-Puffer in die Spin-Säule pipettiert und für 1min zentrifugiert. Der EB-Puffer besaß im Gegensatz zum PB-Puffer einen niedrigen Salzgehalt und einen pH von 8,5.

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in einer Vakuumzentrifuge (Appligene) getrocknet. Für die abschließende Markierung mit einem Nick Translations Mix wurde ein Volumen von 16µl mit H₂Odd eingestellt.

3.2.3.2 Markierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden durch Nick Translation markiert. Hierzu sind zwei Enzyme notwendig: zum einen die DNase I und zum anderen die DNA-Polymerase I. Die DNase I erzeugt in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen an statistisch verteilten Stellen der DNA Einzelstrangbrüche, „nicks“. Hier greift die DNA-Polymerase I an und baut mit ihrer 5´3´-Exonukleaseaktivität Nukleotide in Syntheserichtung ab. Mit ihrer Polymeraseaktivität ersetzt die DNA-Polymerase I gleichzeitig die entfernten Nukleotide durch markierte und unmarkierte Nukleotide komplementär zum anderen Strang. So entstehen Stränge, die markierte Nukleotide enthalten. Diese können radioaktiv oder mittels eines Haptens markiert sein. Die auf diese Weise markierte DNA kann als Sonde in der FISH eingesetzt werden.

Für die Markierung wurde ein gebrauchsfertiger Nick Translations Mix (Boehringer Mannheim) mit Biotin als markierendem Hapten verwendet. Er enthielt DNase I, DNA-Polymerase I, 0,25mM dATP, 0,25mM dCTP, 0,25mM dGTP, 0,17mM dTTP und 0,08mM Biotin-16-dUTP in einem optimierten Pufferkonzentrat mit 50% Glycerin. Das vorgegebene molare Verhältnis von Biotin-16-dUTP zu dTTP garantiert, dass jedes 20.-25. Nukleotid der neu synthetisierten DNA markiert ist. Diese Haptendichte liefert die ideale Sensitivität für die immunologische Detektionsreaktion.

Während der folgenden Pipettierschritte waren die benutzten Reagenzien auf Eis gestellt. Zu den 16µl, die am Ende des oben beschriebenen Aufreinigens vorlagen und die das PCR-Produkt in H₂Odd enthielten, wurden 4µl des Biotin-Nick Translations Mix hinzupipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 15°C über

90min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l 0,5M EDTA (pH 8,0) und 10min Erhitzen auf 65°C gestoppt. Damit war die eigentliche Markierung abgeschlossen.

Gefällt wurde die markierte Sonde durch Zugabe von 2 μ l 3M Na-Acetat und 60 μ l eiskaltem 100%-igem Ethanol. Der Ansatz wurde mit dem Vortexgerät durchmischt, für 30min bei -20°C inkubiert und danach bei 4°C während 30min mit 14 000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit der markierten Sonde mittels einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Sonde wurde in 10 μ l 50%igem Formamid, 2xSSC (pH 7,0) aufgenommen, 30min mit dem Vortexgerät durchmischt und schließlich wieder kurz zentrifugiert.

Somit entstand für jedes Primerpaar eine Sonde der entsprechenden Länge, die in einer FISH eingesetzt werden konnte.

3.3 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)

3.3.1 Prinzip

Die FISH ermöglicht es, DNA-Bereiche auf den Chromosomen mit Hilfe von Sonden darzustellen. Bei den Sonden handelt es sich um Nukleinsäuren in Form von DNA oder RNA. Die Sonden lagern sich mit dem komplementären DNA-Abschnitt des Chromosoms zusammen. Voraussetzung für das Binden der Sonden ist, dass der DNA-Doppelstrang der Ziel- und Sonden-DNA zuerst in zwei Einzelstränge aufgetrennt wird, was durch Hitzedenaturierung geschieht. Damit die Morphologie der Präparate beim Denaturieren nicht zerstört wird, gibt man Formamid hinzu, was pro zugegebenem Prozentpunkt die Schmelztemperatur um 0,72°C absenkt. Die Bindung der Sonden an die Ziel-DNA kommt durch Basenpaarung zustande und es entsteht ein neuer Doppelstrang. Die neu gebildeten Hybride sind umso stabiler, je größer die Übereinstimmung der Basensequenz zwischen der Sonde und der Ziel-DNA ist, d.h. je spezifischer die Sonde ist. Außer den spezifisch gebundenen Sondenmolekülen entstehen immer auch unspezifische Bindungen, die weniger stabil sind. Diese sollen mittels Stringenzwaschungen gelöst werden. Anschließend erfolgt die Detektion der Sonden.

Handelt es sich um Sonden, die durch eingebaute Fluoreszenzfarbstoffe direkt markiert sind, so können diese unmittelbar nach der Hybridisierung mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Handelt es sich dagegen um Sonden, die durch an sie gekoppelte Haptene, wie z.B. Biotin oder Digoxigenin markiert sind, so müssen zuerst diese Reportermoleküle detektiert werden. Hierfür werden spezifische Bindungspartner benutzt, die wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, welcher dann mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden kann. Ist das Fluoreszenzsignal zu schwach, so kann es verstärkt werden. Der für die Detektion verwendete spezifische Bindungspartner wird hierbei mit einem zweiten für ihn spezifischen Bindungspartner markiert. An diesen zweiten ist wieder ein Hapten gekoppelt, welches anschließend detektiert werden kann. Zur besseren Lokalisierung der Sonden kann die DNA der Chromosomen mit DAPI gegengefärbt werden.

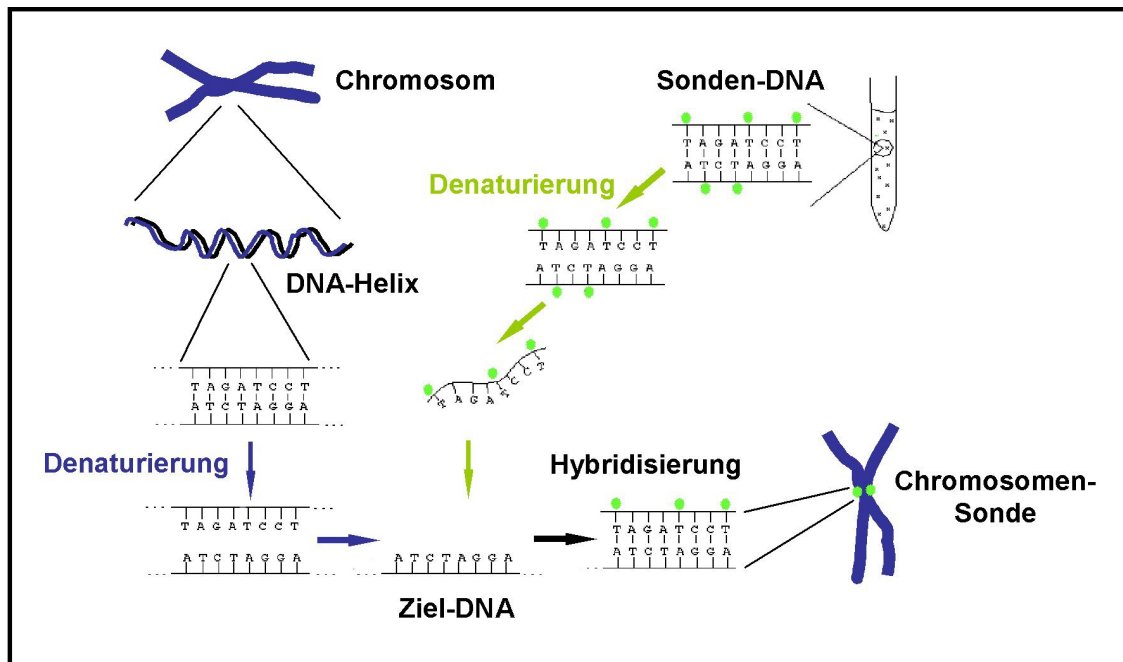


Abb. 5: Prinzip der FISH

Die FISH wurde mit verschiedenen Sonden durchgeführt, für die unterschiedliche Protokolle etabliert werden mussten. In einem ersten Schritt wurden Sonden eingesetzt, die mit großen Zielsequenzen hybridisieren.

Die hierbei initial benutzte Sonde (α -satellite DNA probe for chromosome 1, Locus D1Z5, Oncor) hybridisiert mit der Zentromerregion des größten Chromosoms, Chromosom 1, und besitzt eine Zielsequenz von 440kb bis 1,51Mb (WEVRICK, WILLARD, 1989). Später wurde ein Sondenmix verwendet, der mit den Zentromerregionen aller Metaphasechromosomen (All human Centromeres, α -satellite, Oncor) hybridisiert, und dessen Zielsequenzen ebenfalls im Bereich mehrerer hundert kb bis ca. 5Mb liegen (WAYE et al., 1987; WEVRICK, WILLARD, 1989; LEE et al., 1997). Sowohl für die FISH-Experimente mit der Zentromersonde gegen Chromosom 1 als auch für die FISH-Experimente mit dem Sondenmix gegen alle Zentromere wurden Metaphasechromosomen aus menschlichen Lymphozyten benutzt.

In einem zweiten Schritt wurde eine c-myc-Sonde (Oncor) eingesetzt, die mit einer mittelgroßen Zielsequenz von 80kb hybridisiert. Die Zielsequenz umfasst das c-myc Onkogen der Zelllinie Colo 320 DM und flankierende Sequenzen.

Abschließend wurden die mittels PCR hergestellten Sonden verwendet, die mit Zielsequenzen von 1031, 718, 475 sowie 273bp innerhalb des c-myc Onkogens hybridisieren.

Als Substrat für die FISH-Experimente mit der c-myc-Sonde und den mittels PCR hergestellten Sonden dienten die Metaphasechromosomen der Zelllinie Colo 320 DM.

3.3.2 Protokolle

Die FISH-Experimente wurden nach folgendem Grundprotokoll durchgeführt, wobei für die verschiedenen Sonden Variationen eingeführt wurden.

3.3.2.1 Grundprotokoll

Chromosomenvorbehandlung

Die Objektträger mit den aufgetropften Mitosen wurden 10min in eine Küvette mit 1xPBS gestellt. Danach wurde ein RNA-Verdau vorgenommen, der Hybridisierungen der Sonde mit RNA vermeiden sollte. Hierfür wurden 60µl 2xSSC, das RNase in einer Endkonzentration von 100µg/ml enthielt, pro Objektträger aufpipettiert, ein großes Deckglas (24mm x 60mm) aufgelegt und für 1h bei dem Wirkoptimum des Enzyms, 37°C, im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser entfernt, die Objektträger in 2xSSC gegeben und bei Raumtemperatur 2x5min inkubiert. Für weitere 5min wurden die Objektträger in 37°C warmes 2xSSC überführt, um sie auf den folgenden bei 37°C stattfindenden 5-minütigen Verdau mit 0,4% Pepsin in 0,01M HCL (pH 2,0) vorzubereiten. Der Verdau sollte die Zugänglichkeit der Ziel-DNA verbessern. Nach dem Verdau wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für 2x5min in 1xPBS gestellt.

Nachfixierung

Die Nachfixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehyd in 1xPBS. Sie dauerte 5min unter Einsatz eines Schüttlers (Celloshaker, Variospeed, Renner GmbH).

Dann wurden die Präparate für 10min mit 1xPBS-Tween 20 (0,1%) bei Raumtemperatur gewaschen, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5min 70%, 80%, 96% Ethanol) dehydriert und luftgetrocknet.

Denaturierung

Bevor die Hybridisierung erfolgen konnte, musste die Doppelhelix der Ziel-DNA zunächst in zwei Einzelstränge aufgetrennt werden, was durch Denaturierung geschah. Hier kamen im Laufe der Versuche zwei unterschiedliche Verfahren zum Einsatz. Zum einen wurde eine Codenaturierung, zum anderen eine getrennte Denaturierung von Ziel-DNA und Sonden-DNA vorgenommen.

Codenaturierung

10µl Hybridisierungsmix wurden pro Objektträger aufpipettiert, ein kleines Deckglas (18mm x 18mm) unter Vermeidung von Blasenbildung aufgelegt, mit Fotokleber (Fixogum, Marabuwerke) verschlossen und während 5min auf einer 72°C heißen Heizplatte codenaturiert.

Getrennte Denaturierung

Bei der getrennten Denaturierung wurden 100µl eines Denaturierungsmix (70% Formamid in 2xSSC, pH 7,0) auf den Objektträger mit der Ziel-DNA aufgebracht, ein großes Deckglas aufgelegt, mit Fotokleber verschlossen und für 2min auf einer 70°C heißen Heizplatte denaturiert. Anschließend wurden die Deckgläser entfernt und mit einer eiskalten aufsteigenden Alkoholreihe (je 3min 70%, 80%, 96% Ethanol) dehydriert.

Getrennt davon wurden pro Objektträger 10µl Hybridisierungsmix in ein Sicherheitseppendorfggefäß pipettiert und dieses für 5min in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Der Hybridisierungsmix wurde kurz mit dem Vortexgerät durchmischt und anzentrifugiert. Die Denaturierung erfolgte während 5min im 70°C heißen Wasserbad. Sofort danach wurde der Hybridisierungsmix wieder anzentrifugiert und auf Eis gestellt.

Der Objektträger mit der denaturierten Ziel-DNA und ein kleines Deckglas wurden auf eine 37°C warme Heizplatte gelegt. 10µl des Hybridisierungsmix mit der darin enthaltenen, nun denaturierten Sonde bzw. dem denaturierten Sondenmix wurden direkt vom Eis auf den Objektträger aufpipettiert, das Deckglas unter Vermeidung von Blasenbildung aufgelegt und mit Fotokleber verschlossen.

Hybridisierung

Die Hybridisierung fand über Nacht in einer feuchten Kammer im 37°C warmen Brutschrank statt. Am nächsten Tag wurde der Fotokleber mit einer Pinzette entfernt, das Deckglas vorsichtig in 2xSSC abgelöst.

Stringenzwaschung

Um die unspezifischen Hybride abzuwaschen, musste die Stringenzwaschung optimiert werden. Anschließend wurden die Objektträger in 4xSSC-Tween 20 (0,05%) gestellt, da die späteren Waschschrte mit dem gleichen Puffer erfolgten. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 4xSSC, 0,5% Blockierungsreagenz 30min lang geblockt. Hierfür wurden 75µl pro Objektträger aufgetragen und dieser mit einem großen Deckglas versehen. Das Blocken erfolgte in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C.

Detektion

Zur Detektion des Haptens Biotin, mit dem die Sonde gegen das Zentromer von Chromosom 1, der Sondenmix gegen alle Zentromere und die mittels PCR hergestellten Sonden markiert waren, wurde Streptavidin eingesetzt. Streptavidin wird von *Streptomyces avidinii* produziert und ist ein tetrameres Protein mit 4 Bindungsstellen für Biotin. An das verwendete Streptavidin war Fluoresceinisothiocyanat (FITC) als Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Streptavidin-FITC (Vector) wurde in 4xSSC-Blockierungsreagenz im Verhältnis 1:200 gelöst. Jeweils 100µl wurden pro Objektträger aufpipettiert und ein großes Deckglas aufgelegt. Die Inkubation erfolgte für 30min im 37°C warmen Brutschrank. Um ein Ausbleichen des FITC zu vermeiden, wurden die folgenden Schritte - soweit möglich - unter Lichtausschluss durchgeführt. Überschüssiges, nicht spezifisch gebundenes Streptavidin wurde in anschließenden Waschschrten entfernt. Hierzu wurden die Objektträger nach Entfernen des Deckglases für 3x5min in 4xSSC-Tween 20 (0,05%) bei Raumtemperatur gestellt.

Amplifikation

Wurde amplifiziert, so geschah dies mit einem Antikörper gegen Streptavidin, der seinerseits wieder biotinyliert war (Anti-Streptavidin, biotinyliert, Vector). Er wurde im Verhältnis 1:400 in 4xSSC-Blockierungsreagenz gelöst. 100µl wurden pro

Objektträger aufpipettiert und dieser mit einem großen Deckglas versehen. Die Inkubation erfolgte für 30min im 37°C warmen Brutschrank. Ungebundene Antikörper wurden durch 3x5-minütiges Waschen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) bei Raumtemperatur entfernt.

Danach wurde wieder eine Detektion mit Streptavidin-FITC durchgeführt, wobei jetzt nicht das Biotin der Sonde, sondern das Biotin des Anti-Streptavidins detektiert wurde. Dadurch erhöht sich die Anzahl der FITC-Moleküle und das Signal wird stärker. Anschließend erfolgte ein erneutes 3x5-minütiges Waschen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) bei Raumtemperatur.

Es konnte mehrfach amplifiziert werden.

Um die Präparate optisch besser beurteilen zu können, erfolgte die DNA-Gegenfärbung durch Inkubation mit 240ng DAPI/ml 2xSSC für 10min. Zum Schluss wurden die Präparate mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5min 70%, 80%, 96% Ethanol) dehydriert und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.3.2.2 Variationen

Zentromersonde gegen Chromosom 1

Der Hybridisierungsmix musste selbst hergestellt werden und setzte sich aus 20% Sonde ($c=2-5\text{ng}/\mu\text{l}$), 60% Formamid in 2xSSC zusammen. Die Stringenzwaschung erfolgte mit 50% Formamid, 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C für 3x5min, in weiteren Versuchen wurde der Formamidanteil auf 60% erhöht.

Sondenmix gegen alle Zentromere

Es lag ein gebrauchsfertiger Hybridisierungsmix vor, der neben den Sonden 50% Formamid und 2xSSC enthielt. Im Verlauf wurde die von der Fa. Oncor empfohlene Sondenmenge verdoppelt und auch eine Hybridisierungszeit von 3,5h getestet. Für die Stringenzwaschung wurden die zwei der Fa. Oncor angegebenen Methoden ausprobiert. Methode I empfahl eine Waschung mit 1xSSC bei 72°C für 5min, Methode II eine Waschung mit 65% Formamid, 2xSSC (pH 7,0) bei 43°C für 15min und anschließend eine Waschung mit 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C für 8min. Bei der Detektion wurde das Lösungsverhältnis von Streptavidin-FITC in 4xSSC-Blockierungsreagenz bis auf 1:100 gesteigert. Ebenso wurde bei der Amplifikation das Lösungsverhältnis von Anti-Streptavidin in 4xSSC-Blockierungsreagenz bis auf

1:100 erhöht. Zudem wurden bei der Detektion und der Amplifikation jeweils Inkubationszeiten von 15min getestet.

c-myc-Sonde

Zur Chromosomenvorbehandlung wurden die Objektträger für 30min in 37°C warmes 2xSSC (pH 7,0) gestellt. Danach wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2min 70%, 80%, 95% Ethanol) dehydriert. Die Denaturierung der Ziel-DNA wurde wie bei der getrennten Denaturierung durchgeführt. Die c-myc-Sonde (c=50-100ng/µl), die in einem gebrauchsfertigen Hybridisierungsmix vorlag, der neben der Sonde 50% Formamid, 2xSSC und Blockierungs-DNA enthielt, wurde entsprechend den Herstellerangaben nicht hitzedenaturiert, sondern lediglich für 5min bei 37°C erwärmt und kurz mit dem Vortexgerät durchmischt. Die zwei empfohlenen Stringenzwaschungen wurden ausprobiert. Zunächst wurde mit 2xSSC bei 72°C für 5min gewaschen. Später wurde eine Alternativwaschung mit 50% Formamid, 2xSSC (pH 7,0) bei 43°C für 15min, gefolgt von 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C für 8min, durchgeführt. Da die c-myc-Sonde mit Digoxigenin markiert war, wurde ein aus der Maus gewonnener monoklonaler FITC-markierter Anti-Digoxigenin-Antikörper (Dianova) zur Detektion benutzt. Er wurde in 0,5% Blockierungsreagenz-TN-Puffer im Verhältnis 1:100 gelöst. Amplifiziert wurde mit einem digoxigenierten Anti-Maus-Antikörper (Dianova), der mit 0,5% Blockierungsreagenz-TN-Puffer im Verhältnis 1:100 gemischt wurde. Bei der zweiten Detektion wurde Anti-Digoxigenin-FITC im Verhältnis 1:25 mit 0,5% Blockierungsreagenz-TN-Puffer eingesetzt. Die Waschungen wurden mit TN-Puffer/0,05%Tween durchgeführt.

Mittels PCR hergestellte Sonden der Länge 1031, 718, 485, 243bp

Die Chromosomenvorbehandlung erfolgte analog zu der FISH mit der c-myc-Sonde. Denaturiert wurde für 10min auf einer 80°C heißen Heizplatte. Die Stringenzwaschung wurde zunächst mit 2xSSC bei 72°C für 5min, im Verlauf entsprechend oben beschriebener Methode II (s. 3.3.2.2 Sondenmix gegen alle Zentromere) durchgeführt, wobei auch Formamidanteile von 55% und 60% getestet wurden. Ferner fanden die Waschungen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) bei Raumtemperatur und bei 42°C statt. Initial wurde auf eine Amplifikation verzichtet, später wurde 2-, 4- und 6-mal amplifiziert.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die FISH wurde immer an mindestens zwei Präparaten parallel durchgeführt. Eines davon wurde danach eingedeckt zwecks Überprüfung der FISH mit dem Fluoreszenzmikroskop. Zum Eindecken wurden pro Objektträger ein bis zwei Tropfen eines Antibleichmittels (Antifade) aufgebracht, ein großes Deckglas unter leichtem Druck aufgelegt und der Überschuss mit einem Tuch abgesaugt. Antifade sollte die Signale vor dem Ausbleichen schützen, das Aufbringen des Deckglases das Betrachten des Präparates unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels Ölimmersion mit einem 100-er Objektiv ermöglichen.

Zur Qualitätsbeurteilung der FISH stand ein Fluoreszenzmikroskop (Axioskop I, Zeiss) mit einem 10-er, 40-er und 100-er Objektiv zur Verfügung. Es wurde auf die Spezifität der Signale und das Signal/Hintergrundverhältnis geachtet. Waren diese Kriterien bei den eingedeckten Präparaten erfüllt, wurden die referierenden, nicht eingedeckten Präparate mit dem SNOM untersucht.

3.5 SNOM

3.5.1 Funktionsprinzip

Wie in der Einleitung beschrieben (s. 2.2, S.13, 14) ermöglicht die SNOM durch das Arbeiten im Nahfeld eine Auflösung, die nicht mehr von der Wellenlänge des benutzten Lichtes, sondern von der Größe der Lichtquelle und ihrem Abstand zur Oberfläche des zu untersuchenden Materials abhängig ist.

Durch einen Argonlaser wird Licht der Wellenlänge 488nm erzeugt, das über eine Glasfaser geleitet wird und am anderen Ende der Glasfaser aus einer Spitze austritt. Die Öffnung der Spitze ist für gewöhnlich kleiner als 100nm. Die Größe der Spitzenöffnung definiert die Größe der Lichtquelle. Der Probenstisch wird relativ zur Spitze bewegt, so dass der optische Strahlengang unverändert bleibt. Das von der Probe reflektierte und gestreute Licht wird im Fernfeld von Objektiven hoher numerischer Apertur entweder in Reflexion oder in Transmission gesammelt. Anschließend passiert es mehrere Filter und trifft auf hochsensitive Detektoren.

Während die Nahfeld-Spitze die Probenoberfläche im Nahfeld scannt, wird der Abstand zwischen beiden konstant gehalten. Dies kann mit verschiedenen Verfahren erfolgen. Meist wird jedoch der hier benutzte Rückkopplungsschaltkreis verwendet, der die Dämpfung von Scherkräften zwischen Spitze und Probe misst (BETZIG et al.,

1992; TOLEDO-CROW et al., 1992). Dazu wird die Nahfeld-Spitze auf ihrer Eigenresonanzfrequenz zum Schwingen angeregt. Nähert sich die Spitze der Probenoberfläche in eine Entfernung von 10-50nm, so sinkt die Oszillationsamplitude. Die genauen Gründe dafür sind nicht vollständig geklärt. Gleichbleibende Scherkräfte bedeuten also einen gleichbleibenden Abstand.

Sobald die Dämpfung der Scherkräfte einen Sollwert überschreitet, wird der Piezostelltisch, auf dem die Probe gelagert wird, in der Vertikalen soweit bewegt, bis die ursprünglichen Scherkräfte wieder erreicht sind. Damit kann der Abstand zwischen Nahfeld-Spitze und Probe konstant gehalten werden. Er beträgt gewöhnlich 10-50nm. Die vertikale Auslenkung des Piezoelementes entspricht dann der Topographie der Probe.

Somit liefert die SNOM nicht nur eine optische Auflösung weit unter der Diffraktionsgrenze, sondern gleichzeitig auch topographische Informationen.

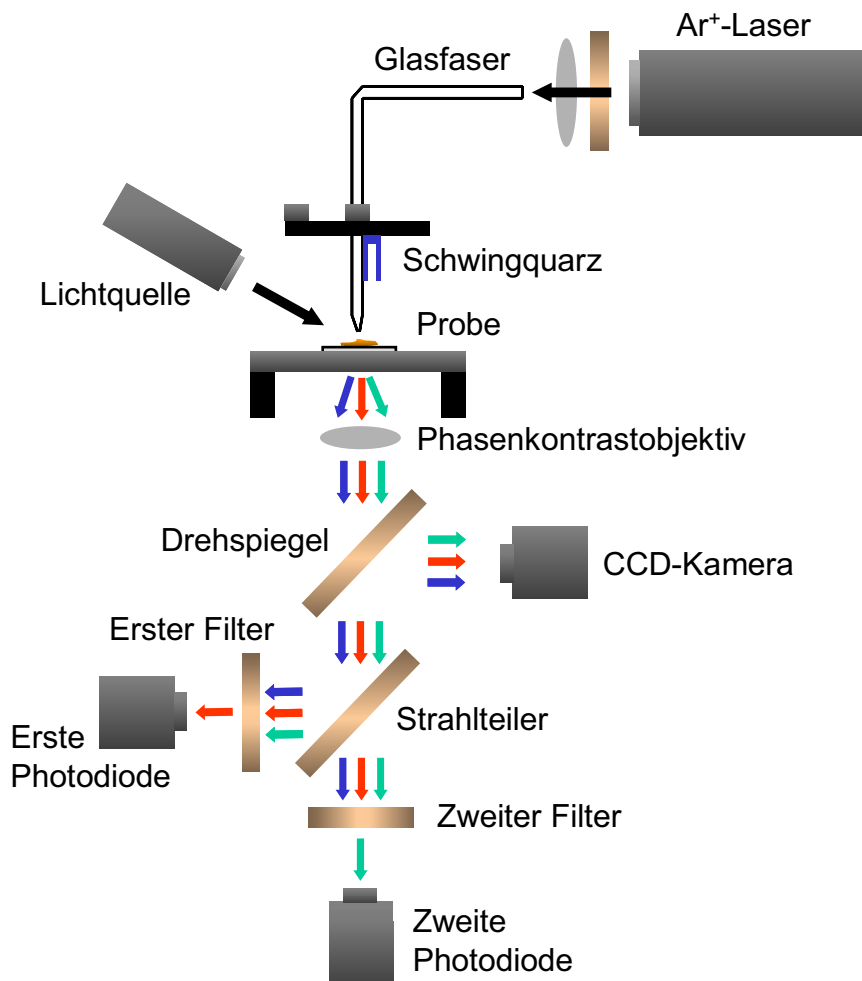


Abb 6: schematischer Aufbau der SNOM-Anordnung

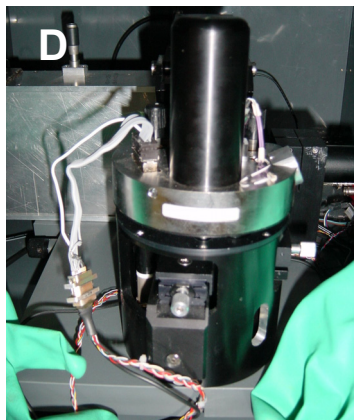
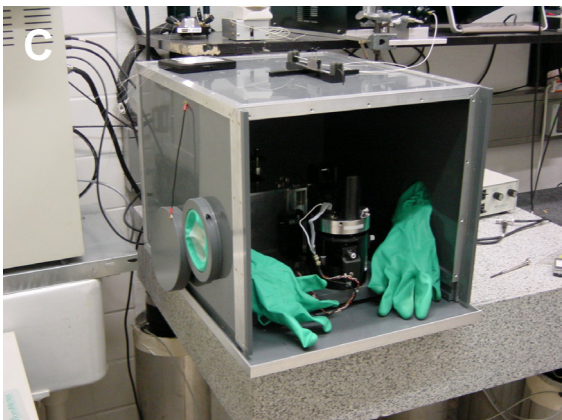
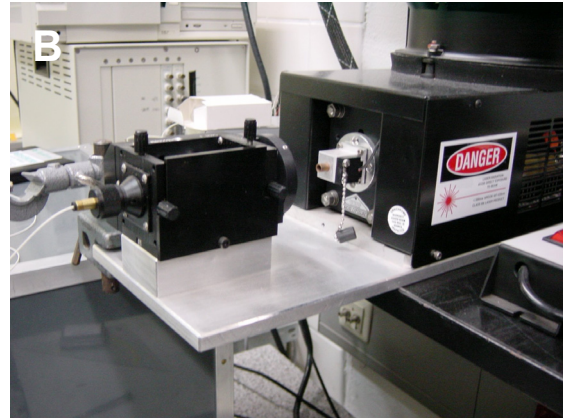
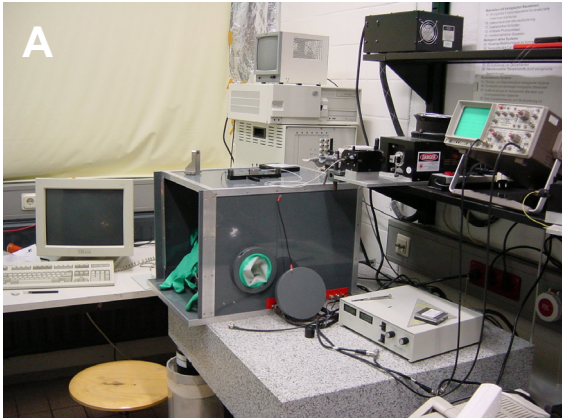


Abb. 7a-d zeigen das Setup des SNOM. In Abb. 7a ist die gesamte SNOM-Einheit zu sehen, in Abb. 7b die Glasfaser, das Objektiv und der Laser. Abb. 7c zeigt die Kammer, die den SNOM-Kopf umgibt, Abb. 7d den SNOM-Kopf sowie den Scantisch.

Zur Untersuchung der Präparate diente ein kommerziell erhältliches SNOM (Aurora, ThermoMicroscopes, Sunnyvale, USA). Der Illuminations- und Transmissions-Modus wurden angewendet. Im Verlauf der Arbeit wurden Modifizierungen vorgenommen, die im Folgenden genannt sind.

Über eine Glasfaser wurde Laserlicht, das von einem luftgekühlten 488nm Argonlaser (Uniphase, San Jose, USA) stammte, in die Nahfeld-Spitze geleitet. Die Spitzen wurden durch Ziehen kommerzieller „single-mode“ Glasfasern (F-SA, Newport, Irvine, USA) hergestellt. So entstanden sehr feine Spitzen, die anschließend mit Aluminium in einer UHV-Kammer bedampft wurden. Die Öffnung der Spitzen war mit 50nm kleiner als die Wellenlänge des eingesetzten Argonlasers, der die Fluoreszenzfarbstoffe anregte. Das resultierende Fluoreszenzlicht wurde von einem 0,7NA Objektiv (60x, Nikon, Japan) gebündelt und gelangte anschließend in einen Photonen Detektor. Um auch schwache Fluoreszenzsignale nachweisen zu können, wurde der Standard PMT Detektor durch eine Silicon Avalanche Photon

Diode (APD, C30902S, EG&G OPTOELECTRONICS, Vaudreuil, Kanada), einen selbstgebauten Preamplifier, ein Counting Modul und einen D/A Converter ersetzt. Dadurch konnten auch einzelne Pulse, die man einem Photon zuordnen kann, detektiert werden. Die APD wurde zur Reduktion von „dark counts“, welche durch die thermische Energie von Elektronen entstehen und ein Hintergrundrauschen verursachen, auf 0°C heruntergekühlt. Zwischen das Sammelobjektiv und den Detektor wurde ein 542nm Laser Line Filter (10nm FWHM, Newport, Irvine, USA) eingebracht, um das Laserlicht des 488nm Argonlasers und des Lasers, der die Scherkräfte kontrollierte, herauszufiltern. Die SNOM-Aparatur wurde durch eine sie umgebende Kammer geschützt.

3.5.2 Darstellung der Chromosomen

Da mit der SNOM aufgrund des begrenzten Scan-Bereiches keine Übersichtsdarstellung möglich ist, mussten die interessierenden Strukturen zunächst mit einem Objektiv und einer CCD Kamera gesucht werden. Danach wurde die Nahfeld-Spitze über diesem Areal positioniert.

Für den Nachweis der zentromerspezifischen Sonde auf Chromosom 1 musste dieses zuerst identifiziert werden. Dazu wurde das Areal mit der Metaphase komplett topographisch gescannt. Der Anregungslaser blieb währenddessen ausgeschaltet. War Chromosom 1 sicher identifiziert, so wurde der Anregungslaser zur Detektion des Fluoreszenzsignals eingeschaltet.

Für den Nachweis der Zentromersonden gegen alle Chromosomen wurde ebenso wie für den Nachweis der c-myc-Sonde und der mittels PCR hergestellten Sonden nur die Mitose eingestellt, die Detektion erfolgte direkt im Anschluss.

Um eine ausreichende Signalstärke zu erhalten, wurde über jedem Pixel 10ms lang gemessen und integriert. Folglich dauert das Anfertigen eines 30µm x 30µm großen Bildes mit einer Auflösung von 500pixel x 500pixel ca. 42min.

3.5.3 Manipulation/Extraktion chromosomaler DNA

Hinsichtlich der Manipulation, die letztendlich die gezielte Isolierung und Extraktion chromosomaler DNA erlauben sollte, wurden erste Erfahrungen, die mittels AFM erarbeitet wurden, benutzt: Zur Dissektion eines Chromosoms wurde eine AFM-Spitze zwischen dem Anfangs- und Endpunkt eines Schnittes hin und her bewegt. Die Kraft wurde dabei ausgehend von $2\mu\text{N}$ bei jeder Bewegung um $4\mu\text{N}$ erhöht, bis $40\mu\text{N}$ erreicht waren. In der Folge wurden die Kräfte ermittelt, die zur Manipulation am Chromosom nötig sind. Hierzu wurden mit FMR-W-Spitzen der Fa. Nanoworld ($K=2,8\text{N/m}$, $f_R=75\text{kHz}$) unterschiedliche Kräfte auf die Chromosomenoberfläche ausgeübt. Drückte die Spitze mit einer Kraft von $2,2\mu\text{N}$ auf die Chromosomenoberfläche, resultierte eine Eindringtiefe von ca. 40nm ; eine Kraft von $3,1\mu\text{N}$ führte zu einem Eindringen bis in eine Tiefe von ca. 100nm .

Die gemachten Erfahrungen wurden auf das SNOM übertragen. Durch vertikales Eintauchen der SNOM-Spitze in das Chromosom wurde versucht, chromosomale DNA zu manipulieren. Die Extraktion sollte durch Hängenbleiben der DNA in der Öffnung der SNOM-Spitze erfolgen. Daher wurden die SNOM-Spitzen vor und nach der Manipulation mit einem REM abgebildet, um zu überprüfen, ob DNA hängen geblieben war. Ferner wurde eine DOP-PCR durchgeführt, welche die Amplifikation unbekannter DNA-Sequenzen ermöglicht. Hiermit sollte die DNA direkt nachgewiesen werden.

3.6 Verwendete Materialien

3.6.1 Zellmaterial

humane Lymphozyten eines gesunden männlichen Spenders

humane Colon-Karzinom Zelllinie Colo 320 DM

3.6.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Chemikalie	Firma
Agarose	Peqlab
Blockierungsreagenz	Boehringer Mannheim
Bromphenolblau	Roth
Colcemid	Serva
DABCO	Sigma
DAPI	Sigma
dATP	Pharmacia Biotech
dCTP	Pharmacia Biotech
dGTP	Pharmacia Biotech
dTTP	Pharmacia Biotech
EDTA	Roth
Essigsäure	Merck
EtBr	Sigma
FCS	PAA
Fixogum	Marabuwerke
Formamid	Roth
Glycerin	Roth
HCL	Roth
H ₂ O ₂	Delta Pharma
Methanol	Merck
Na-Acetat	Merck
Na ₃ Citrat·2H ₂ O	Roth

NaCl	Roth
NaN ₃	Serva
NEA	PAA
NEA	PAA
Paraformaldehyd	Roth
PBS	Oxoid
Penicillin/Streptomycin	PAA
Pepsin	Serva
RNase	Boehringer Mannheim
RPMI 1640	PAA
Taq-Polymerase	Pharmacia Biotech
Tris	Roth
Trypsin	PAA
Tween 20	Roth

3.6.3 Puffer und Lösungen

Die Auflistung wurde in alphabetischer Reihenfolge erstellt.

Antifade

2g DABCO in 90ml Glycerin bei 60°C lösen

10ml 1M Tris (pH 7,0)

100µl 20% NaN₃

Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau

40% Glycerin

in 1xTAE-Puffer lösen

PBS

8,0g/l NaCl

0,2g/l KCl

1,15g/l Na₂HPO₄

0,2g/l KH₂PO₄

10 Tabletten PBS in 1l H₂O add auflösen

pH 7,3

SSC 20x (Stammlösung)

3M NaCl

300mM Na₃Citrat·2H₂O

pH 7,0

TAE-Puffer

40mM Tris

40mM Essigsäure

1mM EDTA

TN-Puffer

0,1M Tris

0,15M NaCl

pH 7,6

4. Ergebnisse

4.1 Auswertung der FISH-Experimente mittels Fluoreszenzmikroskopie

Nach der erfolgreichen Chromosomenpräparation und der Herstellung kleiner Sonden mittels PCR wurden die FISH-Experimente mit den verschiedenen Sonden durchgeführt. Auch hier mussten die Versuchsbedingungen optimiert werden. Die Betrachtung der Metaphasechromosomen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop I, Zeiss). Mit Hilfe eines DAPI-Filters konnte die mit DAPI gegengefärbte DNA sichtbar gemacht werden. Im FITC-Filter kamen die grünen FITC Signale zur Darstellung.

4.1.1 Zentromersonde gegen Chromosom 1

Es wurde eine Codenaturierung durchgeführt. Eine Amplifikationsrunde war ausreichend, um das Signal deutlich erkennen zu können. Jedoch lagen bei der anfänglichen Stringenzwaschung mit 50% Formamid, 2xSSC bei 37°C für 3x5min noch viele unspezifische Signale vor (Abb. 8). Eine Erhöhung des Formamidanteils auf 60% hatte eine deutliche Reduzierung der unspezifischen Signale zur Folge, in einigen Versuchen verschwanden sie ganz (Abb. 9). Die im DAPI-Filter sichtbaren „Signale“ im Bereich der Zentromere kommen durch die höhere Affinität von DAPI zu AT-reichen Regionen zustande (SCHWEIZER, 1976). Das Zentromer ist eine AT-reiche Region, da es einen hohen Anteil an α -Satelliten-DNA besitzt, welche aus AT-reichen Monomeren besteht (MANUELIDIS, 1978; ALEXANDROV et al., 2001).

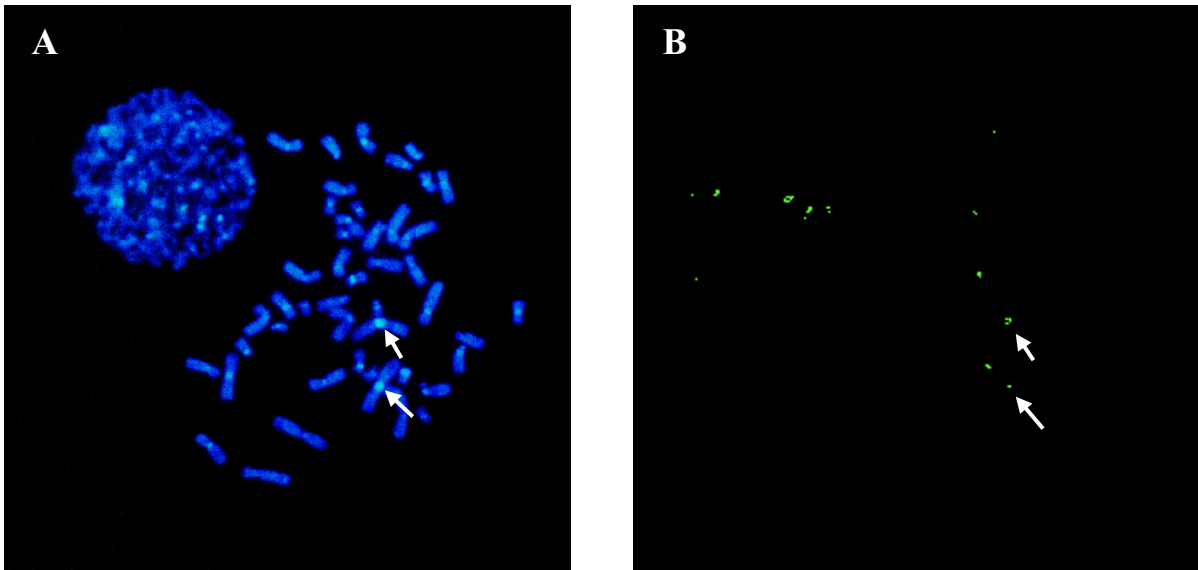


Abb. 8a und **b** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Metaphase nach einer FISH mit der biotinylierten Zentromersonde gegen Chromosom 1. Die Stringenzwaschung erfolgte mit 50% Formamid, 2xSSC bei 37°C für 3x5min, die Detektion mit Streptavidin-FITC. Für Abb. 8a wurde ein DAPI-Filter benutzt, der die mit DAPI gegengefärbte DNA sichtbar macht. Für Abb. 8b wurde ein FITC-Filter eingesetzt, der die grünen FITC Signale erkennen lässt. In Abb. 8b sind neben den spezifischen Signalen im Bereich des Zentromers von Chromosom 1 (Pfeile) auch mehrere unspezifische Signale zu erkennen.

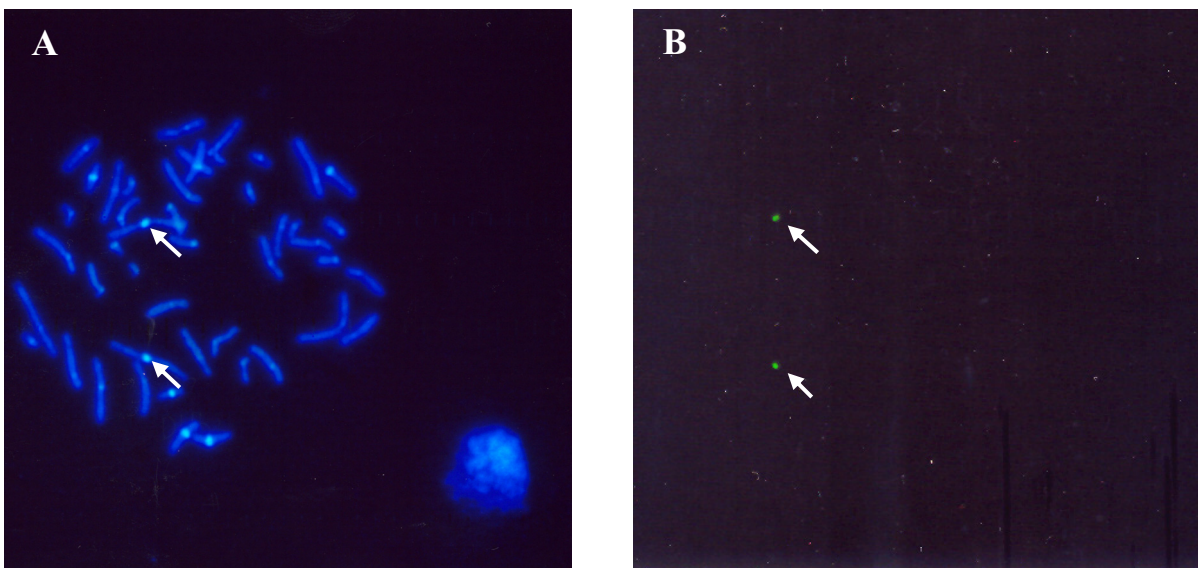


Abb. 9a und **b** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Metaphase nach einer FISH mit der biotinylierten Zentromersonde gegen Chromosom 1. Die Stringenzwaschung wurde hier mit 60% Formamid, 2xSSC bei 37°C für 3x5min durchgeführt, die Detektion mit Streptavidin-FITC. Sind im DAPI-Filter in 9a noch mehrere „Signale“ im Bereich der Zentromere sichtbar, so kommen im FITC-Filter in 9b nur die Zentromersignale von Chromosom 1 zur Darstellung (Pfeile); unspezifische Signale sind nicht zu erkennen.

4.1.2 Sondenmix gegen alle Zentromere

Sämtliche getesteten Bedingungen (s. 3.3.2.1, S.36 und 3.3.2.2, S.39) lieferten einheitliche Ergebnisse. Die Signale kamen nach einer Amplifikation klar zur Darstellung. Jedoch waren nie alle Zentromere sichtbar markiert. Die Zahl der markierten Zentromere schwankte zwischen 25-35.

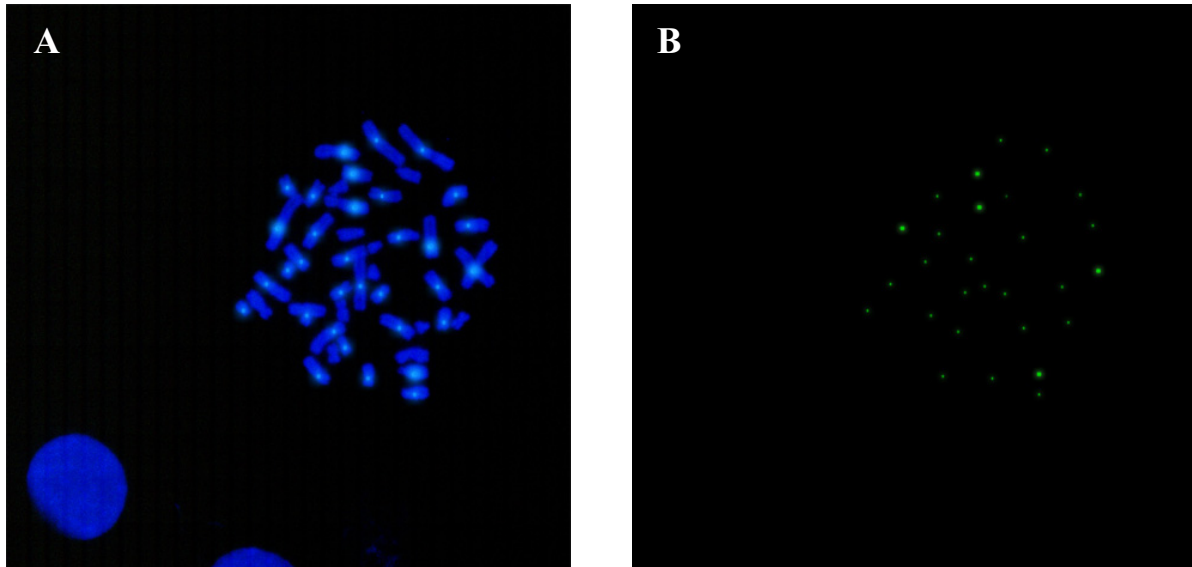


Abb. 10a und **b** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Metaphase nach einer FISH mit dem biotinylierten Sondenmix gegen alle Zentromere. Die Stringenzwaschung erfolgte mit 65% Formamid, 2xSSC (pH 7,0) bei 43°C für 15min und anschließend mit 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C für 8min. Detektiert wurde mit Streptavidin-FITC. Es wurde 1x amplifiziert. Für Abb. 10a wurde ein DAPI-Filter benutzt, der die mit DAPI gegengefärbte DNA sichtbar macht. Im FITC-Filter in Abb. 10b zeigen sich die grünen FITC-Signale im Zentromerbereich. Nicht alle Zentromere sind markiert.

4.1.3 c-myc-Sonde

Bei Hybridisierungen der c-myc-Sonde zeigten sich viele Signale, die außer auf dem erwarteten Genlocus 8q24 an mehreren Stellen der Chromosomen auftraten. Auch auf den außerhalb der Chromosomen gelegenen Double minutes waren Signale sichtbar (Abb. 11). Die Variation der Versuchsbedingungen (s. 3.3.2.2, S.40) lieferte keine Unterschiede.

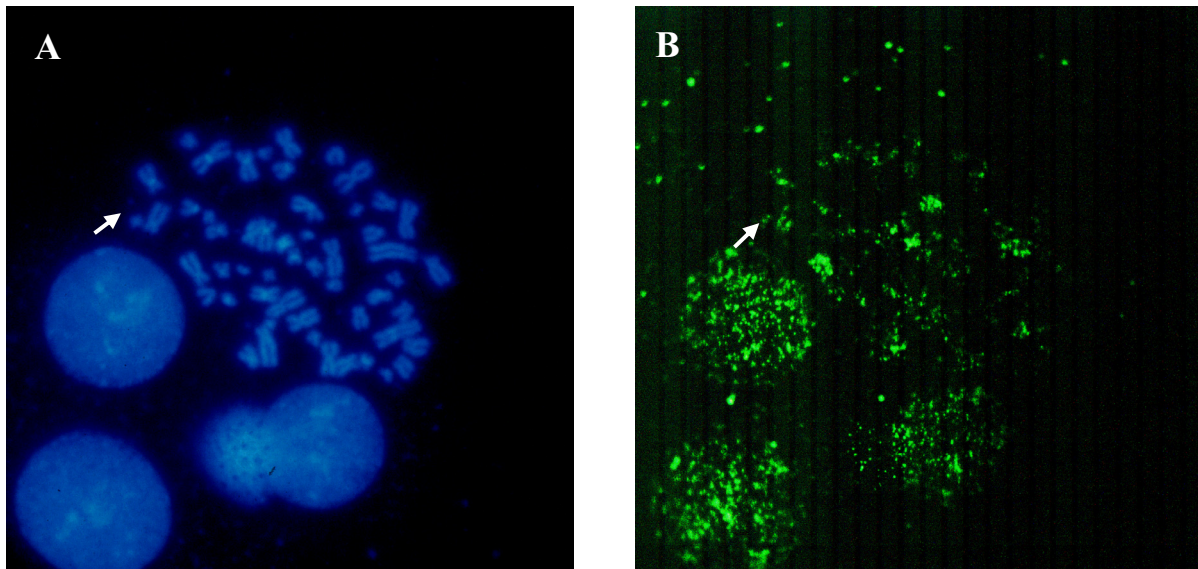


Abb. 11a und **b** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Metaphase der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der digoxigenierten c-myc-Sonde. Die Stringenzwaschung erfolgte über 5min mit 2xSSC bei 72°C. Detektiert wurde mit einem FITC-markierten Anti-Digoxigenin-Antikörper. Es wurde einmal amplifiziert. Für Abb. 11a wurde ein DAPI-Filter benutzt, der die mit DAPI gegengefärbte DNA sichtbar macht. Es sind mehrere Double minutes zu erkennen, eines ist exemplarisch mit Pfeil gekennzeichnet. Für Abb. 11b wurde ein FITC-Filter verwendet. An mehreren Stellen der Chromosomen zeigen sich die grünen FITC-Signale. Außerdem sind Signale auf den Double minutes (z.B. s. Pfeil) nachweisbar. Auch die Kerne zeigen zahlreiche Signale. Ferner findet sich eine unspezifische Hintergrundfärbung.

4.1.4 Mittels PCR hergestellte Sonden der Länge 1031, 718, 485, 243bp

Mit der PCR wurden 4 verschiedene Produkte aus der c-myc Onkogenesequenz amplifiziert mit Längen von 1031, 718, 485 und 243bp. Durch die anschließende Markierung mit Biotin entstanden so Sonden, die für eine FISH gegen die aus der Zelllinie Colo 320 DM präparierten Metaphasechromosomen eingesetzt werden konnten.

Initial wurde nicht amplifiziert (Abb. 12 und 13). Keine der 4 Sonden zeigte unter dem Fluoreszenzmikroskop spezifische Signale, weder auf den Chromosomen noch auf den Double minutes. Um die unspezifische Fluoreszenz auf den Chromosomen zu minimieren, wurden bei der Stringenzwaschung Veränderungen vorgenommen. Anstatt mit 2xSSC bei 72°C für 5min (Abb. 12) wurde mit 55% Formamid, 2xSSC bei 43°C für 15min, gefolgt von 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C für 8min, gewaschen (Abb. 13). Die Veränderungen blieben ohne Auswirkung.

Außerdem wurde schrittweise amplifiziert. Für jede der 4 Sonden entstanden so FISH mit 2 (Abb. 14), 4 (Abb. 15 und 16) und 6 (Abb. 17) Amplifikationsrunden.

Die Präparate lieferten ein einheitliches Bild: Spezifische Signale waren weder auf den Chromosomen noch auf den Double minutes zu erkennen, stattdessen zeigte sich eine unspezifische Fluoreszenzmarkierung der Chromosomen und der Double minutes. Eine Erhöhung des Formamidanteils auf 60% bei der Stringenzwaschung (Abb. 14, 15, 16, 17) brachte keine Verbesserung. Ferner wurden die Waschungen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) anstatt bei Raumtemperatur (Abb. 12, 13, 14, 15, 17) bei 42°C (Abb. 16) ausgeführt, was auch zu keiner wesentlichen Veränderung führte. Im Folgenden sind die oben beschriebenen Variationsbedingungen und Ergebnisse anhand der beiden größeren Sonden (718, 1031bp) aufgezeigt. Auf die Darstellung der kleineren Sonden (485, 243bp) wurde verzichtet, da keine relevanten Unterschiede zu verzeichnen waren.

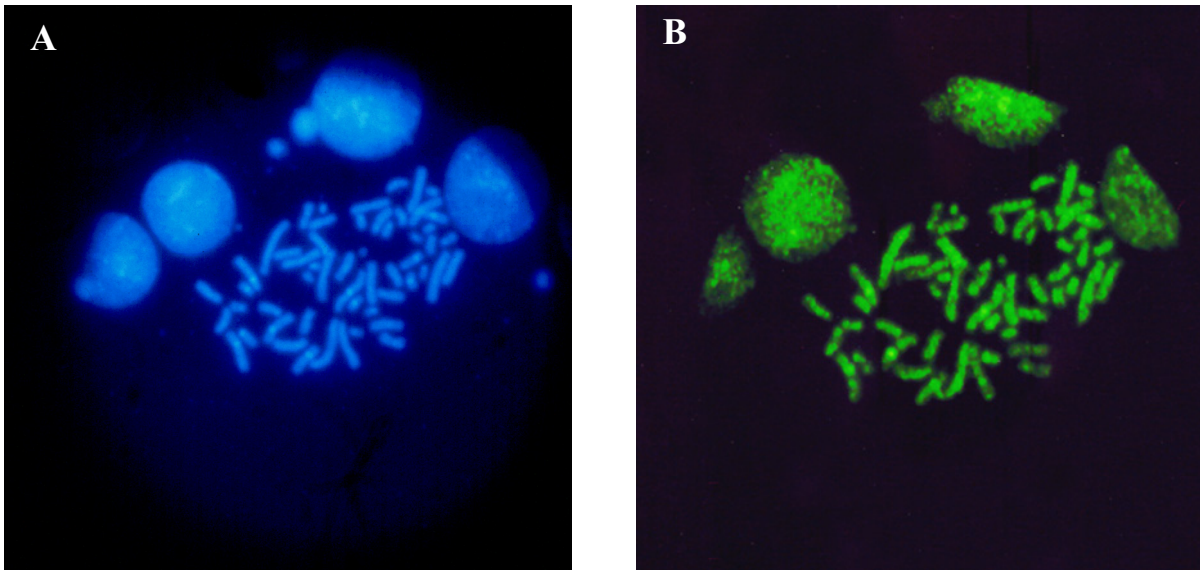


Abb. 12a und **b** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Metaphase der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der selbst hergestellten biotinylierten Sonde mit einer Länge von 718bp. Die Stringenzwaschung erfolgte mit 2xSSC bei 72°C über 5min. Detektiert wurde mit Streptavidin-FITC. Es wurde nicht amplifiziert. Die Waschungen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für Abb. 12a wurde ein DAPI-Filter benutzt, der die mit DAPI gegengefärbte DNA sichtbar macht. Für Abb. 12b wurde ein FITC-Filter verwendet. Es sind keine spezifischen Signale zu erkennen. Die Chromosomen sowie die Double minutes zeigen eine unspezifische Fluoreszenzmarkierung.

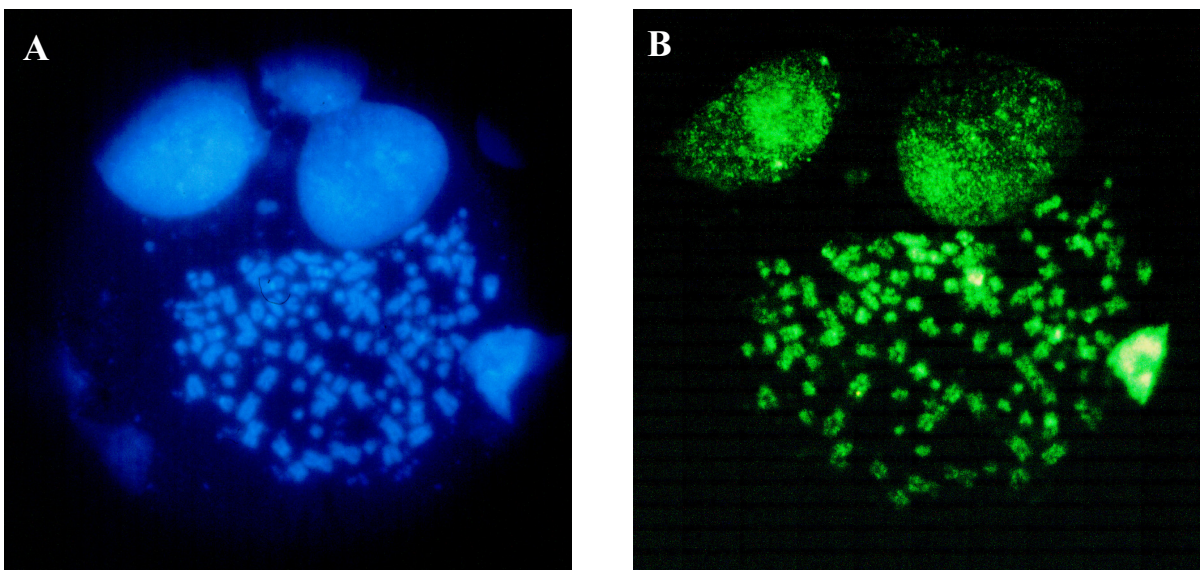


Abb. 13a und **b** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Metaphase der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der selbst hergestellten biotinylierten Sonde mit einer Länge von 1031bp. Die Stringenzwaschung erfolgte mit 55% FA, 2xSSC bei 43°C über 15min und anschließend mit 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C über 8min. Detektiert wurde mit Streptavidin-FITC. Es wurde nicht amplifiziert. Die Waschungen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für Abb. 13a wurde ein DAPI-Filter verwendet, der die mit DAPI gegengefärbte DNA sichtbar macht. Für Abb. 13b wurde ein FITC-Filter benutzt. Es zeigen sich keine spezifischen Signale. Die Chromosomen sowie die Double minutes weisen eine unspezifische Fluoreszenzmarkierung auf. Die Änderung der Stringenzwaschung brachte keine Reduktion der unspezifischen Signale.

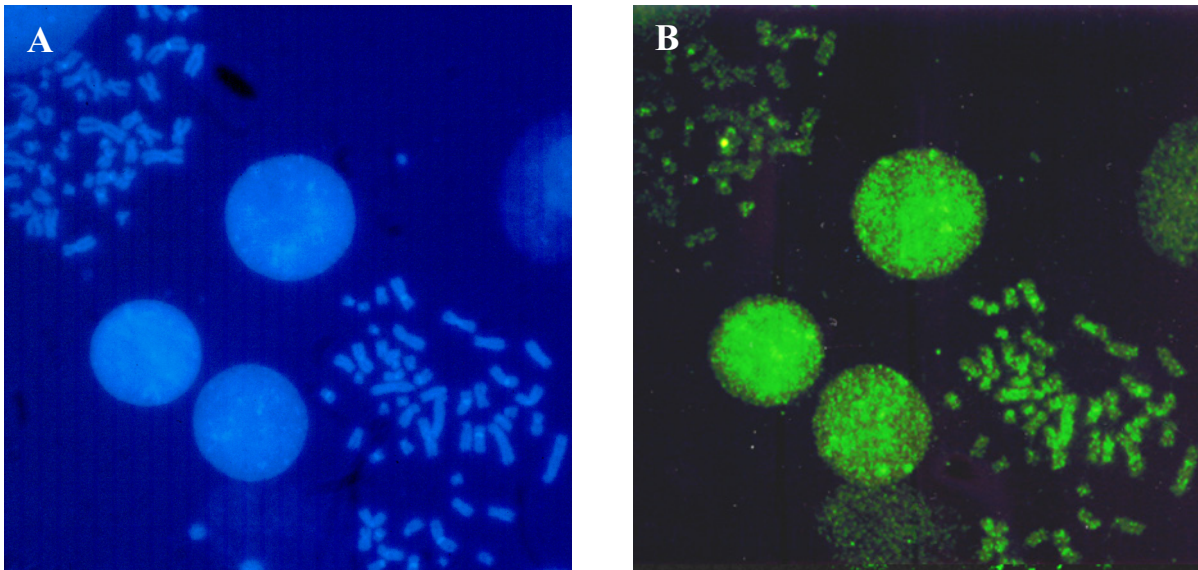


Abb. 14a und **b** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zweier Metaphasen der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der selbst hergestellten biotinylierten Sonde mit einer Länge von 1031bp. Die Stringenzwaschung erfolgte mit 60% FA, 2xSSC bei 43°C über 15min und anschließend mit 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C über 8min. Detektiert wurde mit Streptavidin-FITC. Es wurde 2x amplifiziert. Die Waschungen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für Abb. 14a wurde ein DAPI-Filter benutzt, der die mit DAPI gegengefärbte DNA sichtbar macht. Für Abb. 14b wurde ein FITC-Filter verwendet. Es finden sich keine spezifischen Signale. Die Chromosomen sowie die Double minutes zeigen eine unspezifische Fluoreszenzmarkierung. Die Änderung der Stringenzwaschung lieferte keine Reduktion der unspezifischen Signale.

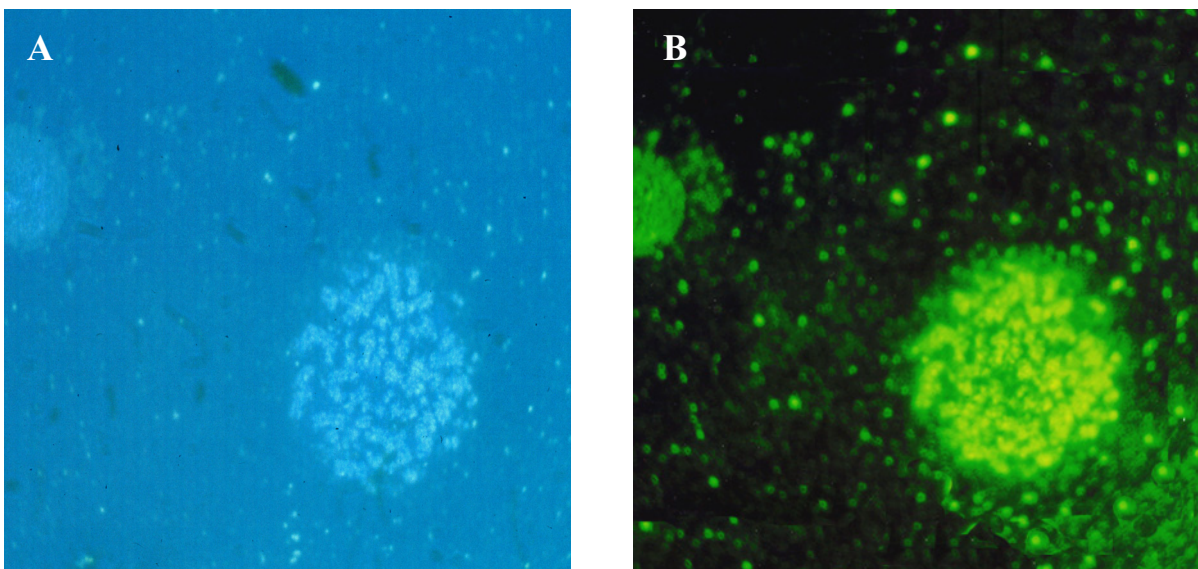


Abb. 15a und **b** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Metaphase der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der selbst hergestellten biotinylierten Sonde mit einer Länge von 1031bp. Die Stringenzwaschung erfolgte mit 60% FA, 2xSSC bei 43°C über 15min und anschließend mit 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C über 8min. Detektiert wurde mit Streptavidin-FITC. Es wurde 4x amplifiziert. Die Waschungen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für Abb. 15a wurde ein DAPI-Filter verwendet, der die mit DAPI gegengefärbte DNA sichtbar macht. Für Abb. 15b wurde ein FITC-Filter benutzt. Es sind keine spezifischen Signale zu erkennen. Die Chromosomen sowie die Double minutes zeigen eine unspezifische Fluoreszenzmarkierung.

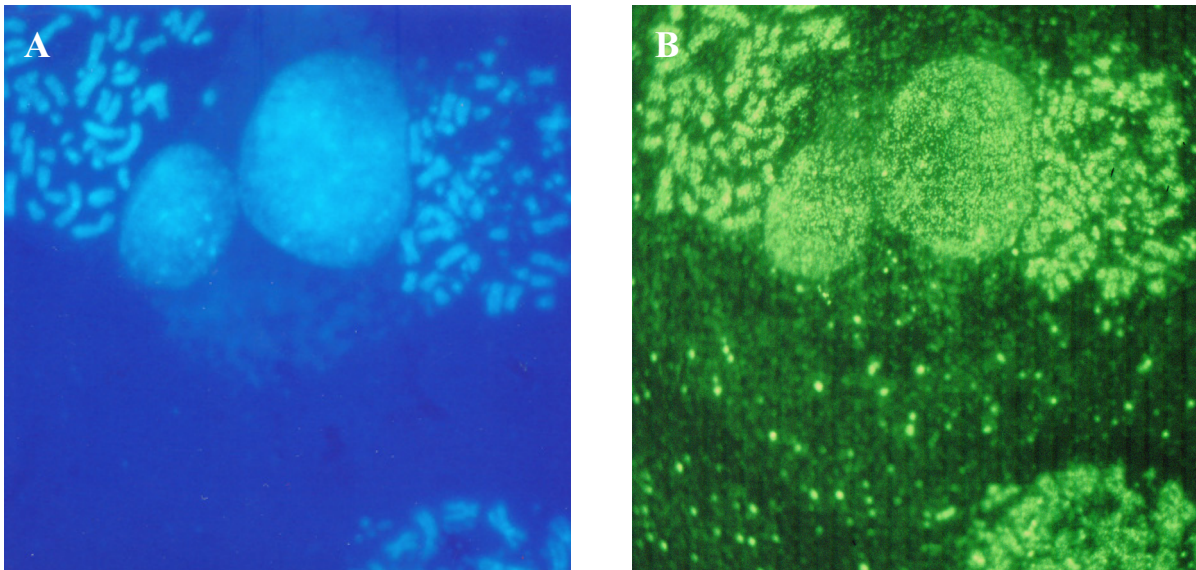


Abb. 16a und **b** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Metaphasen der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der selbst hergestellten biotinylierten Sonde mit einer Länge von 1031bp. Die Stringenzwaschung erfolgte mit 60% FA, 2xSSC bei 43°C über 15min und anschließend mit 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C über 8min. Detektiert wurde mit Streptavidin-FITC. Es wurde 4x amplifiziert. Die Waschungen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) wurden bei 42°C durchgeführt. Für Abb. 16a wurde ein DAPI-Filter verwendet, der die mit DAPI gegengefärbte DNA sichtbar macht. Für Abb. 16b wurde ein FITC-Filter benutzt. Es zeigen sich keine spezifischen Signale. Die Chromosomen sowie die Double minutes weisen eine unspezifische Fluoreszenzmarkierung auf.

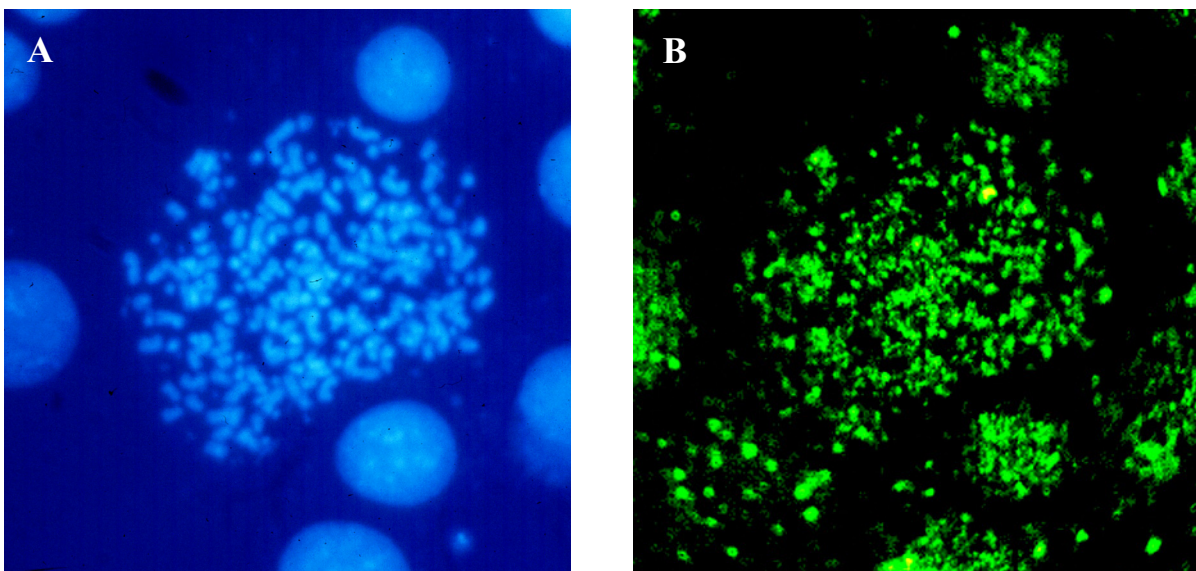


Abb. 17a und **b** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Metaphasen der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der selbst hergestellten biotinylierten Sonde mit einer Länge von 1031bp. Die Stringenzwaschung erfolgte mit 60% FA, 2xSSC bei 43°C über 15min und anschließend mit 2xSSC (pH 7,0) bei 37°C über 8min. Detektiert wurde mit Streptavidin-FITC. Es wurde 6x amplifiziert. Die Waschungen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für Abb. 17a wurde ein DAPI-Filter benutzt, der die mit DAPI gegengefärbte DNA sichtbar macht. Für Abb. 17b wurde ein FITC-Filter verwendet. Es lassen sich keine spezifischen Signale nachweisen. Die Chromosomen sowie die Double minutes zeigen eine unspezifische Fluoreszenzmarkierung.

4.2 Auswertung der FISH-Experimente mittels SNOM

Wie unter 3.4 (S.41) beschrieben, wurden die FISH-Experimente immer an mindestens zwei Präparaten parallel durchgeführt, d.h. die Auswertung der FISH-Experimente mittels SNOM erfolgte parallel zur Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop an einem gleich behandelten Referenzpräparat.

Zunächst sollte geklärt werden, ob das kommerziell erworbene SNOM zum Abbilden chromosomaler DNA geeignet ist oder ob Modifizierungen vorgenommen werden müssen.

Es zeigte sich, dass das vorliegende Setup nicht für die zu untersuchenden Proben geeignet war. Es mussten Veränderungen bei der Positionierung der SNOM-Spitze, der Detektionseinrichtung sowie der Abstandsregelung durchgeführt werden. Außerdem wurde eine Kammer zur Integration der SNOM-Bestandteile konstruiert, die im Verlauf der Experimente an die Veränderungen angepasst wurde. Auch waren einige sicherheitsrelevante Modifikationen nötig.

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob DNA-Sonden, die mit großen Zielsequenzen hybridisieren, im topographischen und optischen Modus dargestellt werden können und ob die Modi korrelieren, wurde initial eine Zentromersonde gegen Chromosom 1 und später ein Sondenmix gegen alle Zentromere benutzt.

4.2.1 Zentromersonde gegen Chromosom 1

Abb. 18a zeigt eine topographische, Abb. 18b eine optische Aufnahme von Chromosom 1 nach einer FISH mit der zentromerspezifischen Sonde gegen Chromosom 1. Es wurde 1x amplifiziert, die Stringenzwaschung erfolgte mit 60% Formamid. Chromosom 1 ist als eine annähernd zirkuläre Struktur mit der zentralen „Aufhellung“ in Abb. 18a zu erkennen. Helligkeitszunahmen in den topographischen Aufnahmen weisen auf einen Höhenanstieg hin. Die „Aufhellung“ in Abb. 18a kommt durch die Anlagerung der Zentromersonde zustande.

Auf der optischen Aufnahme in Abb. 18b ist das FITC-Fluoreszenzsignal der Sonde sichtbar. Es weist dort die höchste Intensität auf, wo sich in der topographischen Aufnahme die „Aufhellung“ befindet, nämlich im Zentromerbereich. Der Vergleich beider Aufnahmen zeigt, dass sie miteinander korrelieren. Daher kann die Aufhellung auf der topographischen Aufnahme sicher als angelagerte Sondenmoleküle

identifiziert und das Fluoreszenzsignal auf der optischen Aufnahme dem Zentromer zugeordnet werden.

Die anderen Signale liegen an Orten, gegen die nicht hybridisiert wurde, und stammen wahrscheinlich von verbliebenen Farbstoffmolekülen oder unspezifisch gebundenen Sondenmolekülen.

Nur auf den beiden Chromosomen 1 dieser Mitose waren spezifische Zentromersignale (Pfeile) zu sehen, auf den anderen Chromosomen - wie erwartet - keine (nicht gezeigt).

Abb. 18a und b haben eine Scangröße von jeweils $7,3\mu\text{m} \times 7,3\mu\text{m}$ bei einer Pixelauflösung von 500×500 . Die Entfernung der einzelnen Rasterpunkte beträgt ca. 14nm . Für beide Aufnahmen wurde eine FWHM-Auflösung von weniger als 100nm erreicht. Das Anfertigen der Bilder dauerte ca. 42min .

Abb. 18c und 18d zeigen eine andere Perspektive. Im Vergleich zur Abb. 18a sind in der topographischen Abb. 18c zwei Erhöhungen im Zentromerbereich zu erkennen und die Schwesterchromatiden kommen besser zur Darstellung. In Korrelation zu den zwei Erhöhungen im Zentromerbereich sind in Abb. 18d zwei starke Fluoreszenzsignale zu sehen (Pfeile).

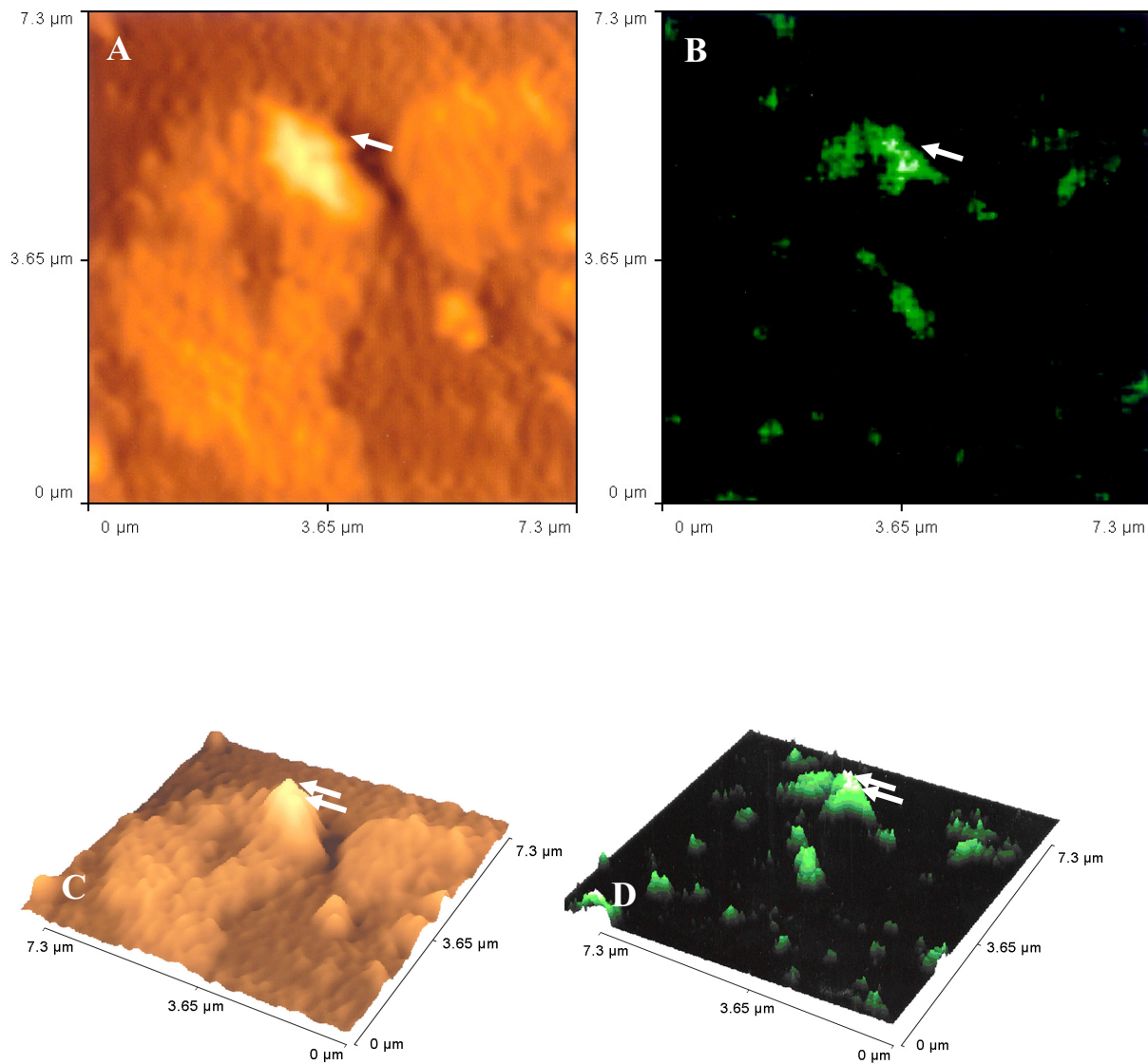


Abb. 18a-d zeigen SNOM-Aufnahmen von Chromosom 1 nach einer FISH mit der biotinylierten Zentromersonde gegen Chromosom 1, die mit Streptavidin-FITC detektiert wurde. Abb. 18a und c stellen die topographische, 18b und d die optische Aufnahme dar. Die zentrale „Aufhellung“ in 18a und c entspricht der am Zentromer gebundenen Sonde. Abb. 18b und d zeigen das FITC-Signal. Bei den anderen Signalen handelt es sich wahrscheinlich um verbliebene Farbstoffmoleküle. Abb. 18c und d repräsentieren eine andere Perspektive, die zwei Signale im Zentromerbereich erkennen lässt.

Neben den Erhöhungen im Zentromerbereich war in anderen SNOM-Aufnahmen oftmals eine weitere, zwischen den Chromatiden verlaufende Erhöhung zu sehen, die mittels konventioneller Mikroskopie nicht nachzuweisen war (Abb. 19).

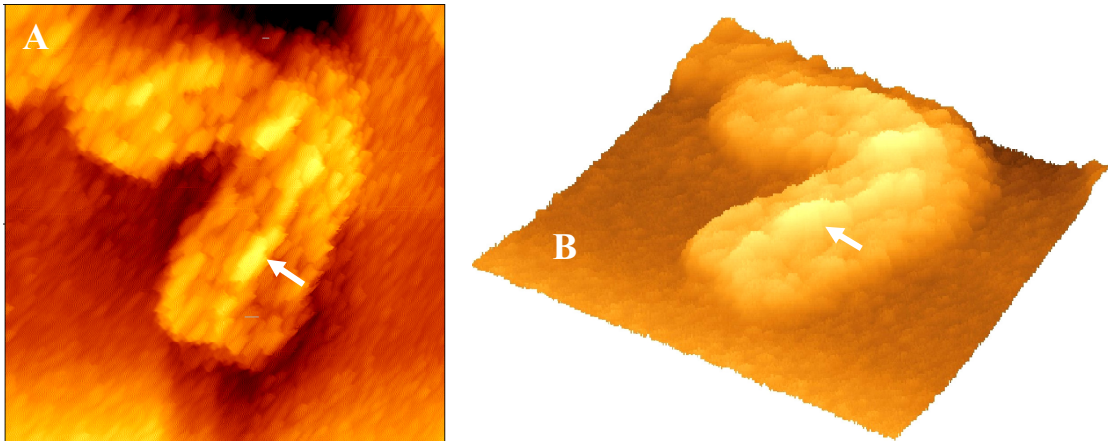


Abb. 19a stellt eine topographische Aufnahme von Chromosom 1 dar. Außer den Erhöhungen im Zentromerbereich verläuft zwischen den Chromatiden eine weitere Erhöhung (Pfeil), die in **19b** durch eine andere Perspektive besser zur Darstellung kommt.

Beim Suchen nach Chromosom 1 wurden im Rahmen der Scans auch topographische Aufnahmen von Kernen erstellt.

Abb. 20a zeigt eine topographische Aufnahme eines Kerns und mehrerer Chromosomen. Abb. 20b zeigt einen anderen Kern, der 4 größere und eine kleinere Aufhellung aufweist. Eine andere perspektivische Darstellung (Abb. 20c) lässt erkennen, dass diese Strukturen entweder aus dem Kern herausragen oder aufgelagert sind.

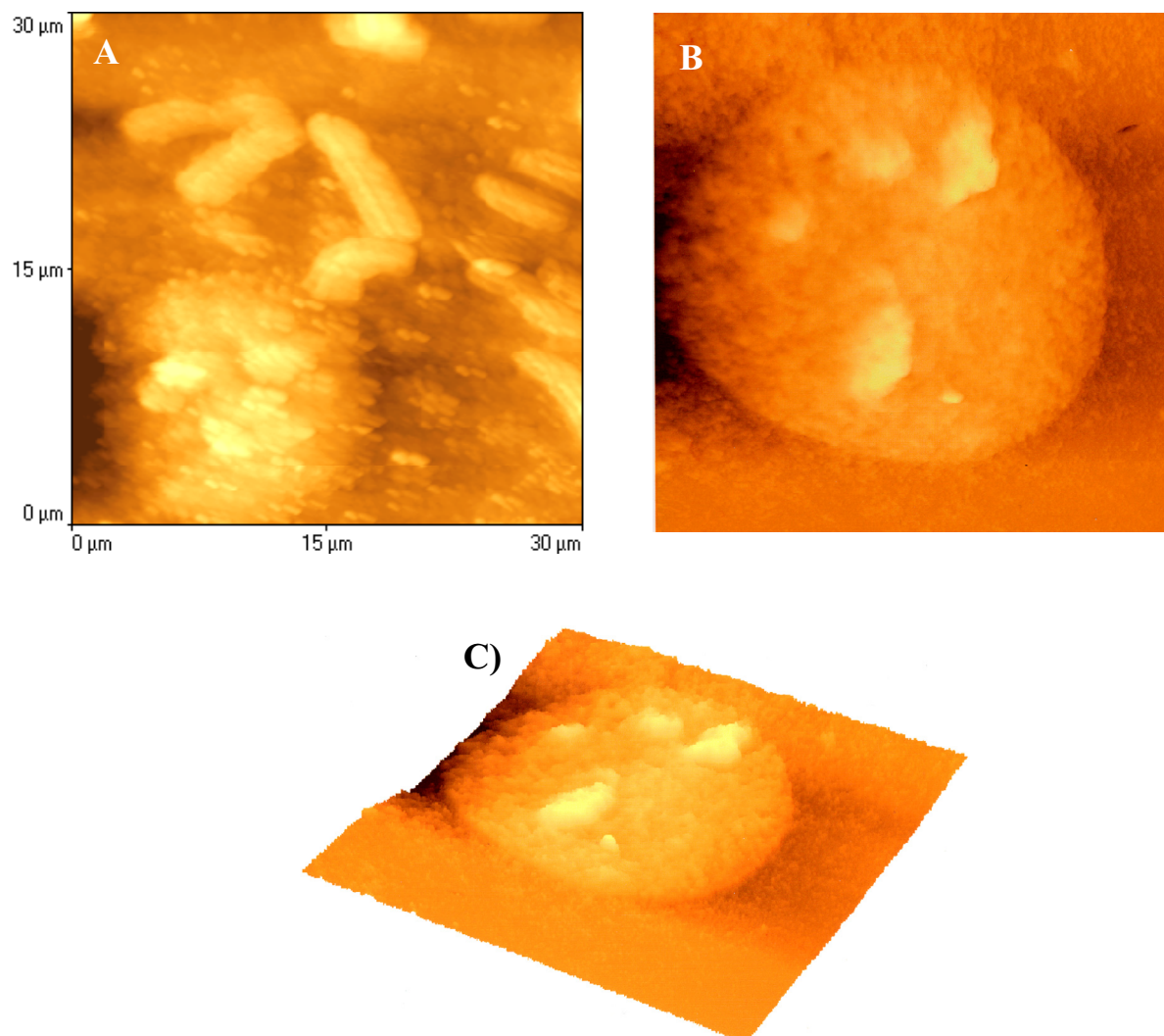


Abb. 20a zeigt eine topographische Aufnahme eines Kerns sowie mehrerer Chromosomen. **Abb. 20b** und **20c** zeigen unterschiedliche Perspektiven einer topographischen Aufnahme eines anderen Kerns. Es sind 4 größere und eine kleinere Aufhellung zu sehen.

4.2.2 Sondenmix gegen alle Zentromere

In Abb. 21a-e ist ein Ausschnitt einer Mitose abgebildet. Es sind insgesamt 11 Chromosomen zu erkennen, gegen die mit dem für alle Zentromere spezifischen Sondenmix hybridisiert wurde. Es wurde eine Amplifikation durchgeführt. Abb. 21a ist die topographische, 21b die optische Aufnahme. Abb. 21c zeigt die Mitose in einer anderen Perspektive. In Abb. 21d sind nur die FITC-Fluoreszenzsignale herausgearbeitet. Die Übereinanderprojektion in Abb. 21e verdeutlicht, dass auf 8 der 11 Chromosomen Signale im Zentromerbereich sichtbar sind. Hierbei können mit dem SNOM auch wenig intensive FITC-Signale nachgewiesen werden. Auf einigen Chromosomen sind die Fluoreszenzsignale in 2 oder sogar mehrere kleine Teile aufgetrennt. Drei Chromosomen weisen kein Signal auf, wobei das Zentromer des Chromosoms, das sich in der Mitte des linken Bildrandes befindet, außerhalb des hier gescannten Bereichs zu liegen scheint.

Die Bilder haben ein Scangröße von je $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ bei einer Pixelauflösung von 500×500 . Die einzelnen Rasterpunkte liegen 50nm voneinander entfernt. Auch hier wurde eine FWHM-Auflösung von weniger als 100nm erzielt. Die Aufnahmedauer betrug ca. 42min .

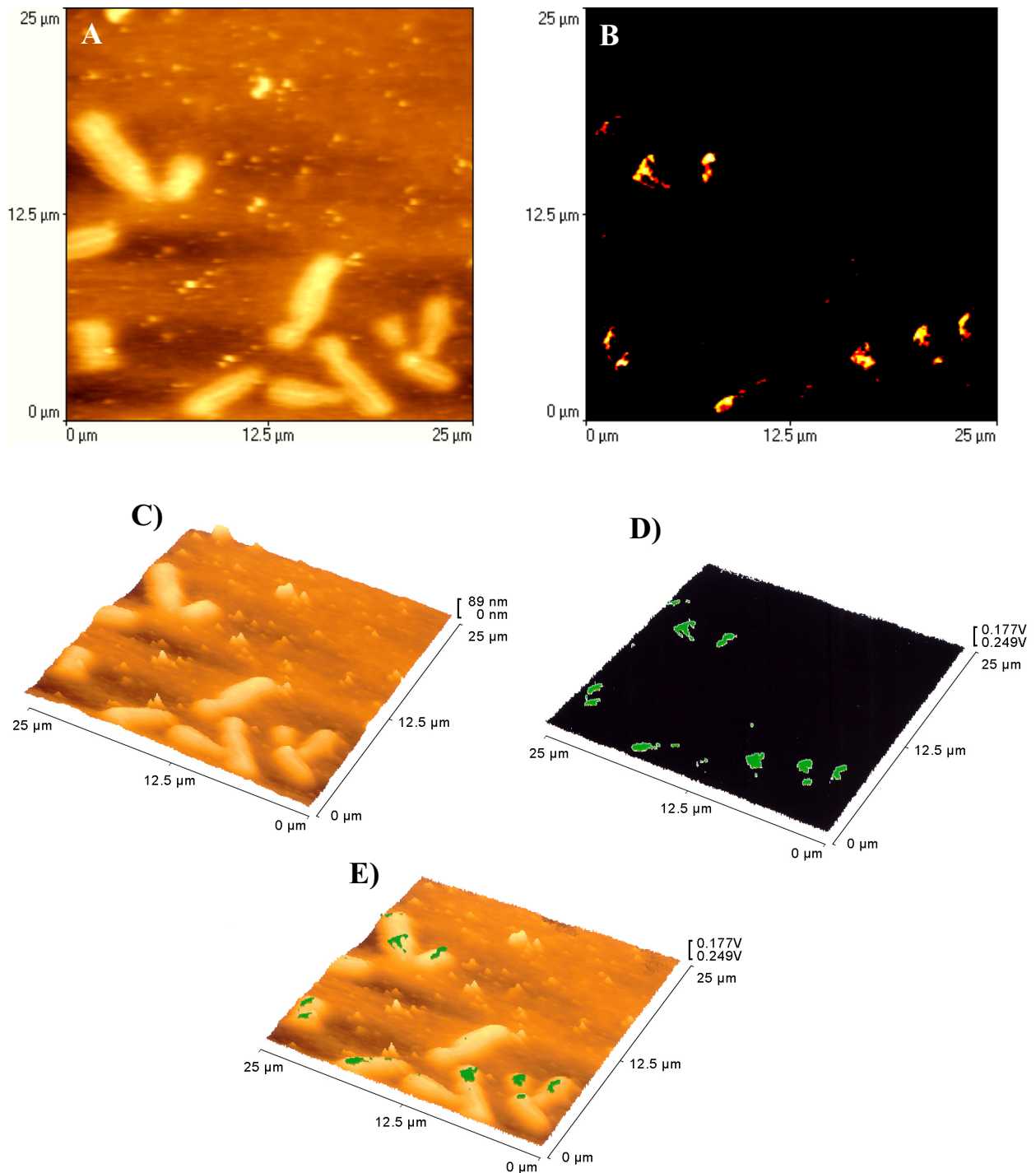


Abb. 21a-e zeigen SNOM-Aufnahmen eines Mitoseausschnitts mit insgesamt 11 Chromosomen. Es wurde eine FISH mit dem für alle Zentromere spezifischen biotinylierten Sondenmix durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit Streptavidin-FITC.

Abb. 21a stellt die topographische, 21b die optische Aufnahme dar. Abb. 21c zeigt die Mitose in einer anderen Perspektive. In Abb. 21d sind nur die Fluoreszenzsignale herausgearbeitet. In der Übereinanderprojektion in Abb. 21e weisen 8 der 11 Chromosomen Signale im Zentromerbereich auf. Einige dieser Signale sind in 2 oder sogar mehrere kleine Teile aufgetrennt. 3 Chromosomen weisen kein Signal auf, wobei das Zentromer des Chromosoms, das sich in der Mitte des linken Bildrandes befindet, außerhalb des hier gescannten Bereichs zu liegen scheint.

Insgesamt konnte anhand der Versuche mit der Zentromersonde gegen Chromosom 1 und dem Sondenmix gegen alle Zentromere gezeigt werden, dass mit dem modifizierten SNOM DNA-Sonden, die mit großen Zielsequenzen von mehreren hundert kb bis ca. 5Mb hybridisieren, optisch und topographisch dargestellt werden können. Außerdem konnte demonstriert werden, dass beide Modi korrelieren und reproduzierbares Arbeiten möglich ist.

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob auch DNA-Sonden, die mit einer mittelgroßen Zielsequenz hybridisieren, topographisch und optisch dargestellt werden können und ob die Modi korrelieren. Hierfür wurde eine c-myc-Sonde eingesetzt.

4.2.3 c-myc-Sonde

Abb. 22 zeigt Chromosomen der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der c-myc-Sonde. Es wurde 1x amplifiziert. Bei den auf der topographischen Aufnahme in Abb. 22a zwischen den Chromosomen liegenden kleineren Strukturen handelt es sich um Double minutes (Pfeil). Fluoreszenzsignale befinden sich sowohl auf den Chromosomen als auch auf den Double minutes (Abb. 22b). Die Bilder haben eine Scangröße von je $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$. Bei einer Pixelauflösung von 500×500 beträgt die Entfernung der einzelnen Rasterpunkte 50nm . Es wurde eine FWHM-Auflösung von weniger als 100nm erzielt. Die Aufnahmedauer betrug ca. 42min .

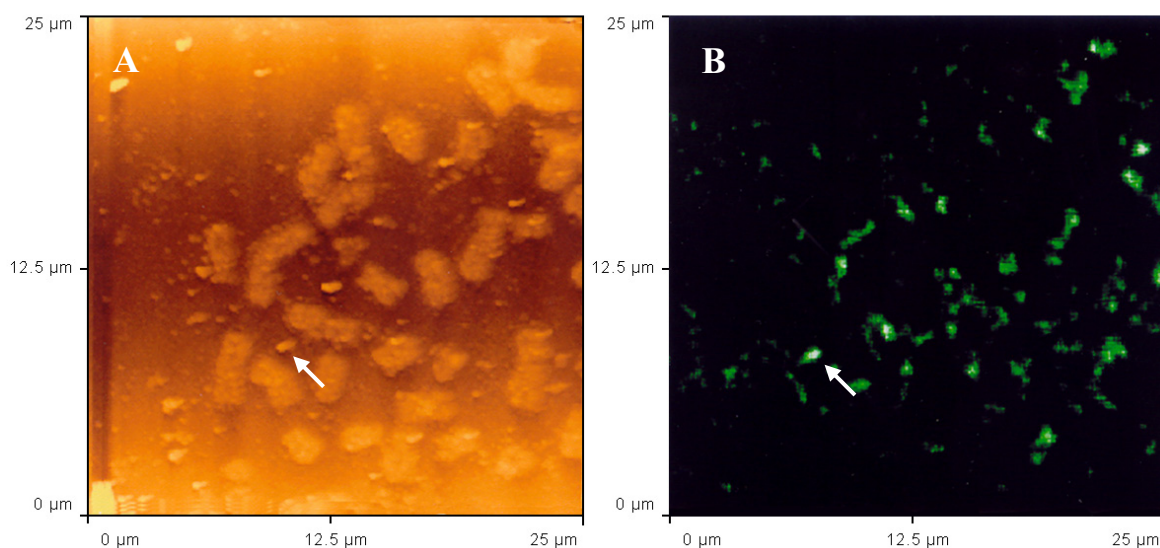


Abb. 22a und **b** zeigen SNOM-Aufnahmen von Chromosomen der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der digoxigenierten c-myc-Sonde. Die Detektion erfolgte mit einem FITC-markierten Anti-Digoxigenin-Antikörper. Auf der topographischen Aufnahme in 22a sind Double minutes (Pfeil) zu erkennen. Fluoreszenzsignale befinden sich in Abb. 22b sowohl auf den Chromosomen als auch auf den Double minutes.

Die Versuche mit der c-myc-Sonde belegen, dass das modifizierte SNOM für die topographische und optische Darstellung von DNA-Sonden, die mit einer mittelgroßen Zielsequenz von 80kb hybridisieren, geeignet ist und dass auch hier die beiden Modi korrelieren.

Im Folgenden wurden die FISH-Experimente mit den mittels PCR hergestellten Sonden untersucht. Mit Hilfe dieser Sonden sollte überprüft werden, ob mit dem SNOM Zielsequenzen dargestellt werden können, die mit dem Fluoreszenzmikroskop nicht sichtbar sind. Gleichzeitig sollte die untere Nachweisgrenze des SNOM bestimmt werden.

4.2.4 Mittels PCR hergestellte Sonden der Länge 1031, 718, 485, 243bp

Weder auf den Double minutes noch auf den Chromosomen waren spezifische Signale zu erkennen. Amplifikationsrunden bei der FISH führten zu einer Zunahme der unspezifischen Signale und damit zu einem verstärkten Signalrauschen, welches die Auswertung erschwerte. Spezifische Signale ließen sich jedoch weder optisch noch topographisch nachweisen.

Abb. 23 zeigt exemplarisch Chromosomen und Double minutes (Pfeile) der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der mittels PCR hergestellten Sonde der Länge 1031bp. Es wurde nicht amplifiziert. Die Chromosomen kommen auf der topographischen Aufnahme (Abb. 23a) unscharf zur Darstellung. Ursächlich hierfür ist die Einstellung der Regelparameter. Diese waren hier so eingestellt, dass die SNOM-Spitze der weniger hohen Topographie der Double minutes besser folgte. Da sich die Zielsequenz in x-facher Amplifikation auf den Double minutes befindet, waren dort am ehesten Signale zu erwarten. Die optische Aufnahme (Abb. 23b) zeigt ein Hintergrundrauschen und lässt keine spezifischen Signale erkennen. Die Auswertung der FISH-Experimente mit den kleineren Sonden ergab keine relevanten Unterschiede, weshalb auf eine Darstellung verzichtet wurde. Somit konnten mit dem SNOM Zielsequenzen, die mit dem Fluoreszenzmikroskop nicht darstellbar sind, ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie konnte folglich nicht belegt werden. Die eigentliche untere Nachweisgrenze des SNOM kann aufgrund des Größensprungs zwischen der mittelgroßen Zielsequenz der c-myc-Sonde von 80kb und den kleinen Zielsequenzen der mittels PCR hergestellten Sonden nicht sicher angegeben werden.

Die Bilder haben eine Scangröße von je $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. Die Auflösung beträgt 500×500 Pixel, die Entfernung der einzelnen Rasterpunkte 20nm . Die FWHM-Auflösung lag unter 100nm . Das Scannen der Bilder dauerte ca. 42min .

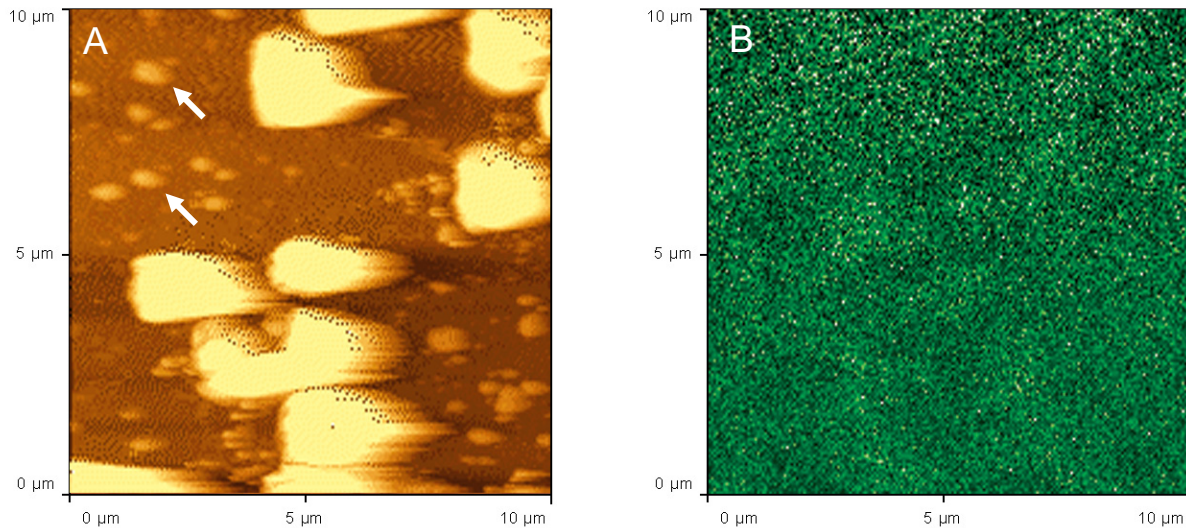


Abb. 23a zeigt eine topographische, **Abb. 23b** eine optische SNOM-Aufnahme von Chromosomen und Double minutes (Pfeile) der Zelllinie Colo 320 DM nach einer FISH mit der mittels PCR hergestellten biotinylierten Sonde der Länge 1031bp . Die Detektion erfolgte mit Streptavidin-FITC. Es wurde nicht amplifiziert. Die Chromosomen kommen in Abb. 23a wegen der Einstellung der Regelparameter unscharf zur Darstellung. Spezifische Signale sind weder auf der topographischen Aufnahme noch auf der optischen, die ein Hintergrundrauschen zeigt, zu erkennen.

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Manipulation/Extraktion chromosomaler DNA mit dem modifizierten SNOM möglich ist.

4.2.5 Manipulation/Extraktion chromosomaler DNA

Zur Festlegung der Manipulationsmuster wurden Erfahrungen aus der Rasterkraftmikroskopie auf das SNOM übertragen. Durch eine vertikale Bewegung wurde die SNOM-Spitze in das Chromosom eingetaucht. Ein derart manipuliertes Chromosom ist in Abb. 24a zu sehen. Abb. 24b stellt den Bereich der Indentation vergrößert dar. Der topographische Querschnitt (vgl. Linie in Abb. 24b) verdeutlicht die Tiefe des Loches von ca. 80nm und seinen Durchmesser von ca. 250nm (Abb. 24c).

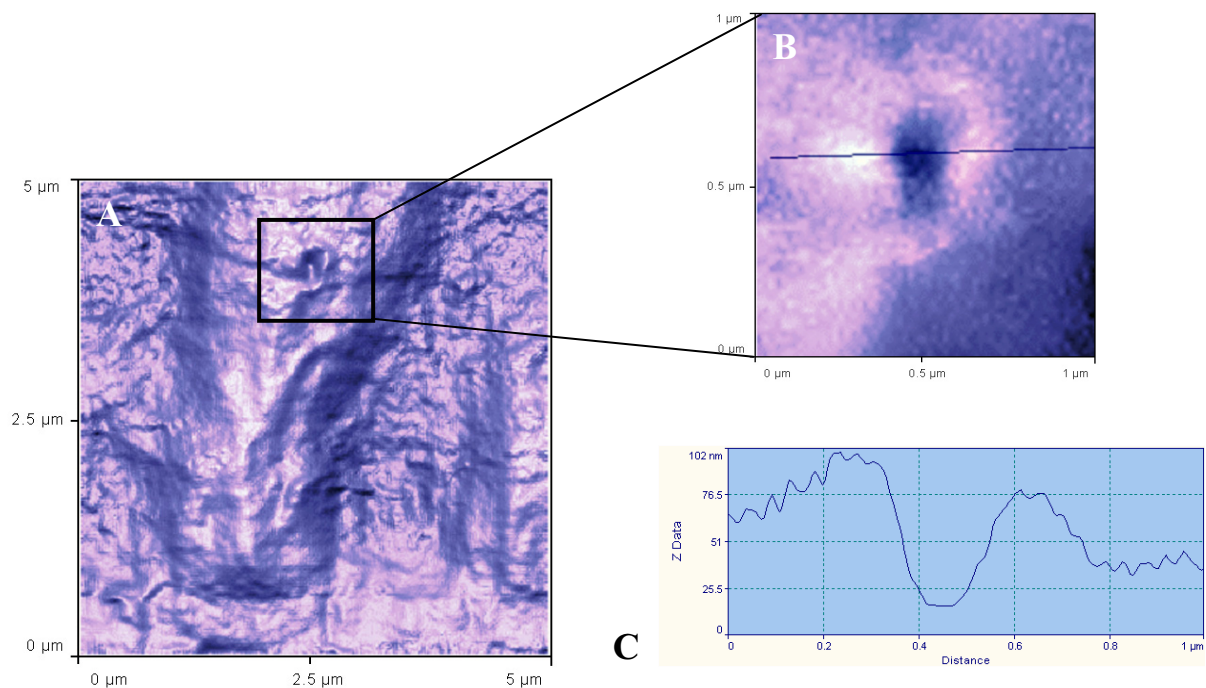


Abb. 24a zeigt ein Chromosom (Kantenlänge 4 μm), welches mit der SNOM-Sonde manipuliert wurde, **Abb. 24b** zeigt die Ausschnittsvergrößerung. Auf **Abb. 24c** sind die Abmessungen der Indentation zu erkennen (Tiefe ca. 80nm, Durchmesser ca. 250nm).

Eine andere Möglichkeit der Manipulation besteht darin, statt einer Vertikalbewegung eine Horizontalbewegung mit der Spitze durchzuführen, was in Abb. 25 dargestellt ist.

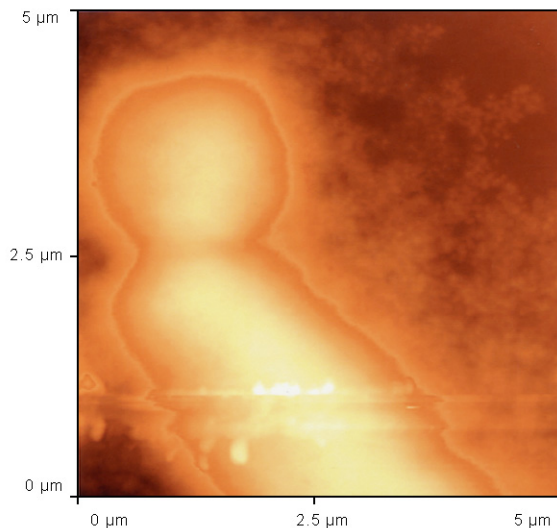


Abb. 25 zeigt ein mittels SNOM-Spitze manipuliertes Chromosom.

Um zu überprüfen, ob DNA an der Spitze haften geblieben war, wurde diese mittels REM untersucht. Die REM zeigte hauptsächlich Veränderungen der Aluminiumbeschichtung, meistens in Form einer Absplitterung, wodurch die Identifikation verbliebener DNA unmöglich wurde. Der Versuch, die DNA mittels DOP-PCR nachzuweisen, war ebenfalls nicht erfolgreich. Bisher konnte der Beweis, dass die Extraktion chromosomaler DNA gelungen war, nicht erbracht werden.

4.3 Vergleich der Auswertungen der FISH-Experimente mittels Fluoreszenzmikroskopie und mittels SNOM

Initial zeigte sich, dass das kommerziell erworbene SNOM sich nicht für das Abbilden chromosomaler DNA und die Auswertung von FISH-Experimenten eignete. Durch Veränderungen am Setup gelang es, das SNOM so umzubauen, dass ein reproduzierbares Arbeiten möglich wurde. Zwar blieb die Handhabung des SNOM im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie erschwert, jedoch wurde eine Auflösungsverbesserung erzielt und eine Auflösung $<100\text{nm}$ möglich. Im Laufe der Versuche stellte sich heraus, dass vergleichende Untersuchungen nicht an denselben Chromosomenpräparaten vorgenommen werden konnten, da die Präparate nach der Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop für eine Auswertung mittels SNOM unbrauchbar wurden. Die in der folgenden Tabelle aufgelisteten und gegenübergestellten Ergebnisse beruhen daher auf der Untersuchung von Präparaten, die aus derselben Präparationsserie stammen.

Tabelle 5: Vergleich der Auswertungen der FISH-Experimente mittels Fluoreszenzmikroskopie und mittels SNOM

	Fluoreszenzmikroskopie	SNOM
Zentromersonde gegen Chromosom 1	immer ein Signal im Zentromerbereich	immer zwei Signale im Zentromerbereich
Sondenmix gegen alle Zentromere	ca. 25-35 Zentromere markiert	ca. 25-35 Zentromere markiert einzelne Signale in 2 oder mehrere kleine Teile aufgetrennt
c-myc-Sonde	Signale auf 8q24 sowie anderen Chromosomen und auf den Double minutes	Signale auf 8q24 sowie anderen Chromosomen und auf den Double minutes
mittels PCR hergestellte Sonden der Länge 1031, 718, 485, 243bp	keine spezifischen Signale	keine spezifischen Signale
Topographie	nicht möglich	möglich korreliert mit der optischen Darstellung und liefert zusätzliche Informationen
Manipulation chromosomaler DNA	nicht möglich	möglich
Extraktion chromosomaler DNA	nicht möglich	noch nicht gezeigt

5. Diskussion

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 Probenherstellung

Die Herstellung geeigneter Metaphasechromosomen war die Grundlage für die nachfolgenden FISH-Experimente und deren Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop und mit dem SNOM.

Die Metaphasechromosomen sollten eine gute Spreitung besitzen, da bei schlechter Spreitung durch übereinander liegende Chromosomen Signale verdeckt würden oder nur schwer zuzuordnen wären. Daher wurden beim Auftropfen verschiedene Bedingungen getestet. Es wurden sowohl unbehandelte Objektträger als auch solche, die über Nacht in -20°C kalten 50%igen Alkohol gestellt wurden, verwendet. Damit sollten die Objektträger zusätzlich entfettet werden, um die Hintergrundfluoreszenz bei der FISH zu reduzieren. Als Unterlage für die Objektträger wurden beim Auftropfen trockene und nasse Papiertücher erprobt. Die Nässe sollte die Spreitung der Chromosomen begünstigen. Aufgetropft wurde aus niedriger (20-30cm) und großer Höhe (ca. 150cm). Pipettenspitzen aus Plastik und Glas wurden eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass sich nur die Höhe, aus der aufgetropft wurde, auf die Qualität der Spreitung auswirkte. Die beste Spreitung wurde bei der größten Höhe erreicht, weshalb diese Bedingung für das Auftropfen übernommen wurde. Die anderen Versuchsvariationen lieferten keine Unterschiede. Für die Auswertung mittels SNOM spielte vor allem die Anzahl bzw. Dichte der Mitosen eine entscheidende Rolle, da das SNOM keine Übersichtsdarstellung bietet und das Auffinden der Mitosen erschwert ist. Ziel war es daher, eine hohe Anzahl/Dichte an Mitosen zu erhalten, um das Auffinden zu erleichtern und damit das Ausbleichen der Fluoreszenzsignale zu minimieren. Gerade im Hinblick darauf, möglichst kleine Sonden zu detektieren, kommt dem raschen Auffinden der untersuchenden Strukturen eine große Bedeutung zu.

Um eine hohe Anzahl an Mitosen zu erhalten, musste zunächst die Colcemidzeit optimiert werden. Je länger die Einwirkzeit war, umso mehr Metaphasen lagen vor. Gleichzeitig erhöhte sich aber die Zahl der Mitosen, deren Chromosomen einen höheren Kondensationsgrad aufwiesen, was ein gedrungenes Erscheinungsbild der Chromosomen zur Folge hatte. Dadurch wurde die mikroskopische Beurteilung der

FISH-Experimente schwieriger. Bei der Chromosomenpräparation aus menschlichen Blutlymphozyten wurde das beste Ergebnis mit einer Colcemidzeit von 30min, bei der Chromosomenpräparation aus der Zelllinie Colo 320 DM mit einer Zeit von 3h15min erreicht. Diese Zeiten wurden daher bei den anschließenden Präparationen gewählt. Auch die Hypotoniebehandlung hatte Einfluss auf die Anzahl/Dichte der Mitosen. War die Hypotoniezeit zu lang, resultierte das vorzeitige Zerplatzen der Zellen und folglich eine zu geringe Anzahl/Dichte der Mitosen; war sie zu kurz, lagen die Mitosen noch in ihren Hüllen. Diese erschwerten einerseits das Vordringen der Sonde zu den Chromosomen und verursachten andererseits einen stärkeren „Hintergrund“, was sich letztlich negativ auf die Qualität der FISH-Präparate auswirkte. Bei der Chromosomenpräparation aus menschlichen Blutlymphozyten zeigte sich, dass mit einer Hypotoniezeit von 7min das beste Ergebnis erzielt wurde, bei der Chromosomenpräparation aus der Zelllinie Colo 320 DM mit einer Zeit von 12min. Letztlich konnte die Dichte der Mitosen durch Zentrifugieren und Verringerung der Fixansmenge bzw. durch Hinzugabe von Fixans und Resuspendieren des Pellets optimiert werden.

5.1.2 PCR

Mit der PCR wurden Sonden hergestellt, die mit Zielsequenzen hybridisieren, die deutlich kleiner als die Zielsequenzen der Zentromersonde gegen Chromosom 1, des Sondenmix gegen alle Zentromere und der c-myc-Sonde sind. Durch immer kleiner werdende Zielsequenzen sollte überprüft werden, ob mit dem SNOM Zielsequenzen dargestellt werden können, die kleiner als die bislang mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie nachweisbaren sind, und wo die untere Nachweisgrenze des SNOM liegt. Hierfür wurden Primerpaare verwendet, die PCR-Produkte mit einer Länge von 1031, 718, 485 und 243bp liefern sollten. Um spezifische PCR-Produkte zu erhalten, musste zunächst die Annealingtemperatur, später die Menge an Primer und DNA optimiert werden. Beim Finden der Annealingtemperatur war ein Thermocycler hilfreich, der die Einstellung eines Temperaturgradienten erlaubte. Zur Optimierung der Menge an Primer und DNA wurden verschiedene Mastermixe (s. 3.2.2.3, S.26) hergestellt. Die Auswertung mittels Gelelektrophorese ergab, dass alle Mastermixe für alle Primerpaare PCR-Produkte der erwarteten Größe lieferten. Mastermix 2 zeigte die schärfsten Banden, d.h. die wenigsten unspezifischen Produkte, und wurde deshalb für die nachfolgenden PCR übernommen.

5.1.3 FISH

Bei den anschließenden FISH-Experimenten musste für jede Sonde die geeignete Versuchsbedingung ermittelt werden. Die Bedingungen der einzelnen Versuchsabschnitte (Chromosomen-Vorbehandlung, Nachfixierung, Denaturierung, Hybridisierung, Stringenzwaschung, Detektion, Waschung, Amplifikation) wurden hierfür - wie in Material und Methode beschrieben – variiert.

5.1.3.1 Zentromersonde gegen Chromosom 1

Die FISH mit der zentromerspezifischen Sonde gegen Chromosom 1 zeigte unspezifische Signale (s. Abb. 8, S.50). Durch Erhöhung des Formamidanteils von 50% auf 60% bei der Stringenzwaschung konnten die unspezifischen Signale deutlich reduziert, teilweise sogar ganz vermieden werden (s. Abb. 9, S.50).

5.1.3.2. Sondenmix gegen alle Zentromere

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der FISH zeigte, dass sich nicht auf allen Zentromeren Signale nachweisen ließen. Daher wurden - wie unter Material und Methoden beschrieben (s. 3.3.2.1, S.36 und 3.3.2.2, S.39) - bei der Denaturierung, der Hybridisierung, der Stringenzwaschung, der Detektion und der Amplifikation verschiedenste Bedingungen ausgetestet. Trotz all dieser Veränderungen gelang es nicht, alle Zentromere zu markieren. Die Anzahl der markierten Zentromere schwankte zwischen 25-35.

Hierfür können folgende Gründe in Frage kommen:

Einerseits ist nicht auszuschließen, dass die optimalen FISH-Bedingungen nicht gefunden wurden. Andererseits könnte der benutzte Sondenmix, der mit α -Satelliten-DNA hybridisiert, selbst ursächlich sein. Zwar ist α -Satelliten-DNA die häufigste Form repetitiver DNA in Zentromeren und kommt in jedem menschlichen Zentromer vor (WARBURTON, WILLARD, 1996), jedoch kann die Kopienzahl individuell beträchtlich variieren (YUROV et al., 1987). Im Zentromerbereich von Chromosom X beispielsweise finden sich Variationen zwischen 1,38Mb und 3,73Mb (MAHTANI, WILLARD, 1990), im Zentromerbereich von Chromosom 16 zwischen 430kb und 2Mb (GREIG et al., 1989; WEVRICK, WILLARD, 1989). Eine extreme Reduktion von α -Satelliten-DNA könnte in einem sehr schwachen bzw. nicht mehr nachweisbaren Fluoreszenzsignal resultieren, was für das Zentromer von Chromosom 21 (MIZUNOE, YOUNG, 1992; WEIER, GRAY, 1992; BOSSUYT et al.,

1995; LO et al., 1999) und für das Zentromer von Chromosom 22 (LIEHR et al., 1998) beschrieben ist.

Obwohl sich nicht alle Zentromere markieren ließen, konnte mit dem Sondenmix im Vergleich zur Zentromersonde gegen Chromosom 1 ein Fortschritt erzielt werden, da die höhere Anzahl markierter Zentromere das Auffinden eines Fluoreszenzsignals mittels SNOM erleichterte und damit das Ausbleichen verringerte.

5.1.3.3 c-myc-Sonde

Die FISH-Experimente mit der c-myc-Sonde zeigten Signale, die sowohl auf Chromosomen als auch auf den außerhalb der Chromosomen gelegenen Double minutes lagen (s. Abb. 11, S.52). Bei den Double minutes handelt es sich um extrachromosomale, paarweise vorliegende Chromatinfragmente, die in Größe und Anzahl pro Zelle stark variieren. Sie enthalten zirkuläre DNA aus meist mehreren Kopien der amplifizierten Sequenz und werden bei Zellteilungen als azentrische Elemente zufällig verteilt. Double minutes sind bei der menschlichen Promyeloidzelllinie HL-60 (COLLINS, GROUDINE, 1982; DALLA-FAVERA et al., 1982), akuter myeloischer Leukämie (OHYASHIKI et al., 1987) sowie zahlreichen soliden Tumoren (BIGNER et al., 1990; BLOCK et al., 1999) beschrieben und scheinen mit einer schlechteren Prognose einherzugehen. Die Signale auf den Double minutes der Zelllinie Colo 320 DM waren zu erwarten, da c-myc amplifiziert auf den Double minutes vorliegt (ALITALO et al., 1983).

Ferner sollten sich Signale auf dem Genlocus 8q24 zeigen. Jedoch waren in allen Versuchen immer mehrere Signale zu sehen, die sich außerhalb des Genlocus befanden. In der Literatur finden sich zwar Hinweise, dass c-myc auch auf Chromosom 9, 10 und 18 vorkommen kann (GOLOVLEVA et al., 2002), allerdings werden diese Amplifikationen nicht bei einer Zelllinie Colo 320 DM, sondern bei Zellen einer akuten myeloischen Leukämie beschrieben und die Amplifikationen liegen als homogen gefärbte Chromosomenregionen (homogeneously staining regions, HSRs) vor. HSRs stellen ausgedehnte intrachromosomale Chromosomensegmente dar, die zahlreiche, nacheinander angeordnete Kopien der amplifizierten DNA-Sequenz enthalten. Die auf den Chromosomen der Zelllinie Colo 320 DM zu beobachtenden Signale imponierten jedoch nicht als HSRs. Außerdem treten HSRs und Double minutes in der Regel nicht zusammen auf, wobei aber auch ein gleichzeitiges Auftreten bei einem Neuroblastom beschrieben ist (YOSHIMOTO et al., 1999). Da es sich bei c-myc um ein Onkogen handelt und Onkogene oft in

amplifizierter Form vorkommen, sind Amplifikationen auf anderen Chromosomen der Zelllinie Colo 320 DM prinzipiell denkbar, obwohl es in der Literatur diesbezüglich bislang keine Anhaltspunkte gibt. Letztlich kann nicht sicher beantwortet werden, ob die außerhalb des Genlocus 8q24 gelegenen Signale ebenfalls Amplifikationen von c-myc oder unspezifische Signale sind.

5.1.3.4 Mittels PCR hergestellte Sonden der Länge 1031, 718, 485, 243bp

Die mittels PCR hergestellten Sonden waren kleiner als das von SCHERTHAN et al. (1992) nach einmaliger Amplifikation noch nachweisbare single-copy Plasmid (3,65kb), so dass davon ausgegangen werden musste, dass die Sonden ohne Amplifikation mit dem Fluoreszenzmikroskop nicht zu detektieren sind. Da die Sonden jedoch mit Zielsequenzen auf dem c-myc Gen hybridisieren, welches amplifiziert auf den Double minutes der Zelllinie Colo 320 DM (ALITALO et al., 1983) vorliegt, wurde zunächst auf eine Amplifikationsrunde verzichtet. Keine Sonde lieferte spezifische Signale. Trotz vielfältiger Veränderungen bei der Stringenzwaschung und den Waschungen mit 4xSSC-Tween 20 (0,05%) ließen sich letztlich auch nach mehrfachen Amplifikationsrunden (max. 6) keine spezifischen Signale erkennen. Die Auswertbarkeit war dabei durch eine mit den Amplifikationsrunden steigende Anzahl unspezifischer Signale bzw. eine unspezifische Hintergrundmarkierung, welche bei Tumorzelllinien aufgrund eines vermehrten Proteindetritus häufig beobachtet wird, eingeschränkt.

5.1.4 SNOM

Bei der Auswertung der FISH-Experimente mittels SNOM zeigte sich, dass das schnelle Auffinden der zu untersuchenden Strukturen ein großes Problem des kommerziell erworbenen SNOM war. Ursache hierfür ist, dass das durch die kleine Sondenspitze austretende Licht nur einen sehr kleinen Teil der Objektträgeroberfläche beleuchtet und daher keine Übersichtsdarstellung möglich ist. Eine geringe Dichte der Chromosomen auf dem Objektträger erschwerte das schnelle Auffinden. Deshalb wurden für die FISH auch nur Objektträger ausgewählt, die eine hohe Dichte an Metaphasen aufwiesen.

Dennoch blieb das Auffinden erschwert, so dass von unserer Arbeitsgruppe Modifikationen vorgenommen wurden. Das SNOM wurde mit einem Phasenkontrastobjektiv und der entsprechenden Kondensoroptik ausgerüstet, wobei die bauartbedingten Gegebenheiten des SNOM berücksichtigt werden mussten.

Mit dem Phasenkontrastobjektiv konnten die Probe und die Spitze konventionell abgebildet und die Positionierung der SNOM-Spitze optisch kontrolliert werden. Durch Verschieben des Probenstückes gelang es, die Probe unter der SNOM-Spitze zu positionieren. Danach wurde die SNOM-Spitze ins Nahfeld eingebracht und die Probe gescannt. Da der maximale Scanbereich des SNOM $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ beträgt, erforderte das Abbilden einer kompletten Mitose je nach Spreitung 5-9 Scans. Daher wurden zunächst orientierende topographische Scans mit einer niedrigeren Auflösung von 100×100 Pixel durchgeführt, wodurch die Scandauer auf ein Fünftel reduziert werden konnte. Dennoch wurden zum Scannen der kompletten Mitose noch ca. 45-80min benötigt. Um das Ausbleichen der Fluoreszenzsignale zu minimieren, wurde der Anregungslaser während dieser Zeit ausgeschaltet.

Die initial eingesetzte Zentromersonde gegen Chromosom 1 sollte das Auffinden erleichtern, da Chromosom 1 in der Topographie sicher als das größte Chromosom identifiziert werden konnte. Erst nach der Identifizierung wurde der Anregungslaser zur Detektion des Fluoreszenzsignals eingeschaltet und das Chromosom mit einer höheren Pixelauflösung von 500×500 gescannt, was ca. 42min dauerte.

Da das Auffinden der Zentromersonde gegen Chromosom 1 schwierig war und zum Teil bis zu 2h erforderte, wurde auf einen Sondenmix gegen alle Zentromere gewechselt. Durch die höhere Anzahl vorhandener Zentromersignale konnte das Suchen nach Chromosom 1 umgangen werden. Nach Einstellen der Mitose konnte direkt mit einer Auflösung von 500×500 Pixel gescannt und direkt detektiert werden. Es resultierte ein schnelleres Auffinden der Fluoreszenzsignale, wodurch ein mögliches Ausbleichen reduziert wurde.

Bei der Auswertung der FISH-Experimente mit der c-myc-Sonde und den mittels PCR hergestellten Sonden konnte analog zu den Versuchen mit dem Sondenmix gegen alle Zentromere vorgegangen werden, da die Signale auf den Double minutes erwartet wurden, welche zahlreich in der Mitose vorhanden waren.

Eine hohe Signalstabilität und das schnelle Auffinden der interessierenden Region sind für die Qualität der Darstellung und damit auch für die sichere Beurteilung ein wesentlicher Faktor. Eine bessere praktische Handhabung und ein schnelleres Auffinden der zu untersuchenden Strukturen wird mit inversen Mikroskopen erreicht, bei denen ein konventionelles optisches Mikroskop in das SNOM integriert ist. Nachteile sind die hohen Kosten (Fa. Veeco, Preis ca. 220.000-250.000 Euro).

Da die Auflösung des SNOM durch das Arbeiten im Nahfeld umso höher ist, je kleiner die Lichtquelle und deren Abstand zur Probenoberfläche ist, kommen den verwendeten Spitzen, die die Größe der Lichtquelle definieren, und der Abstandsregelung eine große Bedeutung zu. Für die hohe Qualität einer Spitze sind ein hoher Lichtdurchsatz, eine definierte kreisförmige Öffnung am Spitzenende, kein seitliches Austreten von Licht durch den Metallfilm sowie eine hohe Festigkeit maßgebend. In der vorliegenden Arbeit wurden daher nur Spitzen benutzt, die durch adiabatisches Ziehen (BETZIG et al., 1991; VALASKOVIC et al., 1995) kommerzieller „single-mode“ Glasfasern (F-SA, Newport, Irvine, USA) hergestellt und anschließend in einer UHV-Kammer mit Aluminium bedampft wurden. Beim Bedampfen musste darauf geachtet werden, eine möglichst homogene Aluminiumschicht aufzutragen, um ein seitliches Austreten von Licht zu verhindern. Außerdem sollte die Schicht nicht über das Spitzenende hinausragen, da sich das Zentrum der Apertur sonst um einige nm verschiebt, was zu Fehlern in der optischen und topographischen Darstellung und letztlich zu Fehlinterpretationen der SNOM-Daten führen kann. Die gefertigten Spitzen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) überprüft. So konnten Spitzen hergestellt werden, deren Öffnungen bei ca. 50nm lagen.

Außer dem adiabatischen Ziehen gibt es eine Reihe anderer Methoden zur Herstellung guter SNOM-Spitzen. Bei einer dieser Methoden wird eine Ätztechnik eingesetzt (HOFFMANN et al., 1995). Die auf diese Weise gefertigten Spitzen besitzen einen höheren Lichtdurchsatz als die gezogenen Spitzen, da ihr Öffnungswinkel größer ist (ZEISEL et al., 1996; YATSUIA et al., 1998). Jedoch gestaltet sich die Herstellung schwierig und ist mit einem hohen Anteil an Ausschuss verbunden. Eine Abwandlung dieser Ätztechnik stellt das „tube etching“ dar, bei dem der Polymermantel der Glasfaser vor dem Ätzen nicht entfernt wird (STÖCKLE et al., 1999). Dadurch ist die Spitze während des Ätzvorgangs vor Erschütterungen und Temperaturschwankungen geschützt. Sehr gute Spitzen mit großem Kegelwinkel und glatter Oberfläche sind das Ergebnis. Die glatte Oberfläche erleichtert das Auftragen einer homogenen Aluminiumschicht.

Eine weitere Möglichkeit SNOM-Spitzen herzustellen, bietet die Mikrofrästechnik, die einen fokussierten Ionenstrahl nutzt (VEERMAN et al., 1998). Auch kann man winzige Glassplitter als tetraedische SNOM-Spitzen verwenden (KOGLIN et al., 1996).

Die Vielfalt der verschiedenen Verfahren zur Herstellung von SNOM-Spitzen verdeutlicht, dass im Streben um eine höhere Auflösung der Entwicklung noch besserer SNOM-Spitzen in Zukunft eine wichtige Rolle zukommt.

Bei der Abstandsregelung der SNOM-Spitze mussten im Laufe der Versuche Veränderungen vorgenommen werden, da die Detektion mittels einer Laserdiode starkes Streulicht erzeugte. Daher wurde auf eine Abstandsregelung auf Basis eines Schwingquarzes gewechselt (Abb. 6, S.42). Hiermit konnte ein Abstand von $<10\text{nm}$ zur Probenoberfläche erreicht werden.

Auch bei der Detektionseinheit mussten Modifizierungen durchgeführt werden, weil der detektierbare Flux einen limitierenden Faktor für die minimale Spitzenöffnung und damit die Auflösung darstellt. Da das von den FISH-Präparaten transmittierte Licht nur eine sehr geringe Intensität besaß, kam eine „single-photon-counting“-taugliche Avalanche-Photodiode zum Einsatz. Mit ihr wurde eine so hohe Detektorempfindlichkeit erreicht, dass das transmittierte Licht nachgewiesen werden konnte. Zur Wandlung der von der Photodiode abgegebenen TTL-Impulse in eine von der Steuerungselektronik aufzuzeichnende Eingangsspannung wurde eine Zählerelektronik gebaut und in das System integriert.

Ferner waren einige sicherheitsrelevante Umbaumaßnahmen nötig, da die sensiblen Photodioden durch den Einfall intensiven Laserlichts hätten zerstört werden können. Durch einen Schalter am Schieber der Detektionseinheit wurde beim Öffnen des Schiebers der Stromkreis zur Beleuchtungseinheit unterbrochen, so dass danach kein Licht mehr einfallen konnte. Zusätzlich wurde die Umgebung des gesamten Strahlengangs mit schwarzem Samt ausgekleidet, um den Einfall von Streulicht zu vermeiden. Außerdem wurde ein kontinuierlich variierbarer Graufilter verwendet, der die Intensität des zur Justage der Photodioden benötigten Diodenlasers so anpasste, dass die Justage von unterschiedlich stark emittierenden SNOM-Spitzen möglich war. Überschritt hierbei die Zählrate den Wert von 4 Megacounts pro Sekunde, welche kurzzeitig noch unkritisch ist, wurde dies durch eine Warnleuchte signalisiert.

Um die Integration der SNOM-Komponenten zu ermöglichen, musste die selbst entwickelte Kammer (Abb. 7, S.43) geringfügig modifiziert werden. Hierbei wurde auf eine einfach zu handhabende Dekontaminationsmöglichkeit geachtet, da speziell im Hinblick auf die Extraktion chromosomaler DNA eine möglichst DNA- und DNase-freie Umgebung von Bedeutung ist.

5.2 Ergebnisse

Mit dem modifizierten SNOM sollte überprüft werden, ob DNA-Sonden, die in FISH-Experimenten eingesetzt werden, topographisch und optisch dargestellt werden können und ob beide Abbildungsmodi korrelieren. Ausgehend von der Zentromersonde gegen Chromosom 1, die mit einer großen Zielsequenz hybridisiert, sollten die Zielsequenzen schrittweise reduziert und somit die untere Nachweisgrenze bestimmt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse reproduzierbar sind und ob die mittels SNOM gemachten Abbildungen mit denen aus der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie übereinstimmen oder das SNOM zusätzliche Informationen liefert. Abschließend sollte geklärt werden, ob das SNOM auch zur Manipulation oder Extraktion von DNA geeignet ist.

5.2.1 Abbilden

Der Nachweis der Zentromersonde gegen Chromosom 1 zeigte, dass das modifizierte SNOM DNA-Sonden abbilden und somit für die Beurteilung von FISH-Experimenten eingesetzt werden kann. Eine genaue Größenangabe der Zielsequenz ist nicht möglich, da die Sonde mit α -Satelliten-DNA hybridisiert. Diese besitzt einen Polymorphismus und liegt im Locus D1Z5 in einer Größenordnung von 440kb-1,51Mb vor (WEVRICK, WILLARD, 1989).

Durch die Auflösung im Nanometerbereich kamen im Zentromerbereich zwei Signale (s. Abb. 18, S.59) zur Darstellung. Denkbar wäre, dass es sich hierbei um jeweils ein Signal auf den beiden Schwesterchromatiden handelt, was mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie nicht auflösbar ist. Durch die verdrehte Lage des in Abb. 18 dargestellten Chromosoms kommt es zum räumlichen Versatz der beiden Schwesterchromatiden. Die Signale scheinen hintereinander zu liegen.

Denkbar wäre auch, dass durch die Anlagerung nicht verdauter Proteine an α -Satelliten-DNA, wie z.B. CENP-A, CENP-B (EARNSHAW, ROTHFIELD, 1985) bzw. α -Protein (STRAUSS, VARSHAVSKY, 1984) ein „homogenes Binden“ der Sonde verhindert wird. Dass hierbei stets exakt zwei Signale entstehen, ist hingegen eher unwahrscheinlich. Dagegen spricht auch, dass in den von OHTANI et al. (2002) durchgeführten Untersuchungen an Gerstechromosomen im Telomerbereich ebenfalls zwei Signale im Abstand von 100-200nm zu erkennen sind, wohingegen mit konventionellen Lichtmikroskopen nur ein Signal zu beobachten war. Zum

gleichen Ergebnis gelangte OBERRINGER et al. (2003) an Telomeren humaner Chromosomen. Auch hier konnten Signale nachgewiesen werden, die mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie nicht mehr sichtbar waren.

Außerdem konnten in unseren Versuchen auch kleine Farbstoffmoleküle bzw. unspezifische Fluoreszenzsignale dargestellt werden (s. Abb. 18b, d, S.59), welche auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nicht zu sehen waren. Dies belegt das große Potential des SNOM, kleinste Mengen an Fluoreszenzfarbstoff zu detektieren.

Den hohen Grad der topographischen Auflösung dokumentieren neben den zwei Peaks im Zentromerbereich die zwischen den Chromatiden sichtbare Erhöhung (s. Abb. 19, S.60) sowie die in Abb. 20 (S.61) aus dem Nucleus herausragenden bzw. ihm aufgelagerten Strukturen. Die Erhöhungen zwischen den Chromatiden könnten angelagerten Proteinen entsprechen. Bei den aus dem Nucleus herausragenden bzw. ihm aufgelagerten Strukturen könnte es sich beispielsweise um m-RNA, die im Moment der Aufnahme aus den Kernporen ausgeschleust wird, oder um verbliebene Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums bzw. des Zytoskeletts handeln. Denkbar wäre auch, dass es Nucleoli sind, wobei es in der Literatur diesbezüglich bislang keine Anhaltspunkte gibt.

Nach dem Nachweis der Zentromersonde gegen Chromosom 1 konnte auch mit dem Sondenmix gegen alle Zentromere gezeigt werden, dass das modifizierte SNOM zum Abbilden von DNA-Sonden, die mit großen Zielsequenzen hybridisieren, geeignet ist. Eine exakte Größenangabe der Zielsequenzen ist auch hier nicht möglich, da der Sondenmix ebenfalls mit α -Satelliten-DNA hybridisiert, welche in den einzelnen Zentromerregionen in einer Größenordnung von mehreren hundert kb bis ca. 5Mb vorkommt (WAYE et al., 1987; WEVRICK, WILLARD, 1989; LEE et al., 1997).

Auf den meisten Chromosomen waren im Zentromerbereich Fluoreszenzsignale zu erkennen, wobei wesentliche Unterschiede in der Intensität der einzelnen Signale bestanden. Ursächlich hierfür könnte die Organisation von α -Satelliten-DNA sein. α -Satelliten-DNA besteht aus Monomeren, die eine Konsensussequenz von ca. 171bp besitzen (WILLARD, WAYE, 1987). Diese Monomere können ungeordnet vorliegen oder in übergeordneten Einheiten organisiert sein (WILLARD, 1991; WARBURTON, WILLARD, 1996; ALEXANDROV et al., 2001). Die übergeordneten Einheiten bestehen aus multiplen tandemförmig angeordneten Kopien von Grundeinheiten, die sich aus 2-35 Monomeren zusammensetzen (ROSENBERG et

al., 1978; WU, MANUELIDIS, 1980). Während die einzelnen Monomere eine Sequenzdivergenz bis zu 35% aufweisen (CHOO, 1997), zeigen benachbarte Grundeinheiten eine Übereinstimmung von 97-100% (RUDD, WILLARD, 2004). Da der Sondenmix an den verschiedenen Zentromeren entsprechend dem Vorkommen der Zielsequenz unterschiedlich oft bindet, könnten somit Unterschiede in der Intensität der verschiedenen Zentromersignale zustande kommen. Die geringe Intensität einiger Signale könnte der Grund dafür sein, dass mit dem Fluoreszenzmikroskop nicht alle Zentromersonden nachweisbar waren. Aufgrund der Möglichkeit der Einzel-Photon-Detektion (BETZIG, CHICHESTER, 1993; XIE, DUNN, 1994) hätten mit dem SNOM theoretisch mehr Signale als mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar sein müssen. Praktisch konnte dies jedoch nicht überprüft werden, da die FISH-Präparate für die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie eingedeckt werden mussten. Dadurch wurden die FISH-Präparate für nachfolgende Untersuchungen mittels SNOM unbrauchbar, so dass nie dasselbe Präparat verglichen werden konnte.

Dass auch mit dem SNOM nicht auf allen Zentromeren Signale darstellbar waren, ist möglicherweise einerseits darauf zurückzuführen, dass im Rahmen der FISH nicht alle Zentromere markiert wurden, zumal von Seiten des Herstellers eine eingeschränkte Sondenqualität eingeräumt wurde. Andererseits könnten durch eine extreme Reduktion von α -Satelliten-DNA (s. 5.1.3.2, S.72) oder einen geringen Anteil zum Sondenmix komplementärer Sequenzen sehr schwache Fluoreszenzsignale resultieren. Nicht auszuschließen ist, dass diese bis zum Auffinden der jeweiligen Zentromerregion schon verblasst waren, so dass der Nachweis mittels SNOM misslang.

Im Unterschied zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen waren auf einigen Chromosomen die Fluoreszenzsignale in mehrere kleine Teile aufgetrennt (s. Abb. 21, S.63), was die hohe Auflösung des SNOM demonstriert. Durch die Auflösung im Nanometerbereich ist es vorstellbar, dass diese Substrukturen den Bindungsstellen des Sondenmix an komplementäre Sequenzen entsprechen, welche durch nicht komplementäre α -Satelliten-DNA unterbrochen werden. Außerdem könnten die Unterbrechungen auch durch Alu-Elemente entstehen, die in die α -Satelliten-DNA eingestreut sind (LEE, 1997). Alu-Elemente sind kurze, verstreut liegende, repetitive Elemente mit einer Durchschnittslänge von ca. 280bp und zählen zu den SINEs (short interspersed nuclear elements). Ferner könnten auch hier nicht

verdaute Proteine wie CENP-A, CENP-B bzw. α -Protein, die eine Bindungsaffinität zu α -Satelliten-DNA besitzen, ein „homogenes Binden“ der Sonden verhindert haben. Da die Zentromer- und Perizentromerregion beim Human Genome Project (COLLINS et al., 1998) ausgespart wurden, ist der exakte Aufbau dieser Regionen noch nicht bekannt. Worum es sich bei den Substrukturen handelt, muss daher zurzeit offen bleiben.

Die Auswertung der FISH-Experimente mit der c-myc-Sonde belegt, dass das modifizierte SNOM DNA-Sonden, die mit mittelgroßen Zielsequenzen von 80kb hybridisieren, nachweisen kann. Die SNOM-Abbildungen zeigten Signale auf mehreren Chromosomen sowie auf den Double minutes und entsprachen damit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Im Gegensatz zu den SNOM-Darstellungen der Zentromersonde gegen Chromosom 1 und dem Sondenmix gegen alle Zentromere lieferten die SNOM-Aufnahmen der c-myc-Sonde keine zusätzlichen Informationen.

Um herauszufinden, bis zu welcher kleinsten Größe Zielsequenzen nachgewiesen werden können, wurden mittels PCR Sonden hergestellt, die eine Länge von 1031, 718, 485 und 243bp besaßen. Spezifische Signale ließen sich jedoch nicht nachweisen, obwohl die Zielsequenzen auf c-myc und damit amplifiziert auf den Double minutes vorliegen. Theoretisch hätten durch die Möglichkeit der Einzel-Photon-Detektion des SNOM Signale nachweisbar sein müssen. Bei sehr kleinen Sonden mit wenig intensiven Fluoreszenzen ist die Darstellung jedoch erschwert, da die Fluoreszenzsignale nur noch sehr schlecht bzw. gar nicht mehr vom Hintergrundrauschen unterschieden werden können. Dieses kann zwar durch Herunterkühlen der APD reduziert, jedoch nicht vermieden werden.

Ferner spielt die Problematik des Auffindens und des Ausbleichens gerade bei schwachen Fluoreszenzsignalen eine limitierende Rolle, weshalb eine hohe Signalstabilität von großer Bedeutung ist.

Neben diesen möglichen Gründen kann aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung (s. 4.1.4, S.53) am ehesten davon ausgegangen werden, dass die für die sehr kurzen Sonden gewählten FISH-Bedingungen nicht optimal waren. Sollte die Frage nach der unteren Nachweisgrenze des SNOM erneut aufgegriffen werden, müsste zunächst eine Optimierung der FISH-Bedingungen im Vordergrund stehen.

5.2.2 Manipulation/Extraktion chromosomaler DNA

Da bezüglich der Manipulation/Extraktion von DNA mittels SNOM bis zum Beginn dieser Arbeit keine Erfahrungen existierten, wurde auf Erkenntnisse aus der Rasterkraftmikroskopie zurückgegriffen. Somit konnten Manipulationsmuster festgelegt werden, die in einer Vertikal- bzw. einer Horizontalbewegung der Spitze zur Probe resultierten. Die nach einer Vertikalbewegung durch Eintauchen der Spitze in das Chromosom zu beobachtende Indentation (s. Abb. 24, S.67) zeigt, dass DNA mit der Spitze verdrängt und folglich angehäuft wurde; gleiches gilt für den Versuch mit der Horizontalbewegung (s. Abb. 25, S.68). Geht man davon aus, dass die angehäuften DNA den gleichen Kondensationsgrad hat wie zuvor, so bedeutet dies, dass letztendlich eine gewisse Menge an DNA an der Spitze haften bleibt.

In diesem Zusammenhang wurde ein Spitzendesign entwickelt, das ein Anhaften der DNA unterstützen sollte. Durch Ziehen von Glaskapillaren und anschließendem Ätzen in Flusssäure entstanden Hohlsonden, die einen Öffnungsdurchmesser im Bereich von 500nm bis 1µm besaßen. Um sie als SNOM-Spitzen verwenden zu können, wurde Aluminium aufgedampft. Dadurch konnte zwar einerseits eine Einengung des Öffnungsdurchmessers bis auf ca. 200nm erzielt werden, andererseits kam es zu einer Verrundung der Kanten, wodurch ein Ausstanzen von DNA erschwert wird. Eine solche Spitze zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme in Abb. 26. Der definitive Nachweis, dass chromosomale DNA extrahiert wurde, kann nach derzeitigem Wissensstand nur mit Hilfe eines kompletten Reverse-FISH-Experiments geführt werden, dessen Etablierung für speziell diese Anwendung bisher noch nicht gelungen ist. Möglicherweise war die entnommene DNA-Menge nicht ausreichend für eine DOP-PCR oder das Ausstanzen aufgrund der abgerundeten Kanten nicht erfolgreich.

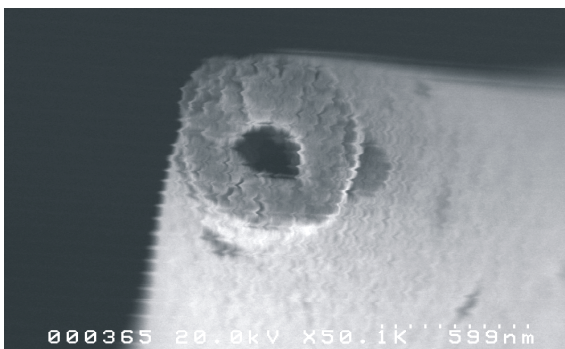


Abb. 26: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer stanzenartig gezogenen SNOM-Spitze mit einem inneren Durchmesser von ca. 200nm. Die Öffnung wird von der aufgetragenen Aluminiumschicht umgeben.

5.3 Wertung und Ausblick

Zu Beginn der Arbeit zeigte sich, dass das kommerziell erworbene SNOM nicht zum Abbilden chromosomaler DNA geeignet war und Modifizierungen vorgenommen werden mussten. Letztlich gelang es, das SNOM so umzurüsten, dass damit auch chromosomale DNA und FISH-Sonden dargestellt und untersucht werden konnten. Als nachteilig hat sich im Laufe der Arbeit die Handhabung des SNOM erwiesen, die z.T. unpraktikabel und sehr zeitaufwendig ist. So stellt das Auffinden der zu untersuchenden Strukturen ein Problem dar. Weitere Verbesserungen bei der exakten Positionierung der SNOM-Spitze sowie die Kombination mit in der Humangenetik verwendeten Erkennungsprogrammen könnten zukünftig das Auffinden der Signale und damit die Auswertung der FISH-Experimente erleichtern.

Mit dem Nachweis der Zentromersonde gegen Chromosom 1 und dem Nachweis mehrerer Zentromersonden des Sondenmix gegen alle Zentromere konnte gezeigt werden, dass sich das SNOM zum Abbilden von DNA-Sonden eignet, die mit Zielsequenzen von mehreren hundert kb bis ca. 5Mb hybridisieren. Dass hierbei keine exakten Größenangaben gemacht werden können, liegt an der Wahl der Sonden, die mit α -Satelliten-DNA hybridisieren. Die Zentromersonde gegen Chromosom 1 wurde gewählt, da zunächst die Auswertung von FISH-Experimenten mittels SNOM etabliert werden sollte. Einerseits werden Zentromersonden häufig in FISH-Experimenten eingesetzt, andererseits sollte die große Zielsequenz der Zentromersonde gegen Chromosom 1 sowie die Lokalisation auf dem größten Chromosom das Auffinden mittels SNOM erleichtern. Da sich jedoch herausstellte, dass das Auffinden dennoch erschwert war, wurde auf den Sondenmix gegen alle Zentromere gewechselt, welcher ebenfalls mit großen Zielsequenzen hybridisiert. Durch die höhere Anzahl an Zentromersignalen wurde das Auffinden der Signale erleichtert.

Dadurch gelang es, die Auswertung von FISH-Experimenten sowohl im optischen als auch im topographischen Modus zu etablieren, was die Grundvoraussetzung für die nachfolgenden Experimente darstellte. Die Korrelation beider Modi konnte in allen Versuchen belegt werden. Anhand von Versuchswiederholungen, die die gleichen Ergebnisse lieferten, konnte nachgewiesen werden, dass mit dem SNOM ein reproduzierbares Arbeiten gewährleistet ist.

Als nachteilig erwies sich, dass durch das Eindecken der Präparate eine vergleichende Auswertung am selben Präparat mittels Fluoreszenzmikroskopie und

SNOM unmöglich wurde. Ein Vergleich wäre insbesondere bei der Auswertung der FISH-Experimente mit dem Sondenmix gegen alle Zentromere interessant gewesen, um zu überprüfen, ob mit dem SNOM mehr Signale als mit dem Fluoreszenzmikroskop zur Darstellung kommen. Letztlich konnte dieses methodische Problem nicht umgangen werden.

Durch den Nachweis der c-myc-Sonde konnte gezeigt werden, dass mit dem SNOM auch mittelgroße Zielsequenzen von 80kb im optischen und topographischen Modus dargestellt werden können und dass beide Modi korrelieren.

Dagegen konnte die Frage, bis zu welcher kleinsten Größe Zielsequenzen mit dem SNOM nachweisbar sind, nicht beantwortet werden. Da sich in der Literatur diesbezüglich auch keine Untersuchungen anderer Gruppen finden, muss die Frage nach der Detektionsgrenze derzeit offen bleiben. Sollte zukünftig der Nachweis kleiner Zielsequenzen gelingen, könnte die Menge an Fluoreszenzmarker und die Anzahl der notwendigen Amplifikationen reduziert werden. Somit könnte einerseits eine präzisere Darstellung - was beim physikalischen Kartieren mittels FISH wünschenswert wäre - erreicht und andererseits Zeit bei der FISH eingespart werden.

Die Korrelation der SNOM-Abbildungen mit den Abbildungen der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie konnte in allen Versuchen mit der Zentromersonde gegen Chromosom 1, dem Sondenmix gegen alle Zentromere, der c-myc-Sonde und den mittels PCR hergestellten Sonden belegt werden. Dass hierbei im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie eine höhere Auflösung erreicht wurde, zeigen die zwei Signale im Zentromerbereich von Chromosom 1 und die in mehrere kleine Teile aufgetrennten Zentromersignale des Sondenmix.

Ferner konnten immer zusätzlich topographische Abbildungen erstellt werden, welche ergänzende und teilweise neue Informationen lieferten. Dies stellt einen weiteren deutlichen Vorteil des SNOM dar. Die Qualität der topographischen Aufnahmen des SNOM ist dank der sehr guten Kontrolle des Proben-Spitzen-Abstands (KARRAI, GROBER, 1995) vergleichbar mit der der Rasterkraftmikroskopie. Durch die Gegenüberstellung optischer und topographischer Bilder ist es mit dem SNOM möglich, auf demselben Chromosom verschieden gefärbte DNA-Sonden im Nanometerbereich darzustellen und sicher zu identifizieren. Bisher bestand diese Möglichkeit nicht, da sowohl bei der Elektronenmikroskopie als auch bei der Kraftmikroskopie die optischen Informationen fehlen.

KIMURA et al. (2002) konnten an menschlichen Metaphasechromosomen den Austausch von Schwesterchromatiden, die unterschiedlich angefärbt waren, nachweisen. Die hierbei erzielte Auflösung war größer als die des Fluoreszenzmikroskops. Die Superposition von optischen und topographischen Aufnahmen lieferte genauere Aufschlüsse der Chromosomenstruktur, insbesondere bezüglich des ausgetauschten Materials. Durch die präzisere Darstellung der Topographie können so letztlich bessere Rückschlüsse hinsichtlich der Funktion gewonnen werden. YOSHINO et al. wiesen die höhere Auflösung des SNOM und die Übereinstimmung der optischen und topographischen Aufnahmen 2002 an mit YOYO-1 gefärbten Gerstechromosomen nach. Außerdem zeigten sie die Anwendung für die Auswertung des R-Chromosomenbandings an mit YOYO-1 und Methylgrün gefärbten Gerstechromosomen.

Beim Versuch chromosomale DNA mittels SNOM zu manipulieren, konnten zwar erfolgreich Manipulationsmuster erstellt werden, die die Manipulation chromosomaler DNA im Nanometerbereich ermöglichten, jedoch zeigte die rasterelektronische Überprüfung der SNOM-Spitzen, dass es durch die Manipulation zu Schäden an den SNOM-Spitzen kam. Dadurch wurden die Spitzen einerseits zum Abbilden unbrauchbar, andererseits wurde der rasterelektronenmikroskopische Nachweis verbliebener DNA unmöglich. Die Entwicklung von Hohlsonden ist ein erster Schritt auf der Suche nach einem geeigneten Spitzendesign. Dass im Rahmen der Manipulation tatsächlich DNA extrahiert wurde, konnte jedoch selbst unter Verwendung von Hohlsonden bislang nicht bewiesen werden und bleibt eine Herausforderung. Zukünftig könnte der Einsatz von Hohlsonden aus Quarz, die die Form eines scharfkantigen Pyramidenstumpfes besitzen, das Ausstanzen chromosomaler DNA verbessern. Ferner könnte ein automatisierter Sondenwechsel das wiederholte Ansteuern einer Chromosomenstelle ermöglichen und damit das Extraktionsverfahren erleichtern.

Somit steht die Möglichkeit, mit dem SNOM DNA im Nanometerbereich gezielt zu manipulieren bzw. zu extrahieren, zwar noch am Anfang, bietet jedoch neue Perspektiven. Die Erstellung bandenspezifischer Bibliotheken, das Anlegen von Genkarten sowie cytogenetische Analysen für die Diagnostik erfordern eine Isolierung der DNA. Dies geschieht z.B. mit Hilfe der Mikrodissektion, bei der eine Glasspitze oder ein Laser verwendet werden. Ein fundamentales Problem bei der Mikrodissektion stellt die präzise Bestimmung des Ortes des zu extrahierenden

Materials dar. Normalerweise werden mit konventionellen Methoden der Mikrodisektion komplette Chromosomenbanden piezo-gesteuert extrahiert. Durch eine bessere Auflösung könnte einerseits Material präziser entnommen und andererseits die Menge des extrahierten Materials reduziert werden, was eine Verfeinerung der Analyse bedeuten würde.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil des SNOM ist, dass man im Gegensatz zu anderen hochauflösenden Mikroskopiertechniken nichtinvasiv und damit zerstörungsfrei arbeiten kann. Dadurch, dass die Spitze nicht in Kontakt mit der Probenoberfläche gelangt und eine Vorbehandlung, wie z.B. ein Fixieren oder Anfärben der zu untersuchenden Materialien, nicht erforderlich ist, kommt es zu keiner Veränderung der ursprünglichen Probe. Auch ein Umgebungsvakuum wird nicht benötigt, so dass eine Betrachtung der Objekte in Luft wie auch in Flüssigkeiten möglich wird und die Untersuchung biologischer Strukturen in vivo erfolgen kann. MURAMATSU et al. (1996) untersuchten Aktin- und Keratinfilamente sowohl in Wasser als auch in Luft. HÖPPENER et al. (2003) gelang es, eine Kernhülle in Flüssigkeit darzustellen. Sie erreichten eine Auflösung von ca. 70nm, ohne die Struktur zu beschädigen. Ferner konnten einzelne Poren in der Kernhülle mit einem minimalen Abstand von 120nm abgebildet werden. In Studien an *Pseudomonas aeruginosa* konnten CEFALI et al. (2002) durch den Einsatz des SNOM eine Struktur- und Morphologieänderung der Bakterien unter Stressbedingungen nachweisen.

Dank seiner hohen Auflösung und der Möglichkeit der topographischen Darstellung findet das SNOM mittlerweile neben den ursprünglichen Einsatzgebieten wie der Halbleitertechnologie sowie der Magnetooptik auch in vielen Bereichen der Grundlagenforschung, der Biologie, der Molekularbiologie, der Physiologie, der Pharmakologie und der Medizin eine Anwendung, was die folgenden Beispiele belegen.

KIRSCH et al. (1999) beobachteten den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen einem einzelnen Donor- und Akzeptor-Molekül. Der FRET wird in der Zellbiologie und der Molekularbiologie zum Nachweis von Protein-Protein-, Protein-Nukleinsäure- und Nukleinsäure-Nukleinsäure-Wechselwirkungen sowie für die Abstandsbestimmung von Molekülen benutzt, deren Abstand weniger als 10nm beträgt. Hierbei sind der Donor und der Akzeptor mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Kommt es zu einer Energieübertragung, so kann dies optisch sichtbar gemacht werden. Außerdem können dynamische Veränderungen durch

Morphologieänderungen, welche mit Veränderungen der Topographie einhergehen, nachgewiesen werden.

Im medizinischen Bereich kam das SNOM bei der Erforschung der altersbedingten Maculadegeneration zum Einsatz (KROGMEIER et al., 2001). Studien mit konfokalen Mikroskopen hatten gezeigt, dass eine hohe Emissionsrate in den Lipofuszingranula mit dem Vorhandensein des Fluorophores AE2 einherging, was bei der altersbedingten Maculadegeneration eine wichtige Rolle zu spielen schien. Die Interpretation der Ergebnisse war aber aufgrund der wenigen Informationen über die Struktur der Granula schwierig. Mit Hilfe des SNOM konnten topographische Informationen gewonnen werden, die jedoch nicht mit den optischen korrelierten. Der Vergleich der Aufnahmen ergab, dass AE2 wohl doch nicht die Hauptkomponente des Lipofuszins darstellt.

Eine weitere Anwendung fand das SNOM in der onkologischen Grundlagenforschung. NAGY et al. (1999) führten Untersuchungen der erbB2 Rezeptor Tyrosin Kinase durch, die oft bei Brustkrebs und anderen Malignomen verstärkt exprimiert ist. PERNER et al. (2002) analysierten mit Hilfe des SNOM Zelloberflächenveränderungen einer mit Estrogen behandelten Brustkrebszelllinie. Darüber hinaus kann die hohe Auflösung des SNOM in der onkologischen Therapie genutzt werden, wenn es z.B. um die Beurteilung von Fluoreszenzmarkern geht, die in der photodynamischen Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden. TEITEN et al. (2002) setzten das SNOM ein, um die Lokalisation des Fluoreszenzmarkers Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) und den von ihm induzierten Zelltodmechanismus in menschlichen Brustkrebszellen nachzuweisen.

In der onkologischen Therapie wird die Gentherapie zukünftig eine große Rolle spielen, wobei der FISH bei der Erforschung genetischer Erkrankungen weiterhin eine große Bedeutung zukommt. Über die Identifizierung einzelner Gene hinausgehend, eröffnet sich mit der Kenntnis der DNA-Sequenz ein neues Forschungsfeld, nämlich die Untersuchung der von diesen Sequenzen kodierten Proteine. Die Identifizierung einzelner fluoreszenzmarkierter Proteine zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen ist auf molekularer Ebene mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie jedoch wegen ihrer geringeren Auflösung nur bedingt möglich. GAO et al. (2001) gelang es mit Hilfe des SNOM, FITC- und Alpha RED-markiertes Streptavidin (60kDa) darzustellen. Hierdurch wird es möglich,

mittels verschieden markierter Proteine Interaktionen zwischen den Proteinen zu untersuchen.

Ein weiteres Einsatzgebiet ergibt sich durch die Kombination der SNOM-Technik mit dem „reverse chromosome painting“ (CARTER et al., 1992), welches bei der Erforschung genetisch verursachter Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Eine Modifikation des „reverse chromosome painting“ stellt die „comparative genomic hybridization“ (CGH) dar, bei der DNA von Tumorzellen als Sonde benutzt wird (KALLIONIEMI et al., 1992). Durch die simultane Erfassung unterschiedlicher genetischer Veränderungen ist die CGH als Screening-Methode für die Untersuchung genomischer Imbalancen in Tumorzellen geeignet.

Die Kombination des SNOM mit der Massenspektrometrie schafft bei der chemischen Analyse kleinster Proben neue Möglichkeiten. Die Analyse der molekularen Zusammensetzung mit einer Auflösung von unter $1\mu\text{m}$ gestaltet sich schwierig, da sowohl die Rastertunnel- als auch die Rasterkraftmikroskopie kaum chemische Informationen liefern. Mit Ionen- oder Elektronenstrahlen können zwar Proben im Nanometerbereich gewonnen werden, jedoch erfordern diese Verfahren im Gegensatz zum SNOM eine spezielle Präparation der Proben und Ultrahochvakuumbedingungen. Ein weiterer Nachteil ist, dass außerdem chemische Bindungen gebrochen werden. Mit dem SNOM hingegen gelingt es, durch Laserablation (KRAUSCH, MLYNEK, 1996) Proben im Nanometerbereich zu gewinnen, die dann mit dem hochempfindlichen Verfahren der Massenspektrometrie chemisch analysiert werden können. Für viele Wissenschaften, wie z.B. die supramolekulare Chemie, die Mikroelektronik, die Materialkunde, die Biologie und die Medizin ist die chemische Zusammensetzung von Nanopartikeln von großem Interesse und ihre Kenntnis spielt bei der Erforschung von Prozessabläufen eine wichtige Rolle. Die Entschlüsselung von Prozessabläufen ist in der Medizin für das Verstehen von Krankheitsentwicklung und somit auch für die Entwicklung geeigneter Therapieansätze von grundlegender Bedeutung.

Im Streben um eine weitere Verbesserung der Auflösung wird das SNOM mit Abwandlungen der Standard-FISH kombiniert. Eine dieser Abwandlungen stellt die „low temperature-FISH“ (LTFISH) dar, deren Einsatz bei morphologischen Studien einen Fortschritt (WINKLER et al., 2003) verspricht. Durch genauere Kenntnis der Morphologie könnten evtl. auch neue Erkenntnisse hinsichtlich der Funktion gewonnen werden. Die in 2.1 beschriebene „Fiber-FISH-Methode“ erzielt ebenfalls

eine größere Auflösung als die Standard-FISH. Die „nano-FISH“ benutzt solche DNA-Fiber, um mit Hilfe des SNOM den Abstand unterschiedlich angefärbter Gene zu einem Marker zu messen (YOSHINO et al., 2003). Auf diese Weise kann die Lokalisation des Gens bestimmt werden. Diese scheint neben der DNA-Sequenz eine entscheidende Rolle bei der Genexpression zu spielen. Außerdem kann mit dem SNOM die Länge der Gene gemessen werden.

Die bestehenden breiten Anwendungsmöglichkeiten des SNOM scheinen noch nicht ausgeschöpft. Durch den interdisziplinären Austausch von Erkenntnissen aus der Biologie, Chemie, Physiologie, Pharmazie und Medizin werden sich auch zukünftig noch weitere Einsatzfelder erschließen.

Für die medizinische und biologische Forschung stellt das SNOM ein vielversprechendes Werkzeug dar. Da sich das SNOM nicht nur zum Abbilden im Nanometerbereich eignet, sondern darüber hinaus auch die Manipulation von DNA in diesem Maßstab erlaubt, kann es zum Bindeglied zwischen der molekularen Zytogenetik und der Molekularbiologie werden. Dabei sind die Grenzen der Nahfeldmikroskopie noch nicht erreicht, insbesondere da die Weiterentwicklungen der SNOM-Technik noch nicht abgeschlossen sind. Die Integration inverser Mikroskope sowie Verbesserungen beim Spitzendesign und der Abstandsregelung versprechen eine einfachere Handhabung und eine noch größere Auflösung. Somit könnte die Manipulation/Extraktion chromosomaler DNA erleichtert werden, wodurch sich neue Perspektiven eröffnen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFM	atomic force microscopy, Rasterkraftmikroskopie
APD	avalanche photon diode
bp	Basenpaare
BACs	bacterial artificial chromosomes
CCD Kamera	charge coupled device Kamera
CENP A	centromere protein A
CENP B	centromere protein B
CGH	comparative genomic hybridization
D/A Converter	Digital/Analog Converter
DABCO	1,4 Diazobicyclo(2,2,2,)octan
DAPI	4,6 Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DM	Double minutes
DNA	desoxyribonucleic acid
DOP-PCR	degenerate oligonucleotide primer-polymerase chain reaction
DS DNA	Doppelstrang DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
f_R	Resonanzfrequenz
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FWHM	full-width-half-maximum, Halbwertsbreite des Intensitätspeaks
H ₂ O _{dd}	Wasser, doppelt destilliert

HSRs	homogeneously staining regions, homogen gefärbte Chromosomenregionen
ISH	in situ-Hybridisierung
K	Federkonstante
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
LT-FISH	low temperature-FISH
Mb	Megabasen
Mg ²⁺	Magnesiumionen
NA	Numerische Apertur
NEA	non essential amino acids, nicht essentielle Aminosäuren
PACs	P1 derived artificial chromosomes
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PMT Detektor	Photo Multiplier Detektor
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
SINEs	short interspersed nuclear elements
SNOM	scanning near-field optical microscopy, scanning near-field optical microscope, optische Rasternahfeldmikroskopie, optisches Rasternahfeldmikroskop
SPM	scanning probe microscopy, Rastersondenmikroskopie
STM	scanning tunneling microscopy, Rastertunnelmikroskopie
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris Acetat EDTA-Puffer
TN-Puffer	Tris NaCl-Puffer
UHV-Kammer	Ultrahochvakuum-Kammer
UV-Licht	ultraviolettes Licht
YACs	yeast artificial chromosomes

7. Literaturverzeichnis

1. Alexandrov I, Kazakov A, Tumeneva I, Shepelev V, Yurov Y (2001) Alpha-satellite DNA of primates: old and new families. *Chromosoma* 110:253-266
2. Alitalo K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE, Bishop JM (1983) Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1707-1711
3. Ben-Ami N, Radko A, Ben-Ami U, Lieberman K, Rothman Z, Rabin I, Lewis A (1998) Near-field optical microscopy of unstained bacteria: comparison with normal atomic force and far-field optical microscopy in air and aqueous media. *Ultramicroscopy* 71:321-325
4. Bensimon A, Simon A, Chiffaudel A, Croquette V, Heslot F, Bensimon D (1994) Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* 265:2096-2098
5. Bettio D, Rizzi N, Giardino D, Grugni G, Briscioli V, Selicorni A, Carnevale F, Larizza L (1995) FISH analysis in Prader-Willi and Angelmann syndrome patients. *Am J Med Genet* 56:224-228
6. Betzig E, Chichester RJ (1993) Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science* 262:1422-1425
7. Betzig E, Chichester RJ, Lanni F, Taylor DL (1993) Near-field fluorescence imaging of cytoskeletal actin. *Bioimaging* 1:129-135
8. Betzig E, Finn PL, Weiner JS (1992) Combined shear force and near-field scanning optical microscopy. *Appl Phys Lett* 60:2484-2486
9. Betzig E, Trautman JK, Harris TD, Weiner JS, Kostelak RL (1991) Breaking the diffraction barrier: Optical microscopy on a nanometric scale. *Science* 251:1468-1470
10. Bigner SH, Mark J, Bigner DD (1990) Cytogenetics of human brain tumor. *Cancer Genet Cytogen*: 47:141-154
11. Block AMW (1999) Cancer cytogenetics. In: Gersen S, Keagle M (eds) *The principles of clinical cytogenetics*. Humana press Inc, Totowa, NJ, pp 345-420

12. Bossuyt PJ, van Tienen M-N, de Gruyter L, Smets V, Dumon J, Wauters JG (1995) Incidence of low-fluorescence α -satellite region of chromosome 21 escaping detection of aneuploidy at interphase by FISH. *Cytogenet Cell Genet* 68:203-206
13. Bray-Ward P, Menninger J, Lieman J, Desai T, Mokady N, Banks A, Ward DC (1996) Integration of the cytogenetic, genetic and physical maps of the human genome by FISH mapping of CEPH YAC clones. *Genomics* 32:1-14
14. Burke DT, Carle GF, Olson MV (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236:806-812
15. Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT, Telenius H, Pelmeur AH, Leversha MA, Glancy MT, Wood SL, Cook K, Dyson HM (1992) Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 29:299-307
16. Cefali E, Pantanè S, Arena A, Saitta G, Guglielmino S, Cappello S, Nicolò M, Allegrini M (2002) Morphologic variations in bacteria under stress conditions: near-field optical studies. *Scanning* 24:274-283
17. Choo KHA (1997) *The centromere*. Oxford University Press Inc, New York
18. Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L (1998) New goals for the U.S. Human genome project: 1998-2003. *Science* 282:682-689
19. Collins J, Hohn B (1978) Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage lambda heads. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4242-4246
20. Collins S, Groudine M (1982) Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature* 298:679-681
21. Dalla-Favera R, Wong-Staal F, Gallo RC (1982) onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemia cells of the same patient. *Nature* 299:61-63
22. Earnshaw WC, Rothfield N (1985) Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91:313-321

23. Enderle T, Ha T, Ogletree DF, Chemla DS, Magowan C, Weiss S (1997) Membrane specific mapping and colocalization of malarial and host skeletal proteins in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte by dual-color near-field scanning optical microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:520-525
24. Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63:378-383
25. Gao H, Oberringer M, Englisch A, Hanselmann RG, Hartmann U (2001) The scanning near-field optical microscope as a tool for proteomics. *Ultramicroscopy* 86:145-150
26. Gingrich JC, Shadravan F, Lowry SR (1993) A fluorescence in situ hybridization map of human chromosome 21 consisting of 30 genetic and physical markers on the chromosome: localization of 137 additional YAC and cosmid clones with respect to this map. *Genomics* 17:98-105
27. Golovleva I, Hultdin J, Roos G, Wahlin A, Holmgren G (2002) Co-existence of pseudo-Chediak-Higashi anomaly and double minutes containing c-myc oncogene in three patients with AML M2. *Leukemia* 16:152-154
28. Greig GM, England SB, Bedford HM, Willard HF (1989) Chromosome-specific alpha satellite DNA from the centromere of human chromosome 16. *Am J Hum Genet* 45:862-872
29. Haaf T, Ward DC (1994) Structural analysis of α -satellite DNA and centromere proteins using extended chromatin and chromosomes. *Hum Mol Genet* 3:697-709
30. Heinzelmann H, Pohl DW (1994) Scanning near-field optical microscopy. *Appl Phys A* 59:89-101
31. Heiskanen M, Karhu R, Hellsten E, Peltonen L, Kallioniemi OP, Palotie A (1994) High resolution mapping using Fluorescence in situ hybridization to extended DNA fibers prepared from agarose-embedded cells. *BioTechniques* 17:928-933
32. Heiskanen M, Peltonen L, Palotie A (1996) Visual mapping by high resolution FISH. *Trends Genet* 12:379-382
33. Hoffmann P, Dutoit B, Salathé RP (1995) Comparison of mechanically drawn and protection layer chemically etched optical fiber tips. *Ultramicroscopy* 61:165-170
34. Höppener C, Molenda D, Fuchs H, Naber A (2003) Scanning near-field optical microscopy of a cell membrane in liquid. *J Microsc* 210:288-293

35. Horiuchi Y, Yagi K, Hosokawa T, Yamamoto N, Muramatsu H, Fujihira M (1999) Imaging of various surface properties of fluorescently labelled phospholipid Langmuir-Blodgett films with a combined scanning probe microscope. *J Microsc* 194:467-471
36. Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ (1994) A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet* 6:84-89
37. Jenei A, Kirsch AK, Subramaniam V, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM (1999) Picosecond multiphoton scanning near-field optical microscopy. *Biophys J* 76:1092-1100
38. John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587
39. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821
40. Karrai K, Grober RD (1995) Piezoelectric tip-sample distance control for near-field optical microscopes. *Appl Phys Lett* 66:1842-1844
41. Keller TH, Rayment T, Klenerman D (1998) Optical chemical imaging of tobacco mosaic virus in solution at 60-nm resolution. *Biophys J* 74:2076-2079
42. Kim UJ, Birren BW, Slepak T, Mancino V, Boysen C, Kang HL, Simon MI, Shizuya H (1996) Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 34:213-218
43. Kimura E, Hitomi J, Ushiki T (2002) Scanning near-field optical/atomic force microscopy of bromodeoxyuridine-incorporated human chromosomes. *Arch Histol Cytol* 65:435-444
44. Kirsch AK, Subramaniam V, Jenei A, Jovin TM (1999) Fluorescence resonance energy transfer detected by scanning near-field optical microscopy. *J Microsc* 194:448-454
45. Kirsch AK, Subramaniam V, Striker G, Schnetter C, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM (1998) Continuous wave two-photon scanning near-field optical microscopy. *Biophys J* 75:1513-1521
46. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56:341-61

47. Koglin J, Fischer UC, Fuchs H (1996) Scanning near-field optical microscopy with a tetrahedral tip at a resolution of 6nm. *J Biomed Opt* 1:75-78
48. Krausch G, Mlynek J (1996) Surface modification in the optical near-field. *Microelectron Eng* 32:219-228
49. Krogmeier JR, Clancy CMR, Pawlak A, Rozanowska M, Sarna T, Simon JD, Dunn RC (2001) Mapping the distribution of emissive molecules in human ocular lipofuscin granules with near-field scanning optical microscopy. *J Microsc* 202:386-390
50. Laan M, Kallioniemi OP, Hellsten E, Alitalo K, Peltonen L, Palotie A (1995) Mechanically stretched chromosomes as targets for high-resolution FISH mapping. *Genome Res* 5:13-20
51. Langer PR, Waldrop AA, Ward DC (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6633-6637
52. Lawrence JB, Singer RH, McNeil JA (1990) Interphase and metaphase resolution of different distances within the human dystrophin gene. *Science* 249:928-932
53. Ledbetter DH (1992) Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet* 51:451-456
54. Lee C, Wevrick R, Fisher RB, Ferguson-Smith MA, Lin CC (1997) Human centromeric DNA's. *Hum Genet* 100:291-304
55. Liehr T, Pfeiffer RA, Trautmann U, Gebhard E (1998) Centromeric alphoid DNA heteromorphisms of chromosome 22 revealed by FISH-technique. *Clin Genet* 53:231-232
56. Lo AWI, Liao GCC, Rocchi M, Choo KHA (1999) Extreme reduction of chromosome-specific α -satellite array is unusually common in human chromosome 21. *Genome Res* 9:895-908
57. Mahtani MM, Willard HF (1990) Pulsed-field gel analysis of α -satellite DNA at the human X chromosome centromere: high-frequency polymorphisms and array size estimate. *Genomics* 7:607-613
58. Manning JE, Hershey ND, Broker TR, Pellegrini M, Mitchell HK, Davidson N (1975) A new method of in situ hybridization. *Chromosoma* 53:107-117

59. Manuelidis L (1978) Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNA's. *Chromosoma* 66:23-32
60. Mizunoe T, Young SR (1992) Low fluorescence alpha satellite region yields negative result. *Prenatal Diag* 12:549-550
61. Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 4:36-43
62. Muramatsu H, Chiba N, Nakajima K, Ataka T, Fujihira M, Hitomi J, Ushiki T (1996) Fluorescence imaging and spectroscopy of biomaterials in air and liquid by scanning near-field optical/atomic force microscopy. *Scanning Microsc* 10:975-982
63. Nagy P, Jenei A, Kirsch AK, Szöllösi J, Damjanovich S, Jovin TM (1999) Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *J Cell Sci* 112:1733-1741
64. Oberringer M, Englisch A, Heinz B, Gao H, Martin T, Hartmann U (2003) Atomic force microscopy and scanning near-field optical microscopy studies on the characterization of human metaphase chromosomes. *Eur Biophys J* 32:620-627
65. Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC (1997) Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* 16:235-242
66. Ohtani T, Shichiri M, Fukushi D, Sugiyama S, Yoshino T, Kobori T, Hagiwara S, Ushiki T (2002) Imaging of chromosomes at nano-meter scale resolution using scanning near-field optical/atomic force microscopy. *Arch Histol Cytol* 65:425-434
67. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Miller KB, Cuiffo BP, Sandberg AA (1987) Acute myelomonocytic leukemia with double minute chromosomes and normal karyotype. *Cancer Genet Cytogen* 25:1-6
68. Pai GS, Thomas GH, Mahoney W, Migeon BR (1980) Complex chromosome rearrangements. Report of a new case and literature review. *Clin Genet* 18:436-444
69. Perner P, Rapp A, Dressler C, Wollweber L, Beuthan J, Greulich KO, Hausmann M (2002) Variations in cell surfaces of estrogen treated breast cancer cells detected by a combined instrument for far-field and near-field microscopy. *Anal Cell Pathol* 24:89-100

70. Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934-2938
71. Pohl DW, Denk W, Lanz M (1984) Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$. *Appl Phys Lett* 44:651-653
72. Pohl DW, Novotny L, Hecht B, Heinzelmann H (1996) Radiation coupling and image formation in scanning near-field optical microscopy. *Thin Solid Films* 273:161-167
73. Rosenberg H, Singer M, Rosenberg M (1978) Highly reiterated sequences of SIMIANSIMIANSIMIANSIMIANSIMIAN. *Science* 200:394-402
74. Rudd MK, Willard HF (2004) Analysis of the centromeric regions of the human genome assembly. *Trends Genet* 20:529-533
75. Scambler PJ, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Shprintzen R, Wilson DI, Goodship JA, Cross IE, Burn J (1992) Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet* 339:1138-1139
76. Scherthan H, Köhler M, Vogt P, van Malsch K, Schweizer D (1992) Chromosomal in situ hybridization with double-labeled DNA: signal amplification at the probe level. *Cytogenet Cell Genet* 60:4-7
77. Schmickel RD (1986) Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. *J Pediatr* 109:231-241
78. Schnittger S, Rao VV, Deutsch U, Gruss P, Balling R, Hansmann I (1992) Pax1, a member of the paired box-containing class of developmental control genes, is mapped to human chromosome 20p11.2 by in situ hybridization (ISH and FISH). *Genomics* 14:740-744
79. Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307-324
80. Seibel EJ, Pollack GH (1997) Imaging `intact` myofibrils with a near-field scanning optical microscope. *J Microsc* 186:221-231
81. Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8794-8797

82. Stankiewicz P, Kostyk E, Bocian E, Stanczak H, Parczewska J, Piatkowska E, Mazurczak T, Pietrzyk JJ (1997) Familial four breakpoint complex chromosomal rearrangement as a cause of monosomy 9p22-pter and trisomy 10p11.2-pter and 11q21 analysed by dual and triple colour FISH. *J Med Genet* 34:696-699
83. Stöckle R, Fokas C, Deckert V, Zenobi R, Sick B, Hecht B, Wild UP (1999) High quality near-field optical probes by tube etching. *Appl Phys Lett* 75:160-162
84. Strauss F, Varshavsky A (1984) A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell* 37:889-901
85. Subramaniam V, Kirsch AK, Jovin TM (1998) Cell biological applications of scanning near-field optical microscopy (SNOM). *Cell Mol Biol* 44:689-700
86. Teiten MH, Even P, Burgos P, Frochot C, Aubert S, Carré M-C, Bolotine L, Merlin J-L, Guillemin F, Viriot M-L (2002) Specific fluorescent tracers. Imaging and applications for photodynamic therapy. *C R Biol* 325:487-493
87. Toledo-Crow R, Yang PC, Chen YY, Vaez-Iravani M (1992) Near-field differential scanning optical microscope with atomic force regulation. *Appl Phys Lett* 60:2957-2959
88. 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* 5:710-717
89. Trask BJ (1991) Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet* 7:149-154
90. Trask BJ, Massa H, Kenwick S, Gitschier J (1991) Mapping of human chromosome Xq28 by two-color fluorescence in situ hybridization of DNA sequences to interphase cell nuclei. *Am J Hum Genet* 48:1-15
91. Valaskovic GA, Holton M, Morrison GH (1995) Parameter control, characterization, and optimization in the fabrication of optical fiber near-field probes. *Appl Optics* 34:1215-1228
92. van den Engh G, Sachs R, Trask BJ (1992) Estimating genomic distance from DNA sequence location in cell nuclei by random walk model. *Science* 257:1410-1412
93. van Hulst NF, Moers MHP (1996) Biological applications of near-field optical microscopy. *IEEE Eng Med Biol* 15:51-58

94. Veerman JA, Otter AM, Kuipers L, van Hulst NF (1998) High definition aperture probes for near-field optical microscopy fabricated by focused ion beam milling. *Appl Phys Lett* 72:3115-3118
95. Warburton PE, Willard HF (1996) Evolution of centromeric alpha satellite DNA: molecular organization within and between human and primate chromosomes. In: Jackson M, Strachan T, Dover G (eds) *Human Genome Evolution*. BIOS Scientific Publishers pp121-145
96. Waye JS, Durfy SJ, Pinkel D, Kenwrick S, Patterson M, Davies KE, Willard HF (1987) Chromosome-specific alpha satellite DNA from human chromosome 1: hierarchical structure and genomic organization of a polymorphic domain spanning several hundred kilobase pairs of centromeric DNA. *Genomics* 1:43-51
97. Weier HU, Gray JW (1992) A degenerate alpha satellite probe, detecting a centromeric deletion on chromosome 21 in an apparently normal human male, shows limitations of the use of satellite DNA probes for interphase ploidy analysis. *Anal Cell Pathol* 4:81-86
98. Wevrick R, Willard HF (1989) Long-range organization of tandem arrays of α -satellite DNA at the centromeres of human chromosomes. High-frequency array-length polymorphism and meiotic stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9394-9398
99. Willard HF (1991) Evolution of alpha satellite. *Curr Opin Genet Dev* 1:509-514
100. Willard HF, Waye JS (1987) Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet* 3:192-198
101. Winkler R, Perner B, Rapp A, Durm M, Cremer C, Greulich K-O, Hausmann M (2003) Labelling quality and chromosome morphology after low temperature FISH analysed by scanning far-field and near-field optical microscopy. *J Microsc* 209:23-33
102. Wu JC, Manuelidis L (1980) Sequence definition and organization of a human repeated DNA. *J Mol Biol* 142:363-386
103. Xie XS, Dunn RC (1994) Probing single molecule dynamics. *Science* 265:361-364
104. Yatsuia T, Kouroggi M, Ohtsu M (1998) Increasing throughput of a near-field optical fiber probe over 1000 times by the use of a triple-tapered structure. *Appl Phys Lett* 73:2090-2092

105. Yoshimoto M, Toledo SRC, Caran EMM, Seixas MT, Martino Lee ML, Campos Vieira Abib S, Vianna SMR, Schettini ST, Andrade JAD (1999) MYCN Gene Amplification. *Am J Pathol* 155:1439-1443
106. Yoshino T, Sugiyama S, Hagiwara S, Fukushi D, Shichiri M, Nakao H, Kim J-M, Hirose T, Muramatsu H, Ohtani T (2003) Nano-scale imaging of chromosomes and DNA by scanning near-field optical/atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 97:81-87
107. Yoshino T, Sugiyama S, Hagiwara S, Ushiki T, Ohtani T (2002) Simultaneous collection of topographic and fluorescent images of barley chromosomes by scanning near-field optical/atomic force microscopy. *J Electron Microsc* 51:199-203
108. Yurov YB, Mitkevich SP, Alexandrov IA (1987) Application of cloned satellite sequences to molecular-cytogenetic analysis of constitutive heterochromatin heteromorphisms in man. *Hum Genet* 76:157-164
109. Zeisel D, Nettesheim S, Dutoit B, Zenobi R (1996) Pulsed laser-induced desorption and optical imaging on a nanometer scale with scanning near-field microscopy using chemically etched fiber tips. *Appl Phys Lett* 68:2491-2492

8. Dank

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Eckart Meese, Leiter des Instituts für Humangenetik, dass er mir die Anfertigung dieser Dissertation ermöglichte, außerdem für die Durchsicht der Arbeit sowie Tipps zur Verbesserung
- Herrn Dr. Rainer Hanselmann, unter dessen Betreuung diese Arbeit konzipiert und durchgeführt wurde
- Frau PD Dr. Yasmin Mehraein und Herrn Dr. Martin Oberringer für ihre ausdauernde Hilfe, Anregungen und Korrekturen. Sie waren stets Ansprechpartner bei aufgetretenen Problemen - dafür besonderen Dank.
- Herrn Dr. Hans-Peter Sattler für die Betreuung der Polymerase-Ketten-Reaktion
- Herrn Dr. Haibin Gao und Herrn Andreas Englisch für die Kooperation und die Einführung in die Rasternahfeldmikroskopie
- Fr. Martina Jennewein für die Unterstützung bei der Laborarbeit
- Caro, Uli und meinem Bruder Jens für die Hilfe bei aufgetretenen Computerproblemen
- Isa für das beharrliche Korrekturlesen, die Verbesserungsvorschläge sowie die jederzeitige Unterstützung und ihr Verständnis
- Meinen Eltern Marlene und Jürgen Niedereichholz, die mir das Studium und damit diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben. Außerdem herzlichen Dank für das Korrekturlesen.
- Letztlich möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit in irgendeiner Weise unterstützt haben.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Niedereichholz
Vorname:	Markus
Geburtsdatum:	16.02.73
Geburtsort:	Illingen
Familienstand:	ledig
Konfession:	römisch-katholisch
Eltern:	Jürgen und Marlene Niedereichholz
Geschwister:	Jens Niedereichholz

Bildungsgang

1979-1983	Grundschule Uchtelfangen
1983-1992	Abitur am Illtalgymnasium Illingen
1992-1993	Zivildienst beim Paritätischen Wohlfahrtsverband
1993	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
1996-1997	Université Louis Pasteur in Straßburg
1999-2000	Université Pierre et Marie Curie in Paris
2000	3. Staatsexamen an der Universität des Saarlandes
02.2001-08.2001	AiP in der Praxisklinik Rennbahn für Orthopädie und Sportmedizin (MuttENZ-Basel, Schweiz)
11.2001-10.2002	AiP im DRK Krankenhaus Saarlouis, Abteilung für Innere Medizin
11.2002-01.2003	Assistenzarzt im DRK Krankenhaus Saarlouis, Abteilung für Innere Medizin
02.2003-10.2005	Assistenzarzt im Ev. Krankenhaus Saarbrücken, Abteilung für Innere Medizin und Intensivmedizin
Seit 12.2005	Assistenzarzt in internistischer Gemeinschaftspraxis (Dr. Schwamborn/Hoch, Saarbrücken)